



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Análisis taxonómico de las especies del género  
*Cryptonemia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) en la costa  
central del Perú, mediante análisis morfológico y  
código de barras de ADN**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en  
Botánica

**AUTOR**

Paola Rosa ROMERO OROZCO

**ASESOR**

Mónica ARAKAKI MAKISHI

Natalia ARAKAKI MAKISHI

Lima, Perú

2018

## DEDICATORIA

A mis padres, Leonardo y Rita, por su amor, por creer en mi, por sus sabios consejos, por apoyar mis sueños y metas.

A mis hermanos, Leonardo E. y Rebeca, por sus ánimos y apoyo incondicional en todo momento.

A mis abuelos, quienes me inculcaron este amor hacia la naturaleza.

A mis amigos que tuve la suerte de conocer en la universidad, por su apoyo y cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesoras Dra. Mónica Arakaki y Dra. Natalia Arakaki, por sus valiosas observaciones y comentarios en la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Dra. María Eliana Ramírez por sus comentarios sobre este trabajo y su invaluable ayuda en la visita realizada al Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de Chile (MNHN).

Al Proyecto 129-2015-FONDECYT “Diversidad de macroalgas de la costa central del Perú usando código de barras de ADN, en la perspectiva de sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas”, el cual brindó el financiamiento para la colecta y procesamiento de muestras.

Al Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos (IMARPE) y los miembros que lo conforman, por las facilidades otorgadas para realización de esta tesis.

A los miembros del jurado conformados por Dr. Miguel Machahua, Blgo. Max Hidalgo y Blga. Olga Riofrio Vargas por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo de tesis.

## INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN .....	1
2	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Taxonomía y descripción del género <i>Cryptonemia</i> J. Agardh.....	4
2.2	Estudios moleculares en <i>Cryptonemia</i> y géneros relacionados (Halymeniaceae).....	13
2.3	Código de barras de ADN (o barcoding) .....	15
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo general .....	17
3.2	Objetivos específicos .....	17
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
4.1	Área de estudio .....	18
4.2	Colecta y procesamiento de las muestras.....	18
4.3	Análisis molecular .....	22
4.3.1	Aislamiento de ADN .....	22
4.3.2	Amplificación de ADN .....	23
4.3.3	Secuenciación y edición de secuencias .....	24
4.3.4	Alineamiento de secuencias.....	24
4.3.5	Código de Barras de ADN.....	24
4.3.6	Análisis filogenético.....	25
4.4	Caracterización morfológica.....	26
5	RESULTADOS.....	27
5.1	Circunscripción de especímenes foliosos al género <i>Cryptonemia</i> J. Agardh .....	27
5.2	Morfotipos (morfoespecies) de <i>Cryptonemia</i> .....	28
5.3	Análisis molecular de los morfotipos .....	33
5.3.1	Análisis de distancias genéticas.....	33
5.3.2	Análisis filogenético.....	38

5.4	Caracterización morfológica-anatómica .....	41
5.4.1	<i>Cryptonemia anconensis</i> Acleto & Zúñiga .....	41
5.4.2	<i>Cryptonemia limensis</i> (Kützing) Lewis .....	44
5.4.3	<i>Cryptonemia obovata</i> J.Agardh .....	46
5.4.4	<i>Cryptonemia</i> sp.1 .....	48
5.4.5	<i>Cryptonemia</i> sp. 2.....	49
6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	52
7	CONCLUSIONES .....	59
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
9	ANEXOS .....	72
9.1	Anexo 1. Primers usados en la amplificación y secuenciación de <i>rbcl</i> en especímenes de <i>Cryptonemia</i> .....	72
9.2	Anexo 2. Especies de la familia Halymeniaceae incluidas en el análisis filogenético, números de acceso a GenBank, país y lugar de colecta.....	73
9.3	Anexo 3. Sitios de colecta en la costa central del Perú .....	76
9.4	Anexo 4. Esquemas (Acleto 1973, Acleto y Zúñiga 2011) y cortes histológicos transversales (realizados en este estudio) mostrando estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de <i>Cryptonemia</i> .....	77
9.5	Anexo 5. <i>Cryptonemia angustata</i> (Setchell & N.L.Gardner) E.Y.Dawson .....	79
9.6	Anexo 6. Lista de especies utilizadas en el análisis de distancias genéticas.....	80
9.7	Anexo 7. Distancia genética entre especies de la familia Halymeniaceae utilizadas en el análisis filogenético del gen <i>rbcl</i> .....	83

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Recuento cronológico de especies del género <i>Cryptonemia</i> reportadas en el Perú.....	8
<b>Tabla N° 2.</b> Principales características de las especies de <i>Cryptonemia</i> reportadas en el litoral peruano.....	9
<b>Tabla N°3.</b> Datos de colecta de los ejemplares de <i>Cryptonemia</i> incluidas en este estudio. ....	20
<b>Tabla N° 4.</b> Distancias genéticas (%) interespecífica e intraespecífica (diagonal) entre los grupos genéticos obtenidos, mediante el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros. ....	36
<b>Tabla N° 5.</b> Comparación de secuencias <i>rbcL</i> entre los grupos genéticos obtenidos, mediante el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros.....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Área de estudio .....	19
<b>Figura 2.</b> Electroforesis en gel de agarosa, amplificados del marcador <i>rbcL</i> de <i>Cryptonemia</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> <i>Cryptonemia anconensis</i> .....	29
<b>Figura 4.</b> <i>Cryptonemia limensis</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> <i>Cryptonemia obovata</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> <i>Cryptonemia</i> sp. 1 .....	32
<b>Figura 7.</b> <i>Cryptonemia</i> sp. 2 .....	32
<b>Figura 8.</b> Árbol filogenético basado en secuencias <i>rbcL</i> inferido con el método <i>Neighbor-Joining</i> .....	35
<b>Figura 9.</b> Árbol filogenético <i>Majority-rule consensus</i> , basado en secuencias <i>rbcL</i> , inferido con el método de máxima parsimonia.....	39
<b>Figura 10.</b> Árboles filogenéticos basados en secuencias <i>rbcL</i> de especies de la familia Halymeniaceae y de especies del género <i>Cryptonemia</i> .....	40
<b>Figura 11.</b> Hábito de <i>Cryptonemia anconensis</i> .....	42
<b>Figura 12.</b> Estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de <i>Cryptonemia anconensis</i> .....	43
<b>Figura 13.</b> Hábito y estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de <i>Cryptonemia limensis</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Hábito y estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de <i>Cryptonemia obovata</i> .....	47
<b>Figura 15.</b> Hábito y estructuras vegetativas de <i>Cryptonemia</i> sp. 1. ....	49
<b>Figura 16.</b> Hábito y estructuras vegetativas y femeninas de <i>Cryptonemia</i> sp. 2. ....	51

## RESUMEN

Dentro de la familia Halymeniaceae, el género *Cryptonemia* forma parte del grupo de “algas rojas foliosas”, es decir aquellas que se caracterizan por presentar la forma plana, simple y foliosa del talo, lo cual sumado a otros factores como plasticidad fenotípica, ausencia de muestras de individuos fértiles, estacionalidad y presencia en la zona submareal, dificultan su identificación taxonómica. En los últimos años, gracias al uso combinado del análisis morfológico y molecular, ha sido posible la descripción de nuevas especies y cambios nomenclaturales para la familia, lo que ha permitido aclarar el estatus taxonómico de sus especies. En Perú han sido reportadas ocho especies de *Cryptonemia*, *C. anconensis*, *C. angustata*, *C. chinchensis*, *C. latissima*, *C. limensis*, *C. lobata*, *C. heteronema* y *C. obovata*. El presente trabajo revisa morfológicamente y molecularmente, mediante el código de barras de ADN, las especies de *Cryptonemia* presentes en la costa central de Perú. Una colecta exhaustiva de ejemplares de *Cryptonemia*, entre los 9°S - 78°O y los 15°S - 75°O, proporcionó material para el análisis morfológico, donde se aplicaron técnicas de tinción con anilina y de medición con el software ImageJ. Para el análisis molecular se generaron secuencias del gen cloroplastidial *rbcL*, con las cuales se realizó construcciones filogenéticas con tres métodos: el método de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). Los análisis morfológicos y moleculares reconocieron solo tres especies de las seis reportadas para la costa central, *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, más dos especies no reconocidas, *Cryptonemia* sp.1 y *Cryptonemia* sp. 2. Futuras revisiones requieren incluir una mayor cantidad de ejemplares para las morfoespecies caracterizadas, en especial *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2, así como la aplicación de otros marcadores moleculares, mitocondriales y nucleares, los cuales han sido de ayuda para distinguir especies y resolver las relaciones filogenéticas en otros géneros de la familia Halymeniaceae.

**Palabras claves:** Halymeniaceae, *rbcL*, alga roja foliosa.



## ABSTRACT

Within the family Halymeniaceae, the genus *Cryptonemia* is part of the group of "foliose red algae", that are characterized by presenting the flat, simple and foliose form of the thallus, which added to other factors such as phenotypic plasticity, absence of samples of fertile individuals, strongly seasonal and often found subtidally make their taxonomic identification difficult. In recent years, thanks to the combined use of morphological and molecular analysis, it has been possible to describe new species for the family, as well as several nomenclatural changes that have made it possible to clarify the taxonomic status of their species. In Peru, eight species of *Cryptonemia*, *C. anconensis*, *C. angustata*, *C. chinchensis*, *C. latissima*, *C. limensis*, *C. lobata*, *C. heteronema* and *C. obovata* have been reported. The present work reviews morphologically and molecularly, through the DNA barcode, the *Cryptonemia* species present in the central coast of Peru. An exhaustive collection of *Cryptonemia* specimens, between 9 °S - 78 °W and 15 °S - 75 °W, provided material for morphological analysis, where techniques of aniline staining and measurement with ImageJ software were applied. For the molecular analysis, sequences of the chloroplastial *rbcL* gene were generated, phylogenetic constructions were made using three methods: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) method and bayesian inference (BI). Morphological and molecular analyzes recognized only three of the six species reported for the central coast, *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, plus two unrecognized species, *Cryptonemia* sp.1 and *Cryptonemia* sp. 2. Future revisions require including a greater number of specimens for the morphospecies characterized, especially *Cryptonemia* sp. 1 and *Cryptonemia* sp. 2, as well as the application of other molecular, mitochondrial and nuclear markers, which have helped to distinguish species and resolve phylogenetic relationships in other genera of the family Halymeniaceae.

**Keywords:** Halymeniaceae, *rbcL*, foliose red algae

# 1 INTRODUCCIÓN

Las algas rojas comprenden un diverso grupo de organismos, constituido por un aproximado de 7250 especies, presente en ambientes marinos de todas las latitudes. En general, se caracterizan a nivel celular por la ausencia de flagelos, presentar clorofila *a*, ficobiliproteínas, almidón de florídeas como producto de reserva y tilacoides en los cloroplastos. Pueden presentarse de forma unicelular (microalgas) como pluricelular (macroalgas) y se reproducen por vía asexual o sexual (Graham et al. 2016, Guiry & Guiry 2018, Lee 2018). La identificación taxonómica de macroalgas rojas en el Perú se ha basado principalmente en aspectos morfológicos y anatómicos (Calderón 2017), como patrones de ramificación, estructuras reproductivas, y tamaño, así como otros caracteres. Sin embargo estos aspectos son limitados, debido a que este grupo de algas presenta una gran variabilidad morfológica, además de ciclos de vida complejos, con alternancia de generaciones heteromórficas en algunos de sus representantes. En varios casos, esta problemática se ha visto esclarecida por medio de cultivos y el uso de técnicas moleculares como el código de barras (Saunders 2005, Robba et al. 2006).

Dentro de las algas rojas, la familia Halymeniaceae se encuentra conformada por 330 especies, agrupadas en 43 géneros ampliamente distribuidos (Guiry & Guiry 2018). Los miembros de esta familia presentan un talo erecto folioso a muy ramificado, con o sin estípite. En una sección transversal se observa una estructura multiaxial, con una médula densa o escasa conformada por filamentos, con o sin la presencia de células con material refractivo y una corteza de células ovoides. Los individuos gametofíticos y tetrasporofíticos son isomórficos. Además se caracteriza por ser no procárpico, es decir que en el sistema reproductivo femenino, el carpogonio y la célula auxiliar se localizan en un sistema de ramas accesorias denominado ampolla (Womersley & Lewis 1994). Los tipos de ampolla han ayudado a diferenciar a los géneros dentro de la familia. En el Perú se reportan los géneros: *Cryptonemia*, *Grateloupia*, *Halymenia*, *Mariaramirezia*, *Neorubra*, *Pachymenia*, *Phyllymenia* y *Prionitis* (Ramírez & Santelices 1991, Guiry & Guiry 2018).

Algunas especies de la familia Halymeniaceae están incluidas en el grupo denominado: "algas rojas foliosas", junto con especies de las familias Delesseriaceae, Gigartinaceae, Kallymeniaceae y Schizymeniaceae. Aunque todas ellas externamente presentan un talo laminar y no ramificado, internamente son distintas. Las características externas e internas del espécimen tales como la forma del talo, presencia o ausencia del estípite,

número de capas de células de zona cortical, ausencia o presencia de filamentos hialinos con contenido denso refringente, además de la presencia de estructuras reproductivas, es posible determinar hasta nivel de género, y en algunos casos inclusive hasta especie. La dificultad en la determinación específica en el grupo de las algas rojas foliosas aumenta debido a la ausencia de material fértil en las muestras. Dentro de la familia Halymeniaceae, Chiang (1970) clasificó las ampollas, estructuras reproductivas femeninas, en cinco tipos: tipo *Grateloupia*, tipo *Thamnoclonium*, tipo *Halymenia*, tipo *Aeodes* y tipo *Cryptonemia*, diferenciándolas en la cantidad de filamentos secundarios. A esto se suma su ubicación en la zona submareal y presentar muchas veces una fuerte distribución estacional lo que dificulta su colecta y por otro lado presentar plasticidad fenotípica (Abbott 1967, Gargiulo et al. 2013, D'Archino et al. 2014).

El género *Cryptonemia* se distingue por presentar generalmente un talo folioso, internamente presenta células en la medula con alto contenido refringente y la ampolla densa, cónica conformada por varios filamentos de hasta cuarto orden. Estos caracteres han ayudado a la separación entre especies, sin embargo algunas especies pueden presentar una gran variabilidad en su morfología externa e interna, sobre todo cuando se encuentran en estado vegetativo (Abbott 1967, Chiang 1970, Abbott & Hollenberg 1992, Womersley & Lewis 1994). Además, especies de *Cryptonemia* son recursos promisorios en medicina, por la presencia de compuestos como los galactanos de *Cryptonemia* que han demostrado actividad antiviral contra el virus del herpes (Talarico et al. 2004), del dengue (Talarico et al. 2005), y metapneumovirus humano (Mendes et al. 2014). A lo largo de la costa peruana, este género se encuentra representado con ocho especies reconocidas: *Cryptonemia anconensis* Acleto & Zúñiga, *C. angustata* (Setchell & N. L. Gardner) E. Y. Dawson, *C. chinchensis* (W. R. Taylor) Acleto & Zúñiga, *C. heteronema* (M. Howe) Acleto & Zúñiga, *C. latissima* J. Agardh, *C. limensis* (Kützinger) Lewis, *C. lobata* (Howe) M. E. Ramírez y *C. obovata* J. Agardh (Guiry & Guiry 2018).

Algunas de las especies de *Cryptonemia* reportadas para Perú presentan una distribución muy variada tales como *C. obovata* que se encuentra ampliamente distribuida en las costas del Pacífico y Atlántico, *C. angustata* se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico y *C. limensis* en las costas de Perú, Brasil, Costa Rica y México (Guiry & Guiry 2018). Por otra parte, *C. latissima* se encuentra solo reportada para Nueva Zelanda (localidad tipo) y Perú (Piura) (Acleto 1973) y *C. lobata* en la costa peruana-chilena. Las especies *C. chinchensis*, *C. heteronema* y *C. anconensis* se han reportado solo para la costa peruana (Acleto y Zúñiga 2011).

Acleto (1988) menciona 225 especies de algas marinas para el Perú, de las cuales 160, son rojas. En años recientes, en el Perú, los análisis moleculares, combinados con el diagnóstico morfológico, han permitido esclarecer la taxonomía y distribución de especies en algunas familias de las algas rojas. Por ejemplo, se realizaron nuevas inclusiones para Rhodomelaceae, reportándose como nuevas especies a *Neosiphonia peruviana* y *N. ramirezii* mediante el análisis morfológico y de secuencias del marcador plastidial RuBisCO subunidad grande, *rbcL* (Bustamante et al. 2012, Bustamante et al. 2013). Usando el mismo marcador molecular, Arakaki et al. (2015) reportó la presencia de *Gracilaria chilensis* para la zona sur de Perú, determinando la distribución de *Gracilariopsis lemaneiformis* en el centro y norte de la costa peruana. Mediante el análisis filogenético y morfológico, realizado en las familias Halymeniaceae y Phylloporaceae se propusieron nuevas combinaciones y descripciones en los géneros *Ramirezia* (= *Mariaramirezia*), *Neorubra* y *Phyllymenia* para la primera familia y *Gymnogongrus*, *Phyllophorella*, *Acletoa* y *Asterfilopsis* para la segunda (Calderón et al. 2014a, Calderón et al. 2014b, Calderón & Boo 2016a, 2016b, 2017).

El código de barras de ADN (o Barcoding) es una herramienta molecular utilizada en trabajos recientes que ha permitido discriminar especies crípticas como en el caso de ciertos géneros de la familia Halymeniaceae (Manghisi et al. 2014, De Azevedo et al. 2016a,b, Manghisi et al. 2017), así como resolver problemas taxonómicos en grupos de macroalgas rojas (Yang et al. 2007, Saunders 2008, Clarkston & Saunders 2010). El código de barras está siendo usado para la identificación rápida y efectiva de especies de macroalgas y se ha empleado para construir bases de datos referenciales (Saunders 2005, Saunders & McDevit 2012, Zhao et al. 2012). En el presente trabajo, el uso combinado de la herramienta molecular del código de barras de ADN y una revisión morfológica y anatómica para *Cryptonemia* se presenta como una opción para el diagnóstico de especies de este género en la costa central del Perú.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Taxonomía y descripción del género *Cryptonemia* J. Agardh

El género *Cryptonemia* fue establecido por J. Agardh (1842) e incluyó dos especies, *C. dichotoma* J. Agardh y *C. lactuca* (C. Agardh) J. Agardh, sin designar un tipo. *C. dichotoma* actualmente es sinónimo de *Euhymania dichotoma* (J. Agardh) Kützing (Guiry & Guiry 2018) y *C. lactuca* automáticamente sirvió como tipo nomenclatural de *Cryptonemia*. Sin embargo, la especie *C. lactuca* es considerada sinónimo de *Cryptonemia lomation* (Bertoloni) J. Agardh (antes *Fucus lomation*), combinación realizada por J. Agardh (1851). Por lo que *C. lomation* es la especie tipo del género, siendo la localidad tipo el Golfo di Spezia, Italia. Este género cuenta con 45 especies aceptadas taxonómicamente, usualmente submareales, ampliamente distribuidas principalmente en aguas cálidas templadas a tropicales (Chiang 1970, Guiry & Guiry 2018).

Los miembros de este género se caracterizan por presentar un talo de textura membranácea, de forma plana, lobada, lanceolada u obovada, ocasionalmente laciniada, con margen entero o dentado, que puede estar ramificado. Usualmente tienen un estípite y un disco de fijación reducido. Internamente la zona cortical posee de una a tres hileras de células fotosintéticas, mientras que la zona medular presenta filamentos hialinos entrecruzados, algunos con contenido denso y refringente. El gametofito femenino se caracteriza por presentar las ramas carpogoniales y la célula auxiliar por separado, en ramas accesorias denominadas ampollas. La rama carpogonial posee dos células, que pueden desarrollar filamentos primarios o secundarios. La ampolla de la célula auxiliar es grande con numerosos filamentos secundarios que convergen. El cistocarpo tiene un pericarpo formado por células alargadas de la ampolla, es compacto y presenta un ostiolo no elevado. El espermatangio se encuentra en la capa cortical externa. El tetrasporofito es isomórfico con tetrasporangios pequeños y cruciados (Abbott 1967, Chiang 1970, Womersley & Lewis 1994, Guiry & Guiry 2018).

Dentro del género *Cryptonemia*, se han realizado diversos cambios nomenclaturales basados principalmente en el análisis morfológico y anatómico, los cuales han permitido clarificar el estatus genérico y familiar de las especies así como la descripción de nuevas especies. Abbott (1967) realizó una revisión de las especies de algas foliosas de la costa de Pacífico, y propuso a *C. taylorii* como especie nueva, además de ampliar los rangos de distribución de *C. ovalifolia* (actualmente *Isabbottia ovalifolia*), *C. borealis*, *C.*

*angustata* y *C. obovata*, siendo las dos últimas especies reportadas para Perú por Dawson et al. (1964) y Acleto (1973) respectivamente. Tanaka (1963) describió como especie nueva a *C. semiprocurbens*, la cual se distribuye en el sur de Japón. Posteriormente, Pinheiro y Oliveira (1977) describieron a *C. flabellifolia* para Brasil y Guiry e Irvine (1974) a *C. hibernica* para el Atlántico. Así mismo, Lewis (1994) transfirió *Kallymenia nitophylloides* a *C. nitophylloides*, al revisar material tipo de *K. nitophylloides* y material colectado a 180 km al sur de la localidad tipo.

En el Perú, *Cryptonemia* ha presentado cambios taxonómicos, que incluyen nuevas combinaciones y nuevos registros de especies (Tabla 1). Un total de ocho especies se reportan para estas costas: *C. anconensis*, *C. angustata*, *C. chinchensis*, *C. latissima*, *C. limensis*, *C. lobata*, *C. heteronema* y *C. obovata*, según Guiry y Guiry (2018) (Tabla 2). Inicialmente, Dawson et al. (1964) reportaron para el Perú a *C. angustata*, estudiando un ejemplar femenino colectado en Barranco, Lima. El ejemplar presentaba un talo membranoso, que consistía de un pequeño disco de fijación, uno o varios estípites delgados, con láminas simples oblanceoladas, de margen entero o con proliferaciones en las terminaciones mutiladas, con un ápice redondeado. *Cryptonemia angustata* se distribuye desde el Golfo de California y las Islas Revillagigedo hasta Perú, siendo la localidad tipo Baja California, México (Dawson et al. 1964, Abbott & Hollenberg 1992). Posteriormente, Acleto (1973) añadió cuatro especies, de las cuales describe dos como nuevas, *C. chiangii* y *C. peruviana*, y dos como nuevos reportes, *C. latissima* y *C. obovata*, basándose éstas últimas en ejemplares tetraspóricos.

*Cryptonemia latissima* se encuentra reportada para Sechura, Piura, siendo su localidad tipo Nueva Zelanda. Externamente, presenta un estípite notorio (1 cm), una costa media sobresaliente y ancha que desaparece bruscamente a 2.5 cm de su origen, mientras que *C. obovata* está conformada por una lámina principal aovada y dividida en varios lóbulos o láminas secundarias, las cuales son enteras o llevan proliferaciones marginales, aovadas o lanceoladas, de base ligeramente angosta o notoriamente constricta, de margen entero, ondulado o con escasas proyecciones cortas, espiniformes. *Cryptonemia obovata* fue descrita por Acleto basado en un ejemplar tetraspórico colectado en Bahía San Nicolás, Nazca, Perú (Acleto 1973) y tiene como localidad tipo San Francisco, California, Estados Unidos (Ramírez & Santelices 1991, Guiry & Guiry 2018).

Posteriormente, Lewis (1990), realizó una revisión del material tipo de *Euhymenia limensis* Kützing y de especímenes peruanos identificados como *C. peruviana*, *C.*

*chiangii* y *Sebdenia chinchensis* W. R. Taylor, depositados en el National Herbarium of Victoria (MEL). Este autor observó que las estructuras vegetativas y reproductivas de las especies revisadas tenían características del género *Cryptonemia*, proponiendo la combinación *C. limensis* (Kützinger) Lewis, con registros en Lima y Callao. Esta especie fue nuevamente revisada por Acleto y Zúñiga (2011) confirmando que el único sinónimo de *C. limensis* es *C. peruviana*. *Cryptonemia limensis* se caracteriza por tener 4-5 lóbulos de 4-8 cm en su parte más ancha, de ápice redondeado, y de borde entero y crenulado. Esta especie ha sido reportada en Perú para Lima y Callao, siendo esta última su localidad tipo.

En el mismo trabajo, Acleto y Zúñiga (2011) revisaron ejemplares tipo identificados como *Sebdenia afuerensis*, *S. chinchensis*, *S. heteronema*, *S. lapathifolia*, *S. limensis* y *S. polydactyla*, además de ejemplares herborizados del género *Cryptonemia*, con el objetivo de reevaluar sus identidades. Estos autores determinaron que de seis especies del género *Sebdenia*, cinco correspondían a *Cryptonemia*: *C. anconensis*, *C. chinchensis*, *C. heteronema*, *C. lapathifolia* y *C. limensis*, solo *S. polydactyla* pasó a ser sinónimo de *Sebdenia flabellata* (J. Agardh) Parkinson.

*Cryptonemia anconensis*, identificada previamente como *Sebdenia limensis* (Sonder) Howe y *Chrysomenia lobata* M. Howe, se caracteriza por un talo laminar que consiste de un estípite corto (0.5 cm) con 4-8 lóbulos en conjunto subpalmados, oblongo lanceolados o digitiformes en un plano, de 3–10 cm de largo y 1–4 cm de ancho en la parte basal. Ápice acuminado gradualmente, obtuso, los lóbulos más grandes con lóbulos similares, margen liso entero o dentado, o con proliferaciones marginales espatuladas o dentiformes, con o sin constricción en su base. Esta especie comparte basónimo y localidad tipo (Ancón) con *Cryptonemia lobata*, especie reportada en Antofagasta, Chile y que fue descrita como especie nueva por Santelices et al. (1989). Se diferencia de *C. anconensis* por no presentar estípite y ser de mayor tamaño, alcanzando 50 cm de alto y 30 cm de ancho (Acleto y Zúñiga 2011).

*Cryptonemia chinchensis* fue propuesta por Acleto y Zúñiga (2011) al realizar el análisis del material tipo de *C. chiangii* Acleto (Acleto 1973) y especímenes de *Sebdenia chinchensis* Taylor (Dawson et al. 1964). *Cryptonemia chinchensis* se caracteriza por un rizoide parenquimatoso del cual nace una a varias láminas primarias, espatuladas u oblongo-lanceoladas, provistas de un estípite corto y compreso. La base es cuneada, angosta, con una costa media, notoria y corta como *C. latissima*, y el margen entero, ondulado o crespado, frecuentemente erosionado. Se aproxima morfológicamente a *C.*

*obovata* de la cual se diferencia por su mayor tamaño, textura más rígida, ramificaciones abundantes y láminas amplias de ápice emarginado.

*Cryptonemia heteronema*, combinación propuesta por Acleto y Zúñiga (2011) del tipo *Sebdenia heteronema* Howe y *Sebdenia afuerensis* Taylor (Dawson et al. 1964), se caracteriza por presentar una lámina principal de contorno oblongo que alcanza más de 30 cm de alto y 25 cm de ancho. Esta especie está dividida subpalmadamente una a varias veces, de forma subdicotómica a irregular, las ramas se adelgazan hacia los ápices, las que son redondeadas, con proliferaciones marginales o superficiales pequeñas. Al igual que *C. latissima*, consta de un único ejemplar tetraspórico colectado en Sechura, Piura.



**Tabla N° 1.** Recuento cronológico de especies del género *Cryptonemia* reportadas en el Perú.

Dawson et al. (1964)	Acleto (1973)	Santelices et al. (1989)	Lewis (1990)	Acleto y Zúñiga (2011)	Calderón et al. (2014a)	Guiry y Guiry (2018)
<b><i>C. angustata</i></b>						<b><i>C. angustata</i></b>
<b><i>C. latissima</i></b>						<b><i>C. latissima</i></b>
<b><i>C. obovata</i></b>						<b><i>C. obovata</i></b>
<i>C. chiangii</i>				<b><i>C. chinchensis</i></b>		<b><i>C. chinchensis</i></b>
<i>C. peruviana</i>			<b><i>C. limensis</i></b>	<b><i>C. limensis</i></b>		<b><i>C. limensis</i></b>
				<b><i>C. heteronema</i></b>		<b><i>C. heteronema</i></b>
				<b><i>C. anconensis</i></b>		<b><i>C. anconensis</i></b>
	<b><i>C. lobata</i></b>					<b><i>C. lobata</i></b>
					<i>C. lapathifolia</i>	<i>C. lapathifolia</i>
				<i>C. lapathifolia</i>	(= <i>Mariaramirezia lapathifolia</i> )	

**Tabla N° 2.** Principales características de las especies de *Cryptonemia* reportadas en el litoral peruano.

<b>Caracteres</b>	<b><i>C. anconensis</i></b>	<b><i>C. angustata</i></b>	<b><i>C. chinchensis</i></b>	<b><i>C. heteronema</i></b>	<b><i>C. latissima</i></b>	<b><i>C. limensis</i></b>	<b><i>C. lobata</i></b>	<b><i>C. obovata</i></b>
<b>Hábito laminar</b>	Lámina principal con 4-8 lóbulos, lanceolados o digitiforme	Lamina simple oblanceolada	Láminas primarias espatuladas u oblongo lanceoladas. Presencia de costa media	Lámina principal oblonga, dividida sub-palmadamente una a varias veces, sub-dicotómicamente a irregular	Varias láminas principales de base cuneada, oblongas, enteras o lobuladas. Presencia de costa media	Lámina principal corta, base cuneada, se divide en 4-5 lóbulos palmado-cuneados	Lámina ancha central, lobada sub-palmadamente con lóbulos digitados oblongo-lanceolados	Lámina principal aovada, dividida en varios lóbulos o láminas secundarias aovadas o lanceoladas
<b>Margen</b>	Liso, entero. Proliferaciones marginales espatuladas o dentiformes	Entero	Ramificaciones marginales, espatuladas u aovadas, 2-5 lóbulos marginales de borde ondulado	Proliferaciones marginales (0,5-3 cm de tamaño) Suborbicular, reniforme, sésiles o pedunculadas	Entero u ondulado (láminas jóvenes) Irregularmente dentado	Entero u ondulado Entero o crenulado (ápice)	Subentero, obtusamente dentado o minuciosamente lobulado	Enteras o con proliferaciones aovadas o lanceoladas, borde entero ondulado o con proyecciones
<b>Color</b>	Rosado intenso a rojo	Rosado a rojo	Rosado intenso a rojo púrpura	Rojo violáceo brillante	Marrón rojizo intenso	Rosado o rojo púrpura	Rojo	Rosado intenso
<b>Tamaño (cm)</b>								
Alto	25	5-14	22	30	25	25	50	17
Ancho	16	-	11	25	6	2 (lámina principal)	30	-
<b>Estípites</b>	0.5 cm	0.3-0.4 cm, varios	Presente, corto	-	1 cm	Ausente	-	Corto
<b>Grosor en sección</b>	60-110	35-60	89-110	90-120	66-150	60- 84	65-110	-

<b>transversal</b> ( $\mu\text{m}$ )							
<b>Corteza</b>							
Capas de células	1-2	1-2	2	3	2-4	3-4	3-4
Díámetro de la células ( $\mu\text{m}$ )	3-4	5-10	3-7	4-8	-	-	11-20
<b>Subcorteza</b>							
Capas de células	2-3	-	3-4	-	-	-	-
Díámetro de las células ( $\mu\text{m}$ )	6-10	-	9-36	-	-	-	-
<b>Zona medular</b>							
	Pocos filamentos hialinos (3-4 $\mu\text{m}$ de diámetro)	Filamentos entrelazados, arreglados longitudinalmente	Filamentos entrecruzados, oblicua o periclinalmente	Filamentos de contenido homogéneo, entrecruzados y ramificados	Filamentos dispuestos oblicua o periclinamente	Filamentos ramificados. Células alargadas unidas por sus extremos, periclinales	Filamentos aplanados, refringentes dispuestos periclinalmente
Filamentos con contenido denso refringente	Presente	-	Presente, escasos	Presente, con extremos engrosados	Presente	Presente	Presente
<b>Ampolla de la rama carpogonial</b>							
Filamento principal	-	-	-	-	-	8 células	-

Filamentos secundarios (fs.)	-	-	-	-	3-4 fs.	-	-
Rama carpogonial	-	-	-	-	2 células	-	-

**Ampolla de la célula auxiliar**

Filamento principal	10-12 células	-	10-13 células	-	3-13 células	10-12 células	-
Filamentos secundarios (fs.)	4-6 fs., 6-8 células	-	4-5 fs., 7-10 células	-	3-4 fs., 6-8 células	2 o más fs., 8 células	-
Filamentos de tercer orden	-	-	3-8 células	-	2-4 células	-	-
Célula auxiliar Diámetro (µm)	6-9	-	29	-	-	-	-
<b>Cistocarpio</b>							
<b>Diámetro (µm)</b>	180	150-200	-	-	-	220	-

**Tetrasporangio cruciado**

Diámetro (µm)	5-9	16 (vista superficial)	12	9	14	14-17	-
---------------	-----	------------------------	----	---	----	-------	---

Longitud ( $\mu\text{m}$ )	18	-	19-21	15-21	-	21.6	14-27	-
<b>Hábitat</b>	Submareal Fondo arenoso consolidado	Submareal	-	-	-	-	Submareal	Adherida a rocas, Submareal
<b>Profundidad (m)</b>	5-15	10-30	-	-	-	-	10-15	10-50
<b>Referencias</b>	Acleto y Zúñiga (2011)	Dawson et al. (1964), Abbott y Hollenberg (1992)	Acleto (1973), Acleto y Zúñiga (2011)	Acleto y Zúñiga (2011)	Acleto (1973)	Acleto (1973), Acleto y Zúñiga (2011)	Howe (1914), Santelices et al. (1989)	Acleto (1973), Abbott y Hollenberg (1992)

(-) Información no mencionada en la bibliografía revisada.

## 2.2 Estudios moleculares en *Cryptonemia* y géneros relacionados (Halymeniaceae)

El uso de las herramientas moleculares ha contribuido a la resolución de problemas taxonómicos en diversos grupos de la familia Halymeniaceae, los cuales no habrían podido ser resueltos solamente con el análisis morfológico. Inicialmente, la subunidad mayor del gen cloroplastidial RuBisCO (*rbcl*) fue ampliamente usado para la identificación de especies, en conjunto con observaciones morfológicas. Por ejemplo, utilizando estos dos tipos de análisis se esclareció el estatus taxonómico de *Grateloupia catenata*, *G. subpectinata*, *G. minima*, *G. luxurians* que eran consideradas como sinónimos o subespecies de *G. filicina* debido principalmente a su gran variabilidad morfológica (Wang et al. 2000, Faye et al. 2004, Wilkes et al. 2005, De Clerck et al. 2005b). También se corrigieron identificaciones erradas, como en el caso de *G. doryphora*, originaria de Perú, que fue considerada especie introducida en el Atlántico, hasta que fue renombrada por Gavio y Fredericq (2002) como *G. turuturu* originaria de Japón. Del mismo modo, el uso de técnicas moleculares ha permitido describir nuevas especies dentro de la gran diversidad críptica del género *Grateloupia*, como en el caso de *G. asiática*, *G. capensis*, *G. jejuensis*, *G. huangiae*, *G. huertana*, *G. tenuis*, *G. boaoensis*, *G. ramosa*, *G. taiwanensis* y *G. orientalis*. Además se propuso a *Yonagunia* como género nuevo (Kawaguchi et al. 2001, Kawaguchi et al. 2004, De Clerck et al. 2005b, Mateo-Cid et al. 2005, Lin et al. 2008, Lin & Liang 2011, Kim et al. 2013, Yu et al. 2013, Liu et al. 2014, Cao et al. 2016).

Mediante el análisis combinado de análisis molecular y morfológico se reconoció a los géneros *Dermocorynus*, *Pachymeniopsis*, *Phyllymenia*, *Prionitis* como sinónimos del género *Grateloupia* (Kawaguchi et al. 1997, Wang et al. 2001, De Clerck et al. 2005a, Wilkes et al. 2005). Aunque Gargiulo et al. (2013) concluyeron que estos grupos deben ser tratados como géneros independientes, debido a diferencias morfológicas como los tipos de ampolla y eventos postfertilización que los diferencian entre sí, además de estar bien soportados en los análisis filogenéticos de secuencias *rbcl*. En otros géneros, al igual que en *Grateloupia*, mediante el análisis morfológico y de secuencias *rbcl*, se han realizado la descripción de nuevas especies y nuevos reportes. En *Halymenia*, Hernández-Kantún et al. (2012), luego de revisar las especies de talo ramificado del género de la región Indo-Pacífica, describieron dos especies, *H. hawaiiiana* y *H. tondoana*. Por su parte Tan et al. (2015), examinaron las especies foliosas de *Halymenia*, describiendo la especie *H. malaysiana* para el sudeste de Asia.

En el género *Cryptonemia*, Kim et al. (2012) reportaron a *C. rotunda* para Corea mediante análisis filogenético de secuencias *rbcl*, además sus resultados mostraron que el género no era monofilético, como se ha observado en otros géneros, como *Halymenia* (Hernández-Kantún et al. 2012). Posteriormente, Yang y Kim (2014) propusieron a *C. asiatica* como especie nueva para Japón y Corea, con caracteres morfológicos que las distinguen de otras especies. Paralelamente, D'Archino et al. (2014) determinaron que los especímenes foliosos identificados como *Cryptonemia* sp. y *Halymenia* sp. de Nueva Zelanda, pertenecían a los nuevos géneros *Amalthea* y *Galene*. Para las costas de Perú y Chile se estableció el nuevo género *Mariaramirezia*, mediante el análisis morfológico y filogenético de secuencias *rbcl* de taxones foliosos identificados como *Grateloupia* sp. y *Cryptonemia lapathifolia* (Calderón et al. 2014a), con dos especies: *M. osornoensis* y *M. lapathifolia*. Luego, Calderón et al. (2014b) describieron el nuevo género *Neorubra* basado en los ejemplares previamente identificados como *Prionitis decipiens* y *Grateloupia denticulata*.

En trabajos más recientes se ha considerado el uso de dos o más marcadores moleculares para la resolución de problemas taxonómicos con algas. Por ejemplo, en el género *Aeodes*, Russell et al. (2009) utilizando los marcadores ITS (nuclear) y *rbcl* (plastidial) transfirieron dos especies al género *Pachymenia*, dejando *Aeodes* con solo dos especies, *A. nitidissima* y *A. marginata*. Esta última especie posteriormente conformaría la nueva especie *Felicinia marginata* (Manghisi et al. 2014), por lo que se concluye que *Aeodes* y *Felicinia* son géneros monotípicos. Boo et al. (2013) transfirió a *Gelidium zollingeri* al género *Yonagunia*, proponiendo la nueva combinación, *Y. zollingeri*. También, en Brasil se han podido diferenciar nuevas especies del género *Halymenia*, *H. ignifera*, *H. pinnatifida*, *H. silviae* y *H. cearensis* (De Azevedo et al. 2016a, 2016b) y evaluar el estatus taxonómico de otros géneros, los cuales rara vez eran reportados o que presentaban falta de documentación de estructuras reproductivas, como en el género *Acrodiscus*, en el cual mediante la combinación de secuencias COI-5P, *rbcl* y LSU, se demostró que corresponde a un género independiente (Manghisi et al. 2017). Recientemente Schneider et al. (2018), realizó una revisión del género *Cryptonemia* de las Bermudas (Océano Atlántico occidental), en el cual se identificaron seis especies, de las cuales cinco son nuevas para el género, *C. abyssalis*, *C. antricola*, *C. atrocotalis*, *C. lacunicola* y *C. perparva*, utilizando los marcadores *rbcl* y LSU (nuclear).

### 2.3 Código de barras de ADN (o barcoding)

El código de barras es una técnica que nos permite una rápida identificación de un individuo problema en base a su secuencia de ADN, a partir de la amplificación de un segmento del genoma o secuencia corta de un gen (menos de 700 bp). Esta región debe poseer baja variabilidad intraespecífica y alta variabilidad interespecífica. El marcador del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI o COX1) es el más usado y ha demostrado su efectividad en estudios realizados en animales. Para utilizar la técnica de código de barras, se sigue un proceso que implica dos pasos básicos: 1) crear una biblioteca referencial de secuencias de ADN de especies correctamente identificadas y validadas y 2) relacionar la secuencia del espécimen desconocido y lograr su asignación al taxón más cercano (Herbert et al. 2003, Kress & Erickson 2012, Coddington et al. 2016).

En macroalgas, el marcador mitocondrial COI-5P fue establecido como marcador primario de código de barras por Saunders y McDevit (2012) y al marcador plastidial *rbcL* como marcador secundario, ambos ampliamente usados en los estudios filogenéticos (Saunders & Moore 2013). Robba et al. (2006) compararon COX1 y *rbcL*, observando que las secuencias de COX1 presentaban mayor divergencia genética. El estudio abarcó secuencias pertenecientes a seis órdenes de algas rojas: Bangiales, Ceramiales, Corallinales, Gigartinales, Gracilariales y Rhodymeniales, encontrando discriminación entre especies y diversidad críptica en seis especies. Yang et al. (2008), por su parte, compararon los resultados de COX1 y *rbcL* en 27 taxones de *Gracilaria vermiculophylla*, resultando en siete y tres haplotipos respectivamente, mostrando COX1 mejor resolución que *rbcL*, aunque Yang et al. (2008) señalan que COX1 debe ser usado con precaución para el código de barras por su alta variabilidad intraespecífica.

Esta técnica ha demostrado ser de utilidad para la resolución de problemas taxonómicos, así como en el manejo y conservación de la biodiversidad marina (Trivedi et al. 2016). Es así que, en España la detección de especies exóticas como *Grateloupia imbricata*, *G. turuturu* y *Pachymeniopsis garguili*, que presentaban morfología variable y ausencia de material fértil, pudieron ser identificadas con la utilización del análisis combinado de COI-5P y *rbcL*, demostrando que el código de barras es efectivo para la evaluación de riesgo de estas especies invasoras asiáticas (Montes et al. 2016, Montes et al. 2017).



A pesar de que esta herramienta molecular usa secuencias cortas, ha servido como complemento para estudios taxonómicos rutinarios, filogenéticos y poblacionales (Saunders 2005, Hajibabaei et al. 2006, Hajibabaei et al. 2007, Saunders 2008). El código de barras de ADN ha mostrado además ser útil para resolver problemas con especies crípticas, como los realizados en la familia Halymeniaceae, donde se utiliza la combinación de marcadores plastidiales, nucleares y mitocondriales. En Halymeniaceae, la combinación de COI-5P y *rbcL* ha resultado efectiva para la separación de especies que son similares morfológicamente, como *Grateloupia elliptica* y *G. lanceolata*, ambas con una divergencia interespecífica entre 3.7 y 4.6% en secuencias *rbcL*, siendo los valores más altos los de COI que varían entre 3.7 y 14%. En otros géneros, como *Pachymeniopsis* y *Kintokiocolax*, también se han podido distinguir especies, además de confirmar la presencia de especies crípticas como *Pachymeniopsis volvita* (Yang et al. 2013, Yan & Kim 2015).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Analizar morfológicamente y mediante el código de barras de ADN, las especies del género *Cryptonemia* (Halymeniaceae) en la costa central de Perú.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Identificar los especímenes del género *Cryptonemia* de otras algas rojas foliosas

Determinar los morfotipos de *Cryptonemia*

Caracterizar las especies de *Cryptonemia* mediante análisis molecular

Caracterizar las especies de *Cryptonemia* mediante análisis morfológico-anatómico.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Área de estudio**

Este estudio se desarrolló en el marco del proyecto: 129-2015-FONDECYT: “Diversidad de macroalgas de la costa central del Perú usando código de barras de ADN, en la perspectiva de sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas”. Especímenes foliosos de diferentes grupos taxonómicos fueron colectados en 28 localidades de la costa central del país (Anexo 3), desde Casma (9°S, 78°W) hasta Marcona (15°S, 75°W), de las cuales solo en cinco localidades se encontró especímenes de *Cryptonemia*, en Bahía San Nicolás, Mendieta y Playón (Ica) y Bahía de Ancón y La Punta (Lima), durante los meses de otoño (abril, mayo), invierno (setiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre) del 2016. Adicionalmente se analizaron especímenes de *Cryptonemia* colectados en el 2014 (Fig. 1, Tabla N° 3).

### **4.2 Colecta y procesamiento de las muestras**

Los ejemplares de *Cryptonemia* fueron colectados por medio de un muestreo exploratorio en las zonas intermareal y submareal. Se seleccionaron ejemplares completos y reproductivos, los que fueron fotografiados en su hábitat y georreferenciados con un GPS. Los talos adheridos a sustrato se removieron con una espátula, también se recogió material varado. Cada material colectado se colocó en una bolsa plástica señalando la localidad y asignándole un código. Para el análisis molecular, trozos de cada espécimen en buen estado, se secaron, se envolvieron en tul y fueron colocados en bolsas con cierre hermético conteniendo sílica gel. El resto del material fue fijado en formalina al 4% con agua de mar para el análisis morfológico y anatómico. Material seleccionado fue herborizado por duplicado y depositado en la colección científica del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y en la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

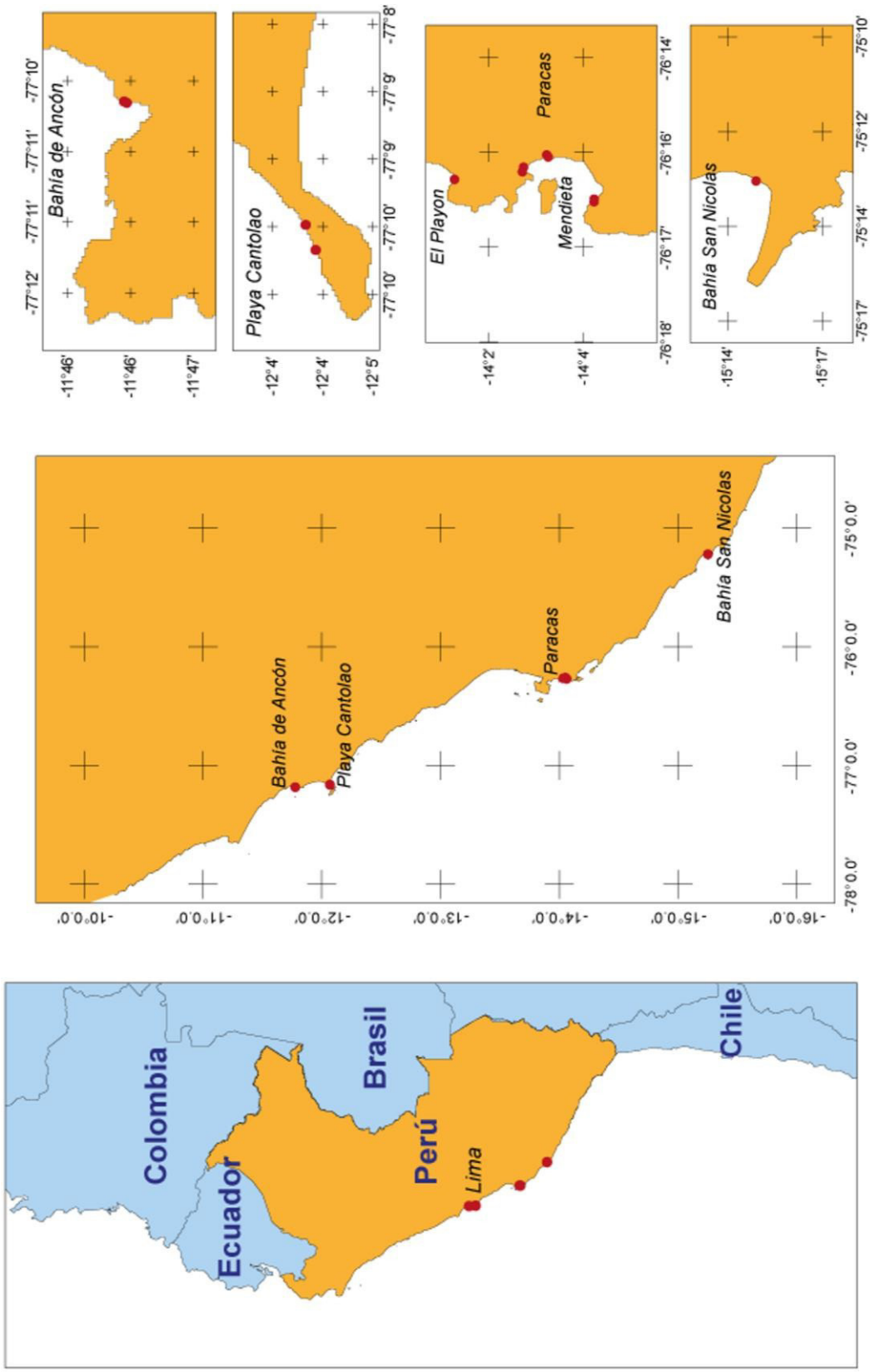


Figura 1. Área de estudio. Los puntos rojos en los mapas señalan las localidades de colecta de *Cryptonemia* en la costa central del Perú.

**Tabla N°3.** Datos de colecta de los ejemplares de *Cryptonemia* incluidas en este estudio.

Código de colección	Código de extracción de ADN	Localización geográfica		Fecha	Colector(es)
		Lugar de colecta	Longitud/ Latitud		
05-001354	BG-221	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	22/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Gianella Fabian
05-001352-1	BG-222	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	22/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Gianella Fabian
05-001352-2	BG-223	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	22/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Gianella Fabian
05-001353-1	BG-229	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	22/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Gianella Fabian Llantoy
05-001353-2	BG-230	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	22/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Gianella Fabian Llantoy
NAM-404-1	BG-305	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	29/12/2014	Natalia Arakaki
NAM-410-1	BG-306	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	06/12/2014	Natalia Arakaki
NAM-402	BG-308	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	29/12/2014	Natalia Arakaki
NAM-413	BG-309	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	29/12/2014	Natalia Arakaki
NAM-416	BG-310	Bahía San Nicolás, Marcona, Ica	75°13'14.83" 15°15'7.21"	29/12/2014	Natalia Arakaki
05-000509-4	BG-217	Mendieta, Paracas, Ica	76°15'37.9" 14°03'07.9"	03/04/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
05-000509-4	BG-311	Mendieta, Paracas, Ica	76°15'37.9" 14°03'07.9"	03/04/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero

05-000551	BG-312	Mendieta, Paracas, Ica	76°15'37.9"	14°03'07.9"	02/04/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
05-001290-3	BG-224	Mendieta, Paracas, Ica	76°16'13.45"	14°03'43.75"	06/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero
05-001290-5	BG-225	Mendieta, Paracas, Ica	76°16'13.45"	14°03'43.75"	06/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero
05-001290-8	BG-226	Mendieta, Paracas, Ica	76°16'13.45"	14°03'43.75"	06/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero
05-000501	BG-279	Mendieta, Paracas, Ica	76°16'13.45"	14°03'43.75"	03/04/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
05-001540-1	BG-282	Mendieta, Paracas, Ica	76°16'13.45"	14°03'43.75"	08/12/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez
05-001289-1	BG-219	Playon, Paracas, Ica	76°15'57.4"	14°02'01.2"	06/10/2016	Melissa Perez, Paola Romero, Joyce Manani
05-001466-1	BG-232	Bahía de Ancón, Ancón, Lima	77°10'38.88"	11°46'27.45"	11/11/2016	Melissa Perez, Paola Romero
05-001466-2	BG-281	Bahía de Ancón, Ancón, Lima	77°10'38.88"	11°46'27.45"	11/11/2016	Melissa Perez, Paola Romero
05-001331-1	BG-220	Playa Cantolao, La Punta, Lima	77°9'48.40"	12°4'9.51"	17/10/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
05-001330-2	BG-227	Playa Cantolao, La Punta, Lima	77°9'48.40"	12°4'9.51"	17/10/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
05-001331-2	BG-228	Playa Cantolao, La Punta, Lima	77°9'48.40"	12°4'9.51"	17/10/2016	Natalia Arakaki, Melissa Perez, Paola Romero
NAM-363	BG-307	Playa Cantolao, La Punta, Lima	77°9'48.40"	12°4'9.51"	29/12/2014	Natalia Arakaki

## 4.3 Análisis molecular

### 4.3.1 Aislamiento de ADN

Previamente a la extracción del ADN, se seleccionaron fragmentos jóvenes de las frondas maduras, no epifitadas. A continuación, estos fragmentos fueron revisados y limpiados en agua de mar y en agua destilada removiendo con un pincel los epifitos u otro material adherido, según lo sugerido por Saunders (1993).

Dos protocolos de extracción de ADN fueron utilizados, el primero fue con CTAB utilizado por Doyle & Doyle (1987), en el cual aproximadamente 0.005 g de alga seca fue molida en un mortero con nitrógeno líquido. Se agregó 500 µl de *buffer* CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y se incubó la muestra a 55 °C por una hora. Luego se añadió 500 µl de 24:1 cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló en el agitador tipo vórtex por 30 segundos. En seguida se procedió a centrifugar por 5-10 minutos a 14 000 RPM. Se obtuvieron tres fases, de las cuales se separó la fase acuosa (incolora). Esta se vertió en un nuevo tubo, al que se le añadieron 0.08 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M frío y 0.54 volúmenes de isopropanol frío. Después de incubada la muestra a -20 °C por 15 minutos, se realizó una serie de lavados con etanol frío al 95% y 70% respectivamente. Finalmente, se dejó secar y se resuspendió con agua ultrapura previamente calentada a 55°C.

El segundo protocolo de extracción de ADN fue del Kit GF-1 Plant DNA (Vivantis Technologies, USA) modificado. Luego de obtener el alga molida en nitrógeno líquido, se le añadió 280 µl de *buffer* PL y se mezcló por 30 segundos hasta obtener una mezcla homogénea. Se adicionaron 20 µl de proteinasa K (conservada a -20°C) y se mezcló. Posteriormente se incubó por 15 a 20 minutos a 65°C y centrifugó a 14 258 RPM por cinco minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó 600 µl de *buffer* PB, se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos. Finalmente se incorporó 200 µl de etanol absoluto y se mezcló inmediatamente. La mezcla se transfirió a un tubo colector con una columna, luego se centrifugó a 11 641 RPM por 1 minuto y se descartó el líquido que pasó por la columna (el ADN extraído quedó atrapado en la membrana de la columna). El paso final fue añadir 650 µl de *wash buffer* y centrifugar a 11 641 RPM por 1 minuto, descartar el líquido y repetir este paso tres veces, para asegurarse de que no quede *wash buffer*, transferir la columna en un tubo nuevo, añadir 100 µl de *elution buffer* en la columna, dejando reposar por 2 minutos antes de centrifugar por 1 minuto

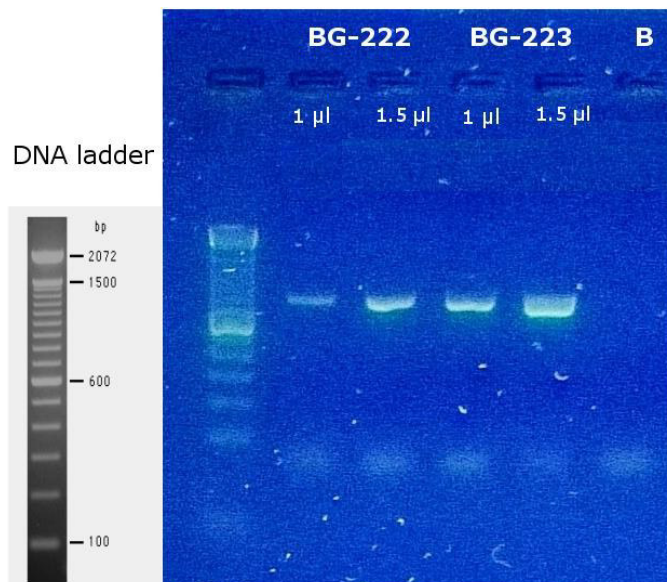
a 11 641 RPM. La columna fue descartada y la muestra de ADN extraída guardada a -4°C.

#### 4.3.2 Amplificación de ADN

Para la amplificación del gen *rbcl* se utilizaron siete diferentes combinaciones de primers: F15 - R753, F57 - R753, F15 - R916, F577 - R1150, F577 - R1381, F577 - RStart y F753 - RStart (Anexo 1), a los cuales se sumaron agua destilada, *buffer*, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), dNTP (desoxinucleótidos), DMSO (dimetilsulfóxido) y polimerasa Taq, reactivos que conforman el mix en PCR. La cantidad de ADN utilizado en el PCR fue de 1 a 2 µl.

Los ciclos de amplificación consistieron de una fase de una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, la fase de alineamiento fue de 48-50 °C por 0.4 a 1.20 minutos y la fase de extensión a 72 °C por 1.20 y 7 minutos, por 40 ciclos. Como control de cada amplificación se empleó uno de los tubos, el cual contenía todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto ADN.

Para la visualización del ADN amplificado se realizó una electroforesis en gel agarosa al 1%, en *buffer* TBE (Tris borato EDTA). Para visualizar el tamaño aproximado del ADN se empleó un marcador de tamaño de peso molecular (o DNA ladder). Para visualizar las bandas de ADN se empleó un transiluminador de luz UV (Fig. 2)



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa, amplificadores del marcador *rbcl* de *Crytonemia*. Al lado izquierdo el marcador de peso molecular. En la parte superior se indica el código de extracción de la muestra y cantidad de ADN utilizado. B: control.



### 4.3.3 Secuenciación y edición de secuencias

Luego de que los productos de amplificación fueran corroborados mediante electroforesis, 20 µl del producto amplificado con una concentración de 115 ng/ µl fueron enviados a purificar y secuenciar a la compañía MacroGen (<http://www.macrogen.com>).

Las secuencias obtenidas en formato AB1 fueron editadas y evaluadas con el software CodonCode Aligner v7.1.2 (<http://www.codoncode.com>), generando posteriormente las secuencias consenso.

### 4.3.4 Alineamiento de secuencias

Las secuencias consenso fueron alineadas mediante el software MEGA7 v 7.0.21 (Jumar et al. 2016). Tres alineamientos fueron realizados: el primero incluyó 64 secuencias en total, de las cuales se consideró a las 25 secuencias consenso obtenidas en este estudio, 39 secuencias de la base de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>, Anexo 2), de las cuales 37 secuencias fueron de especies representativas de la familia de Halymeniaceae y dos secuencias pertenecientes al género *Tsengia*, *T. lanceolata* y *Tsengia* sp., que conformaron el grupo externo (Manghisi et al.2014). El segundo alineamiento contó con 38 secuencias en total, de las cuales solo se incluyeron cinco secuencias representativas de las generadas en este estudio y 33 secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank (incluyendo el grupo externo). El tercer alineamiento fue conformado por 36 secuencias, de las cuales se empleó las 25 secuencias generadas, 10 secuencias de especies representativas del género *Cryptonemia* y una secuencia de *Galene profundae* como grupo externo.

### 4.3.5 Código de Barras de ADN

Un árbol filogenético fue construido con el método de distancias *Neighbor-Joining* (NJ) en MEGA7 con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros (Kimura 1980), con un *bootstrap* con 10 000 réplicas para identificar los grupos de especies. Se realizó una matriz de distancias genéticas, para evaluar las distancias interespecífica e intraespecífica, considerando que si este valor es menor de 1%, o se encuentra entre 1-2% pueden tratarse de la misma especie, o si es mayor de 2% se trataría de especies diferentes (Freshwater & Rueness 1994, Le Gall & Saunders 2010a).

#### **4.3.6 Análisis filogenético**

Construcciones filogenéticas fueron realizadas usando tres métodos: el método de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). Para el método de máxima parsimonia se emplearon dos software como comparación, PAUP\* (Swofford 2002) y MEGA7, con un bootstrap de 10 000 réplicas para determinar el soporte de los nodos.

Para el método de máxima verosimilitud, se escogieron los modelos de sustitución nucleotídica TrN+I+G (Tamura-Nei+sitios invariables+distribución gamma) y TIM+I (Modelo transicional +sitios invariables) según el criterio de información Akaike (AIC) por medio del programa JModeltest (Posada 2008), para el segundo y tercer alineamiento respectivamente. La construcción del árbol filogenético fue realizado mediante dos versiones del programas en línea: IQ-TREE (Nguyen et al. 2015) y PhyML 3.0 (Guindon et al.2010), utilizándose un bootstrap de 10 000 réplicas para determinar el soporte de los nodos.

Para el método de inferencia bayesiana (IB) se escogió el modelo GTR+I+G (modelo general de tiempo reversible+sitios invariables+distribución gamma), considerado el más complejo (Posada 2009). El análisis bayesiano fue realizado mediante el programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al.2011), usando 10 000 000 generaciones de cuatro cadenas de Markov-Monte Carlo (mcmc) y muestreando árboles cada 10 000 generaciones. Para el cálculo de las probabilidades posteriores de árboles, se usó un burn-in (número de árboles no considerados para el análisis) de 2 500, equivalente al 25% de los árboles muestreados.

#### 4.4 Caracterización morfológica

Los caracteres vegetativos y reproductivos fueron observados en cortes histológicos transversales hechos a mano alzada con una hoja de afeitar y asistido por un microscopio estereoscopio. Los cortes histológicos fueron colocados en una lámina portaobjeto y cubiertos por una laminilla, con una gota de agua destilada o de mar. Una vez rehidratado el corte, se procedió a teñirlo. Se utilizó la técnica de tinción con anilina azul modificada por Ramírez (1995), la cual consiste en aplicar unas gotas de anilina azul al 1% al trozo de alga por 5 a 10 minutos, luego fijar con una gota de HCl 1%, por un minuto. Se procedió a lavar con agua destilada para extraer el exceso de tinción y los restos de ácido. Finalmente se agregó una o dos gotas de KARO al 50%, una vez seco, se selló la preparación con esmalte de uñas incoloro. Los cortes histológicos montados, teñidos o sin teñir fueron posteriormente examinados y fotografiados en un microscopio compuesto con cámara incorporada.

Las mediciones de los cortes histológicos se realizaron con el *software ImageJ* (Schneider et al. 2012), considerando caracteres externos como altura, ancho del talo y longitud del estípote, e internos como ancho de la sección transversal, longitud de los filamentos con material refringente y diámetro del tetrasporangio, del cistocarpo y de la célula auxiliar en sección trasversal. La identificación de los ejemplares se realizó siguiendo las descripciones de Howe (1914), Dawson et al. (1964), Abbott (1967), Acleto (1973), Santelices et al. (1989), Lewis (1990), Abbott y Hollenberg (1992) y Acleto y Zúñiga (2011), donde se describen los caracteres vegetativos y reproductivos de las especies de *Cryptonemia*.

Además, se revisaron las muestras de los herbarios del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (USM), el Museo Nacional de Historia Natural (MNHN) en Chile, en los cuales se pudo observar y tomar fotos a ejemplares herborizados del género *Cryptonemia*. También se visitaron las plataformas virtuales, donde se pueden encontrar especímenes digitalizados del género: *Macroalgal Herbarium Portal* (<http://macroalgae.org/portal/index.php>), *University of Michigan Library Digital Collections* (<https://quod.lib.umich.edu/h/herb6ic?q=nathist;page=index>) y *University and Jepson Herbaria (UC/JEPS)*, *University of California, Berkeley* (<https://webapps.cspace.berkeley.edu/ucjeps/publicsearch/publicsearch/>).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Circunscripción de especímenes foliosos al género *Cryptonemia* J. Agardh

Un total de 120 especímenes, identificados en campo como pertenecientes a la familia Halymeniaceae, presentaron un talo plano, folioso de coloración rosada a rojo violáceo, con ausencia o presencia de estípite, unido a disco de fijación pequeño. Sin embargo, la observación detallada de sus caracteres externos e internos permitió determinar que 110 especímenes correspondían a la familia Halymeniaceae. El resto de algas foliosas analizadas fueron designadas como pertenecientes a las familias Delesseriaceae, Gigartinaceae, Kallymeniaceae y Schizymeniaceae.

De los especímenes de Halymeniaceae, 67 presentaron características propias del género *Cryptonemia*: talo de textura membranácea, forma simple y plana, lanceolada a ovoide, que puede estar ramificado, lobado o irregularmente dividido, con margen entero o dentado, ausencia o presencia de un estípite y un disco de fijación reducido. Internamente con una estructura multiaxial, desarrollando una corteza relativamente delgada de una a cuatro capas de células esféricas a elipsoides, siendo de menor tamaño las que se encuentran más cercanas a la superficie, y una médula compuesta de filamentos direccionados periclinalmente, algunos de estos filamentos con material denso y refractivo. En ejemplares femeninos, el gametofito presentó ampollas, estructuras reproductivas que consisten de un sistema de ramas carpogoniales y un sistema de la célula auxiliar por separado (no procarpial). En especímenes tetraspóricos, los tetrasporangios se encontraron en la corteza y estaban divididos cruciadamente (Anexo 4).

Un total de 25 individuos completos, es decir que presentaron un talo con los márgenes y formas definidas, además de un marcado disco de fijación, fueron seleccionados para el análisis molecular y el análisis morfológico posteriores.

## 5.2 Morfotipos (morfoespecies) de *Cryptonemia*

Los 25 ejemplares seleccionados fueron asignados a cinco morfotipos: *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2. La identificación preliminar estuvo basada principalmente en su morfología externa (forma y contorno, grosor, consistencia, tamaño del talo, ausencia o presencia de estípite, proliferaciones, división del talo) y revisión bibliográfica (fotografías, gráficos, descripciones del material tipo).

### *Cryptonemia anconensis*

Los ejemplares presentaron un talo laminar, rosado intenso a rojo, de contorno oblongo o suborbicular, estípite ausente o reducido que se expande originando 4 a 8 lóbulos, en conjunto subpalmados, lóbulos oblongo lanceolados o digitiformes en un plano, ápice acuminado gradualmente, margen liso entero o dentado (Fig. 3).

### *Cryptonemia limensis*

Los ejemplares presentaron un talo laminar de contorno orbicular, de un color rosado a rojo intenso. La lámina principal es corta de base cuneada, el margen entero y ondulado, se divide en su extremo distal y lateral en 4 o 5 lóbulos, estos son palmados, de base angosta de ápice redondeado, amplio, de borde entero y crenulado (Fig. 4).

### *Cryptonemia obovata*

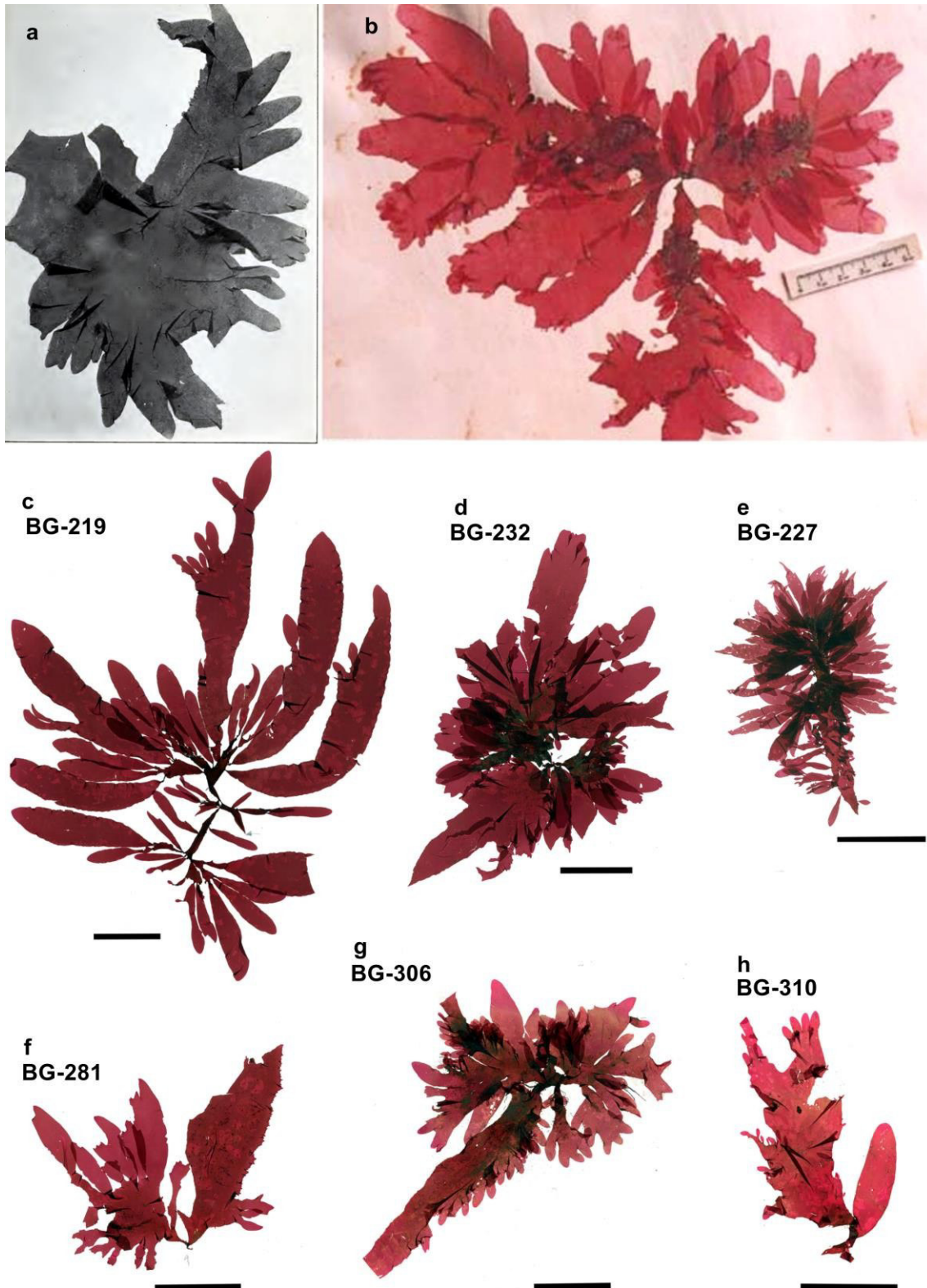
Los individuos se caracterizan por presentar un talo laminar de un color rojo intenso, de estípite corto, que a su vez se divide en varios lóbulos o láminas secundarias aovadas o oblanceoladas, de base angosta, de margen entero o crenulado (Fig. 5).

### *Cryptonemia* sp. 1

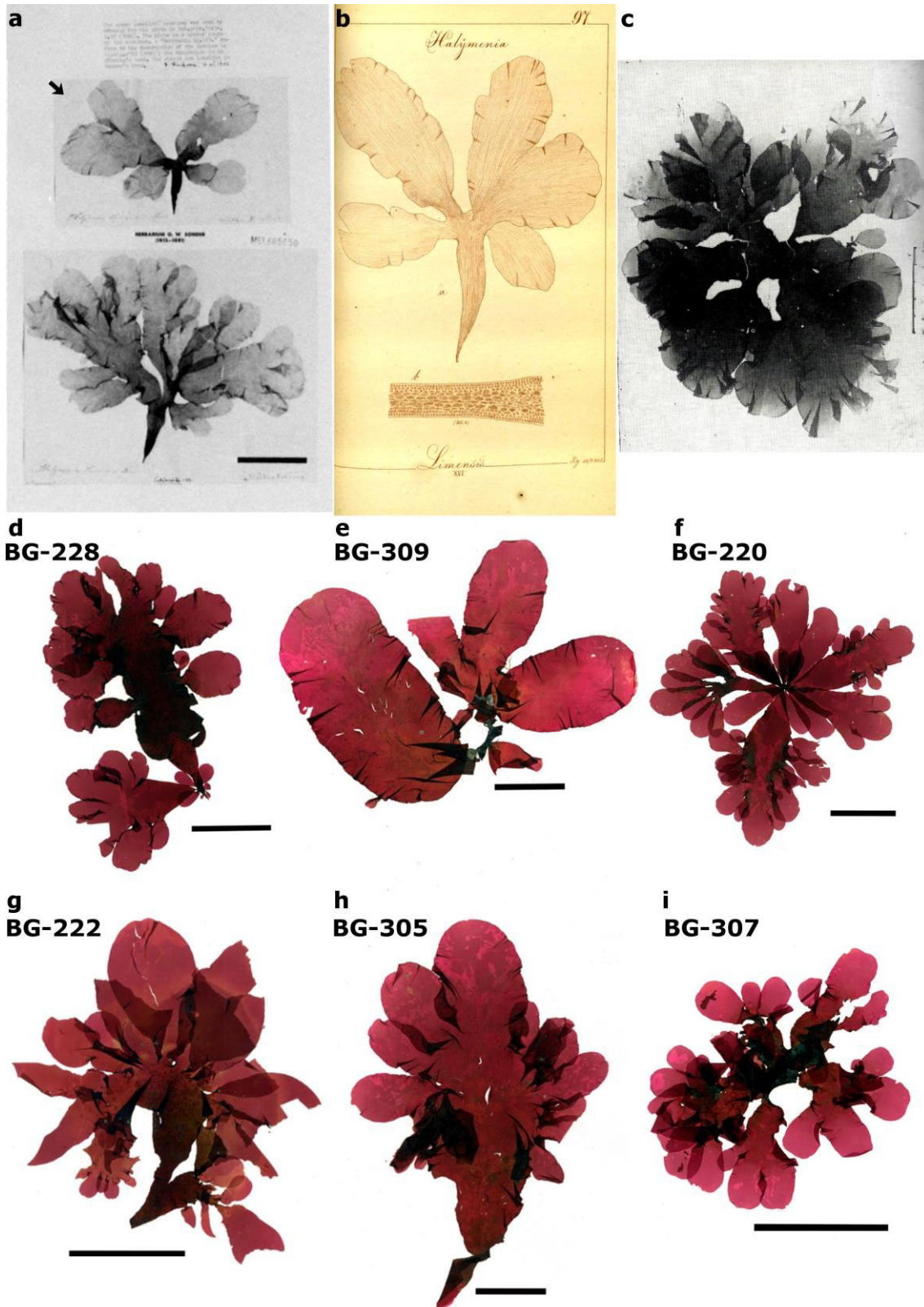
Los especímenes presentaron una lámina principal unida a un estípite, de la cual crecen láminas secundarias oblanceoladas, que a su vez desarrollan lóbulos de ápice redondeado o agudo, margen crenulado a entero (Fig. 6).

### *Cryptonemia* sp. 2

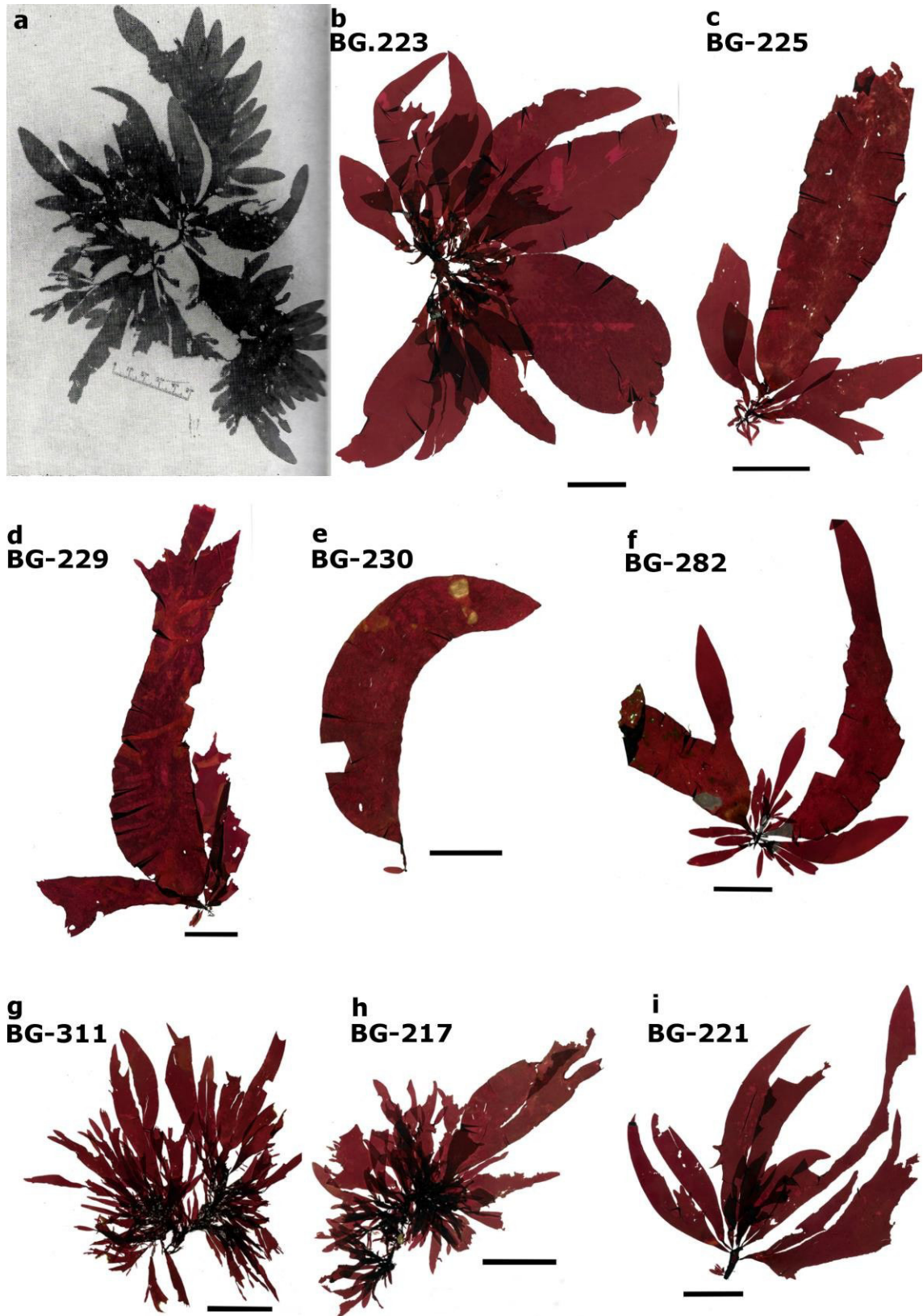
El ejemplar se caracteriza por presentar una lámina principal de color rosado (ápices) verduzco (zona epifitadas), de textura suave al tacto, con contorno orbicular que en un extremo se divide en 12 lóbulos ovados de ápice agudo (Fig. 7).



**Figura 3.** *Cryptonemia anconensis*. (a) Tipo de *Chrysomenia lobata* (Howe 1914, vol. 15, lámina 57). (b) Holotipo de *C. anconensis* (Acleto & Zúñiga 2011). (c,d) Ejemplares tetraspóricos (BG-219, BG-232 respectivamente). (e,f,g,h) Ejemplares vegetativos (BG-227, BG-281, BG-306, BG-310 respectivamente). Escala de las figuras (b,c,d,f,g,h): 5 cm.



**Figura 4.** *Cryptonemia limensis*. (a) Tipo de *C. limensis* (antes *Euhymania limensis* Kützinger), donde se observa al lectotipo señalado por una flecha (Lewis 1990). (b) Ilustración del lectotipo *Euhymania limensis* (Kützinger 1866). (c) Holotipo de *C. peruviana* (Acleto 1973). (d) Ejemplar femenino (BG-228). (e) Ejemplar tetraspórico (BG-309). (f,g,h,i) Ejemplares vegetativos (BG-220, BG-222, BG-305, BG-307 respectivamente). Escalas de las figuras (a,c,d,e,f,g,h,i): 5 cm.



**Figura 5.** *Cryptonemia obovata*. (a) Ejemplar de *C. obovata* (Acleto 1973). (b,c,d,e,f,g) Ejemplares femeninos (BG-223, BG-225, BG-229, BG-230, BG-282, BG-311 respectivamente). (h,i) Ejemplares tetraspóricos (BG-217, BG-221 respectivamente). Escala de figuras las (a,b,c,d,e,f,g,h,i): 5 cm



**a**  
**BG-312**



**b**  
**BG-279**



**c**  
**BG-224**



**d**  
**BG-226**



**Figura 6.** *Cryptonemia* sp. 1. (a) Ejemplar femenino (BG-312). (b) Ejemplar tetraspórico (BG-279). (c,d) Ejemplares vegetativos (BG-224, BG-226). Escalas de las figuras (a,b,c,d): 5 cm.

**BG-308**



**Figura 7.** *Cryptonemia* sp. 2. Ejemplar femenino (BG-308). Escala: 5cm

### 5.3 Análisis molecular de los morfotipos

A los morfotipos se le asignó un color, con el fin de resaltar el cambio con los nuevos grupos genéticos que se formaron en los siguientes análisis: *C. anconensis* (verde), *C. limensis* (rojo), *C. obovata* (azul), *Cryptonemia* sp. 1 (ocre) y *Cryptonemia* sp. 2 (púrpura).

Un total de 25 secuencias *rbcL* de especies de *Cryptonemia* de la costa central del Perú fueron generadas en este trabajo. Las distancias intraespecíficas e interespecíficas y las construcciones filogenéticas fueron realizadas, considerando secuencias disponibles en GenBank, formaron cinco grupos de especies: *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2.

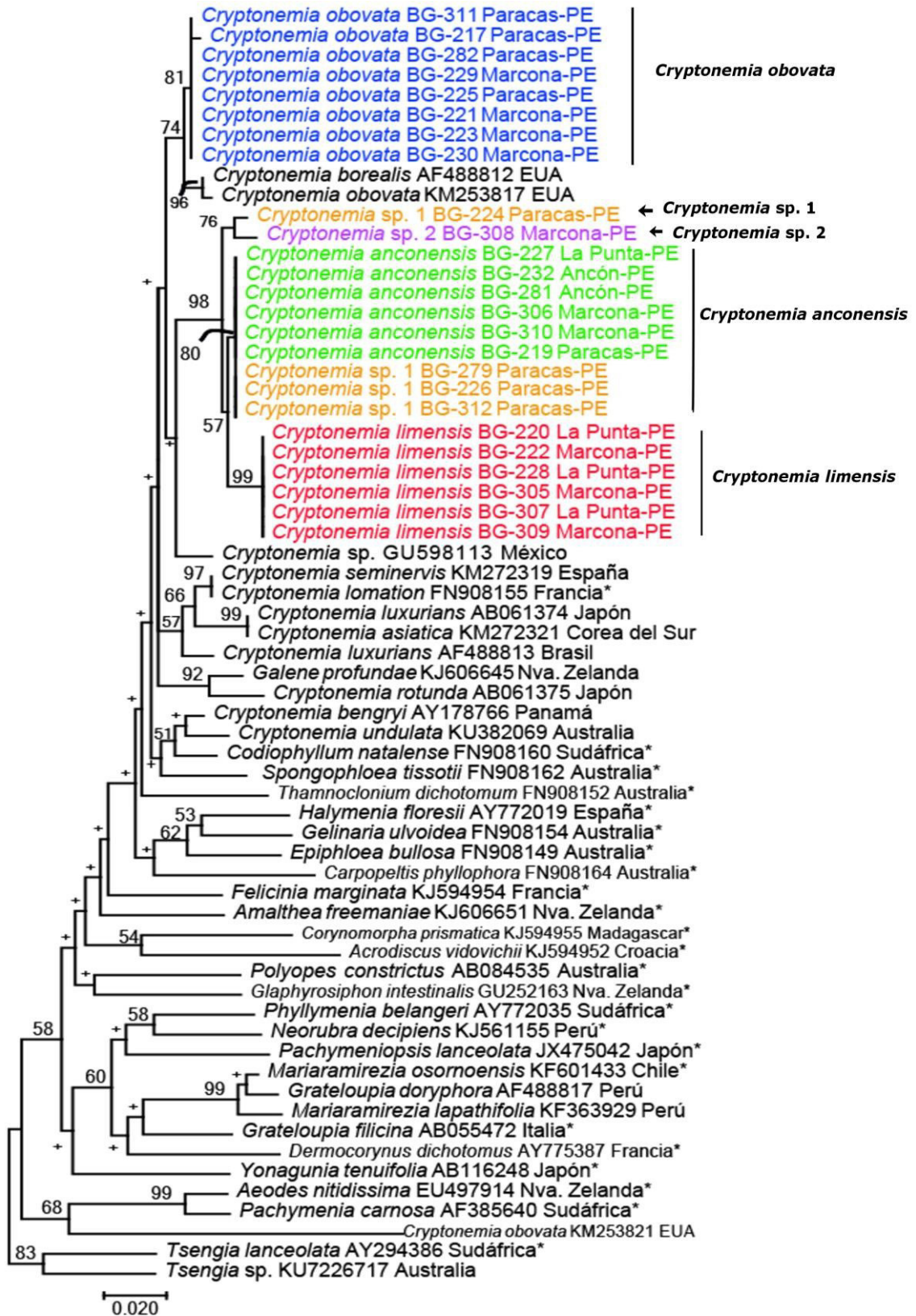
#### 5.3.1 Análisis de distancias genéticas

La distancia genética intraespecífica e interespecífica fue evaluada de un total 64 secuencias *rbcL* del género *Cryptonemia* y especies representativas de la familia Halymeniaceae, incluyendo las 25 secuencias de este estudio. En un alineamiento de 984 nucleótidos (pb), los rangos de las distancias genéticas entre los grupos genéticos: *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2, que se forman en el árbol filogenético obtenido con el método de distancias *Neighbor-Joining* (Fig. 8), se encuentran señalados en la Tabla N° 4. También se realizó una comparación entre las secuencias *rbcL* (Tabla N° 5).

El género *Cryptonemia* conforma un grupo no monofilético, las 25 secuencias de Perú se mantienen juntas aunque en un clado de soporte bajo, menor de 50%, que incluye a *Cryptonemia* sp. (México), *C. obovata* KM253817 y *C. borealis*. Las secuencias que pertenecían al morfotipo *C. obovata* se agruparon en un clado junto a *C. obovata* KM253817 y *C. borealis* con un soporte moderado de 74%. Los especímenes que pertenecen al morfotipo *C. limensis* permanecieron juntas en un clado, con un soporte alto de 99%. Los ejemplares que conformaron los morfotipos *C. anconensis* y *Cryptonemia* sp. 1 (a excepción del espécimen BG-224) conformaron un clado, con un soporte moderado de 80%. Los morfotipos *Cryptonemia* sp. 1 (BG-224) y *Cryptonemia* sp. 2 (BG-308) conforman un clado con un soporte moderado de 76%.

Tomando en cuenta lo mencionado por Freshwater y Rueness (1994) y Le Gall y Saunders (2010a), que si este valor es menor que 1% o varía entre 1-2% pueden

tratarse de la misma especie, si es mayor que 2% es probable que se trate de especies diferentes. A nivel de familia, la distancia genética interespecífica varió en 2.5-16.7% (Anexos 6 y 7), por otro lado los grupos genéticos conformados por *C. anconensis*, *C. limensis*, *C. obovata*, *Cryptonemia* BG-224 y *Cryptonemia* BG-308 (Fig. 8) presentaron una distancia intraespecífica menor que 1% que fluctuó entre 0-0.6% (0-6pb). La distancia interespecífica varía en un rango 1-4.6%, esta distancia fue menor entre *C. anconensis*, *C. limensis*, *Cryptonemia* BG-224 y *Cryptonemia* BG-308. Solo *C. obovata* presenta una distancia mayor que 2% respecto a los otros grupos genéticos (Tabla N° 4, Tabla N° 5).



**Figura 8.** Árbol filogenético basado en secuencias *rbcL* inferido con el método *Neighbor-Joining*. Los valores indican valores de bootstrap para 10000 réplicas. Los taxones en color representan las secuencias generadas en este trabajo. El símbolo (+) indica el valor de soporte menor a 50. El asterisco (\*) indica la especie tipo del género.

**Tabla N° 4.** Distancias genéticas (%) interespecífica e intraespecífica (diagonal) entre los grupos genéticos obtenidos, mediante el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros.

<i>Cryptonemia</i>	<i>C. anconensis</i>	<i>C. limensis</i>	<i>C. obovata</i>	<i>Cryptonemia</i> BG-224	<i>Cryptonemia</i> BG-308
<i>C. anconensis</i>	<b>0</b>				
<i>C. limensis</i>	1.4-1.5	<b>0-0.1</b>			
<i>C. obovata</i>	3.3-3.8	3.9-4.6	<b>0-0.6</b>		
<i>Cryptonemia</i> BG-224	1.1	1.5-1.6	2.8-3.4	<b>0</b>	
<i>Cryptonemia</i> BG-308	1	1.4-1.5	3.2-3.7	0.5	<b>0</b>

**Tabla N° 5.** Comparación de secuencias *rbcl* entre los grupos genéticos obtenidos, mediante el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros.

Comparación de los grupos genéticos	Alineamiento (pb)	Sitios conservados (pb/%)	Sitios variables (pb/%)	Sitios informativos (pb/%)
<i>C. anconensis</i>	984	984/100	0	0
<i>C. limensis</i>	984	983/ 99.9	1/0.1	0
<i>C. obovata</i>	984	978/ 99.4	6/0.6	0
<i>C. anconensis</i> y <i>Cryptonemia</i> (BG-224)	984	973/98,9	11/1.1	0

<i>C. anconensis</i> y <i>Cryptonemia</i> (B-308)	984	974/99	10/1	0
<i>C. limensis</i> y <i>Cryptonemia</i> (BG-224)	984	968/98.6	16/1.6	0
<i>C. limensis</i> y <i>Cryptonemia</i> (BG-308)	984	969/98.5	15/1.5	0
<i>C. obovata</i> y <i>C.</i> <i>anconensis</i>	984	946/96.1	38/3.9	32/3.3
<i>C. obovata</i> y <i>C. limensis</i>	984	935/95	49/5	39/4
<i>C. obovata</i> y <i>Cryptonemia</i> (BG-224)	984	950/96.5	34/3.5	0
<i>C. obovata</i> y <i>Cryptonemia</i> (BG-308)	984	947/ 96.2	37/3.8	0
<i>C. obovata</i> y <i>C. borealis</i> (Estados Unidos)	984	974/99	10/1	0
<i>C. obovata</i> (Perú) y <i>C.</i> <i>obovata</i> KM253817	379	374/98.7	10/1	0
<i>C. obovata</i> (Perú) y <i>C.</i> <i>obovata</i> KM253821	379	312/82.3	67/17.7	0
<i>C. lomation</i> y 25 secuencias de <i>Cryptonemia</i> de Perú	984	915/93	69/7	44/4

### 5.3.2 Análisis filogenético

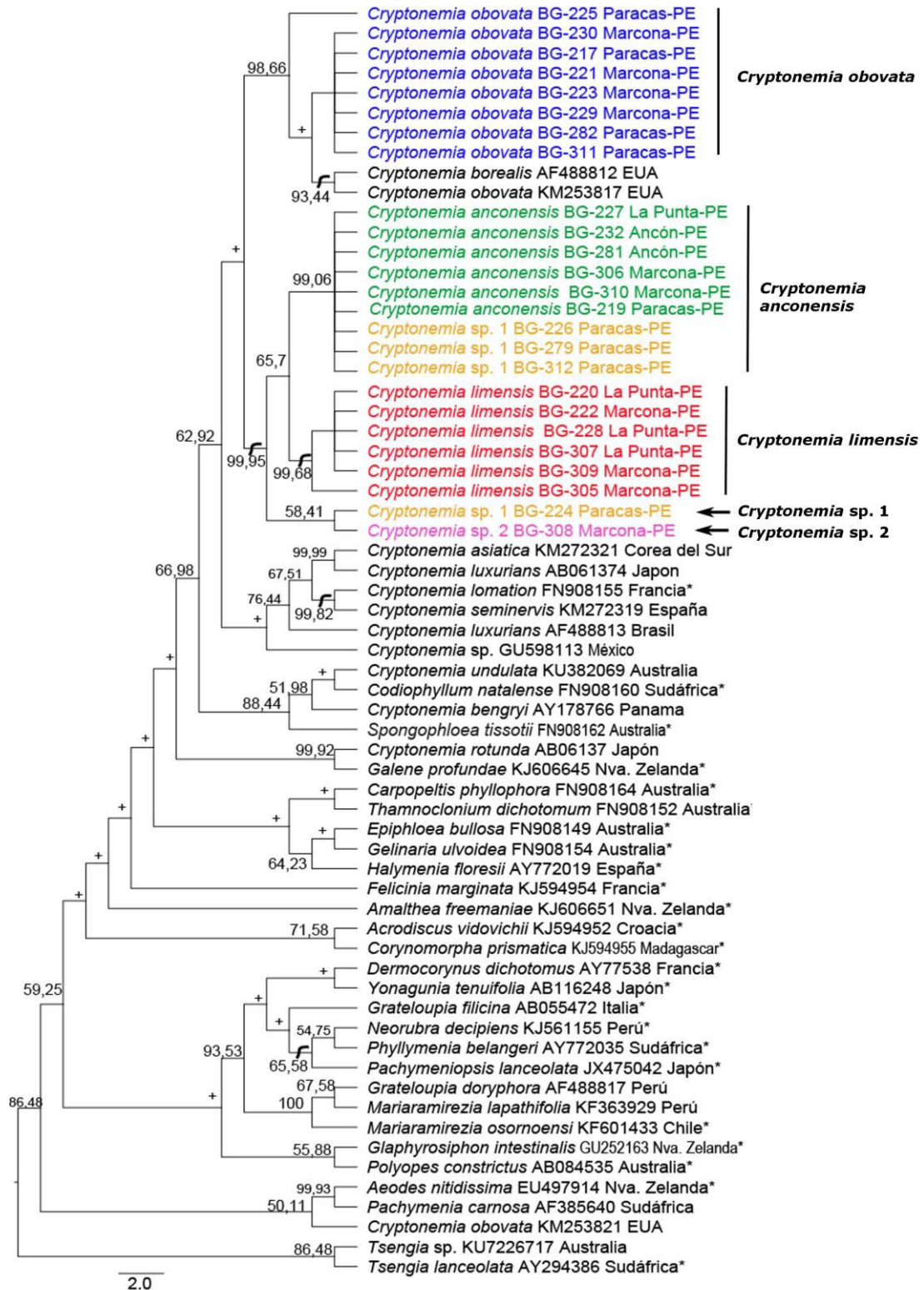
Siguiendo los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB), se generaron árboles filogenéticos. La topología del árbol *Majority-rule consensus*, inferido por el método de máxima parsimonia (Fig. 9), se asemeja más al árbol de *Neighbor-Joining*. Los árboles que resultan de los análisis ML y BI son idénticos, por ello en la Fig. 10 se presentan los árboles ML con los soportes (*bootstraps*) de ambos análisis. La reconstrucción filogenética presenta altos valores de soporte en las ramas terminales, mientras que algunos nodos internos presentan valores bajos. En el caso de los árboles ML e IB son mayores de 50.

En el primer árbol de la figura 10 se encuentran las especies representativas de la familia Halymeniaceae (Fig. 10a), las relaciones filogenéticas inferidas concuerdan con lo reportado por otros autores (Calderón et al. 2014a, Calderón et al. 2014b, Tan et al. 2015, De Azevedo 2016, De Azevedo et al. 2016a). Las especies *Halymenia floresii*, *Gelinaria ulvoidea*, *Epiphloea bullosa*, *Thamnoclonium dichotomum* y *Carpopeltis phyllophora* conforman un clado moderado 89/0.96, mientras que el género *Grateloupia* conforma un clado con *Mariaramirezia*, *Phyllymenia belangeri*, *Neorubra decipiens* y *Pachymeniopsis lanceolata*, de soporte alto (100/1). Representantes del género *Cryptonemia* de otras partes del mundo conformaron un solo clado monofilético con las secuencias de *Cryptonemia* de la costa central del Perú, con soporte alto (99/1), excluyendo secuencias consideradas en el análisis de parsimonia y el análisis de distancias, las cuales fueron: *C. undulata* KU382069 (Australia), *C. bengryi* AY178766 (Panamá) y *C. rotunda* AB06137 (Japón).

El grupo de *Cryptonemia* peruanas permanecieron juntas en todos los análisis, agrupándose solo con dos secuencias de los Estados Unidos, *C. borealis* y *C. obovata*, con un soporte moderado (75/0.81). *C. obovata* de Perú se asocia en un clado con *C. obovata* y *C. borealis* (ambas de los Estados Unidos), de soporte alto (100/1), mientras que *C. anconensis*, *C. limensis*, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2 se agrupan en un solo clado de soporte alto (100/1).

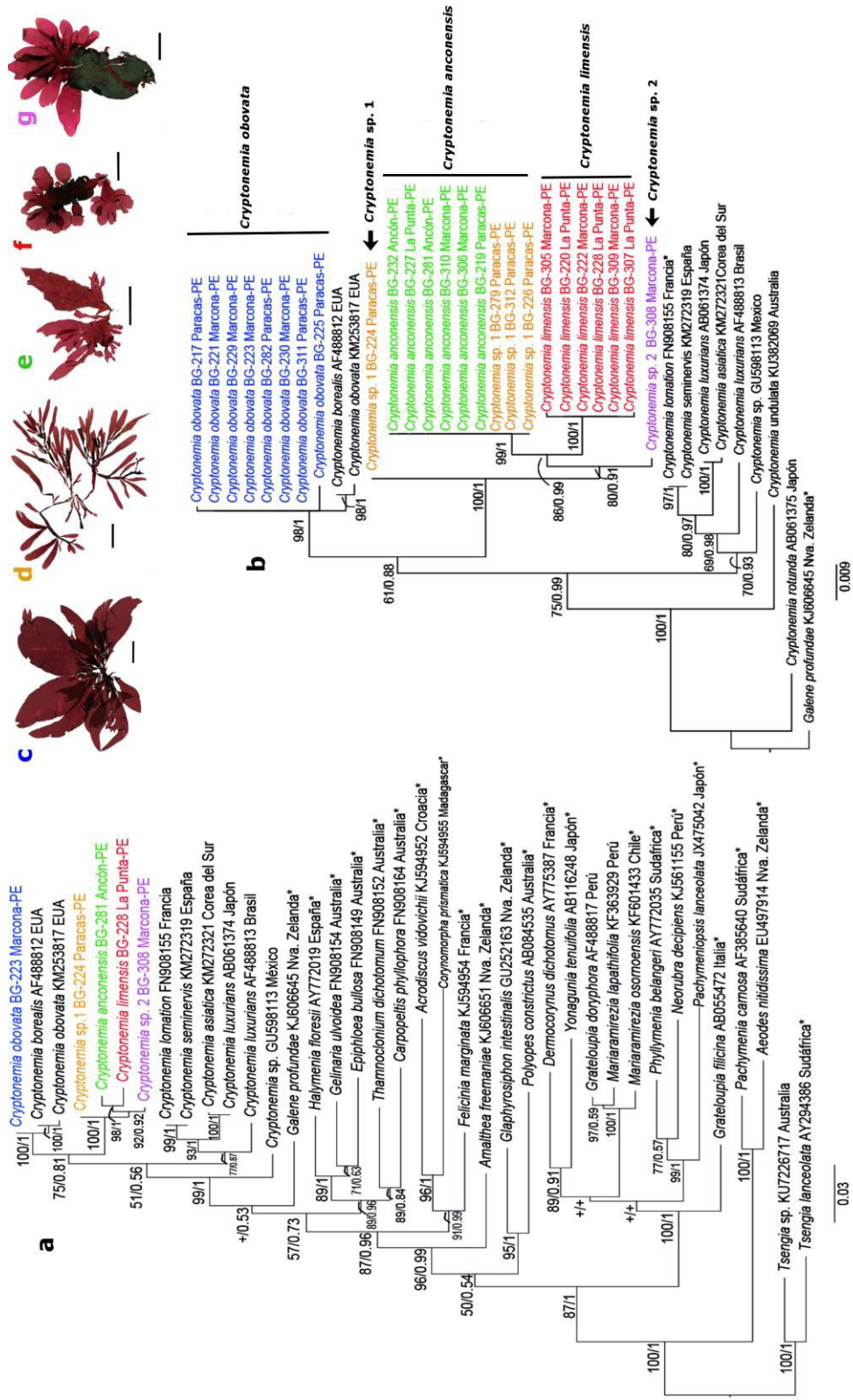
En el segundo árbol (Fig. 10b), donde se consideraron solo especies del género *Cryptonemia* y como agente externo a *Galene profundae*, la distribución de las 25 secuencias coincide con las posiciones del primer árbol, en un clado de soporte bajo/moderado 61/0.88. Además concuerda con la agrupación preliminar de morfotipos, a excepción de los ejemplares que pertenecían al morfotipo *Cryptonemia* sp. 1 y que se

agrupan en un clado con *C. anconensis* de soporte alto (99/1).



**Figura 9.** Árbol filogenético *Majority-rule consensus*, basado en secuencias *rbcl*, inferido con el método de máxima parsimonia (MP). Los valores indican valores de *bootstrap* para 10000 réplicas. Los taxones en color representan las secuencias generadas en este trabajo. El símbolo (+) indica el valor de soporte menor a 50. El asterisco (\*) indica la especie tipo del género.





**Figura 10.** Árboles filogenéticos basados en secuencias *rbcL* de especies de la familia Halymeniaceae (a) y de especies del género *Cryptonemia* (b). Los soportes en los nodos indican los valores inferidos de los análisis de máxima verosimilitud (ML) y las probabilidades posteriores de inferencia bayesiana (IB) respectivamente. Los taxones en color representan las secuencias generadas en este trabajo. El símbolo más (+) indica el valor del soporte menor a 50. El asterisco (\*) indica la especie tipo del género. (c) *Cryptonemia obovata* (BG-223). (d) *Cryptonemia* sp. 1 (BG-224). (e) *Cryptonemia anconensis* (BG-281). (f) *Cryptonemia limensis* (BG-228). (g) *Cryptonemia* sp. 2 (BG-308). Escala de las figuras (c,d,e,f,g): 5 cm

## 5.4 Caracterización morfológica-anatómica

Basándose en el análisis de secuencias *rbcL*, al menos cinco especies del género *Cryptonemia* fueron reconocidas para la costa central del Perú, tres de las cuales fueron identificadas como *C. anconensis*, *C. limensis* y *C. obovata*. Dos especies necesitan estudios adicionales, siendo asignadas en este estudio como *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2.

### 5.4.1 *Cryptonemia anconensis* Acleto & Zúñiga

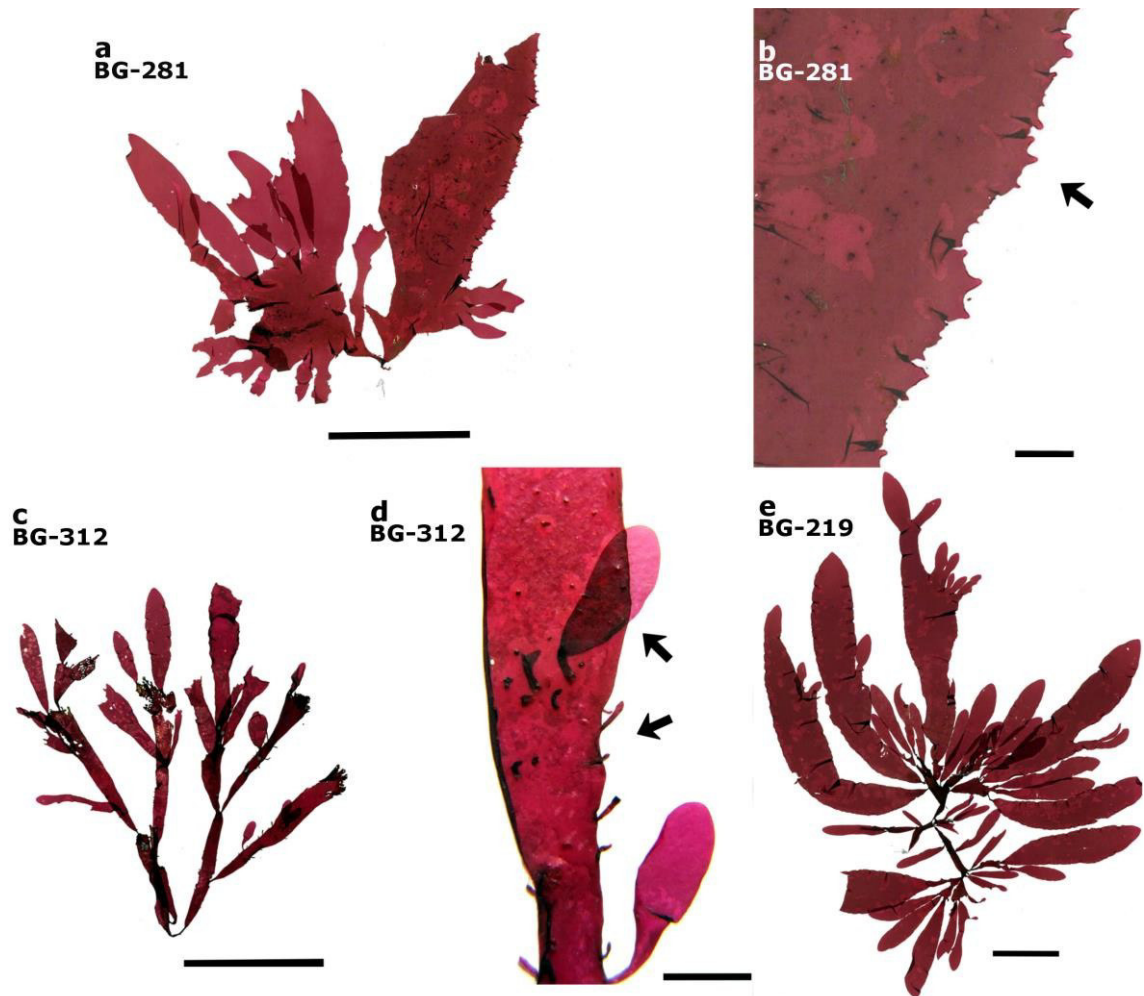
**Descripción:** Talo laminar, membranáceo, suave al tacto, rosado intenso a rojo, de contorno oblongo o suborbicular, alcanzaron 17 cm de largo, estípites ausentes en la mayoría, algunos presentaron un estípite corto que se expande originando 4–8 lóbulos, en conjunto subpalmados, lóbulos oblongo lanceolados o digitiforme en un plano, ápice acuminado gradualmente, obtuso. Los lóbulos más grandes con lóbulos similares, margen liso entero o dentado, o con pequeñas proliferaciones marginales lanceoladas (Fig. 11). Internamente en sección transversal de 28–81  $\mu\text{m}$  de ancho, la corteza conformada por 2 a 3 capas de células, la capa más externa fotosintética, ovoides a angulares y las capas de células internas, elipsoidales. La médula no compacta con filamentos medulares y algunos filamentos con contenido denso, refringente (Fig. 12a). Los tetrasporangios de división cruciada son ovoides y llegan a medir hasta 14  $\mu\text{m}$  de largo (Fig. 12b).

En el sistema reproductivo femenino, la rama carpogonial y la célula auxiliar se localizan en ampollas separadas. La ampolla de la célula auxiliar se encuentra conformada de un filamento primario de 10–12 células ovoides con 3 o 4 filamentos secundarios de 6–8 células, la célula auxiliar mide de 6 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 12c). El cistocarpo maduro alcanza 254  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentra rodeado de un pericarpo definido de células alargadas (Fig. 12d).

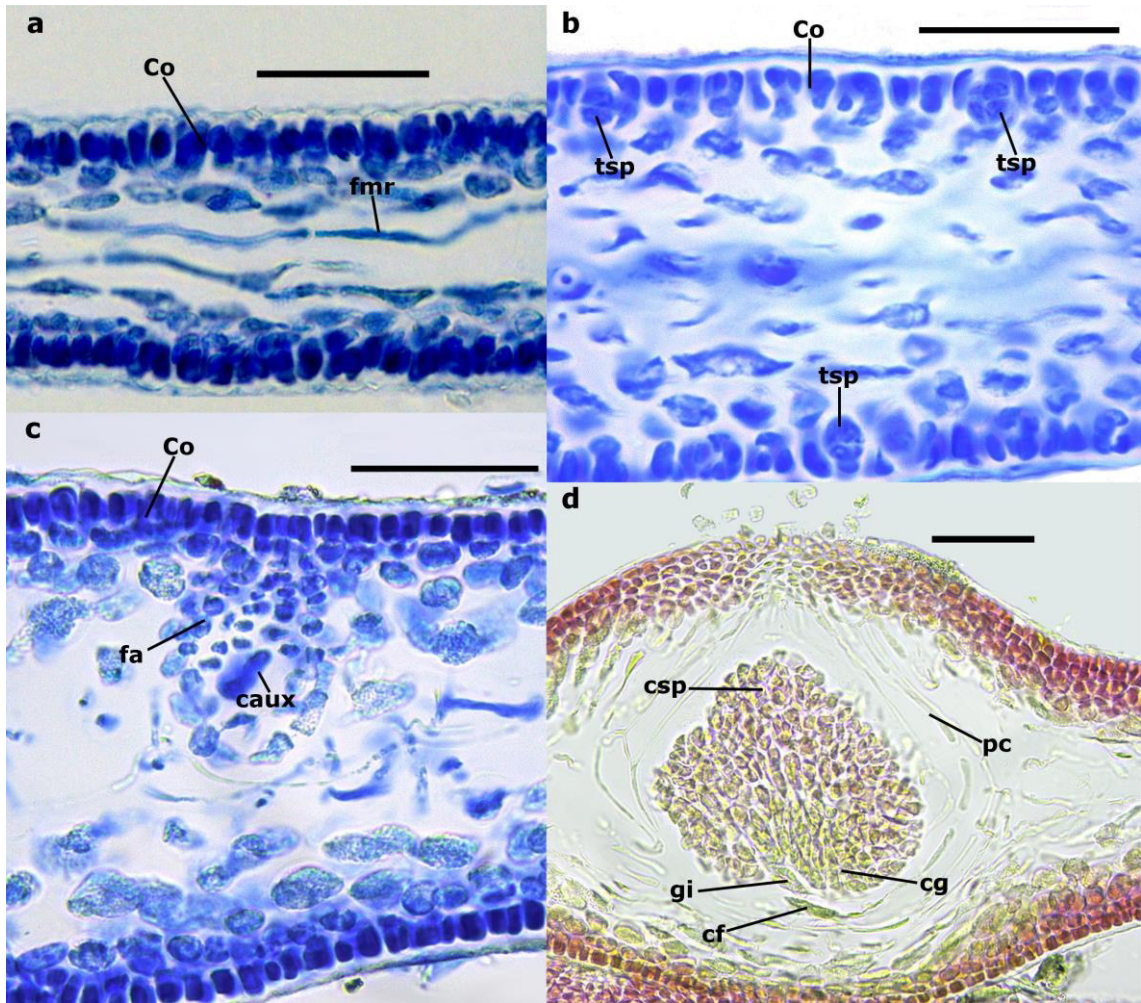
**Observaciones:** No se reconocieron especímenes masculinos en este grupo. Al considerar especímenes que previamente habían sido designados al morfotipo *Cryptonemia* sp. 1, notamos que estos ejemplares presentaban ciertos caracteres externos propios de *C. anconensis*, como el margen dentado, proliferaciones que se desarrollan en la superficie de la lámina así como en los márgenes y láminas lanceolados sin proyecciones. Nótese la variabilidad en la forma del talo (Fig. 11). Esta especie ha sido reportada para Lima, siendo Ancón la localidad tipo. También para

Pucusana, Chancay, Callao y La Punta. En este trabajo se adiciona otra la localidad, Bahía San Nicolás, Ica.

**Material estudiado:** La Punta, Callao, 12° 4' 9.509"S, 77° 9' 48.401"W (BG-227). Bahía de Ancón, Lima, 11°46'27.45"S, 77°10'38,88"W (BG-232, BG-281). Bahía San Nicolás, Nazca, 15°15'7.209"S, 75°13'14.830"W (BG-306, BG-310). Paracas, Ica, 14°02'48.3"S, 76°15'49.8"W (BG-219, BG-226, BG-279, BG-312).



**Figura 11.** Hábito de *Cryptonemia anconensis*. (a,b) Representante vegetativo BG-281, donde se muestran el hábito y el margen dentado, respectivamente. (c,d) Representante cistocárpico BG-312, donde se observan el hábito y las proliferaciones que se desarrollan en la lámina principal. (e) Representante tetraspórico BG-219. Escala de las figuras (a,c,e): 5 cm, (b,d): 0.5cm.



**Figura 12.** Estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de *Cryptonemia anconensis* en sección transversal. (a) Ejemplar tetraspórico BG-232, donde se observan la corteza (Co) y los filamentos medulares con material refringente (fmr). (b) Ejemplar tetraspórico BG-279, donde se señalan los tetrasporangios cruciados (tsp) en la zona cortical (Co). (c) Ejemplar femenino BG-312, donde se observa la corteza (Co) y la posición de la ampolla de la célula auxiliar (caux) y filamentos auxiliares de la ampolla (fa). (d) Ejemplar femenino BG-312, en el cual se observa el cistocarpo y se indican las carposporas (csp), el pericarpo (pc), el gonimoblasto inicial (gi), la célula del gonimoblasto (cg) y la célula fusión (cf). Escalas de las figuras (a,b,c,d): 50  $\mu$ m

#### 5.4.2 *Cryptonemia limensis* (Kützing) Lewis

**Descripción:** Talo laminar de contorno orbicular (Fig. 13a,b), alcanza hasta 24 cm de altura, de color rosado o rojo intenso, ausencia de estípites. La lámina principal es corta, de base cuneada, de margen entero y ondulado, se divide hasta 5 lóbulos en su extremo distal y lateral. Los lóbulos son palmado-cuneados, de base angosta de hasta 1.8 cm que se expande hasta alcanzar de 7 cm en su parte más ancha, de ápice redondeado, de borde entero y crenulado.

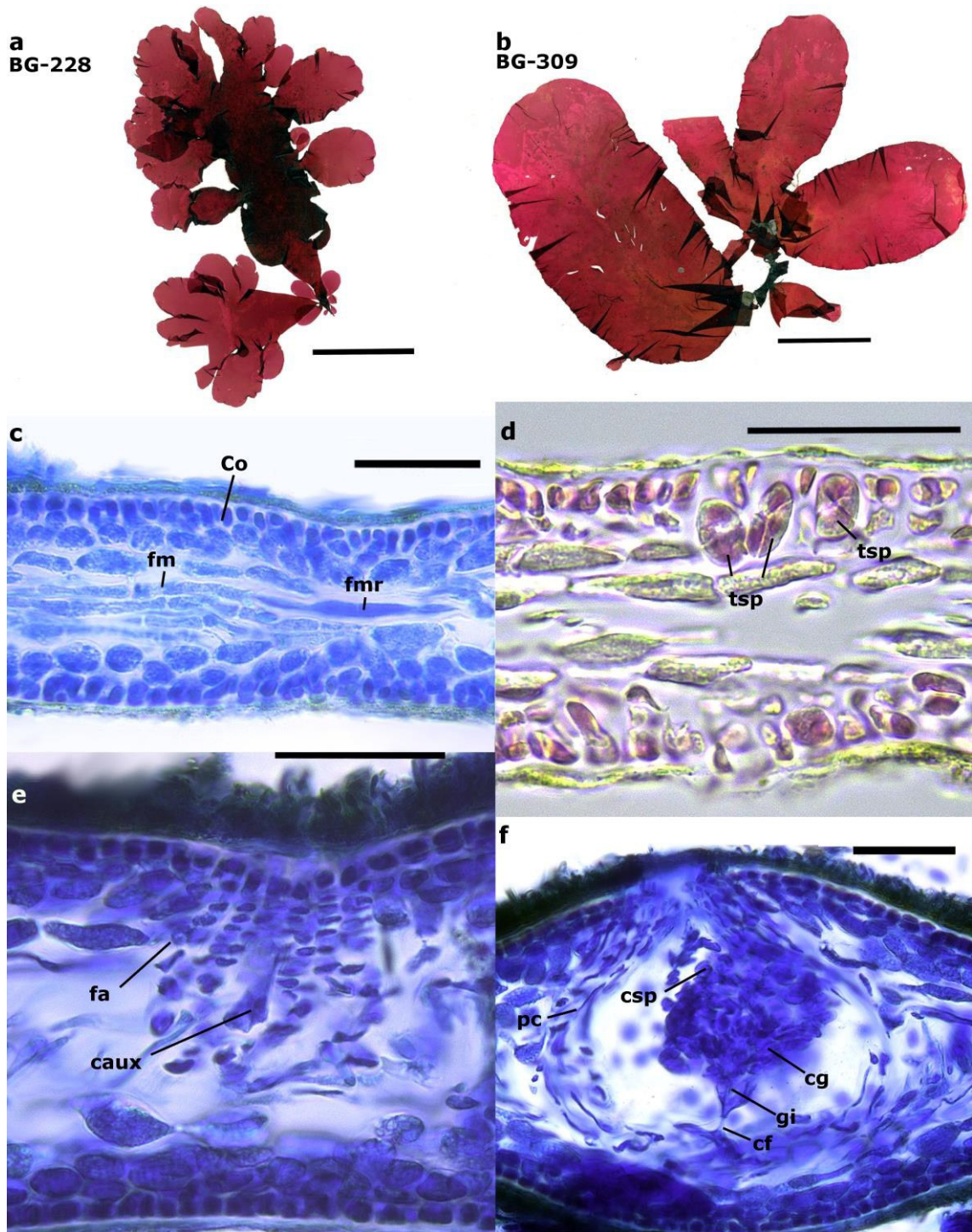
El grosor del talo alcanza los 48-102  $\mu\text{m}$  de ancho, en sección transversal la corteza está compuesta de 3-4 capas, las más internas ovoides o alargadas, maciformes, con abundante contenido granular. La médula estrecha está compuesta de filamentos ramificados, de células alargadas unidas por sus extremos, generalmente orientados periclinalmente, algunas filamentos medulares contienen material refractivo denso (Fig. 13c).

La ampolla de la célula auxiliar (Fig. 13e) consta de un filamento principal de 12-13 células y de 3-4 filamentos secundarios de 6-8 células. La célula auxiliar alcanza un tamaño de 8  $\mu\text{m}$ . El cistocarpo maduro, está rodeado de un pericarpo bien definido y llega a medir 242  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 13f).

El individuo tetrasporofítico (Fig. 13b) es parecido morfológicamente al individuo gametofítico femenino (Fig. 13a), siendo el tetrasporangio de aproximadamente 15.1  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig. 13d), dividido cruciadamente.

**Observaciones:** Los especímenes colectados en este estudio presentan características externas e internas similares a lo descrito para *C. limensis* en Acleto y Zúñiga (2011), tales como la ausencia de estípites y un talo dividido hasta en 5 lóbulos en su extremo distal y lateral, de margen ondulado. Los registros para esta especie son Ancón y Callao (Lima). En este trabajo se reporta su presencia para la Bahía de San Nicolás, Nazca (Ica).

**Material estudiado:** La Punta, Callao, 12° 4' 9,509" S, 77° 9' 48,401" O (BG-220, BG-228, BG-307). Bahía San Nicolás, Nazca, 15° 15' 7,209" S, 75° 13' 14,830" (BG-222, BG-305, BG-309).



**Figura 13.** Hábito y estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de *Cryptonemia limensis*. (a) Ejemplar femenino BG-228. (b) Ejemplar tetraspórico BG-309. (c) Sección transversal del ejemplar BG-220, donde se observan: la corteza (Co), los filamentos medulares (fm) y los filamentos medulares con material refringente (fmr). (d) Sección transversal del ejemplar tetraspórico BG-309, donde se muestran: los tetrasporangios cruciados (tsp) en la zona cortical. (e) Sección transversal del ejemplar femenino BG-228, donde se señalan: la ampolla de la célula auxiliar (caux) y los filamentos auxiliares de la ampolla (fa). (f) Sección transversal del ejemplar femenino BG-228, donde se observa el cistocarpo y se señalan: las carposporas (csp), el pericarpo (pc), célula de fusión (cf), gonimoblasto inicial (gi) y célula del gonimoblasto (cg). Escalas de las figuras (a,b): 5cm, (c,d,e,f): 50  $\mu$ m

### 5.4.3 *Cryptonemia obovata* J.Agardh

**Descripción:** Talo de coloración roja que alcanza 9-25 cm de altura, que se origina de un disco de fijación pequeño. Uno o varios estípites delgados de 0.9 cm de largo se expanden a una lámina simple o dividida dicotómicamente, lanceoladas a oblongas. Las láminas muchas veces originan proliferaciones a partir de las terminaciones mutiladas, con un ápice redondeado y márgenes enteros (Fig. 14a).

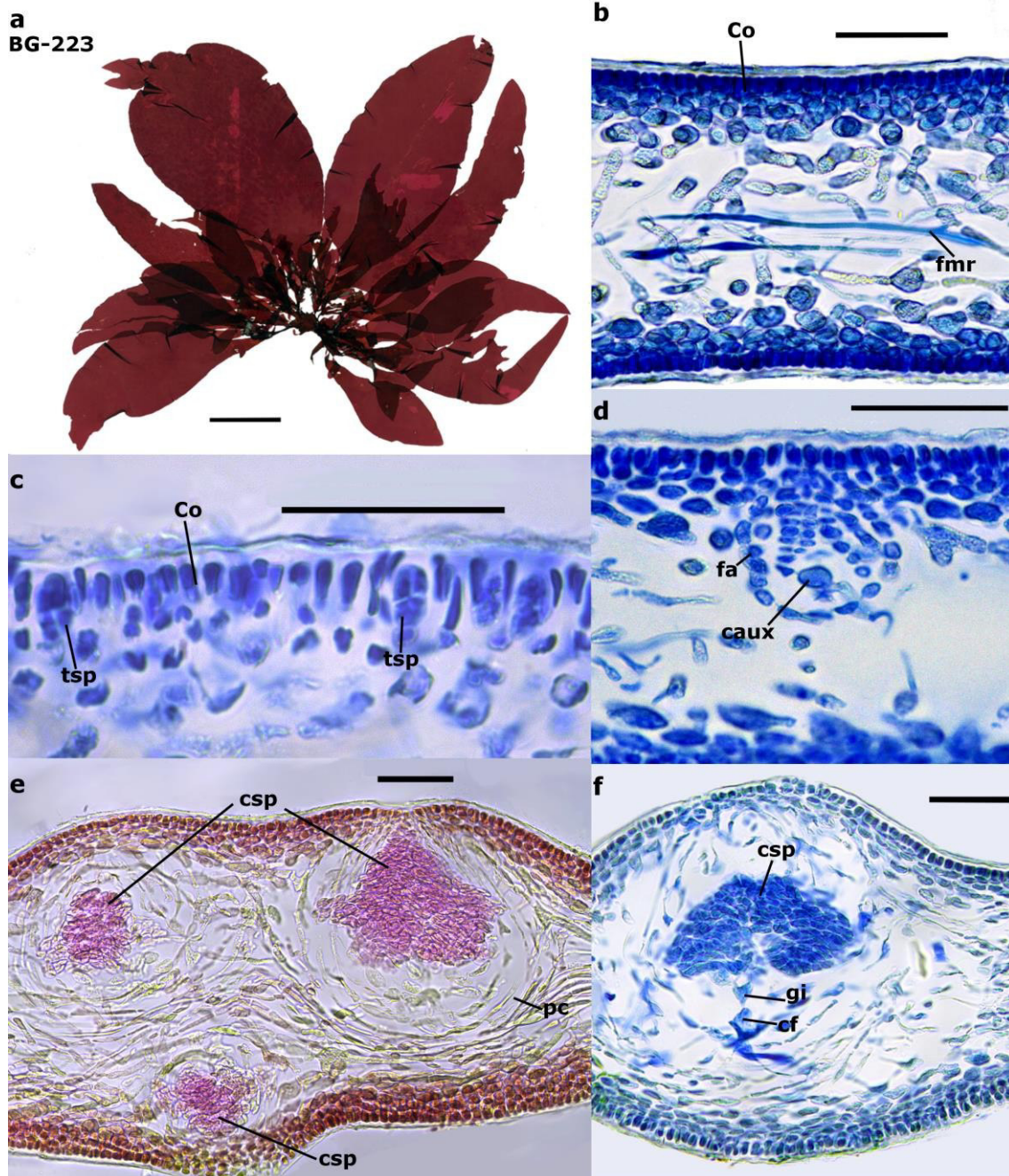
En una sección transversal de 90-177  $\mu\text{m}$  de ancho, la corteza consta de 3 a 4 capas de células. La médula presenta gran variación en el número de filamentos, direccionados oblicua u periclinalmente, presentando filamentos con contenido denso refringente (Fig. 14b).

En el sistema reproductivo femenino, la rama carpogonial y la célula auxiliar se localizan en ampollas separadas. La ampolla de la célula auxiliar se encuentra conformada de un filamento primario de 10–12 células ovoides con 4 o 5 filamentos secundarios de 4–9 células, la célula auxiliar es muy notoria de 8-21  $\mu\text{m}$  (Fig. 14d). El cistocarpo maduro alcanza 266  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin pericarpo definido de células alargadas y sin ostiolo (Fig. 14e,f).

Los individuos tetrasporofíticos presentan tetrasporangio cruciados, ovoides, orientados hacia la superficie, de 14  $\mu\text{m}$  de longitud, dispersos en la corteza (Fig. 14c).

**Observaciones:** El análisis molecular de secuencias *rbcL* realizadas en especímenes de la costa central del Perú se aproxima a las especies *C. borealis* y *C. obovata* que se distribuyen en las costas de los Estados Unidos, Pacífico Este (Guiry & Guiry 2018). Morfológicamente los ejemplares se aproximan a *C. obovata*, aunque no se observaron las proliferaciones marginales mencionadas por Acleto (1973).

**Material estudiado:** Paracas, Ica 14°02'48.3"S, 76°15'49,8"W (BG-217, BG-225, BG-282, BG-311). Bahía San Nicolás, Nazca, 15°15'7.209"S, 75°13'14,830"W (BG-221, BG-223, BG-229, BG-230).



**Figura 14.** Hábito y estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de *Cryptonemia obovata*. (a) Ejemplar femenino BG-223. (b) Sección transversal del ejemplar femenino BG-229, donde se muestran los filamentos medulares con material denso refringente (fmr) y la corteza (Co). (c) Sección transversal del ejemplar tetraspórico BG-217, donde se señalan los tetrasporangios cruciados (tsp) en la zona cortical (Co). (d) Sección transversal del ejemplar femenino BG-229, donde se señalan la ampolla de la célula auxiliar (caux) y filamentos auxiliares (fa). (e) Sección transversal del ejemplar femenino BG-225, donde se observan los cystocarpi y se indican las carposporas y el pericarpo (pc) de un carposporofito. (f) Sección transversal del ejemplar femenino BG-311, en el cual se señalan la célula de fusión (cf), gonimoblasto inicial (gi) y carposporas (cps). Escala de las figuras (a): 5 cm, (b,c,d,e,f): 50  $\mu$ m.



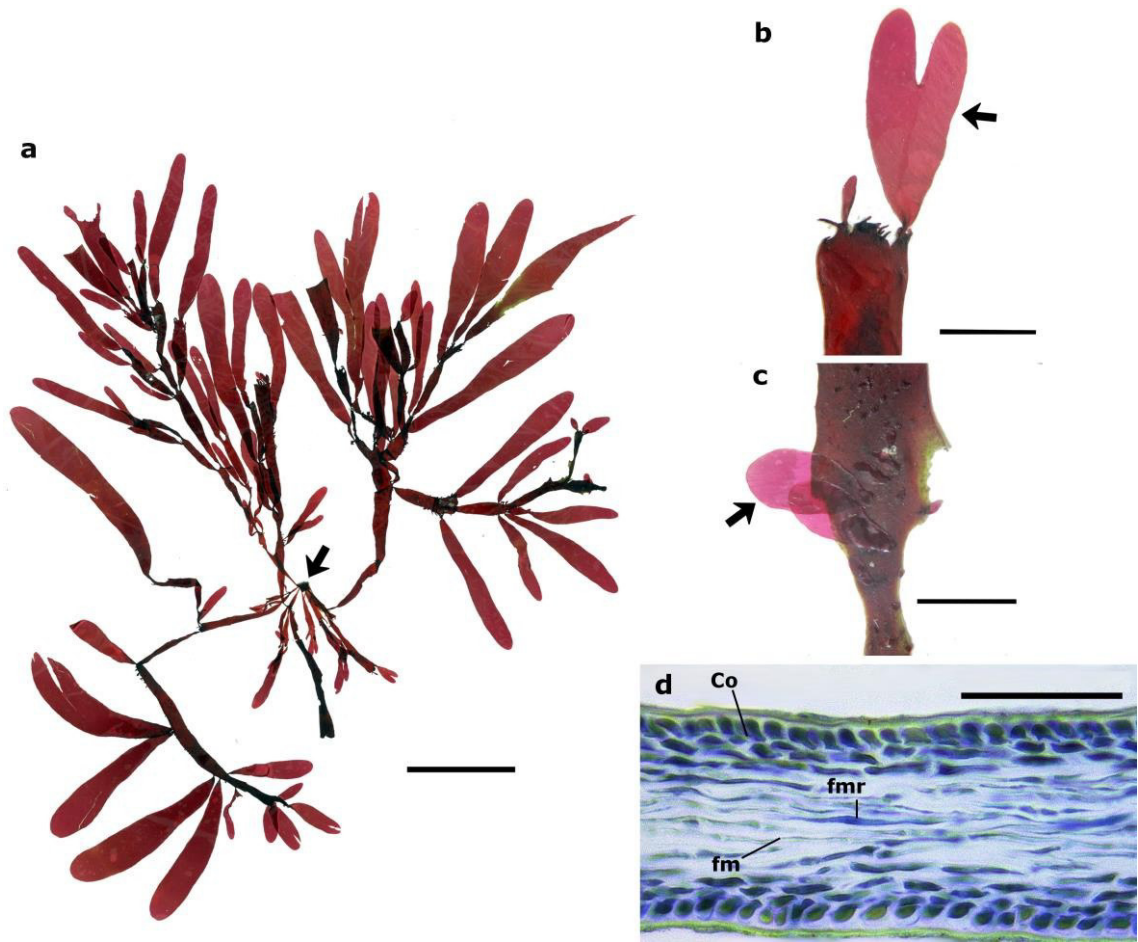
#### 5.4.4 *Cryptonemia* sp.1

**Descripción:** Talo laminar de 24.6 cm de altura y 0.6 cm de ancho, con estípites cortos de 0.3 cm. A partir de la lámina principal angosta crecen laminas secundarias también angostas, estas pueden presentar una hendidura (Fig. 15b), con margen crenulado, entero en los ápices. De los bordes y de la superficie surgen pequeñas lígulas, de base ligeramente angosta, de ápice redondeado (Fig. 15a,c).

En una sección transversal del talo, de 47-78  $\mu\text{m}$  de espesor, se observa una zona cortical que consta de 3-4 capas de células, las dos más externas redondeadas a cilíndricas, fotosintéticas, las más internas ovoides, alargadas en sus extremos. La zona medular está constituida por pocos a muchos filamentos orientados periclinamente u oblicuamente, algunas secciones con contenido denso refringente (Fig. 15d).

**Observaciones:** Solo se encontró un espécimen en estado vegetativo, que se asemeja morfológicamente a *C. angustata*, sin embargo debido a la plasticidad de esta especie no se puede confirmar la identidad del espécimen (Anexo 5)

**Material estudiado:** Paracas, Ica 14°02'48,3"S, 76°15'49,8"W (BG-224).



**Figura 15.** Hábito y estructuras vegetativas de *Cryptonemia* sp. 1. (a) Ejemplar vegetativo BG-224, donde se señala el disco de fijación. (b) Detalle de las proliferaciones en el margen del talo, se indica la lámina hendida. (c) Porción del talo donde se observan las láminas secundarias que crecen sobre la superficie del talo. (d) Sección longitudinal del talo donde se señalan la corteza (Co), los filamentos medulares (fm) y filamentos medulares con material refringente (fmr). Escalas de las figuras (a): 5 cm, (b,c): 0.5 cm, (d): 50  $\mu$ m

#### 5.4.5 *Cryptonemia* sp. 2

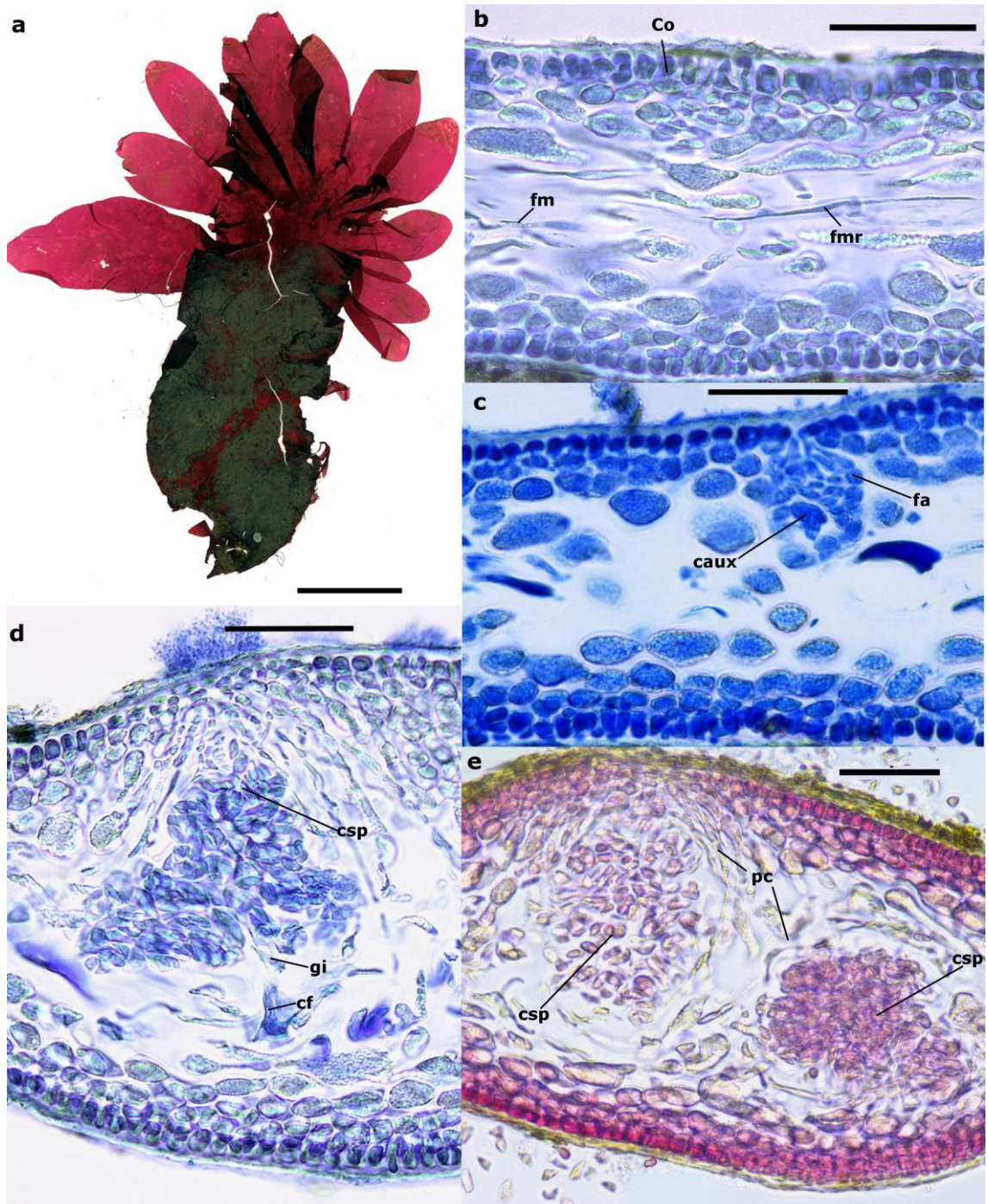
**Descripción:** Presenta un talo laminar que llega a medir 27 cm de alto, cerca a la base el contorno es orbicular, de margen crenado a entero en las partes más jóvenes. Presenta proyecciones oblongos en la parte superior de la lámina, con un ápice obtuso a redondeado (Fig. 16a).

En una sección transversal del talo de 107-134  $\mu$ m de ancho, la corteza está compuesta de 4 capas, las más internas ovoides o alargadas maciformes, con abundante contenido granular. La médula está compuesta de filamentos ramificados, de células alargadas unidas por sus extremos, generalmente orientado periclinamente, algunas células del filamento medular contiene material refractivo denso (Fig.16b).

En individuos reproductivos femeninos, la ampolla de la célula auxiliar (Fig. 16c) es de forma cónica y consta de un filamento principal de 10–13 células y de 3–4 filamentos secundarios de 6–8 células. La célula auxiliar alcanza un tamaño de 11  $\mu\text{m}$ . El cistocarpo maduro, está rodeado de un pericarpo bien definido y llega a medir 242  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 16d,e).

**Observaciones:** El espécimen femenino se encuentra incompleto, debido a que no se observa un disco de fijación, ni estipite. No se aproxima a las especies reportadas para Perú.

**Material estudiado:** Bahía San Nicolás, Nazca, 15°15'7,209"S, 75°13'14.830"W (BG-309).



**Figura 16.** Hábito y estructuras vegetativas y femeninas de *Cryptonemia* sp. 2. (a) Ejemplar femenino BG-308. (b) Sección transversal del talo, donde se señalan la corteza (Co), los filamentos medulares (fm) y con material refringente (fmr). (c) Sección transversal del talo, donde se observan la ampolla de la célula auxiliar (caux) y los filamentos auxiliares (fa). (d) Sección transversal del talo, donde se observa el cistocarpo y señalan las carposporas (csp), el gonimoblasto inicial (gi) y la célula de fusión (cf). (e) Sección transversal del talo, donde se observan los cistocarpos y se indican el pericarpo (pc) y las carposporas (csp). Escalas de las figuras (a): 5cm, (b,c,d,e): 50  $\mu$ m.

## 6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Problemática del género *Cryptonemia* dentro de la familia Halymeniaceae

*Cryptonemia* forma parte del grupo de “algas rojas foliosas” y junto con miembros de otras familias como Delesseriaceae, Dumontiaceae, Gigartinaceae, Kallymeniaceae, Schyzymeniaceae, se constituyen en taxones muy difíciles de diferenciar a simple vista, por lo que para distinguirlos se deben considerar un conjunto de caracteres morfológicos externos, como la forma, tamaño, color, textura, proliferaciones e internos como el número de capas de células que conforman la corteza, medula laxa o compacta, presencia o ausencia de células con material refractivo.

Aun así, en la circunscripción de *Cryptonemia* se debe tomar en cuenta que algunas características que pueden ser comunes con otros géneros de la misma familia (Halymeniaceae). Es decir, especies de *Halymenia* y *Carpopeltis* pueden presentar un hábito similar a algunas especies del género *Cryptonemia*. Lo mismo sucede con especies de *Halymenia*, *Thamnoclonium* y *Codiophyllum*, que poseen internamente filamentos medulares con contenido refringente (Chiang 1970, Womersley & Lewis 1994), un carácter propio del género *Cryptonemia* y que fuera señalado por Abbott (1967). A nivel de género se deben considerar aspectos reproductivos, *Cryptonemia* se distingue por el tipo de ampolla, tipo *Cryptonemia*, por lo que se requiere de ejemplares femeninos, para una identificación adecuada. Otra característica resaltante es el desarrollo de los filamentos de la ampolla de la célula auxiliar, que en el tipo *Cryptonemia* presentan filamentos auxiliares hasta de cuarta orden (Chiang 1970), que permiten discernir entre los géneros *Cryptonemia* y *Halymenia*.

### Conocimiento actual de las especies de *Cryptonemia* de la costa central del Perú

A lo largo de la costa central del Perú, se encuentran reportadas seis de un total de ocho especies del género *Cryptonemia*, *C. angustata*, *C. anconensis*, *C. chinchensis*, *C. limensis*, *C. lobata* y *C. obovata*. Los principales trabajos que tratan acerca estas especies peruanas de *Cryptonemia* están basados en la descripción morfológica externa e interna, así como el reporte de especies, desde Dawson et al. (1964) a Lewis (1990). Solamente en *C. limensis* (antes *C. peruviana*) y *C. chinchensis*, han sido descritas estructuras gametofíticas femeninas (Acleto 1973), en las demás especies se ha evaluado principalmente material tetrasporofítico, debiendo revisarse algunos problemas nomenclaturales. Por ejemplo,ACLETO y ZÚÑIGA (2011) hicieron referencia a especies de *Cryptonemia* cuando realizaron la revisión de especies peruanas del género *Sebdenia*, incluyendo en su estudio material tipo y herborizado colectado en Perú,

determinando una nueva especie, *Cryptonemia anconensis*, así como la transferencia de cinco especies de *Sebdenia* a *Cryptonemia*. Los autores mencionados, llegan a esa conclusión debido a que los especímenes revisados y el holotipo de *Chrysomenia lobata* presentaban caracteres propios del género como: “corteza con 2 a 3 hileras de células fotosintéticas pequeñas, médula filamentosa con algunos filamentos engrosados de contenido refringente y esporangios divididos cruzadamente” (Acleto y Zúñiga 2011, p:98). En esta publicación, *Cryptonemia anconensis* fue propuesta como especie nueva, reconociendo como sinónimo al holotipo *Chrysomenia lobata* Howe e incluyendo a los ejemplares identificados como *Sebdenia limensis* (Sonder) Howe (Dawson 1964).

Sin embargo, Santelices et al. (1989), revisaron especímenes colectados en Antofagasta, Chile y al holotipo *Chrysomenia lobata* que proviene de Ancón, Perú y propusieron la combinación *Cryptonemia lobata* (Howe) M.E.Ramírez, por lo que *Chrysomenia lobata* pasa a ser el basónimo de *Cryptonemia lobata*. Aunque enACLEto y Zúñiga (2011) mencionan que no se trata de la misma especie ya que *C. lobata* morfológicamente difiere de *C. anconensis* debido a que la primera, descrita por Santelices et al. (1989) son ejemplares que “alcanzan 35 cm de alto y 20 cm de ancho, o más de 50 cm de alto y 30 cm de ancho, de 60–120 µm en sección transversal, talo rojo púrpura de textura firme y gruesa” y también porque “no citan ningún ejemplar peruano además del holotipo” (Acleto y Zúñiga 2011, p:101). Sin embargo, estos caracteres no serían suficientes para determinar que son diferentes, ya que presentan alta variabilidad debido a la plasticidad fenotípica del grupo (Abbott 1967, D’ Archino et al. 2014). Por lo tanto, nos llevaría a considerar que *Cryptonemia lobata* (antes *Chrysomenia lobata*) es el nombre válido y *C. anconensis* sería el sinónimo, debido a que la publicación de *C. lobata* fue anterior (Turland et al. 2018), o de realizar estudios morfológicos y moleculares para demostrar la existencia de *C. anconensis*.

### **Estudios en *Cryptonemia* que incluyeron el uso de herramientas moleculares**

Estudios realizados en el género *Cryptonemia*, que incluyan el uso de herramientas moleculares aunado al análisis morfológico, son muy pocos y la mayoría hacen uso del gen cloroplastidial *rbcL*, que ha servido para análisis filogenéticos así como la determinación de códigos de barras, razón por la cual se consideró el uso del marcador molecular *rbcL* para este trabajo. Estas aproximaciones han dado como resultado la propuesta de nuevas especies como el caso de *C. asiática* (Yang & Kim 2014), el reporte de especies como por ejemplo *C. rotunda* para Corea (Kim et al. 2012). En taxones reportados para Perú, estudios moleculares han resultado en cambios nomenclaturales,

como la transferencia de *C. lapathifolia* al nuevo género *Mariaramirezia*, con el nombre específico *M. lapathifolia* (Calderón et al. 2014a). En el trabajo de tesis de Calderón (2017), se generaron dos secuencias *rbcl* de especímenes identificados como *C. anconensis*, sin embargo, estas dos secuencias no se encuentran disponibles, pero puede observarse en el árbol filogenético que se agrupa con *C. borealis* (Calderón, 2017, fig. 19). Recientemente Schneider et al. (2018), describieron cinco nuevas especies de *Cryptonemia* para Las Bermudas (océano Atlántico occidental), lo cual podría indicar un *hotspot* de biodiversidad para este género en esa región, en la revisión los autores mencionados emplearon dos marcadores: nuclear (LSU) y cloroplastidial (*rbcl*). En el presente trabajo, todos los árboles de similaridad y filogenéticos obtenidos con los métodos de matriz de distancias de caracteres (*Neighbor-Joining*, máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana), muestran en el mismo clado a los especímenes peruanos determinados en este estudio como *Cryptonemia*, confirmando lo hallado con el análisis morfológico externo e histológico, la presencia en Perú de *C. anconensis*, *C. limensis* y *C. obovata*, además de dos especies indeterminadas, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2.

### **Análisis de los resultados moleculares y morfológico-anatómico**

En nuestro análisis molecular de secuencias *rbcl*, los valores de las distancias interespecíficas en la familia Halymeniaceae, así como las relaciones filogenéticas se aproximan a lo ya expuesto en otros trabajos (Calderón et al. 2014a, Calderón et al. 2014b, Tan et al. 2015, De Azevedo 2016, De Azevedo et al. 2016a), y mostrando que las especies del género *Cryptonemia* conforma un grupo no monofilético. La formación de varios grupos para el género *Cryptonemia* puede deberse al uso de secuencias erróneamente identificadas, como lo señala Vilgalys (2003) sobre el problema creciente de identificaciones taxonómicas incorrectas en las bases de datos de ADN que son de uso público. Por este motivo, en el presente estudio solo se consideraron las especies de *Cryptonemia* que conformaban un grupo monofilético y se encontraba reunidas con *C. lomation* (especie tipo del género *Cryptonemia*), excluyendo del análisis las secuencias de GenBank que se alejaron de este clado.

### ***Cryptonemia anconensis***

Los ejemplares asignados a *C. anconensis*, en este estudio, presentaron las características externas de la forma del talo y estructuras internas que mencionan Acleto y Zúñiga (2011) para la especie, siendo la mayoría de ejemplares analizados muy

semejantes al holotipo de *C. anconensis* (Fig. 3b). El análisis molecular indicó que tres de los cuatro ejemplares (Fig. 6a, b, d) que habían sido asignados a la morfoespecie *Cryptonemia* sp.2 se adicionaran al grupo *C. anconensis* (Fig.6a, b, d). Esto evidenció que *C. anconensis* presenta una gran variabilidad en la forma del talo, que en los ejemplares colectados se observaban, talos de contorno oblongo u lanceolado, algunas compuestas de una lámina primaria con o sin proyecciones digitadas, estípites cortos o muy reducidos, margen liso entero o dentado, proliferaciones marginales dentiformes con o sin constricción en su base, proliferaciones que crecen en los bordes de las láminas. A pesar de las diferencias de hábito, los análisis moleculares agruparon con un alto soporte a estos ejemplares en un solo clado, y en todas las metodologías utilizadas (máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana). La especie *C. anconensis* se encontraba reportada previamente para el litoral de Ancón, Callao y Pucusana, de la región Lima y en este trabajo se añaden a Paracas y Bahía de San Nicolás, ambas de la región Ica. Como hasta el momento se consideran ambos nombres nomenclaturales válidos, *C. anconensis* y *C. lobata*, para este trabajo se considera el nombre *C. anconensis*, debido a que se requiere un trabajo más completo que incluya la revisión de ejemplares chilenos y del holotipo de *C. anconensis* (Fig. 3b).

### ***Cryptonemia limensis***

*Cryptonemia limensis* ha sido reportada para la costa peruana y brasileña. Esta especie fue descrita por Lewis (1990), incluyendo a *C. peruviana*, especie descrita por Acleto (1973). Luego, Acleto y Zúñiga (2011) en su revisión del género *Sebdenia*, reafirman el estatus taxonómico de *C. limensis*. Esta especie, de fácil reconocimiento debido a su morfología externa característica, puede confundirse con la especie *C. chinchensis*, pero esta última presenta una textura más gruesa y cuenta con un estípite. Los especímenes, colectados y reconocidos como *C. limensis* en este trabajo (Fig. 5), presentaron un talo orbicular, dividido hasta en 5 lóbulos en su extremo distal y lateral, de forma palmado-cuneados, de base angosta, ausencia de estípites en todos los casos. En el análisis molecular los individuos permanecieron juntos en un clado con un alto soporte en todas las metodologías. Y al igual que *C. anconensis*, se incluyeron especímenes de la localidad tipo: Callao.

### ***Cryptonemia obovata***

*Cryptonemia obovata* fue reportada para Perú por Acleto (1973), se encuentra ampliamente distribuida en la zona del Pacífico, esta especie comparte ciertas



características morfológicas con las especies *C. angustata* y *C. borealis* Kylin. La primera especie fue descrita por Dawson (1954) y fue reportada por Dawson (1964) para Perú (Anexo 5), con especímenes que llegaron a los 14 cm de altura, de consistencia membranosa, y formado de uno o varios estípites muy delgados, láminas oblanceolados de un disco de fijación pequeño, expandiéndose a una simple lámina, a veces dicotómicamente, generando proliferaciones desde las terminaciones mutiladas, con un ápice redondeado y márgenes enteros. Por otro lado, *C. borealis* se encuentra reportada para las costas del Estados Unidos y China, esta especie llega hasta 16 cm de alto, presenta un talo membranoso, palmados frecuentemente, pero dividido en varias formas, cada lamina simple u obovada, o irregularmente dividida o hendida, márgenes crenulados, o con proliferaciones (Abbott 1967, Abbott & Hollenberg 1992). Para diferenciar entre las tres especies, *C. angustata*, *C. borealis* y *C. obovata*, Abbott (1967) sugiere tomar en cuenta el grosor del talo, que es hasta dos veces más en *C. obovata*, pero esto no es seguro ya que es un carácter considerado homoplásico (Wang et al. 2001). Además, Guiry y Guiry (2018), incluyendo a una tercera especie, *Cryptonemia hibernica* Guiry & L.M.Irvine, mencionan que “los caracteres morfológicos serían insuficientes como para distinguir entre estas cuatro especies”. Los ejemplares, incluidos en la presente tesis, y asignados a *Cryptonemia obovata* presentaron características dadas para la especie, externamente tales como el talo aovado y dividido en varios lóbulos o láminas secundarias, enteras, con margen crenulado, aovadas o lanceoladas e internamente con un mayor grosor (hasta dos veces más) en sección transversal que los otros taxa. Las secuencias *rbcl* generadas se asocian a secuencias de localidades de los Estados Unidos, nombradas como *C. borealis* y *C. obovata*.

### **Especies no determinadas de *Cryptonemia***

Análisis morfológicos y moleculares indican la presencia, en la costa central de Perú, de dos especies no reconocidas, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2. Un solo ejemplar en estado vegetativo representa a *Cryptonemia* sp. 1 (BG-224). Esta especie se diferencia principalmente por presentar láminas secundarias que surgen de una lámina principal, todas con un ancho de hasta 0.6 cm y un largo de hasta 24.6 cm, además de un ápice muy redondeado y borde crenulado que la diferencian de *C. anconensis* y *C. limensis*. Aunque *Cryptonemia* sp. 1 se aproxima morfológicamente a algunas formas de *C. obovata* y *C. angustata* (Anexo 5, figura b), se distingue de la primera por ser más delgada en una sección transversal, llegando solo a 78  $\mu$ m, además se diferencia de *C. angustata* al no presentar la lámina dividida dicotómicamente (Dawson 1954). Ambas

especies *C. angustata* y *C. obovata* suelen presentar laminas que luego se van expandiendo volviendo más anchas, sin embargo el ejemplar estudiado en esta tesis, presenta laminas lanceoladas y delgadas con un ápice redondeado. Debemos señalar que, aunque el análisis molecular reúne la secuencia de *Cryptonemia* sp. 1 en un solo clado con *C. limensis*, *C. anconensis* y *Cryptonemia* sp. 2, con alto soporte (lo cual indicaría que se trate de una sola especie y que las que se encuentran en ese mismo clado sean variedades), *Cryptonemia* sp. 1 no se asemeja morfológicamente con ninguna de ellas. Para lograr una definición de la especie es necesario realizar más colectas, reconocer el morfotipo e incluirlo en los análisis. Por otro lado, *Cryptonemia* sp. 2 (BG-308) está conformada por un solo ejemplar femenino. Inicialmente se pensó que podría tratarse de la especie *C. limensis* pero existen diferencias en el tamaño, coloración, grosor, además de presentar unas proyecciones, oblanceoladas, con ápices obtusos u redondeados. Como en el caso anterior, *Cryptonemia* sp. 1, contar con ejemplares únicos hace difícil la determinación específica, siendo necesaria la colecta de más especímenes con el mismo morfotipo.

### **Consideraciones finales**

Aunque nuestra revisión de *Cryptonemia* a lo largo de la costa central peruana contribuye a una actualización del estado de este género, también reafirma la necesidad de un estudio más exhaustivo de *Cryptonemia* en todo el litoral peruano. La identificación morfológica de estas tres especies *C. anconensis*, *C. limensis* y *C. obovata*, se ha podido realizar debido a las características distintivas del talo en las dos primeras, y aunque *C. obovata* presenta una gran variabilidad en su morfología, se pudo contar con una secuencia *rbcl* de *C. borealis* y *C. obovata*, lo que nos aproximó a su determinación. Del mismo modo es necesaria la revisión de los problemas nomenclaturales entre *C. anconensis* y *C. lobata* ya que ambas figuran como el nombre actual y válido del holotipo de *Chrysymenia lobata*. Además se requiere la revisión de las especies *C. obovata* y *C. angustata* ya que claramente presentan insuficientes caracteres para diferenciarlas. Tampoco se tienen registros actuales de *C. angustata*, *C. chinchensis*, *C. latissima* y *C. heteronema*, ni han sido estudiadas secuencias de ADN de estas especies.

Otro aspecto que debe tomarse en cuenta, es que la definitiva identificación del género *Cryptonemia* en muchos casos se ve impedida debido a los pocos individuos reproductivos (gametofitos y esporofitos) colectados, lo cual no permite diferenciar apropiadamente a los géneros de Halymeniaceae y que implicaría un mayor esfuerzo

de colecta. También, no se ha realizado el estudio de estructuras reproductivas femeninas y las etapas de desarrollo del carposporófito. A lo anterior se suma la ausencia de estas especies en la localidad tipo, como Las Islas Chincha (Ica), para *C. chinchensis*, Bahía de Sechura (Piura) para *C. heteronema*. Por último, para un mejor conocimiento de *Cryptonemia* deben realizarse colectas en las localidades que no han sido abarcadas en este estudio, como Sechura (Piura) donde han sido reportadas *C. latissima* y *C. heteronema*. Además de incluir otros marcadores mitocondriales o nucleares, ya que como se han observado en otros trabajos (De Azevedo 2016, Schneider 2018), el valor del soporte de los nodos aumenta, dilucidando mejor las relaciones filogenéticas.

## 7 CONCLUSIONES

1. La taxonomía de las especies del género *Cryptonemia* de la costa central del Perú, no se ve reflejada en los análisis moleculares.
2. Los análisis morfológicos y moleculares de secuencias *rbcl* muestran la presencia de cinco especies *Cryptonemia*, tres especies reconocidas, *C. anconensis*, *C. limensis* y *C. obovata*, y dos especies no determinadas, *Cryptonemia* sp. 1 y *Cryptonemia* sp. 2.
3. Es necesario el uso de otros marcadores moleculares (cloroplastidiales y nucleares) para poder dilucidar mejor las relaciones filogenéticas de las especies estudiadas. Además de la revisión de los holotipos de cada especie.
4. Las secuencias obtenidas en este trabajo contribuyen a la biblioteca del código de barras del Perú, la que se encuentra respaldada por una colección científica de referencia.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott I. A. & G. J. Hollenberg. 1992. *Marine algae of California*. Stanford University Press. 1-843.
- Abbott I. A. 1967. Studies in some foliose red algae of the Pacific coast. I. Cryptonemiaceae. *Journal of Phycology* 3 (3): 139-49. doi:10.1111/j.1529-8817.1967.tb04648.x.
- Acleto C. & R. Zúñiga. 2011. Revisión de las especies peruanas de *Sebdenia* (Sebdeniales, Rhodophyta) y descripción de *Cryptonemia anconensis* sp. nov. (Halymeniales, Rhodophyta). *Revista Peruana de Biología* 18 (1): 97-112. doi:10.15381/rpb.v18i1.167.
- Acleto C. 1988. Aspectos fitogeográficos y taxonómicos de las algas marinas del Perú. *Gayana Botánica* 45: 143-146.
- Acleto C. 1973. *Las Algas Marinas del Perú*. Boletín de la Sociedad Peruana de Botánica 6: 1-164.
- Agardh J.G. 1876. *Species genera et ordines algarum*. C.W.K. Gleerup. Lund. 3(1):1-724.
- Agardh J. G. 1851. *Species genera et ordines algarum*. C.W.K. Gleerup. Lund 2(1): 1-351.
- Agardh J.G. 1842. *Algae maris Mediterranei et Adriatici, observationes in diagnosis specierum et dispositionem generum*. Fortin, Masson: Paris. 1-164.
- Arakaki N., Schmidt W. E., Carbajal P. & S. Fredericq. 2015. First occurrence of *Gracilaria chilensis*, and distribution of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariaceae, Gracilariales) in Peru on the basis of *rbcl* sequence analysis. *Phytotaxa* 208(2): 175-181.
- Boo G. H., Park J. K., Gerung G. S. & S. M. Boo. 2013. Transfer of the red alga *Gelidium zollingeri* Sonder (Gelidiales) to *Yonagunia* (Halymeniales) based on morphological and molecular evidence. *Phycologia* 52(3): 279-287.
- Bustamante D. E., Won B. Y. & T. O. Cho. 2013. *Neosiphonia ramirezii* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from Peru. *Algae* 28(1): 73-82.

- Bustamante D. E., Won B. Y., Ramírez M. E. & T. O. Cho. 2012. *Neosiphonia peruviana* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Pacific coast of South America. *Botanica Marina* 55(4): 359-366.
- Calderón M. S. 2017. Filogenia molecular de algunas algas marinas rojas del Perú basada en análisis de ADN plastidial. Tesis Bachiller. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1-276.
- Calderón M. S. & S. M. Boo. 2017. The Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) from Peru with descriptions of *Acletoa tarazonae* gen. & sp. nov. and *Gymnogongrus caespitosus* sp. nov. *Phycologia* 56(6): 686-696.
- Calderón M. S. & S. M. Boo. 2016b. A new genus *Phyllophorella* gen. nov. (Phylloporaceae, Rhodophyta) from central Peru, including *Phyllophorella peruviana* comb. nov., *Phyllophorella humboldtiana* sp. nov., and *Phyllophorella limaensis* sp. nov. *Botanica Marina* 59(5): 339-352.
- Calderón M. S. & S. M. Boo. 2016a. Phylogeny of Phylloporaceae (Rhodophyta, Gigartinales) reveals *Asterfilopsis* gen. nov. from the southern hemisphere. *Phycologia* 55(5): 543-554.
- Calderón M. S., Boo G. H. & S. M. Boo. 2014b. *Neorubra decipiens* gen. & comb. nov. and *Phyllymenia lancifolia* comb. nov. (Halymeniales, Rhodophyta) from South America. *Phycologia* 53(5): 409-422. doi:10.2216/14-027.1.
- Calderón M. S., Boo G. H. & S. M. Boo. 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. doi:10.2216/13-158.1.
- Cao C., Liu M., Guo S., Zhao D., Luan R. & H. Wang. 2016. *Grateloupia ramosa* Wang & Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a new species from China based on morphological evidence and comparative *rbcL* sequences. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 34(2): 283-294.
- Chiang Y. 1970. Morphological Studies of Red Algae of the Family Cryptonemiaceae. *University of California Press*. 58: 1-95.
- Clarkston B. E. & G. W. Saunders. 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(2): 119-131. doi:10.1139/B09-101.

Coddington J.A., Agnarsson I., Cheng R.C., Candek K., Driskell A., Frick H., Gregoric M., Kostanjsek R., Kropf C., Kweskin M., Lokovsek T., Pipan M., Vidergar N. & M. Kuntner. 2016. DNA barcode data accurately assign higher spider taxa. *PeerJ*. 4. e2201. doi:10.7717/peerj.2201

D'Archino R., Nelson W. A. & G. C. Zuccarello. 2014. *Amalthea* and *Galene*, two new genera of Halymeniaceae (Rhodophyta) from New Zealand. *Botanica Marina* 57(3): 185-201. doi:10.1515/bot-2014-0008.

Dawson E. Y., Acleto C. & N. Foldvik. 1964. The Seaweeds of Peru. *Beihefte Zur Nova Hedwigia* 13: 1-111

Dawson E.Y. 1954. Marine red algae of Pacific Mexico. Part 2 (cont.). Cryptonemiales *Allan Hancock Pacific Expeditions* 17(2): 241-398.

De Azevedo C. A. A. 2016. Diversidade e filogenia da ordem Halymeniales (Rhodophyta) no litoral do Brasil. Tesis Doctorado. Instituto de Biociencias, Universidad de Sao Paulo. 1-238.

De Azevedo C. A. A., Cassano V. & M. C. Oliveira. 2016b. Phylogenetic relationships among *Halymenia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) species on the Brazilian coast with description of *Halymenia cearensis* sp. nov. *Phytotaxa* 280(3): 241-258.

De Azevedo C. A. A., Cassano V. & M. C. Oliveira. 2016a. Diversity of branched *Halymenia* (Halymeniales, Rhodophyta) species on the Brazilian coast: molecular and morphological analyses reveal three new species. *Phycologia* 55(4): 431-444.

De Clerck O., Gavio B., Fredericq S., Barbara I. & E. Coppejans. 2005b. Systematics of *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence, including the reinstatement of *G. minima* and the description of *G. capensis* sp. nov. *Journal of Phycology* 41(2): 391-410.

De Clerck O., Gavio B., Fredericq S., Cocquyt E., & E. Coppejans. 2005a. Systematic reassessment of the red algal genus *Phyllymenia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 40(2): 169-178.

- Doyle J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Faye E. J., Wang H. W., Kawaguchi S., Shimada S. & M. Masuda 2004. Reinstatement of *Grateloupia subpectinata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) based on morphology and *rbcl* sequences. *Phycological Research* 52(1): 59-67.
- Filloramo G. V. & G. W. Saunders. 2016. Application of multigene phylogenetics and site-stripping to resolve intraordinal relationships in the Rhodymeniales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 52(3): 339-355.
- Fredericq S. & M. H. Hommersand. 2003. Biogeography of the marine red algae of the South African West Coast: a molecular approach. In *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*. Oxford University Press, Oxford. 325-340.
- Freshwater D. W. & J. Rueness. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcl* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33(3): 187-194.
- Gabriel D., Draisma S. G., Sauvage T., Schmidt W. E., Schils T., Lim P. E., Harris D. J. & S. Fredericq 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.
- Gargiulo G. M., Morabito M. & A. Manghisi. 2013. A re-assessment of reproductive anatomy and postfertilization development in the systematics of *Grateloupia* (Halymeniales, Rhodophyta). *Cryptogamie Algologie* 34(1): 3-35. doi:10.7872/crya.v34.iss1.2013.3.
- Gavio B. & S. Fredericq. 2002. *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *European Journal of Phycology* 37(3): 349-359.
- Gavio B., Hickerson E. & S. Fredericq. 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: 38–57.



- Graham L. E., Graham J. M., Wilcox L. W. & M. E. Cox. 2016. *Algae*. LJLM Press. Tercera edición.
- Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. & O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307-321. <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>
- Guiry M. D. & G. M. Guiry. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. < <http://www.algaebase.org/>> acceso: 20/03/2018.
- Guiry M. D. & L. M. Irvine. 1974. A species of *Cryptonemia* new to Europe. *British Phycological Journal* 9(3): 225–237. <https://doi.org/10.1080/00071617400650261>
- Hajibabaei M., Singer G. A., Hebert P. D. & D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23(4):167-172.
- Hebert P. D., Cywinska A., & S. L. Ball. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270(1512). 313-321.
- Hernández-Kantún J. J., Sherwood A. R., Riosmena-Rodríguez R., Huisman J. M. & O. De Clerck. 2012. Branched *Halymenia* species (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Indo-Pacific region, including descriptions of *Halymenia hawaiiiana* sp. nov. and *H. tondoana* sp. nov. *European Journal of Phycology*. 47(4): 421-432.
- Hommersand M. H., Leister G. L., Ramírez M. E., Gabrielson P. W. & W. A. Nelson. 2010. A morphological and phylogenetic study of *Glaphyrosiphon* gen. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta) based on *Grateloupia intestinalis* with descriptions of two new species: *Glaphyrosiphon lindaueri* from New Zealand and *Glaphyrosiphon chilensis* from Chile. *Phycologia* 49(6): 554-573.
- Howe M. A. 1914. *The marine algae of Peru*. Memoirs of the Torrey Botanical Club 15:1-185.
- Huisman J. M., De Clerck O., Prud'homme Van Reine W. F. & M. A. Borowitzka. 2011. *Spongophloea*, a new genus of red algae based on *Thamnoclonium* sect.

- Nematophorae* Weber-van Bosse (Halymeniales). *European Journal of Phycology* 46(1): 1-15.
- Kawaguchi S., Shimada S., Wang H. W. & M. Masuda. 2004. The new genus *Yonagunia* Kawaguchi et Masuda (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *Y. tenuifolia* Kawaguchi et Masuda sp. nov. from southern Japan and including *Y. formosana* (Okamura) Kawaguchi et Masuda comb. nov. from southeast Asia. *Journal of Phycology* 40(1): 180-192.
- Kawaguchi S., Wang H. W., Horiguchi T., Lewis J. A. & M. Masuda. 2002. Rejection of *Sinkoraena* and transfer of some species of *Carpopeltis* and *Sinkoraena* to *Polyopes* (Rhodophyta, Halymeniaceae). *Phycologia* 41(6): 619-635.
- Kawaguchi S., Wang H. W., Horiguchi T., Sartoni G. & M. Masuda. 2001. A comparative study of the red alga *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae) from the northwestern Pacific and Mediterranean with the description of *Grateloupia asiatica*, sp. nov. *Journal of Phycology* 37(3): 433-442.
- Kim S. Y., Han E. G., Kim M. S., Park J. K. & S. M. Boo. 2013. *Grateloupia jejuensis* (Halymeniales, Rhodophyta): a new species previously confused with *G. elata* and *G. cornea* in Korea. *Algae* 28(3): 233-240.
- Kim S. Y., Seo T. H., Park J. K., Boo G. H., Kim K. M., & S. M. Boo. 2012. *Cryptonemia rotunda* (Halymeniales) and *Schizymeria apoda* (Nemastomatales), two new records of red algae from Korea. *Algae* 27(1): 1-8.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Kress W. J. & D. L. Erickson 2012. DNA barcodes: methods and protocols. *En: W. J. Kress & D. L. Erickson, DNA Barcodes: Methods and Protocols. Humana Press* 3-8. doi:10.1007/978-1-61779-591-6\_10.
- Kumar S., Stecher G., & K. Tamura 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7). 1870-1874.

- Kützing F. T. 1866. *Tabulae phycologicae; oder, Abbildungen der Tange*. Gedruckt auf kosten des verfassers (in commission bei W. Köhne) 16: 1-35.
- Le Gall L. & G. W. Saunders. 2010b. Establishment of a DNA-barcode library for the Nemaliales (Rhodophyta) from Canada and France uncovers overlooked diversity in the species *Nemalion helminthoides* (Velley) Batters. *Cryptogamie, Algologie* 31(4): 403-421.
- Le Gall L. & Saunders G. W. 2010a. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *Journal of Phycology* 46(2): 374-389.
- Lee R. E. 2018. *Phycology*. Cambridge University Press. 1-551.
- Lewis J. A. 1990. *Cryptonemia limensis* (Kützing) Lewis, comb. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta) from Peru. *Taxon* 39(1): 98-104. doi:10.2307/1223195.
- Lewis J.A. 1994. Transfer of the Australian red algae *Kallymenia nitophylloides* to *Cryptonemia* (Halymeniaceae) and *Halymenia chondricola* to *Hymenocladia* (Rhodymeniaceae). *Taxon* 43: 3-10.
- Lin S. M. & H. Y. Liang. 2011. *Grateloupia huangiae* (Halymeniaceae, Rhodophyta), a new species from Taiwan previously confused with *Polyopes lancifolius*, with emphasis on the development of the auxiliary-cell ampullae. *Phycologia* 50(3): 232-240.
- Lin S. M., Liang H. Y. & M. H. Hommersand. 2008. Two types of auxiliary cell ampullae in *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta), including *G. taiwanensis* sp. nov. and *G. orientalis* sp. nov. from Taiwan based on *rbcL* gene sequence analysis and cystocarp development. *Journal of Phycology* 44(1): 196-214.
- Liu M., Wang H.-W. & R.-X. Luan. 2014. Morphological observation and *rbcL* sequence analysis of a new species from China, *Grateloupia boaoensis* Wang et Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Acta Hydrobiologica Sinica* 38(5): 938-44. doi:10.7541/2014.139.
- Macroalgal Herbarium Portal. 2018. <http://macroalgae.org/portal/index.php>. Acceso el 08 de Julio.

- Manghisi A., Le Gall L., Bonillo C., Gargiulo G. M., Ribeira M. A. & M. Morabito. 2017. An assessment of the taxonomic status of the Mediterranean endemic genus *Acrodiscus* Zanardini (Halymeniales, Rhodophyta). *European Journal of Taxonomy* (267): 1-24.
- Manghisi A., Le Gall L., Ribeira M. A., Bonillo C., Gargiulo G. M. & M. Morabito. 2014. The Mediterranean endemic new genus *Felicinia* (Halymeniales, Rhodophyta) recognized by a morphological and phylogenetic integrative approach. *Cryptogamie Algologie* 35(3): 221-243.
- Mateo-Cid L. E., Mendoza-González A. C., Gavio B. & S. Fredericq. 2005. *Grateloupia huertana* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a peculiar new prostrate species from tropical Pacific Mexico. *Phycologia*. 44(1): 4-16.
- Mendes G. S., Duarte M. E., Colodi F. G., Nosedá M. D., Ferreira L. G., Berté S. D., Cavacanti J. F., Santos N. & M. T. Romanos. 2014. Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. *Carbohydrate Polymers* 101: 313-323.
- Montes M., Rico J. M., García-Vázquez E., & Y. J. B. Pichs. 2017. Molecular barcoding confirms the presence of exotic Asian seaweeds (*Pachymeniopsis gargiuli* and *Grateloupia turuturu*) in the Cantabrian Sea, Bay of Biscay. *PeerJ*. 5. e3116
- Montes M., Rico J. M., García-Vázquez E. & Y. J. Borrell. 2016. Morphological and molecular methods reveal the Asian alga *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae) occurs on Cantabrian Sea shores (Bay of Biscay). *Phycologia* 55(4): 365-370.
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A. & B.Q. Minh. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 268-274. <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>
- Pinheiro-Joventino F. & Oliveira Filho E. C. de. 1977. A New Species of *Cryptonemia* from Brazil. *Arquivos de Ciências Do Mar* 17 (1): 49–51.
- Posada D. 2009. Selecting models of evolution. *En: The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge University Press. 256-282.

- Posada D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253-1256.
- Ramírez M. E. 1995. Recolección y colecciones científicas de macroalgas marinas. *En*: K. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira & E. Sar, *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. 418-428. ISBN 978-956-227-113-4.
- Ramírez M. E. & B. Santelices. 1991. *Catálogo de las Algas Marinas Bentónicas de la Costa Templada del Pacífico de Sudamérica*. Monografías Biológicas N° 5 Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Robba L. Russell S. J. Barker G. L. & J. Brodie. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93(8): 1101-1108.
- Ronquist F., Huelsenbeck J., & M. Teslenko. 2011. MrBayes version 3.2 manual: tutorials and model summaries.
- Russell L. K., Hurd C. L., Nelson W. A. & J. E. Broom. 2009. An examination of *Pachymenia* and *Aeodes* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in New Zealand and the transfer of two species of *Aeodes* in South Africa to *Pachymenia*. *Journal of Phycology* 45(6): 1389-1399.
- Santelices B., Ramírez M. E. & I. A. Abbott. 1989. A new species and new records of marine algae from Chile. *British Phycological Journal* 24(1): 73-82. doi:10.1080/00071618900650061.
- Saunders G. W., Filloramo G., Dixon K., Gall L. L., Maggs C. A., Kraft G. T. & H. Verbruggen. 2016. Multigene analyses resolve early diverging lineages in the Rhodymeniophycidae (Florideophyceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 52(4): 505–522. <https://doi.org/10.1111/jpy.12426>
- Saunders G. W. & T. E. Moore 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.
- Saunders G. W. & D. C. McDevit. 2012. Methods for DNA barcoding photosynthetic protists emphasizing the macroalgae and diatoms. *En*: W. J. Kress & D. L. Erickson,

DNA Barcodes: Methods and Protocols. *Humana Press* 207-222. doi:10.1007/978-1-61779-591-6\_10.

Saunders G. W. 2008. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*–*Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86(7): 773–89. doi:10.1139/B08-001.

Saunders G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1879-88.

Saunders G. W. 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly. *Journal of Phycology* 29(2): 251-254.

Schneider C. A., Rasband W. S. & K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671-675.

Schneider C. W., Lane C. E., & G. W. Saunders. 2018. A revision of the genus *Cryptonemia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Bermuda, western Atlantic Ocean, including five new species and *C. bermudensis* (Collins & M. Howe) comb. nov. *European Journal of Phycology*:1-19.

Smith G. M. 1944. *Marine Algae of the Monterey Peninsula, California*. Stanford University Press.

Swofford D. L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4 Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Talarico L. B., Pujol C. A., Zibetti R. G. M., Faria P. C. S., Nosedá M. D., Duarte M. E. R., & E. B. Damonte. 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research* 66(2): 103-110.

Talarico L. B., Zibetti R. G., Faria P. C., Scolaro L. A., Duarte M. E., Nosedá M. D., Pujol C. A. & E. B. Damonte. 2004. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules* 34(1): 63-71.

- Tanaka T. 1963. Studies on some marine algae from southern Japan, IV. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 12: 64-71.
- Trivedi S., Aloufi A. A., Ansari A. A. & S. K. Ghosh. 2016. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(2): 161-171. doi:10.1016/j.sjbs.2015.01.001.
- Turland N. J., Wiersema J. H., Barrie F. R., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen P. S., Knapp S., Kusber W.-H., Li D.-Z., Marhold K., May T. W., McNeill J., Monro A. M., Prado J., Price M. J. & G. F. Smith (eds.) 2018: *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017*. Regnum Vegetabile 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. DOI <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- UC2041483, University Herbarium (UC), University of California, Berkeley. [<https://webapps.cspace.berkeley.edu/ucjeps/publicsearch/publicsearch/?accession=UC2041483&displayType=full&maxresults=1&start=1>] (acceso en [Julio 2018]).
- Verlaque M., Brannock P. M., Komatsu T., Villalard-Bohnsack M. & M. Marston. 2005. The genus *Grateloupia* C. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Thau Lagoon (France, Mediterranean): a case study of marine plurispecific introductions. *Phycologia* 44(5): 477-496.
- Vilgalys R. 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist*. 160(1): 4-5.
- Wang H.-W., Kawaguchi S., Horiguchi T. & M. Masuda. 2001. A morphological and molecular assessment of the genus *Prionitis* J. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Phycological Research* 49(3): 251-61. doi:10.1046/j.1440-1835.2001.00245.x.
- Wang H. W., Kawaguchi S., Horiguchi T. & M. Masuda. 2000. Reinstatement of *Grateloupia catenata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) on the basis of morphology and *rbcL* sequences. *Phycologia* 39(3): 228-237.
- Wilkes R. J., McIvor L. M. & M. D. Guiry. 2005. Using *rbcL* sequence data to reassess the taxonomic position of some *Grateloupia* and *Dermocorynus* species

- (Halymeniaceae, Rhodophyta) from the north-eastern Atlantic. *European Journal of Phycology* 40(1): 53-60.
- Womersley H. B. S. & J. A. Lewis. 1994. Family Halymeniaceae Bory 1828: 158. *En:* H. B. S. Womersley, *The Marine Benthic Flora of Southern Australia Part IIIA. Flora of Australia Supplementary Series 1*. Canberra. 167-218.
- Womersley H.B.S. & A. Bailey. 1970. Marine algae of the Solomon Islands. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B. Biological Sciences* 259: 257-352.
- Yang M. Y. & M. S. Kim. 2015. Taxonomy of *Grateloupia* (Halymeniales, Rhodophyta) by DNA barcode marker analysis and a description of *Pachymeniopsis volvita* sp. nov. *Journal of Applied Phycology* 27(3): 1373-1384.
- Yang M. Y. & M. S. Kim. 2014. *Cryptonemia asiatica* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a new marine macroalgal species from Korea and Japan. *Journal of Ecology and Environment* 37(4): 387-393.
- Yang, M. Y., Han, E. G. & M. S. Kim. 2013. Molecular identification of *Grateloupia elliptica* and *G. lanceolata* (Rhodophyta) inferred from plastid *rbcL* and mitochondrial COI genes sequence data. *Genes & Genomics* 35(2): 239-246.
- Yang E. C., Kim M. S., Geraldino P. J. L., Sahoo D., Shin J.-A. & S. M. Boo. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20(2): 161. doi:10.1007/s10811-007-9201-8.
- Yu L., Wang H.-W. & R. Luan. 2013. *Grateloupia tenuis* Wang et Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta): A new species from South China Sea based on morphological observation and *rbcL* gene sequences analysis. *BioMed Research International*. 2013: 9. doi:10.1155/2013/560163.
- Zhao X., Pang S., Shan T. & F. Liu. 2012. Applications of three DNA barcodes in assorting intertidal red macroalgal flora in Qingdao, China. *Journal of Ocean University of China* 12(1): 139-45. doi:10.1007/s11802-013-2052-9.



## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1. Primers usados en la amplificación y secuenciación de *rbcl* en especímenes de *Cryptonemia*

---

<b>F-forward</b>	
F15	5'-GTAATHCCNTAHGCNAAAATGGG-3'
F57	5'-GTAATTCGATATGCTAAAATGGG-3'
F577	5'-GTATATGAAGGTCTAAAAGGTGG-3'
F753	5'-GGAAGATATGTATGAAAGAGC-3'
<b>R-reverse</b>	
R753	5'-GCTCTTTCATACATATCTTCC-3'
R916	5'-CCWGCCATDCKCATCCA-3'
R1150	5'-GCATTTGTCCGCAGTGAATAC-3'
R1381	5'-ATCTTTCATAGATCTAAAGC-3'
RStart	5'-TGTGTTGCGGCCCGCCCTTGTGTTAGTCTCAC-3'
<b>Referencias</b>	Freshwater y Rueness (1994), Gabriel et al. (2016)

---

## 9.2 Anexo 2. Especies de la familia Halymeniaceae incluidas en el análisis filogenético, números de acceso a GenBank, país y lugar de colecta

Espece	Localidad de colecta	Nº de acceso	Referencia
<i>Acrodiscus vidovichii</i>	Islas Vis, Croacia	KJ594952	Manghisi et al. (2014)
<i>Aeodes nitidissima</i>	Tauranga, Nueva Zelanda	EU497914	Russell et al. (2009)
<i>Amalthea freemaniae</i>	Bahía KariKari, Northland, Nueva Zelanda	KJ606651	D'Archino et al. (2014)
<i>Carpopeltis phyllophora</i>	Australia	FN908164	Huisman et al. (2011)
<i>Codiophyllum natalense</i>	Banco Protea, Kwazulu-Natal, Sudáfrica	FN908160	Huisman et al. (2011)
<i>Corynomorpha prismatica</i>	Beloha, Androy, Madagascar	KJ594955	Manghisi et al. (2014)
<i>Cryptonemia asiatica</i>	Jeju, Corea	KM272321	Yang y Kim (2014)
<i>Cryptonemia borealis</i>	Banco Cobble Hein, Washington, EE.UU.	AF488812	Gavio & Fredericq (2002)
<i>Cryptonemia lomation</i>	Cap de la Revellata, Corsica, Francia	FN908155	Huisman et al. (2011)
<i>Cryptonemia luxurians</i>	Ehime, Namikata, Nagaiso, Japón	AB061374	Wang et al. (2001)
<i>Cryptonemia luxurians</i>	Praia Rasa, Rio de Janeiro, Brasil	AF488813	Gavio & Fredericq (2002)
<i>Cryptonemia rotunda</i>	Kanagawa, Kamakura, Shichirigaham, Japon	AB061375	Wang et al. (2001)
<i>Cryptonemia seminervis</i>	Tarifa, España	KM272319	Yang y Kim (2014)
<i>Cryptonemia</i> sp.	Bahia de los Angeles, La Gringa, Mexico	GU598113	No publicado
<i>Cryptonemia undulata</i>	Queenscliff Jetty, Victoria, Australia	KU382069	Saunders et al. (2016)
<i>Cryptonemia bengryi</i>	Long Bay Point, Isla Colón, Panamá	AY178766	Mateo-Cid et al. (2005)
<i>Cryptonemia obovata</i>	Salmon Bank 10 m, Isla San Juan, Washington, Estados Unidos	KM253817	No publicado

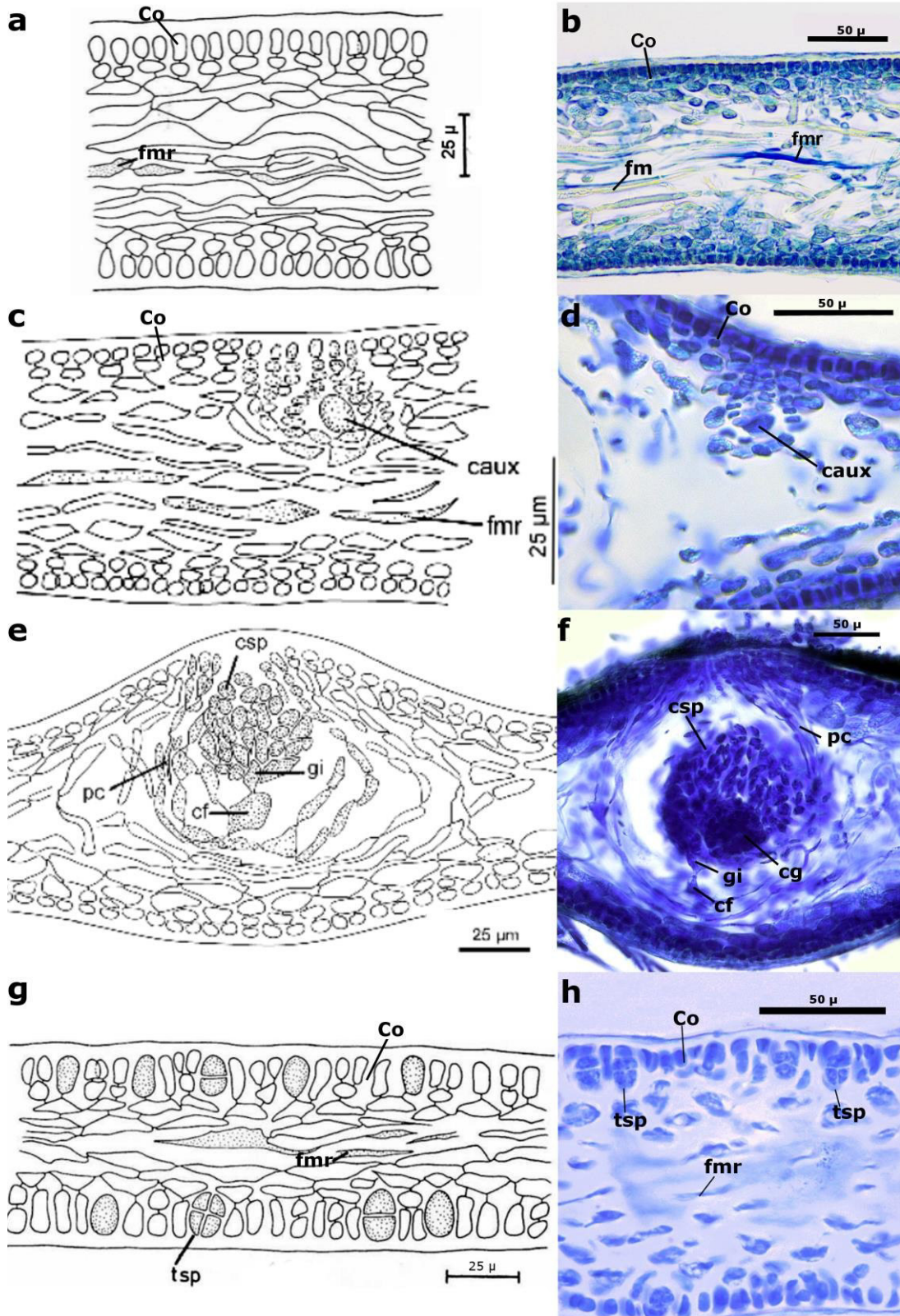
<i>Cryptonemia obovata</i>	Salmon Bank 5 m, Isla San Juan, Washington, Estados Unidos	KM253821	No publicado
<i>Dermocorynus dichotomus</i>	Marsella , Francia	AY775387	Verlaque et al. (2005)
<i>Epiphloea bullosa</i>	Isla Escape, Australia Occidental, Australia	FN908149	Huisman et al. (2011)
<i>Felicinia marginata</i>	Scandola, Corse, Francia	KJ594954	Manghisi et al. (2014)
<i>Galene profundae</i>	Hou Hou Point, Nueva Zelanda	KJ606645	D'Archino et al. (2014)
<i>Gelinaria ulvoidea</i>	Bahía Julien, Isla Escape, Australia	FN908154	Huisman et al. (2011)
<i>Glaphyrosiphon intestinalis</i>	Isla Sur, Brighton, Nueva Zelanda	GU252163	Hommersand et al. (2010)
<i>Grateloupia doryphora</i>	Playa San Francisco, Bahía de Ancón, Perú	AF488817	Gavio & Fredericq (2002)
<i>Grateloupia filicina</i>	Livorno, Italia	AB055472	Kawaguchi et al. (2001)
<i>Halymenia floresii</i>	Islas Formigues, Palamos, España	AY772019	De Clerck et al. (2005b)
<i>Mariaramirezia lapathifolia</i>	La Punta, Callao, Perú	KF363929	Calderón et al. (2014a)
<i>Mariaramirezia osornoensis</i>	Osorno, Chile	KF601433	Calderón et al. (2014a)
<i>Neorubra decipiens</i>	Yacila, Piura, Perú	KJ561155	Calderón et al. (2014b)
<i>Pachymenia carnososa</i>	Sudáfrica	AF385640	Fredericq y Hommersand (2003)
<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	Enoshima, Japón	JX475042	Yang et al. (2013)
<i>Phyllymenia belangeri</i>	Sudáfrica	AY772035	De Clerck et al. (2005a)
<i>Polyopes constrictus</i>	Victoria, Point Losdale, Australia	AB084535	Kawaguchi et al. (2002)
<i>Spongophloea tissotii</i>	Monkey Mia, Bahía Shark, Australia	FN908162	Huisman et al. (2011)

<i>Thamnoclonium dichotomum</i>	Bahía Esperance, North Twin Peaks, Australia	FN908152	Huisman et al. (2011)
<i>Tsengia lanceolata</i>	Kommetjie, Península del Cabo, Sudáfrica	AY294386	Gavio et al. (2005)
<i>Tsengia sp.</i>	Tasmania, Tinderbox, Australia	KU7226717	Filloramo y Saunders (2016)
<i>Yonagunia tenuifolia</i>	Okinawa, Isla Yonaguni, Dannu-hama, Japón	AB116248	Kawaguchi et al. (2004)

### 9.3 Anexo 3. Sitios de colecta en la costa central del Perú

Lugar de colecta	Localización geográfica	
	Longitud/	Latitud
La Mesa, Casma, Ancash	9° 46' 33.719"	78° 14' 42.759"
La Gramita, Casma, Ancash	9° 43' 4.033"	78° 17' 41.582"
La Peru, Casma, Ancash	9° 56' 31.171"	78° 13'44.792"
Tuquillo, Casma, Ancash	10° 1' 14.808"	78° 11' 37.276"
Tamborero, Casma, Ancash	10° 19' 38.655"	78° 3' 13.497"
Bahia de Samanco (Atahualpa), Casma, Ancash	9° 11' 2.31"	78° 30' 23.51"
Bahia Tortugas, Casma, Ancash	9° 22' 10.081"	78° 25' 8.399"
Atenas, Paracas, Ica	13° 49' 44.098"	76° 18' 14.947"
Bahia de Paracas, Paracas, Ica	13° 51' 17.52"	76° 15' 5.42"
Laguna Grande, Paracas, Ica	14° 9' 11.434"	76° 15' 8.305"
Lagunillas, Paracas, Ica	13° 53' 49.099"	76° 18' 45.842"
Playon, Paracas, Ica	14° 2' 1.259"	76° 15' 57.268"
La Mina, Paracas, Ica	13° 54' 47.66"	76° 19' 3.9"
Islas Chinchas, Paracas, Ica	13° 38' 15.562"	76° 23' 49.153"
Mendieta, Paracas, Ica	14° 2' 59.046"	76° 15' 41.669"
Poza de Lapa, Marcona, Ica	15° 25' 33.74"	75° 5' 21.4"
Siete Huecos, Marcona, Ica	15° 24' 19.94"	75° 7' 55.891"
Playa Hermosa, Marcona, Ica	15° 21' 20.22"	75° 10' 17.27"
Los Leones, Marcona, Ica	15° 23' 8.93"	75° 9' 31.46"
Reserva Nacional San Fernando, Marcona, Ica	15° 8' 43.015"	75° 20' 6.161"
Bahia San Nicolas, Marcona, Ica	15° 15' 6.79"	75° 13' 14.989"
Las Conchitas, Ancón, Lima	11°45'24.516"	77°10'17.702"
San Francisco Chico, Ancón, Lima	11° 46' 14.261"	77° 11' 19.611"
San Francisco Grande, Ancón, Lima	11° 42' 2.484"	77° 11' 26.897"
Bahia de Ancon, Ancón, Lima	11° 46' 30.9" 77°	10' 52.391"
Bahia de Pucusana, Pucusana, Lima	12° 28' 50.678"	76° 47' 56.903"
Ninfas, Pucusana, Lima	12° 28' 49.88"	76° 48' 4.019"
Isla Chuncho, Pucusana, Lima	12° 28' 24.19"	76° 47' 53.466"
La Quipa, Pucusana, Lima	12° 26' 36.964"	76° 47' 7.008"
Boqueron del Diablo, Pucusana, Lima	12° 28' 54.39"	76° 48' 2.267"
Muelle de Imarpe, La Punta, Lima	12° 3' 57.773"	77° 9' 30.164"
Isla San Lorenzo, La Punta, Lima	12° 4' 48.986"	77° 14' 0.409"
Cantolao, La Punta, Lima	12° 4' 3.76"	77° 9' 34.916"

9.4 Anexo 4. Esquemas (Acleto 1973, Acleto y Zúñiga 2011) y cortes histológicos transversales (realizados en este estudio) mostrando estructuras vegetativas, tetraspóricas y femeninas de *Cryptonemia*



(a) Sección transversal de *C. obovata*, donde se señalan: corteza (Co) y filamento medular con contenido denso refringente (fmr) (Acleto 1973). (b) Sección transversal del ejemplar BG-225, donde se observan: corteza (Co), filamento medular (fm) y filamento medular con contenido denso refringente (fmr). (c) Sección transversal del ejemplar femenino *C. anconensis* donde se observa la ampolla de la célula auxiliar (caux), la corteza (Co) y filamento medular con contenido denso refringente (fmr) (Acleto & Zúñiga 2011). (d) Sección transversal del ejemplar femenino BG-312, donde se observa la ampolla de la célula auxiliar (caux) y la corteza (Co). (e) Sección transversal del talo cistocárpico de *C. limensis* mostrando el cistocarpo: pericarpo (pc), célula de fusión (cf), gonimoblasto inicial (gi) y carposporas (csp) (Acleto y Zúñiga 2011). (f) Sección transversal del ejemplar femenino BG-228, donde se señalan pericarpo (pc), célula de fusión (cf), gonimoblasto inicial (gi), célula del gonimoblasto (cg) y carposporas (csp). (g) Sección transversal de *C. obovata*, donde se señalan: el tetrasporangio (tsp), corteza (Co) y el filamento medular con contenido denso refringente (fmr) (Acleto 1973). (h) Sección transversal del ejemplar tetraspórico BG-219, donde se muestran: los tetrasporangios (tsp), corteza (Co) y el filamento medular (fm).

## 9.5 Anexo 5. *Cryptonemia angustata* (Setchell & N.L.Gardner) E.Y.Dawson



(a) Holotipo de *Cryptonemia angustata*, (antes *Kallymenia angustata* Setchell & Gardner), UC2041483, University Herbarium (UC), University of California, Berkeley. (b) Isotipo de *Kallymenia tenuifolia* Taylor, nombre actual: *C. angustata*, determinado por Dawson (1954), MICH1306296 acceso a través de *Macroalgal Herbarium Portal*. (c) Ejemplar de *C. angustata* (Dawson 1964, lámina 56B). (d) Ejemplar de *C. angustata*, UC1845298 acceso a través de *Macroalgal Herbarium Portal*.



**9.6 Anexo 6. Lista numerada de especies utilizadas en el análisis de distancias genéticas, con sus respectivos códigos de extracción o número de acceso de GenBank**

	<b>Especie</b>	<b>Código de extracción/ N° de acceso GenBank</b>
1	<i>Cryptonemia anconensis</i>	BG-227
2	<i>Cryptonemia anconensis</i>	BG-232
3	<i>Cryptonemia anconensis</i>	BG-281
4	<i>Cryptonemia anconensis</i>	BG-306
5	<i>Cryptonemia anconensis</i>	BG-310
6	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-220
7	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-222
8	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-228
9	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-305
10	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-307
11	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-308
12	<i>Cryptonemia limensis</i>	BG-309
13	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-217
14	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-221
15	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-223
16	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-225
17	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-229
18	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-230
19	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-282

20	<i>Cryptonemia obovata</i>	BG-311
21	<i>Cryptonemia</i> sp. 1	BG-224
22	<i>Cryptonemia</i> sp. 1	BG-226
23	<i>Cryptonemia</i> sp. 2	BG-219
24	<i>Cryptonemia</i> sp. 2	BG-279
25	<i>Cryptonemia</i> sp. 2	BG-312
26	<i>Cryptonemia asiatica</i>	KM272321
27	<i>Cryptonemia borealis</i>	AF488812
28	<i>Cryptonemia lomation</i>	FN908155
29	<i>Cryptonemia luxurians</i>	AB061374
30	<i>Cryptonemia luxurians</i>	AF488813
31	<i>Cryptonemia rotunda</i>	AB061375
32	<i>Cryptonemia seminervis</i>	KM272319
33	<i>Cryptonemia undulata</i>	KU382069
34	<i>Cryptonemia</i> sp. (Mexico)	GU598113
35	<i>Cryptonemia bengryi</i>	AY178766
36	<i>Cryptonemia obovata</i>	KM253817
37	<i>Cryptonemia obovata</i>	KM253821
38	<i>Acrodiscus vidovichii</i>	KJ594952
39	<i>Aeodes nitidissima</i>	EU497914
40	<i>Amalthea freemaniae</i>	KJ606651
41	<i>Carpopeltis phyllophora</i>	FN908164
42	<i>Codiophyllum natalense</i>	FN908160

43	<i>Corynomorpha prismatica</i>	KJ594955
44	<i>Dermocorynus dichotomus</i>	AY775387
45	<i>Epiphloea bullosa</i>	FN908149
46	<i>Felicinia marginata</i>	KJ594954
47	<i>Galene profunda</i>	KJ606645
48	<i>Gelinaria ulvoidea</i>	FN908154
49	<i>Glaphyrosiphon intestinalis</i>	GU252163
50	<i>Grateloupia doryphora</i>	AF488817
51	<i>Grateloupia filicina</i>	AB055472
52	<i>Halymenia floresiii</i>	AY772019
53	<i>Mariaramirezia lapathifolia</i>	KF363929
54	<i>Mariaramirezia osornoensis</i>	KF601433
55	<i>Neorubra decipiens</i>	KJ561155
56	<i>Pachymenia carnosa</i>	AF385640
57	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	JX475042
58	<i>Phyllymenia belangeri</i>	AY772035
59	<i>Polyopes constrictus</i>	AB084535
60	<i>Spongophloea tissotii</i>	FN908162
61	<i>Thamnoclonium dichotomum</i>	FN908152
62	<i>Yonagunia tenuifolia</i>	AB116248
63	<i>Tsengia lanceolata</i>	AY294386
64	<i>Tsengia sp.</i>	KU7226717

**9.7 Anexo 7. Distancia genética entre especies de la familia Halymeniaceae utilizadas en el análisis filogenético del gen *rbcL*. Cada número representa la especie mostrada en Anexo 6**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	0.000														
3	0.000	0.000													
4	0.000	0.000	0.000												
5	0.000	0.000	0.000	0.000											
6	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014										
7	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.000									
8	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.000	0.000								
9	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.000	0.000	0.000							
10	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000						
11	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022					
12	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022				
13	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.039	0.044			
14	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003		
15	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
16	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	0.000
17	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	0.000
18	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	0.000
19	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	0.000
20	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.036	0.042	0.003	0.000	0.000
21	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.011	0.022	0.033	0.030	0.030
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.033	0.030	0.030
23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.033	0.030	0.030
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.033	0.030	0.030
25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.033	0.030	0.030
26	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.062	0.068	0.030	0.033	0.033
27	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.039	0.045	0.011	0.008	0.008
28	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.028	0.025	0.025
29	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.062	0.068	0.030	0.033	0.033
30	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.025	0.022	0.022

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
31	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.071	0.071	0.071	0.071	0.071	0.071	0.071	0.048	0.045	0.045
32	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.028	0.025	0.025
33	0.051	0.051	0.051	0.051	0.051	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.065	0.059	0.045	0.042	0.042
34	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.027	0.025	0.025
35	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.056	0.050	0.036	0.033	0.033
36	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.042	0.047	0.014	0.011	0.011
37	0.188	0.188	0.188	0.188	0.188	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.202	0.181	0.198	0.198	0.198
38	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.138	0.138	0.138	0.138	0.138	0.138	0.138	0.125	0.122	0.122
39	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.146	0.133	0.127	0.130	0.130
40	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.095	0.089	0.077	0.074	0.074
41	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.087	0.084	0.084
42	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.059	0.053	0.039	0.036	0.036
43	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.123	0.117	0.120	0.117	0.117
44	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.138	0.131	0.124	0.121	0.121
45	0.071	0.071	0.071	0.071	0.071	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.077	0.074	0.074

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
46	0.071	0.071	0.071	0.071	0.071	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.071	0.068	0.068
47	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.042	0.039	0.039
48	0.074	0.074	0.074	0.074	0.074	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.083	0.090	0.077	0.075	0.075
49	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.109	0.102	0.109	0.106	0.106
50	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.129	0.128	0.121	0.118	0.118
51	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.118	0.124	0.108	0.105	0.105
52	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.084	0.084	0.084	0.084	0.084	0.090	0.084	0.081	0.078	0.078
53	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.124	0.121	0.121
54	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.119	0.125	0.118	0.115	0.115
55	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.127	0.121	0.124	0.121	0.121
56	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.146	0.133	0.127	0.130	0.130
57	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.131	0.131	0.131	0.131	0.131	0.138	0.131	0.114	0.111	0.111
58	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.124	0.118	0.118	0.115	0.115
59	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.112	0.112	0.112	0.112	0.112	0.118	0.112	0.099	0.096	0.096
60	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065	0.071	0.065	0.047	0.045	0.045
61	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.074	0.074	0.074	0.074	0.074	0.081	0.074	0.065	0.062	0.062
62	0.109	0.109	0.109	0.109	0.109	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.105	0.102	0.102
63	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.114	0.111	0.111
64	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.114	0.111	0.111

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
16															
17	0.000														
18	0.000	0.000													
19	0.000	0.000	0.000												
20	0.000	0.000	0.000	0.000											
21	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030										
22	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.014									
23	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.014	0.000								
24	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.014	0.000	0.000							
25	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.014	0.000	0.000	0.000						
26	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.056	0.053	0.053	0.053	0.053					
27	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.042				
28	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.045	0.042	0.042	0.042	0.042	0.022	0.033			
29	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.056	0.053	0.053	0.053	0.053	0.000	0.042	0.022		
30	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.042	0.045	0.045	0.045	0.045	0.030	0.030	0.019	0.030	



	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.065	0.062	0.062	0.062	0.062	0.059	0.042	0.048	0.059	0.051
32	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.045	0.042	0.042	0.042	0.042	0.022	0.033	0.000	0.022	0.019
33	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.060	0.051	0.051	0.051	0.051	0.060	0.045	0.048	0.060	0.045
34	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.033	0.030	0.030	0.030	0.030	0.039	0.033	0.022	0.039	0.030
35	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.051	0.042	0.042	0.042	0.042	0.051	0.036	0.039	0.051	0.036
36	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.045	0.003	0.036	0.045	0.033
37	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.195	0.188	0.188	0.188	0.188	0.209	0.202	0.202	0.209	0.195
38	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122	0.132	0.135	0.135	0.135	0.135	0.132	0.125	0.118	0.132	0.112
39	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.143	0.133	0.133	0.133	0.133	0.127	0.140	0.117	0.127	0.123
40	0.074	0.074	0.074	0.074	0.074	0.090	0.083	0.083	0.083	0.083	0.090	0.077	0.077	0.090	0.068
41	0.084	0.084	0.084	0.084	0.084	0.091	0.081	0.081	0.081	0.081	0.090	0.094	0.078	0.090	0.087
42	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.054	0.045	0.045	0.045	0.045	0.060	0.039	0.048	0.060	0.045
43	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.108	0.108	0.108	0.108	0.127	0.114	0.117	0.127	0.114
44	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.128	0.121	0.121	0.121	0.121	0.131	0.118	0.121	0.131	0.115
45	0.074	0.074	0.074	0.074	0.074	0.081	0.071	0.071	0.071	0.071	0.062	0.077	0.068	0.062	0.077

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
46	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.081	0.071	0.071	0.071	0.071	0.080	0.071	0.068	0.080	0.071
47	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.056	0.050	0.050	0.050	0.050	0.053	0.042	0.042	0.053	0.045
48	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.077	0.074	0.074	0.074	0.074	0.074	0.081	0.075	0.074	0.084
49	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	0.096	0.096	0.096	0.096	0.118	0.096	0.109	0.118	0.105
50	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118	0.125	0.126	0.126	0.126	0.126	0.131	0.115	0.115	0.131	0.112
51	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.118	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.105	0.108	0.105
52	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.085	0.075	0.075	0.075	0.075	0.078	0.087	0.078	0.078	0.081
53	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.128	0.125	0.125	0.125	0.125	0.134	0.118	0.118	0.134	0.115
54	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.116	0.116	0.116	0.128	0.111	0.111	0.128	0.109
55	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.111	0.111	0.111	0.111	0.124	0.118	0.121	0.124	0.112
56	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.143	0.133	0.133	0.133	0.133	0.127	0.140	0.117	0.127	0.123
57	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.135	0.121	0.121	0.121	0.121	0.127	0.121	0.124	0.127	0.118
58	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.108	0.108	0.108	0.108	0.118	0.125	0.115	0.118	0.105
59	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.109	0.102	0.102	0.102	0.102	0.105	0.099	0.096	0.105	0.086
60	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.066	0.056	0.056	0.056	0.056	0.062	0.048	0.050	0.062	0.042
61	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.075	0.066	0.066	0.066	0.066	0.071	0.072	0.062	0.071	0.066
62	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.119	0.109	0.109	0.109	0.109	0.099	0.105	0.102	0.099	0.099
63	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.124	0.114	0.114	0.114	0.114	0.124	0.117	0.114	0.124	0.117
64	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.124	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.117	0.104	0.114	0.111

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
31															
32	0.048														
33	0.056	0.048													
34	0.048	0.022	0.036												
35	0.048	0.039	0.019	0.028											
36	0.045	0.036	0.048	0.036	0.039										
37	0.209	0.202	0.183	0.191	0.184	0.198									
38	0.115	0.118	0.132	0.119	0.125	0.122	0.177								
39	0.143	0.117	0.140	0.126	0.130	0.137	0.156	0.143							
40	0.090	0.077	0.062	0.071	0.056	0.081	0.176	0.145	0.123						
41	0.107	0.078	0.069	0.072	0.084	0.097	0.198	0.154	0.153	0.099					
42	0.056	0.048	0.028	0.036	0.025	0.042	0.191	0.125	0.127	0.077	0.081				
43	0.118	0.117	0.098	0.104	0.089	0.111	0.186	0.111	0.159	0.101	0.121	0.101			
44	0.111	0.121	0.122	0.125	0.121	0.115	0.209	0.141	0.143	0.114	0.139	0.111	0.137		
45	0.074	0.068	0.081	0.068	0.068	0.081	0.180	0.119	0.136	0.099	0.097	0.077	0.105	0.135	

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	0.080	0.068	0.065	0.062	0.062	0.074	0.184	0.116	0.140	0.080	0.109	0.084	0.108	0.128	0.093
47	0.028	0.042	0.062	0.042	0.053	0.045	0.184	0.109	0.143	0.089	0.100	0.062	0.111	0.131	0.074
48	0.081	0.075	0.078	0.068	0.069	0.084	0.220	0.143	0.153	0.096	0.090	0.084	0.118	0.167	0.065
49	0.102	0.109	0.112	0.102	0.099	0.093	0.170	0.148	0.126	0.083	0.113	0.112	0.127	0.115	0.105
50	0.095	0.115	0.121	0.115	0.115	0.111	0.214	0.134	0.160	0.115	0.156	0.112	0.147	0.093	0.131
51	0.092	0.105	0.096	0.099	0.086	0.105	0.191	0.128	0.139	0.105	0.136	0.090	0.134	0.087	0.105
52	0.091	0.078	0.078	0.066	0.060	0.084	0.191	0.129	0.143	0.103	0.088	0.081	0.102	0.153	0.060
53	0.092	0.118	0.118	0.118	0.111	0.114	0.213	0.144	0.160	0.114	0.159	0.115	0.160	0.086	0.141
54	0.086	0.111	0.111	0.105	0.105	0.108	0.210	0.138	0.153	0.108	0.146	0.102	0.147	0.096	0.121
55	0.121	0.121	0.118	0.115	0.115	0.121	0.198	0.118	0.139	0.124	0.132	0.099	0.134	0.112	0.128
56	0.143	0.117	0.140	0.126	0.130	0.137	0.159	0.153	0.028	0.136	0.146	0.120	0.156	0.147	0.136
57	0.112	0.124	0.108	0.105	0.105	0.118	0.198	0.128	0.136	0.114	0.149	0.102	0.144	0.105	0.131
58	0.105	0.115	0.118	0.115	0.115	0.121	0.188	0.131	0.139	0.118	0.139	0.105	0.151	0.087	0.128
59	0.112	0.096	0.096	0.096	0.090	0.096	0.176	0.135	0.136	0.096	0.119	0.109	0.127	0.132	0.122
60	0.062	0.050	0.045	0.054	0.039	0.050	0.173	0.122	0.136	0.077	0.104	0.048	0.111	0.109	0.087
61	0.072	0.062	0.066	0.063	0.063	0.075	0.198	0.119	0.140	0.099	0.101	0.066	0.111	0.135	0.090
62	0.105	0.102	0.096	0.093	0.096	0.109	0.179	0.156	0.136	0.096	0.116	0.093	0.141	0.100	0.102
63	0.133	0.114	0.111	0.104	0.111	0.114	0.156	0.143	0.120	0.133	0.127	0.101	0.130	0.127	0.140
64	0.111	0.104	0.117	0.101	0.111	0.114	0.173	0.147	0.133	0.130	0.148	0.114	0.147	0.128	0.134

