

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RODOLITOS DEL PARQUE NACIONAL
COIBA Y OTRAS ÁREAS INSULARES DE PANAMÁ Y COSTA RICA.**

NOEMÍ GUADALUPE LEÓN CORREOSO

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAGISTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025

DEDICATORIA

A mis hijos Gabriel Alonso y Abiel Alonso, para quienes deseo océanos sanos y llenos de
vida .

AGRADECIMIENTO

Cuando Dios nos ayuda lo complicado se hace fácil y lo imposible, posible. Esta investigación se llevó a cabo gracias al apoyo de un grupo de personas que trabajan en ciencia, viven de la ciencia y les apasiona la ciencia tanto como a mí.

Al Dr. Edgardo Díaz Ferguson por brindarme la oportunidad de hacer investigación y creer en mi preparación para estudiar la flora marina, por su guía, anécdotas, tiempo en campo, en laboratorio y por disfrutar como yo de cada logro en este mundo poco conocido de las algas calcáreas.

A la Dra. Cindy Fernández García, mi mentora, colega, amiga, porque a pesar de la distancia siempre estuvo presente en cada paso que daba, por su hospitalidad y gran aprendizaje brindado durante mi estancia en el CIMAR.

A la Dra. Claudia de Pérez por su desinteresada ayuda desde el primer día que conversamos sobre el interés mutuo en los estudios de la flora marina. Su diligencia y forma de ejecutar proyectos me han enseñado que no necesitamos de grandes espacios, ni reconocimientos para ejecutar nuestras ideas de investigación, en ese camino de esfuerzo y trabajo encontraremos personas que nos apoyarán desinteresadamente, solo por el hecho de compartir la misma pasión.

Al Dr. Iván Valdespino por sus orientaciones taxonómicas y diligencia al revisar cada manuscrito.

Al Dr., Bryan Wysor, ficólogo destacado en el estudio de la flora marina de Panamá, por brindarme la oportunidad, (desde hace doce años) de adentrarme en el estudio de algas. Todas las giras en las que participamos, cada capacitación y la experiencia en Roger William University está comenzando a dar frutos.

Al Dr. Wilson Freshwater, del Centro de Ciencias Marinas de la Universidad de Carolina del Norte, especialista en sistemática molecular y evolución de organismos marinos y estudios florísticos de la flora marina algal de Panamá, por sus recomendaciones en la optimización del método de extracción y amplificación de los genes de estudio, así como como los nexos con otros científicos especialistas en la taxonomía del grupo.

Del Departamento de Botánica de la Universidad de Panamá, deseo agradecer al Dr. Orlando Ortiz quien fue el enlace principal para iniciar la colaboración con la Estación Científica Coiba AIP, al Dr. Juan Carrión por sus orientaciones en cuanto a la Filogenia Molecular, a la Dra. Cristina Garibaldi por su respaldo en la propuesta sobre morfología de los rodolitos y al profesor Carlos Guerra, por su amistad incondicional y apoyo en todo lo que necesitaba.

Deseo agradecer también a Sara Justo por su colaboración en el trabajo de campo y laboratorio, a Edgar Wilson por su acompañamiento y a todo el personal de la Estación Científica Coiba AIP, por su disposición y amabilidad para cada consulta y ejecución de esta investigación.

Al Lic. Moisés Polo y los profesores Luis Jaén, Estivali Wilkie y Maribel González por su colaboración y orientación durante el trabajo de laboratorio y adquisición de insumos.

A todo el personal del Centro de Investigaciones del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica, por hacer de mi estancia una experiencia enriquecedora, de aprendizaje y motivación para continuar con mi línea de investigación. Especialmente a Kaylen González y Mariana Viales por cada apoyo en laboratorio y a la distancia para lograr el resultado final de este trabajo, así como a la Magíster Celeste Díaz Licona por su colaboración con las secuencias de Costa Rica utilizadas en los análisis de esta investigación. En la UCR también deseo agradecer al Dr. Gilbert Alvarado del Laboratorio de Patología Experimental y Comparada (LAPECOM) por su tiempo y orientación para con la enseñanza de las técnicas histológicas utilizadas con los rodolitos de Costa Rica

A Eduardo Estrada y el equipo de Expedición Coiba por su acompañamiento en mis giras de buceo y excelente documentación de toda la biodiversidad asociada a los rodolitos.

Al Sr. Jorge Ceballos del Laboratorio de Microscopía Electrónica y Con Focal del Instituto de Investigaciones Tropicales del Instituto de Investigaciones Tropical Smithsonian por su tiempo, profesionalismo y orientación durante las sesiones de trabajo de microscopía. Aprendimos un mundo de estructuras sobre rodolitos, cada conversatorio que teníamos al emocionarnos con la disposición de células y estructuras halladas enriqueció mi mirada taxonómica de este grupo poco estudiado en el país.

A Maycol Madrid por las orientaciones sobre la mejor forma de extraer ADN en algas CCA. A mi querida estudiantes Nahomi Vidal por interesarse en el mundo de la Biología Molecular y dar lo mejor en la ejecución de su proyecto de investigación con algas

calcáreas y apoyarme en la obtención de datos para continuar con esta línea de investigación.

A la estudiante de licenciatura de la orientación en Biología Molecular, Maythe Murillo y al personal del Centro de Investigaciones en Criobiología por su apoyo durante mi trabajo en ese laboratorio, así como al Dr. Axel Villalobos del Laboratorio de Biología Molecular y Aplicada del IDIAP, en donde inicié los primeros pasos del trabajo de extracción y amplificación de ADN de los rodolitos.

A cada uno de los profesores del programa de esta maestría, porque cada clase resultó en aprendizaje para mi crecimiento y desarrollo profesional. Especialmente a la Dra. Magaly de Chial y a la Dra. Edna González por su apoyo logístico en las diversas actividades que participé como estudiante de postgrado, al Dr. Carlos Ramos por su apoyo en el uso de equipos de laboratorio y al Dr. Ariel Magallón, mi tutor en mis años de estudiante de postgrado , gracias por sus consejos y grato acompañamiento.

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo económico del Ministerio de Relaciones Exteriores y el Concurso Nacional Our Ocean 2023, a la Convocatoria Universitaria de Fondos de Investigación 2022 (CUFI) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá y al Programa de apoyo a tesis Mar del Sur, de la estación científica Coiba AIP.

Mi especial agradecimiento a mi familia, mi soporte y ejemplo de constancia para continuar logrando las metas propuestas. A mis padres, hermanos, tíos, sobrinos, cuñadas, gracias por alegrarse con cada una de mis experiencias y por su apoyo para con la crianza y el cuidado de mis hijos mientras yo estudiaba e investigaba.

Finalmente, y no menos importante, doy gracias al Dr. Alonso Santos Murgas, mi esposo, compañero de vida, quien siempre confío en mí y nunca dudo en brindarme su apoyo en cada nueva actividad que resultaba de esta gran experiencia. Eres mi ejemplo a seguir, mi modelo de perseverancia, disciplina y amor por la profesión.

Gracias a todos,

¡El estudio de la flora marina de Panamá, apenas comienza...!

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ABREVIATURAS UTILIZADAS	14
RESUMEN	19
SUMMARY	20
INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LOS RODOLITOS	24
Descripción del término rodolito	25
Sistemas de clasificación de especies formadoras de rodolitos	28
Importancia ecológica de los rodolitos	32
Registros de especies formadoras de rodolitos en Panamá	36
Estudios de genética molecular de rodolitos en Panamá	39
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	41
Sitio de estudio	42
Colecta de especímenes de algas calcáreas formadoras de rodolitos	43
Enfoque 1: Optimización del método de extracción y amplificación	46
Extracción de ADN de rodolitos del PNC	46
Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación	49
Enfoque 2: Caracterización molecular de rodolitos del PNC y Costa Rica	54
Búsqueda de homologías	54
Edición y alineamiento de secuencias	54
Árboles filogenéticos	55
Análisis de delimitación de especies	55

Enfoque 3: Caracterización morfológica de rodolitos del complejo	56
<i>Lithophyllum coibense</i>	
Análisis morfométricos y morfoanatómicos	56
CAPÍTULO III: RESULTADOS	61
Optimización del método de extracción y amplificación de ADN de rodolitos del PNC	62
Caracterización molecular de rodolitos del Parque Nacional Coiba y Costa Rica	66
Análisis para el marcador <i>23S RNA</i> , UPA (amplicon universal del plastidio).	72
Taxonomía molecular de <i>Lithophyllum</i>	72
Taxonomía molecular de <i>Lithothamnion</i>	75
Taxonomía molecular de <i>Sporolithon</i> y <i>Neogoniolithon</i>	78
Análisis de delimitación de especies mediante distancias genéticas (ASAP) para el marcador UPA.	80
Análisis para el marcador <i>psbA</i> del cloroplasto.	83
Taxonomía molecular de <i>Lithophyllum</i>	83
Taxonomía molecular de <i>Lithothamnion</i>	85
Taxonomía molecular de <i>Sporolithon</i>	87
Análisis de delimitación de especies mediante distancias genéticas (ASAP) para el marcador <i>psbA</i> .	88
Caracterización morfológica de especímenes de rodolitos del clado ' <i>Lithophyllum coibense</i> ' del Parque Nacional Coiba	91
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	116
RECOMENDACIONES	117
REFERENCIAS	118
ANEXOS	132

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Lista de términos utilizados para nombrar a las algas rojas coralinas de vida libre. Modificado de Riosmena Rodríguez (2017).	25
Cuadro 2. Características para la clasificación de rodolitos propuestas por Bosence (1976, 1983).	28
Cuadro 3. La subclase Corallinophycidae: sus órdenes, familias, subfamilias y géneros formadores de rodolitos.	31
Cuadro 4. Investigaciones sobre los servicios ecosistémicos que brindan los rodolitos a nivel del Pacífico Este Tropical.	34
Cuadro 5. Listado de especies formadoras de mantos de rodolitos reportadas para Panamá.	37
Cuadro 6. Localidades y números de acceso a Gen Bank para secuencias disponibles de especies formadoras de rodolitos para Panamá.	40
Cuadro 7. Localidades de los sitios de colecta al noreste del Parque Nacional Coiba y sus características.	45
Cuadro 8. Métodos utilizados para la extracción de ADN de rodolitos de Panamá.	48
Cuadro 9. Marcadores utilizados para la amplificación de genes en este estudio.	50
Cuadro 10. Protocolos térmicos para amplificar marcadores UPA y psbA de rodolitos del Parque Nacional Coiba .	52
Cuadro 11. Caracteres vegetativos y reproductivos para identificar rodolitos.	58
Cuadro 12. Promedios de los valores de concentración del ADN (ng/μl) y DO (A260/280) de rodolitos del Parque Nacional Coiba.	63
Cuadro 13. Amplificaciones por método de extracción para marcadores UPA y psbA.	65
Cuadro 14. Caracterización molecular de 35 secuencias analizadas en este estudio. Resultados BLAST para especímenes de rodolitos del Parque Nacional Coiba Panamá, Parque Nacional Isla del Coco y Parque Nacional Isla del Caño.	68
Cuadro 15. Distribución de géneros de rodolitos por sitios de muestreo	71

Cuadro 16. Número de especies hipotetizadas según las distancias genéticas (ASAP) para el marcador UPA.	80
Cuadro 17. Número de especies hipotetizadas según las distancias genéticas (ASAP) para datos moleculares obtenidos con el marcador psbA.	88
Cuadro 18. Comparación morfoanatómica del clado ' <i>Lithophyllum sp</i> ' del Parque Nacional Coiba. Las mediciones se representan como media $\pm$ desviación estándar, seguido del rango en corchetes.	93
Cuadro 19. Continuación. Comparación morfoanatómica del clado ' <i>Lithophyllum sp. 1</i> ' del Parque Nacional Coiba.	94
Cuadro 20. Comparación de características de <i>Lithophyllum atlanticum</i> , <i>Lithophyllum okamurae</i> , <i>Lithophyllum neookamurae</i> y <i>Lithophyllum margaritae</i> .	107
Cuadro 21. Continuación. Comparación de características de <i>Lithophyllum atlanticum</i> , <i>Lithophyllum okamurae</i> , <i>Lithophyllum neookamurae</i> y <i>Lithophyllum margaritae</i> .	108

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Manto de rodolito del sitio Iglesias, Parque Nacional Coiba.	26
Fig. 2. Composición de nódulos de rodolitos.	27
Fig. 3. Diagrama triangular utilizado para la representación de la forma de los rodolitos.	29
Fig. 4. Formas de crecimiento de algas rojas no geniculadas, En el cuadro se agrupan las formas de crecimiento que presentan los rodolitos.	30
Fig. 5. Roles ecológicos de mantos de rodolitos.	35
Fig. 6. Enfoques de investigación para el estudio de rodolitos de Panamá desde 1918.	36
Fig. 7. Sitios de estudio al noreste del PNC.	42
Fig. 8. Sitios de estudio en el Parque Nacional Isla Del Coco, Costa Rica.	43
Fig. 9. Métodos empleados para el muestreo de rodolitos del Parque Nacional Coiba.	44
Fig. 10. Protocolo para la extracción de ADN de algas utilizando el método CTAB.	47
Fig. 11. Temperatura óptima de hibridación para la reacción en cadena de polimerasa con los primers psbAF1 y psbA600R.	53
Fig. 12. Microscopio electrónico de barrido con el cual se realizó el análisis de los ejemplares de especies formadoras de rodolitos del Parque Nacional Coiba.	57
Fig. 13. Características morfológicas de rodolitos vistas al microscopio electrónico.	60
Fig. 14. ADN aislado de muestras de rodolitos del PNC por cinco métodos de extracción en gel de agarosa al 1% (m/v).	64
Fig. 15. Histograma del porcentaje de coberturas de 35 secuencias consenso (query cover) de rodolitos en este estudio.	66
Fig. 16. Histograma del porcentaje de identidad de BLAST de 34 secuencias de rodolitos en este estudio.	66
Fig. 17. Rodolitos del Parque Nacional Coiba caracterizados según BLAST en este estudio.	70
Fig. 18. Distribución de géneros de rodolitos en el PNC por sitio de muestreo.	71
Fig. 19. Cladograma de Inferencia Bayesiana para las secuencias de UPA del género <i>Lithophyllum</i> del PNC, 500000 réplicas, K2P+I+G4.	74

Fig. 20. Cladograma de Inferencia Bayesiana para las secuencias UPA del género <i>Lithothamnion</i> del Parque Nacional Coiba, 500000 réplicas, K2P+I+G4.	77
Fig. 21. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de UPA para los géneros <i>Sporolithon</i> y <i>Neogoniolithon</i> del PNC, 500000 réplicas, K2P+I+G4.	79
Fig. 22. Diagrama de particiones y cluster de distancia genética por ASAP para secuencias de <i>Lithophyllum</i> de Coiba.	82
Fig. 23. Diagrama de particiones y cluster de distancia genética por ASAP para secuencias de <i>Lithophyllum</i> de Coiba.	82
Fig. 24. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA del género <i>Lithophyllum</i> de Costa Rica y Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.	84
Fig. 25. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA para el género <i>Lithothamnion</i> de Costa Rica y Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.	86
Fig. 26. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA del género <i>Sporolithon</i> de Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.	87
Fig. 27. Diagrama de particiones y cluster de distancia genética por ASAP para secuencias <i>psbA</i> de <i>Lithophyllum</i> de Coiba y Costa Rica.	90
Fig. 28. Diagrama de particiones y cluster de distancia genética por ASAP para secuencias <i>psbA</i> de <i>Lithothamnion</i> de Coiba y Costa Rica.	90
Fig. 29. <i>Lithophyllum</i> sp 1. NL-15. Hábito del talo y morfoanatomía	96
Fig. 30. <i>Lithophyllum</i> sp 1. NL-15-2. Hábito del talo y morfoanatomía	98
Fig. 31. <i>Lithophyllum</i> sp 1. NL-25. Hábito del talo y morfoanatomía	100
Fig. 32. <i>Lithophyllum</i> sp 1. NL-40. Hábito del talo y morfoanatomía	102
Fig. 33. <i>Lithophyllum</i> sp 1. NL-102. Hábito del talo y morfoanatomía	104

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ANAM: Autoridad Nacional de Ambiente de Panamá.

ASAP: *Assemble Species by Automatic Partitioning* (en español= ensamblaje de especies mediante partición automática).

BIO: equipo de reactivos de extracción de ADN animal marca Bioneer.

BIORAD: *Biological & Radiation* (en español= biológico y radiación, marca la empresa biotecnológica BIO-RAD).

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (en español= programa de búsqueda de alineamiento de secuencias de tipo local).

BSA: *Bovine serum albumin* (en español= albúmina sérica bovina).

CCA: *Calcareus algae* (en español= algas calcáreas).

CIA: cloroformo y alcohol isoamílico.

CIMAR: Centro de Investigaciones del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica.

CMAR: Corredor Marino del Pacífico Este Tropical.

cox 2: Ciclooxygenasa 2.

cox 1: Ciclooxygenasa 1.

CTAB: *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (en español= bromuro de cetil trimetilamonio).

CUFI: Convocatoria universitaria de fondos de investigación de la Universidad de Panamá

D1: Proteína fotosistema II (PSII).

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DO: Densidad óptica.

EBSA: *Ecologically or Biologically Significant Marine Areas* (en español= áreas marinas ecológicas o biológicamente significativas).

GTR+F+I+G4: *General time reversible + base frequencies + invariant sites + gamma distribution with 4 categories* (en español= modelo de sustitución de nucleótidos reversible + diferentes frecuencias de bases + posiciones que no cambian en el tiempo + distribución gamma con 4 categorías)

H: estadístico de prueba de Kruskal-Wallis.

IDIAP: Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá.

iToL: *Interactive Tree of Life* (en español= árbol filogenético interactivo de la vida).

JC36: Modelo Jukes -Cantor de 1969.

K2P+I+G4: *Kimura 2-parameter + invariant sites+ gamma distribution with 4 categories model* (en español= modelo de dos parámetros de Kimura + sitios invariantes + distribución gamma con 4 categorías).

K80: Modelo de Kimura de 1980.

L-INS-i: *Local Insertion Iterative method* (en español= método iterativo de inserción local).

LSU: *Large Subunit* (en español= subunidad mayor del ARN ribosómico).

m/v: relación masa/volumen.

MAFFT: *Multiple alignment using fast Fourier transform* (en español= alineamiento múltiple utilizando la transformada rápida de Fourier).

MANA: equipo de reactivos de extracción de ADN de plantas marca Macherey Nagel.

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (en español= análisis genético evolutivo molecular).

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (en español= Centro Nacional de Información Biotecnológica).

ng/μl: relación nanogramos/microlitros.

NL: Noemí León .

p23Sr-fl= fragmento o una región 5'-- 3' de la secuencia del gen 23S rRNA (ARN ribosómico 23S).

p23Sr-r1: fragmento o una región 3'—5' de la secuencia del gen 23S rRNA (ARN ribosómico 23S).

PAST: *Paleontological Statistics Software* (en español= programa de estadística paleontológica).

pb: pares de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (en español= reacción en cadena de polimerasa).

p-distance: distancia -p.

PET: Pacífico Este Tropical.

PNC: Parque Nacional Coiba.

psbA: *Photosystem b, subunit A* (en español= FOTOSISTEMA B, subunidad A).

psbA600R: cebador reverse que amplifica el gen psbA en dirección 3' a 5'.

psbAF1: cebador forward que amplifica el gen psbA en dirección 5' a 3'.

QIA: reactivos de extracción de ADN de plantas marca Qiagen.

rbcL: subunidad grande de la ribulosa biscofosfato carboxilasa (RuBisCO).

RNA: *Ribonucleic acid* (en español= ácido ribonucleico).

SEM: *Scanning electron microscopy* (en español= microscopio electrónico de barrido).

SNF: *Small Natural Features* (en español= pequeñas características naturales).

STRI: Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales.

Taq: *Thermus aquaticus*.

TBE: Tris/Borato/EDTA.

TFI: reactivos de extracción de ADN de plantas marca Thermo Fisher.

UCR: Universidad de Costa Rica.

UPA: *Universal Plastid Amplicon* (en español: amplicon universal del plastidio).

RESUMEN

Los fondos poco profundos del Parque Nacional Coiba (PNC) albergan grandes áreas de rodolitos, algas rojas calcificadas que forman nódulos sueltos. Aunque han sido poco estudiados en Coiba y Centroamérica, los rodolitos son unidades funcionales de pequeñas características debido a su capacidad para proporcionar hábitat a diversas especies, a pesar de su pequeño tamaño. Están compuestos principalmente de carbonato de calcio, lo que ayuda a estabilizar el lecho marino funcionando como sustrato para el crecimiento de especies comerciales, como peces y crustáceos, y una gran biodiversidad marina. Su capacidad para transformar los fondos marinos en hábitats les permite ser considerados como bioingenieros del océano. Sin embargo, su vulnerabilidad al cambio climático, especialmente a la acidificación oceánica, ha aumentado el interés en su estudio. En el PNC, los mantos de rodolitos se encuentran entre 10 y 20 m de profundidad, pero su variabilidad morfológica genera confusión en la identificación de especies. Este estudio presenta una caracterización molecular de rodolitos al noreste del PNC y en otras áreas insulares de Costa Rica y Panamá. Se generaron 35 secuencias de ADN, de las cuales 17 corresponden al marcador UPA y 18 al psbA. Los resultados indican que el 45% de las secuencias corresponden a *Lithophyllum*, el 37% a *Lithothamnion*, el 9% a *Sporolithon* y el 3% a *Neogoniolithon*, *Roseolithon*, *Mesophyllum* y *Polystrata*. Los análisis sugieren la presencia de 17 posibles especies, representadas en seis géneros. Se identificaron nuevos reportes para Panamá, como *Lithophyllum corallinae*, *Sporolithon indopacificum* y *Neogoniolithon* sp., y posibles nuevos registros para el Pacífico de Centroamérica. Este estudio es el primero sobre taxonomía molecular de rodolitos en Panamá y en el PNC, marcando un paso esencial para la conservación de estos bioingenieros en el Corredor Marino del Pacífico Tropical (CMAR).

SUMMARY

The shallow waters of Coiba National Park (PNC) host large areas of rhodoliths, calcified red algae that form loose nodules. Although they have been little studied in Coiba and Central America, rhodoliths are functional units of small features due to their ability to provide habitat for various species despite their small size. They are primarily composed of calcium carbonate, which helps stabilize the seafloor, acting as a substrate for the growth of commercially important species such as fish and crustaceans, as well as supporting a rich marine biodiversity. Their ability to transform the seafloor into habitats allows them to be considered bioengineers of the ocean. However, their vulnerability to climate change, particularly ocean acidification, has increased interest in their study. In the PNC, rhodolith beds are found at depths between 10 and 20 meters, but their morphological variability causes confusion in species identification. This study presents a molecular characterization of rhodoliths from the northeast of the PNC and other island areas of Costa Rica and Panama. A total of 35 DNA sequences were generated, 17 corresponding to the UPA marker and 18 to the psbA marker. The results indicate that 45% of the sequences belong to *Lithophyllum*, 37% to *Lithothamnion*, 9% to *Sporolithon*, and 3% to *Neogoniolithon*, *Roseolithon*, *Mesophyllum*, and *Polystrata*. The analyses suggest the presence of 17 possible species, represented by six genera. New reports for Panama were identified, such as *Lithophyllum corallinae*, *Sporolithon indopacificum*, and *Neogoniolithon sp.*, as well as possible new records for the Pacific of Central America. This study is the first molecular taxonomy work on rhodoliths in Panama and PNC, marking an essential step for the conservation of these bioengineers in the Tropical Pacific Marine Corridor.

INTRODUCCIÓN

Los fondos someros de comunidades coralinas del PNC se caracterizan por ser sustratos aptos para el crecimiento de macroalgas; poseen una importante extensión de aproximadamente 150 km de rodolitos (Guzmán et al., 2004). Los rodolitos son algas rojas calcáreas de vida libre, compuestas principalmente de carbonato de calcio. Estas algas son consideradas “modificadores de hábitat” o “bioingenieros oceánicos” ya que brindan un hábitat estable a comunidades de organismos (otras especies de algas e invertebrados) entre sus talos tridimensionales ramificados y entrelazados (Riosmena-Rodríguez, 2017).

El incremento en el interés de estudiar los rodolitos a nivel mundial, ha documentado información sobre las características que elevan su importancia como ecosistema; se consideran puntos marinos críticos de biodiversidad (hotspots), son sensibles a las variaciones de temperatura y se constituyen como indicadores de la acidificación del océano (Frederick et al., 2019). Estas características los convierten en un biotopo único en el mundo, pero, debido al poco conocimiento científico sobre ellos, factores ambientales y actividades antropogénicas como calentamiento global, contaminación y pesca de arrastre se les considera en la mayoría de los casos como especies amenazadas (Potin et al., 1990; Morse et al., 2006; Andersson et al., 2007; Riosmena-Rodríguez et al., 2007; Ragazzola et al., 2012; Adey et al., 2013; Halfar et al., 2013; Centelles, 2019; Rebelo et al., 2022; y Tuya et al., 2023).

A la fecha, varios autores han reportado la presencia de rodolitos para Panamá (Lemoine, 1929; Taylor, 1945; Dawson, 1960, 1961; Earle, 1972; Richards et al., 2017, 2021; Littler y

Littler, 2008; Fernández García et al., 2011; Hernández-Kantun et al., 2016; Gabrielson et al., 2018; y Robinson, 2013), no obstante, la falta de una definición como ecosistema, la taxonomía confusa de las especies (Riosmena-Rodríguez, 2017) y la carencia de información genética son factores limitantes para el diseño e implementación de planes de manejo y conservación de organismos marinos a nivel nacional y regional (Díaz-Ferguson, 2012).

Las amenazas a los ecosistemas marino-costeros, como los arrecifes de coral, manglares, marismas, pastos marinos y humedales, están en aumento, lo que hace crucial el monitoreo y la documentación para gestionar estos recursos de manera sostenible. Sin embargo, los rodolitos, ecosistemas igualmente valiosos, no reciben la misma atención y protección. A pesar de su rol clave en el mantenimiento de la biodiversidad y en la estabilización del fondo marino, los rodolitos carecen de estrategias de monitoreo adecuadas que faciliten su conservación. Al incluir a los rodolitos en los planes de monitoreo y gestión, se podría promover una gestión más completa de los ecosistemas marinos, incrementando la resiliencia y sostenibilidad de estos recursos frente a las crecientes amenazas ambientales.

Las investigaciones sobre los rodolitos en el Pacífico Este Tropical (PET) son escasas (Robinson, 2013), lo que revela que estos ecosistemas permanecen en gran parte desconocidos y subestimados en su importancia ecológica. Esta falta de información limita nuestra capacidad de implementar medidas de conservación efectivas y sostenibles para estos hábitats.

Tomando en consideración la necesidad de conocer los géneros y especies de rodolitos del PNC para evidenciar el papel que juegan en la construcción de ecosistemas que albergan gran diversidad de especies marinas y, en consecuencia, incorporar dicha información en la

planificación, manejo y sostenibilidad de dicha área protegida como parte del PET se desarrolló la presente investigación.

Objetivo general:

Caracterizar molecularmente los rodolitos del PNC y otras áreas insulares de Panamá y Costa Rica.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar molecularmente especies de rodolitos del PNC y Costa Rica, mediante dos marcadores moleculares: UPA y psbA.
2. Analizar estadísticos de distancia genética por ASAP para diferentes especies de rodolitos recolectados en las zonas de estudio.
3. Caracterizar morfológicamente el clado *Lithophyllum sp.1* de rodolitos del Parque Nacional Coiba con soporte molecular.

CAPÍTULO I

CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LOS RODOLITOS

DESCRIPCIÓN DEL CONCEPTO “ RODOLITO”

Etimológicamente, el término rodolito proviene del vocablo griego que significa piedra roja y se describen como nódulos y crecimientos ramificados libres con una forma nodular compuestos principalmente de algas coralinas no geniculadas (Bosence, 1983, Harvey y Woelkerlin) (Fig.1). Otros términos han sido aplicados para nombrar a las algas coralinas de vida libre, lo que dificulta el reconocimiento de un nombre común generalizado para referirse a este grupo de algas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de términos utilizados para nombrar a las algas rojas coralinas de vida libre. Modificado de Riosmena-Rodríguez (2017).

Término científico	Traducción
<i>Boxwork</i>	Caja de rodolito
<i>Rhodolith</i>	
<i>Coating</i>	Revestimiento
<i>Coralline algal nodules</i>	Nódulo de alga coralina
Maërl	Maërl
<i>Nucleated rhodoliths</i>	Rodolito Nucleado
<i>Nodules</i>	Nódulos
<i>Prâlines</i>	Almendra garapiñada
<i>Oncolith/</i>	Oncolitos/
<i>Onkoid</i>	Oncoide
<i>Rhodoid</i>	Rodoide
<i>Rhodolith</i>	Rodolito
<i>Rodolite</i>	Rodolita
<i>Rubble</i>	Grava
<i>Unattached branches</i>	Ramas libres

Los nombres más comunes para referirse a estos organismos son mäerl y manto de rodolito. El término Mäerl fue documentado por Crouan y Crouan (1867) para referirse a

coralinas ramificadas de vida libre que habitan extensos depósitos de algas en la costa Noroeste de Francia (Riosmena-Rodriguez, 2017). Este nombre proviene a su vez de “marga”, “marle” o “marne” nombres utilizados para hacer referencia a depósitos sedimentarios calcáreos no algales, lo que no refleja la composición real de estos organismos. Otros definen maërl como derivada del Latin “margella”, que significa coral. De esta manera, Hall-Spencer et al. (2010) lo define como un término colectivo para varias especies de algas rojas coralinas no articuladas que viven sueltas.

El nombre rodolito propuesto por Bosellini y Ginsburg (1973) surge como una forma de sustituir el término rodolita/rhodolite, ya que solía confundirse con el concepto atribuible a una variedad de minerales de color rosa del grupo de los granates (Binda, 1973). Por tanto, ambos nombres: maërl/rodolitos se atribuyen a las agregaciones de algas coralinas no geniculadas de vida libre que cubren extensas áreas bénticas de los océanos (Aguirre et al., 2017; Riosmena-Rodriguez 2017).



Fig.1. Manto de rodolito del sitio Iglesias, Parque Nacional Coiba.

Los rodolitos individuales pueden estar compuestos por una sola especie de alga roja calcificada (monoespecíficos) o múltiples especies (multiespecíficos) (Fig. 2A). También, pueden desarrollarse alrededor de un núcleo esquelético de coral o conchas (Fig. 2B), aunque puede crecer sin ningún material en el centro produciendo un arreglo concéntrico del talo (Fig. 2C). Otra característica muy interesante de los rodolitos es su amplia variedad de hábitos de crecimiento y su forma discoide o irregular (Fig.2D). Estos detalles son importantes para describir la estructura de la comunidad algal (Del Río et al., 2022; Bracchi et al., 2022, Costa et al., 2023, Aguirre et al., 2017).

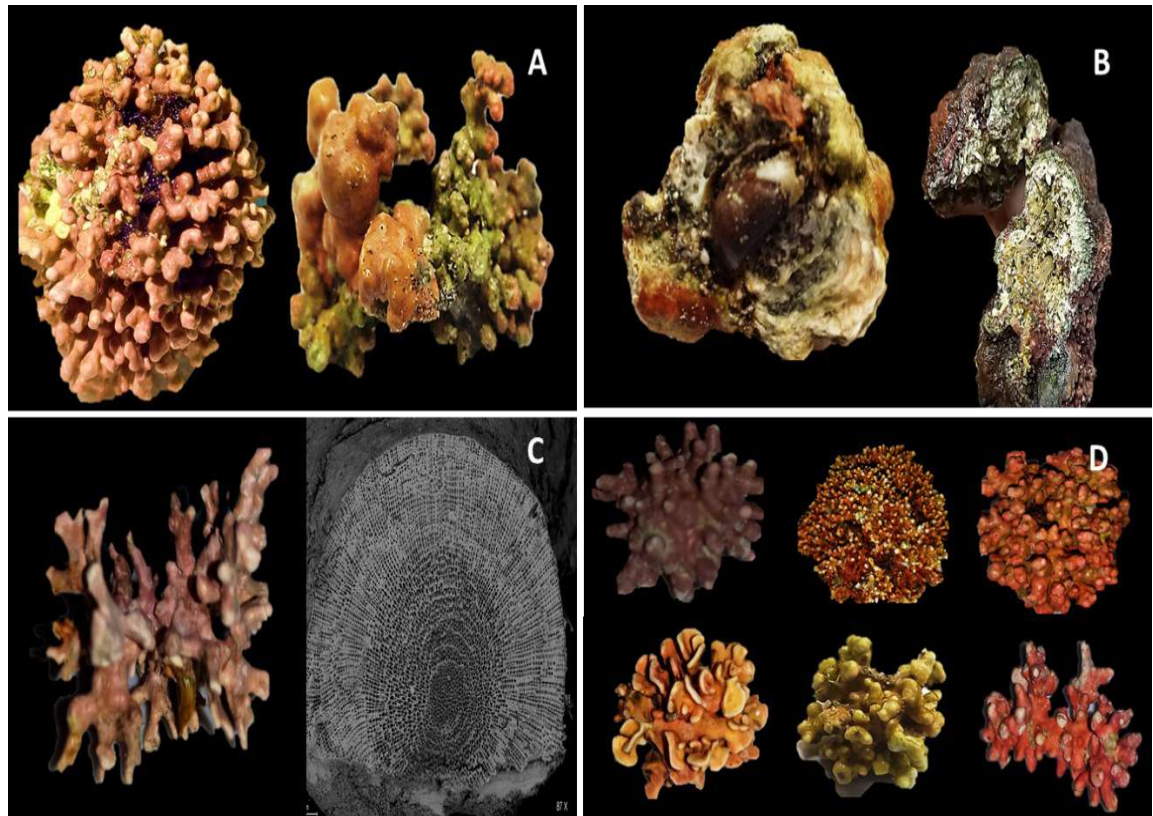


Fig. 2. Composición de nódulos de rodolitos: a) una sola especie (monoespecífico) y múltiples especies (multiespecífico), b) núcleo esquelético y sin núcleo, c) disposición concéntrica del alga y d) formas de crecimiento.

SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE ESPECIES FORMADORAS DE RODOLITOS

Los rodolitos presentan una gran variedad de formas. Muchas especies de algas coralinas de vida libre contienen más de una especie de coralina, lo que hace que la composición del rodolito pueda cambiar con el tiempo y su clasificación sea muy compleja.

Una propuesta inicial para la clasificación de los rodolitos fue desarrollada por Bosence (1976, 1983), quien estableció un esquema general completo de clasificación basado en diferentes características externas (Cuadro 2). Este sistema es útil para la descripción de comunidades de rodolitos.

Cuadro 2. Características para la clasificación de rodolitos propuestas por Bosence (1976, 1983).

<i>Característica de clasificación</i>	<i>Descripción</i>
<i>Composición taxonómica</i>	Monoespecífico y multiespecífico.
<i>Morfología externa</i>	Esféricos, elipsoidales y discoidales
<i>Densidad de ramificaciones</i>	I: ramificación simple II: ramificación abierta III: ramificación frecuente

Formas de crecimiento

IV: densamente ramificado

Laminar, concéntrico o boxwork,
ramificado y columnar

Woelkerling (1993), mediante una adaptación del diagrama triangular para la clasificación de las formas de piedras pequeñas de Sneed y Folk (1958) (Fig.3) propuso que las algas coralinas no geniculadas se clasificaran de acuerdo con su forma de crecimiento (Fig. 4).

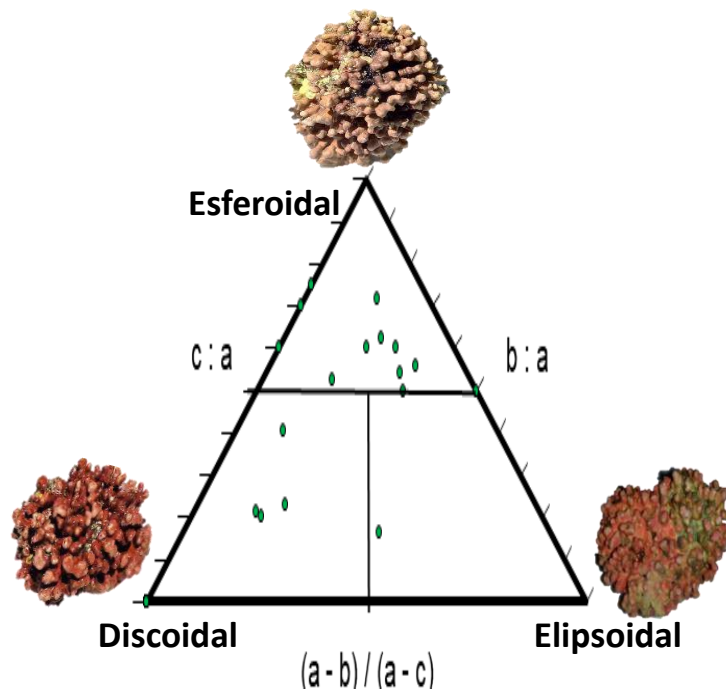


Fig. 3. Diagrama triangular utilizado para la representación de la forma de los rodolitos. Las letras indican el tamaño de los ejes de los rodolitos a=largos, b=intermedios y c=cortos.

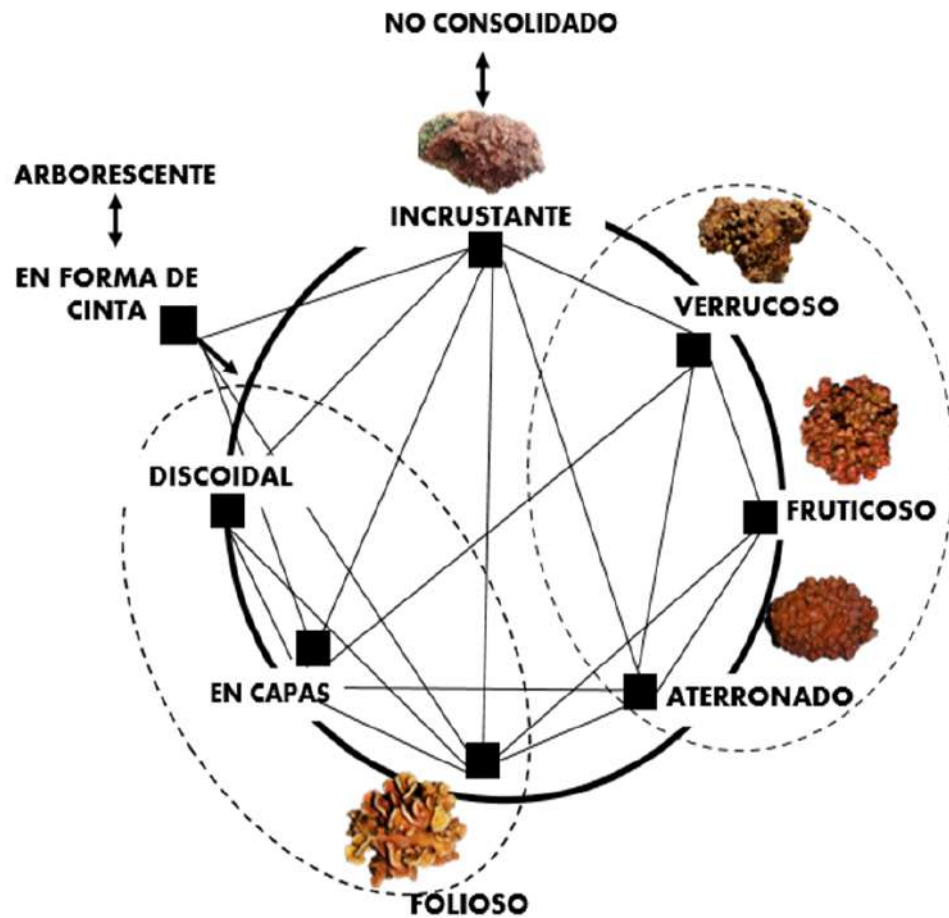


Fig. 4. Formas de crecimiento de algas rojas no geniculadas, En el cuadro se agrupan las formas de crecimiento que presentan los rodolitos. Modificado de Woerkling, 1993.

Por mucho tiempo los intentos de describir y clasificar a los rodolitos fueron basados en estos sistemas morfológicos-ecológicos. Sin embargo, a partir del uso de la información molecular el sistema de clasificación de los rodolitos ha sido modificado (Bailey 1996, 1998 y 2004). Actualmente, la clasificación de las algas coralinas no geniculadas (Cuadro 3), que es el grupo donde se incluyen a los rodolitos, puede ser inferido a partir del trabajo de Robinson, 2013; Hernández-Katun et al., 2014; Nelson et al., 2015; y Peña et al., 2020.

Cuadro 3. La subclase Corallinophycidae: sus órdenes, familias, subfamilias y géneros formadores de rodolitos.

Corallinophycidae (subclase)

Corallinales (orden)		
FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNEROS FORMADORES DE RODOLITOS
Corallinaceae	Chamberlainoideae	<i>Chamberlainium</i> , <i>Pneophyllum</i>
Hydrolithaceae	Hydrolithoideae	<i>Hydrolithon</i>
Lithophyllaceae	Lithophylloideae	<i>Goniolithon</i> , <i>Lithophyllum</i> , <i>Titanoderma</i>
Mastophoraceae	Mastophoroideae	<i>Lithoporella</i>
Porolithaceae	Porolithoideae	<i>Porolithon</i> , <i>Harveyolithon</i>
Spongitiaceae	Neogoniolithoideae	<i>Neogoniolithon</i> , <i>Spongites</i>
Hapalidiales (orden)		
FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNEROS FORMADORES DE RODOLITOS
Hapalidiaceae		<i>Lithothamnion</i>
	Mesophylloideae	<i>Mesophyllum</i> , <i>Synarthrophyton</i>
	Melobesioideae	<i>Phymatolithon</i> , <i>Roseolithon</i>
Sporolithales (orden)		
FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNEROS FORMADORES DE RODOLITOS
Sporolithaceae		<i>Sporolithon</i>

IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS RODOLITOS

Las investigaciones sobre rodolitos alrededor del mundo han ido despertando cada vez más el interés de asociaciones, gobiernos y comunidad científica en la planificación y gestión de este recurso algal por la gran cantidad de servicios ecosistémicos que brindan.

Los rodolitos son reconocidos como áreas marinas ecológicas o biológicamente significativas (*EBSA*, por sus siglas en inglés) que requieren conservación.

Recientemente, también se les ha clasificado como unidades naturales de pequeñas características (*SNF*, por sus siglas en inglés), debido a su importancia clave en la ecología marina. Esto se debe a que los rodolitos proporcionan recursos cruciales, como hábitats para diversas especies marinas y soporte para el crecimiento de organismos comerciales, como peces y crustáceos.

Además, influyen en procesos ecológicos, como la estabilización del lecho marino y la contribución al mantenimiento de la biodiversidad. Estos procesos benefician a áreas más grandes del ecosistema marino, como los ecosistemas de arrecifes coralinos y zonas de pesca comercial, ayudando a mantener la salud y la productividad de estos hábitats (Lundquist et al., 2017; Hunter et al., 2023; Tuya et al., 2023).

El reconocimiento y la gestión de los SNF como unidades de importancia ecológica son fundamentales para facilitar la conservación de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos proporcionados por los rodolitos.

Sin embargo, debido a su naturaleza delicada y a menudo subestimada, los rodolitos son altamente vulnerables a la degradación por actividades humanas y cambios ambientales, lo que incrementa su riesgo de desaparición (Hunter et al., 2023).

Por lo tanto, protegerlos es crucial para preservar los servicios que ofrecen, como la estabilización de los fondos marinos y la provisión de hábitats para diversas especies marinas.

La biodiversidad que provee un manto de rodolito y todas las evidencias que existen sobre sus diferentes roles ecológicos (Fig. 5) han permitido clasificarlos como SNF según siete criterios: rareza, importancia para historia y ciclo de vida de las especies y naturaleza, área de importancia para especies amenazadas o en peligro, gran diversidad y productividad biológica, hábitats vulnerables y de recuperación lenta (Tuya et al., 2023; Díaz-Licona, 2024).

Desde esta perspectiva una serie de investigaciones respaldan los diferentes servicios ecosistémicos que brindan los rodolitos y su importante rol dentro de los ecosistemas marinos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Investigaciones sobre los servicios ecosistémicos que brindan los rodolitos a nivel del Pacífico Este Tropical.

Servicio ecosistémico	Referencias
<i>Hábitat y refugio</i>	Robinson 2013; Riosmena-Rodríguez 2017; Solano-Barquero 2022; León et al., 2023; Díaz-Licona 2024.
<i>Puntos de biodiversidad</i>	Littler y Littler 2008; Robinson 2013; Amado-Filho et al., 2017; Riosmena-Rodríguez 2017; Solano-Barquero 2022; Díaz-Licona 2024.
<i>Indicadores de acidificación oceánica</i>	Ragazzola et al., 2012; Kamenos et al., 2017; Martin y Half Spencer 2017; Frederick et al., 2019.
<i>Producción de carbonato de calcio</i>	Adey et al., 2013; Coletti et al., 2017; Rebelo et al. 2022.
<i>Soporte para el crecimiento y desarrollo de otras especies</i>	Robinson 2013; Amado-Filho et al., 2017; León et al., 2023; Díaz-Licona 2024.
<i>Producción de sedimentos costeros</i>	Riosmena-Rodriguez 2012; Bassi et al., 2017.
<i>Predicciones paleoclimáticas</i>	Robinson 2013; Kamenos et al., 2017.
<i>Recreación y turismo</i>	Díaz-Licona 2024.
Prevención y moderación de disturbios	Frederick et al., 2019; Díaz-Licona 2024.

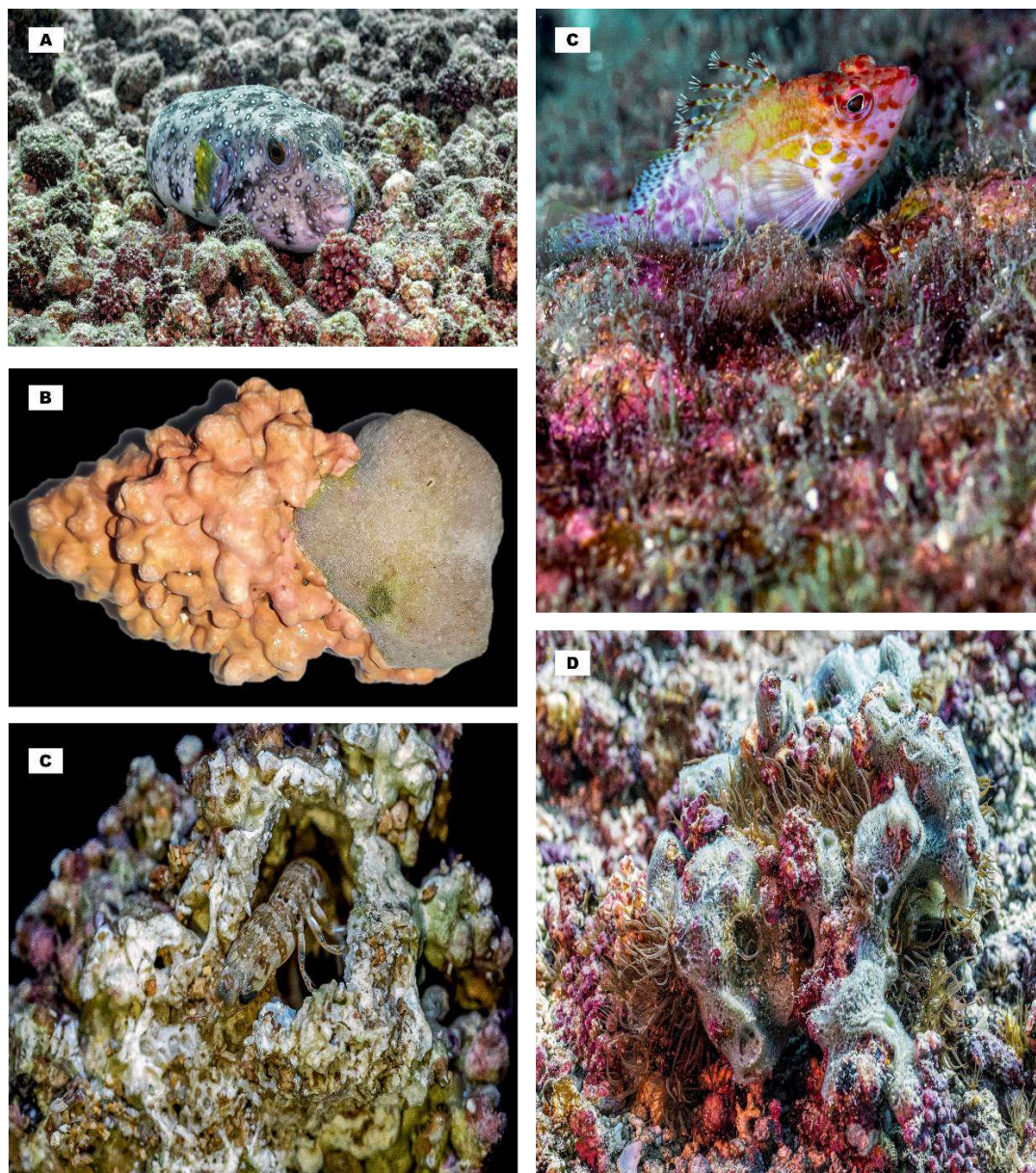


Fig. 5. Roles ecológicos de mantos de rodolitos: A) guardería y hábitat de peces, B) reclutas de corales, C), refugio de invertebrados, D) sustrato para el crecimiento de otras algas y E) soporte para el crecimiento de invertebrados (esponjas y anémonas). Fotos: Eduardo Estrada/Parque Nacional Coiba.

REGISTROS DE ESPECIES FORMADORAS DE RODOLITOS EN PANAMÁ

El estudio de rodolitos en Panamá se circunscribe a dos enfoques de investigación: 1) registros de campo y revisiones literarias y 2) estudios anatómicos y moleculares, los cuales se detallan en la Fig. 6. Con base en esta revisión, se reportan 21 especies de algas rojas calcáreas formadoras de rodolitos para Panamá (14 del orden Corallinales, cinco del orden Hapalidiales y dos del orden Sporolithales; Cuadro 5).

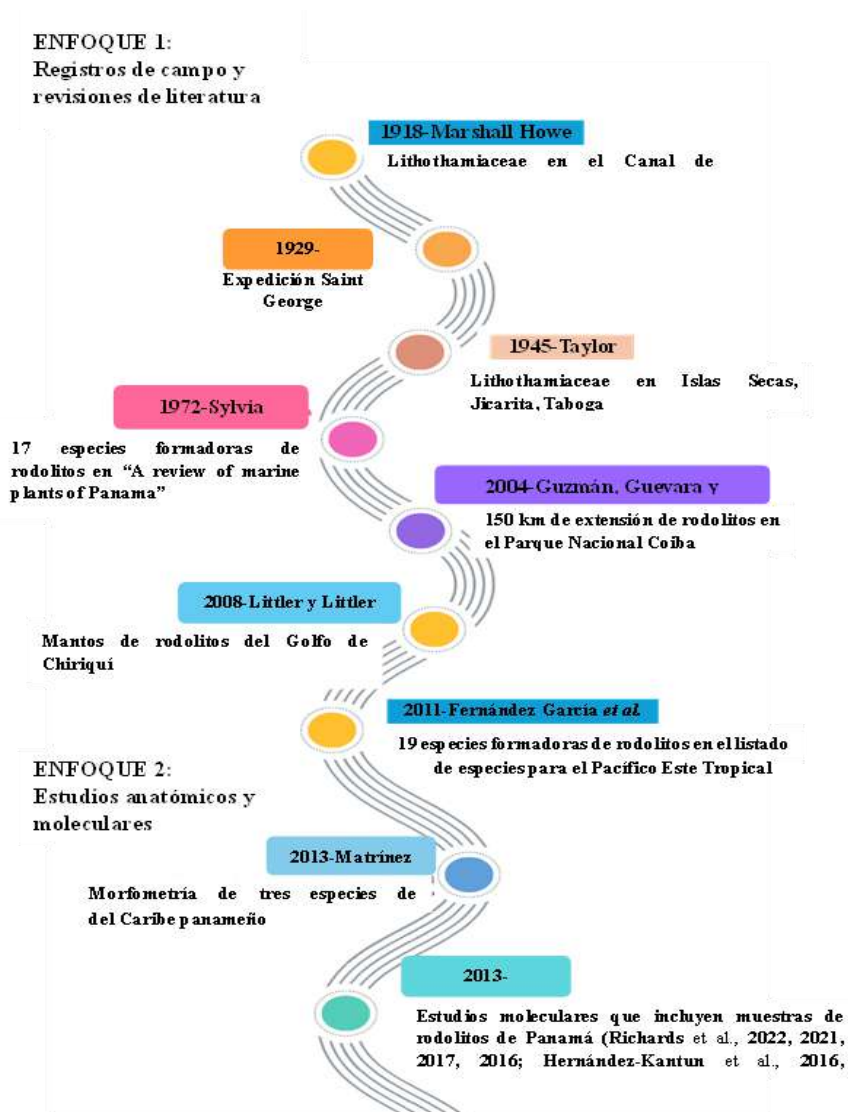


Fig. 6. Enfoques de investigación para el estudio de rodolitos de Panamá desde 1918.

Cuadro 5. Listado de especies formadoras de mantos de rodolitos reportadas para Panamá.
En paréntesis el número de referencia de la literatura donde se encuentra el reporte.

Orden Corallinales

Familia Corallinaceae

Sub-familia Chamberlainoideae

- 1-*Chamberlainium decipiens* (Foslie) Caragnano, Foetisch, Maneveldt & Payri: Pacífico
[= *Spongites decipiens* (3,5)]
- 2-*Pneophyllum confervicola* (Kützinger) YMcChamberlain: Pacífico [= *Heteroderma minutulum* (3,5)]

Familia Lithophyllaceae

Sub-familia Lithophylloideae

- 3- *Goniolithon decutescens* (Heydrich) Foslie ex M.Howe: Caribe: (13,17)
- 4- *Lithophyllum. alternans* Me.Lemoine: Pacífico (5,11)
- 5- *L. brachiatum* (Heydrich) Me.Lemoine: Pacífico (5,10,17)
- 6- *L. coibense* Me. Lemoine: Pacífico (5,10)
- 7- *L. divaricatum* M. Lemoine: Pacífico (5,18)
- 8- *L. neocongestum* JHernandez-Kantun, WHAdey & PWGabrielson Caribe: (8)
- 9- *L. okamurae* Foslie: Pacífico (13)
- 10- *L. pallescens* (Foslie) Foslie: Pacífico (3,5)
- 11- *L. prototypum* (Foslie) Foslie: Pacífico [= *Goniolithon tessellatum* (3,4,5)]
- 12- *Titanoderma pustulatum* (JVLamouroux) Nägeli: Caribe: (4,19,16)

Familia Porolithaceae

Sub-familia Metagoniolithoideae

- 13-*Harveyolithon munitum* (Foslie & M.Howe) A.Rösler, Perfectti, V.Peña & JCBraga:
Caribe: (6,14)

Familia Spongitiaceae**Sub-familia Neogoniolithoideae**

14-*Neogoniolithon trichotomum* (Heydrich) Setchell et L.R. Mason: Pacífico (3,5)

Orden Hapalidiales**Familia Hapalidiaceae****Sub-familia Melobesioideae**

15-*Lithothamnion australe* Foslie: Pacífico (3,5)

16-*L. australe f. americanum* Foslie: Pacífico (5,18)

17-*L. australe f. minutulum* Foslie: Pacífico [= *Mesophyllum australe* var. *minutula* (10)]

18-*L. crispatum* Hauck: Pacífico [= *L. indicum* (5,10,11)]

19-*Mesophyllum australe* var. *tualense* (Foslie) Mc. Lemoine: Pacífico (5,10)

Orden Sphorolithales**Familia Sporolithaceae**

20-*Sporolithon episporum* (M. Howe) EY Dawson: Caribe (4,10,11,19)

21-*S. howei* (Lemoine) N.Y. Yamaguishi-Tomita ex M-J. Wynne: Pacífico
[=*Archaeolithothamnion howei* (2,5,10)]

En función de los estudios ficológicos para el PET (Fernández-García, 2012; Robinson et al. 2017 y la base de datos Symbyota del STRI), nueve de los diez géneros reportados de algas calcáreas formadoras de rodolitos están presentes en el Pacífico de Panamá y la mayor cantidad se encuentran en el PNC (León et al., 2022). El género *Lithophyllum* es el más común y la subfamilia Lithophylloideae tienen mayor representatividad lo cual coincide con lo reportado por Robinson et al. (2017) para el Pacífico Este Tropical y con Díaz-Licona (2024) para Isla del Coco en Costa Rica. Otras áreas del Pacífico (Golfo de Chiriquí y Archipiélago de Las Perlas) reportan presencia de especies de rodolitos por lo que un mayor esfuerzo de muestro podría incrementar la diversidad en esas zonas.

ESTUDIOS DE GENÉTICA MOLECULAR SOBRE RODOLITOS DE PANAMÁ

En la actualidad se realizan estudios moleculares que permiten caracterizar e identificar especies formadoras de rodolitos utilizando genes como: *cox1*, *cox2*, *LSU*, *UPA*, *rbcL* y *psba*. De ellos, el gen *psba* ha sido el más utilizado para caracterizar las especies de rodolitos de Panamá (Cuadro 6), resolviendo potencialmente las relaciones filogenéticas.

En 2013, Robinson reporta por primera vez la especie *L. okamurae* para el Archipiélago de Las Perlas como resultado de sus estudios en morfología e información molecular. Richards et al., (2016) caracterizan molecular y morfológicamente dos especímenes del género *Lithothamnion* del Pacífico panameño. Luego, en 2017, Richards et al., confirman el reporte de *S. episporum* para el Caribe de Panamá e indican que el género *Sporolithon* sp. colectado en el Golfo de Chiriquí, Pacífico de Panamá, podría ser la especie *S. howei* o *S. pacificum*. En 2021, el mismo autor confirma molecularmente el reporte de *Harveyolithon munitum* (Corallinales) para Panamá y una posible especie hermana entre *H. maris-bahiensis* de Brazil y la secuencia panameña y en 2022, incluye dos secuencias de rodolitos de Panamá en un análisis de taxonomía molecular de rodolitos del Noroeste del Golfo de México.

La base datos en el sitio web de NCBI registra 28 secuencias de especies formadoras de rodolitos de Panamá, la mayor parte de Caribe (Cuadro 6). Esta situación dificulta la comparación entre especímenes locales, a la vez que brinda la oportunidad de iniciar la generación de más información molecular sobre rodolitos en el país.

Cuadro 6. Localidades y números de acceso a Gen Bank para secuencias disponibles de especies formadoras de rodolitos para Panamá.

#	Especie	Localidad	ID	Número de acceso a GenBank					
				COX2	LSU	COI	<i>rbcL</i>	UPA	<i>psbA</i>
1	<i>Harveylithon sp.</i>	Cayo Wild, Bocas del Toro	PHYKOS 7053	----	----	----	----	----	MW452886
2	<i>H. munitum</i>	Escudo de Veraguas	PHYKOS_3593	----	MW457636.1	----	MF979962	----	----
3	<i>Lithophyllum sp.</i>	Isla Cébaco	LAF7219	----	KJ412333.1	KJ418417.1	----	----	KJ418411.1
4	<i>Lithophyllum sp. 3</i>	Cayo Swan, Bocas del Toro	FBCS12912	KJ801356.1	----	----	----	----	----
5	<i>Lithophyllum sp.3</i>	Sand Fly Bay, Bocas del Toro	FBCS12913	KJ801357.1	----	----	----	----	----
6	<i>Lithothamnion sp. 4</i>	Cayo Swan, Bocas del Toro	FBCS12920	KJ801364.1	----	----	----	----	----
7	<i>Lithothamnion sp. D</i>	Golfo de Chiriquí	LAF6631	----	----	----	----	KU519740	KU557500
8	<i>Lithothamnion I</i>	Cayo Swan, Bocas del Toro	FBCS12917	KJ801365.1	----	----	----	----	----
9	<i>Lithothamnion sp. J</i>	Isla Tintorera, Cerca de Isla Cébaco	PHYKOS7249	----	KR075891.1	KU504277	----	KU504275	KP844865
10	<i>L. neocongestum</i>	Bocas del Toro	NCU 598862	----	----	----	KX020485	----	----
11	<i>L. neocongestum</i>	Bocas del Toro	US223011	----	----	----	KX020484.1	----	KX020466
12	<i>L. neocongestum</i>	Bocas del Toro	US169412	----	----	----	----	----	KX020486
13	<i>L. neocongestum</i>	Bocas del Toro, Flat Rock Beach	US170968	----	----	----	----	----	KX020440
14	<i>L. neocongestum</i>	Sand Fly Bay, Bocas del Toro	US170967	----	----	----	----	----	KX020441
15	<i>Neogoniolithon sp</i>	Panama	VPF00177	----	----	KM392370.1	----	----	----
16	<i>S. episporum</i>	Punta Toro, Colón	NY_900041	----	----	----	KY994125.1	----	----
17	<i>S. episporum</i>	Bocas del Toro	NCU_598843	----	----	KY994113.1	KY994124.1	----	MF034547.1
18	<i>Sporolithon sp.</i>	Golfo de Chiriquí, cerca de Mono Feliz	PHYKOS_4623	----	----	----	----	----	MF034548.1

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Para los propósitos de este estudio se abordan tres ejes metodológicos: 1) optimización del proceso de extracción y amplificación del ADN de rodolitos, 2) la caracterización molecular de rodolitos del PNC y Costa Rica y 3) la caracterización morfológica de rodolitos del complejo *Lithophyllum coibense* del Parque Nacional Coiba.

Sitio de estudio

El estudio se realizó en siete sitios al noreste del PNC: Iglesias, Don Juan, Buffet, Canales de Afuera, Cocos, Granito de Oro y Playa Machete (Fig. 7). El PNC está situado frente a la costa sudoeste de Panamá, en el Golfo de Chiriquí, protege la isla de Coiba y otras 38 islas e islotes menores, así como las zonas marinas circundantes (ANAM, 2009).

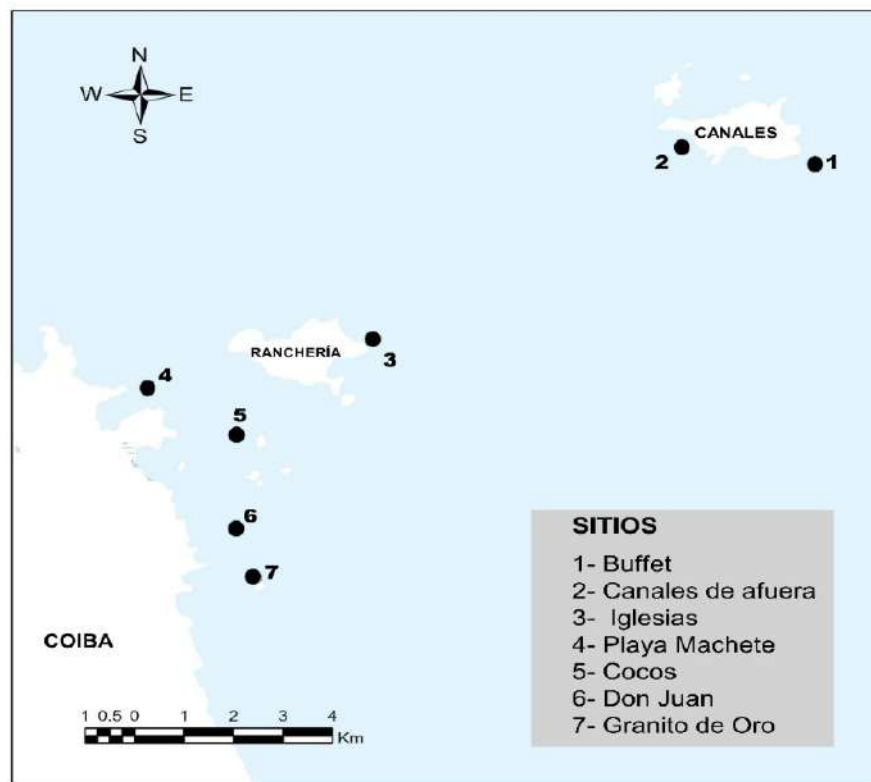


Fig. 7. Sitios de estudio al noreste del PNC

Las muestras de rodolitos de Costa Rica utilizadas en este estudio fueron obtenidas mediante las expediciones de la Dra. Cindy Fernández García al Parque Nacional Isla Del Coco (Fig. 8) para los sitios: Manuelita, Silverado, Weston e Isla Pájara, e Isla del Caño, entre mayo y junio de 2021 como parte del del proyecto *“Paleontología, morfología y genética como base para describir la evolución y la distribución de los rodolitos (Rhodophyta) en Costa Rica: recomendaciones para su conservación”*.

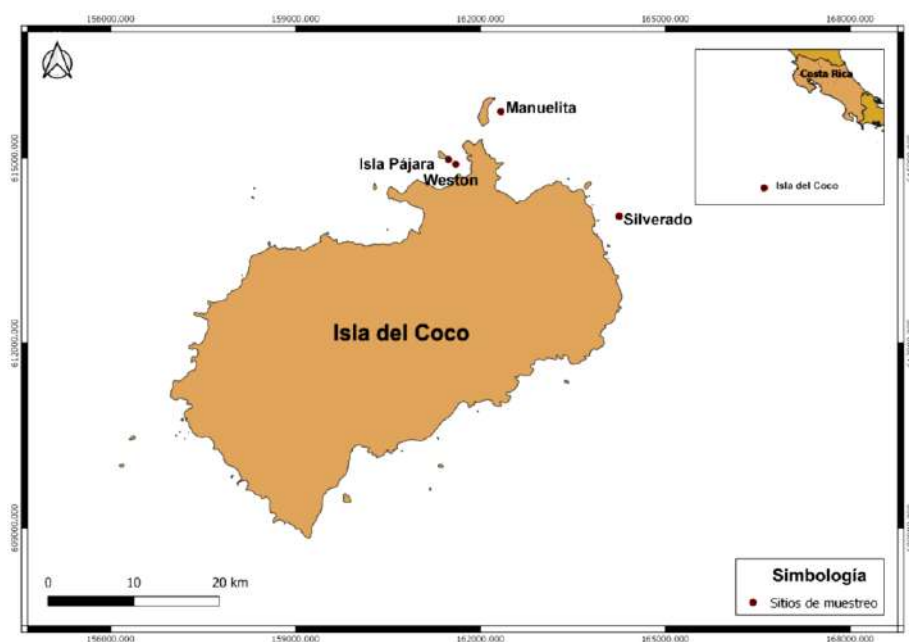


Fig. 8. Sitios de estudio en el Parque Nacional Isla Del Coco, Costa Rica. Fuente: Díaz Licona, 2024.

Colecta de especímenes

En total, 134 muestras de rodolitos fueron recolectadas en las giras de campo que se realizaron durante abril y diciembre 2022 y enero 2023 bajo el permiso de acceso al recurso genético y/o biológico N° ARG-129-2022 del Ministerio de Ambiente.

Se realizó un muestreo al azar por transectos perpendiculares a la línea de costa mediante snorkel a profundidades entre 2 a 3 metros (Fig. 9a) y por reconocimientos submarinos utilizando técnicas SCUBA estándar, en donde se colectó en un área aproximada de 250-500 m² en sitios entre 8 a 17 metros de profundidad (Fig. 9b). Las áreas de cobertura fueron medidas mediante fotografías tomadas con una cámara Canon EOS R6, lente de 85 mm macro. En cada localidad se tomaron coordenadas con un geoposicionador (Cuadro 7).

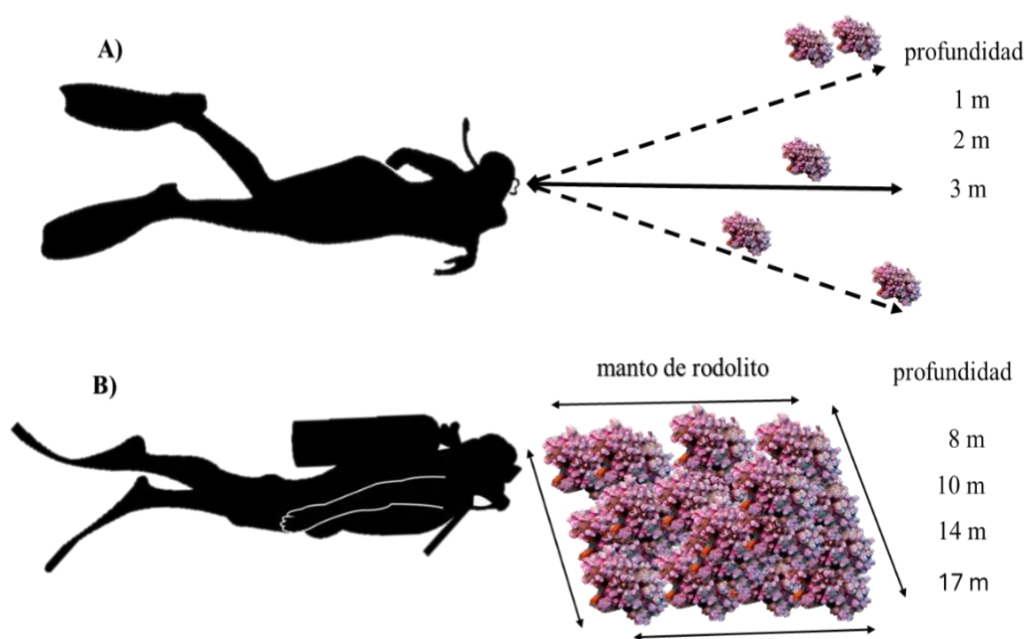


Fig. 9. Métodos empleados para el muestreo de rodolitos del Parque Nacional Coiba: A) transectos perpendiculares y B) reconocimiento de áreas entre 250- 500 m² a diferentes profundidades.

Los rodolitos fueron removidos del sustrato manualmente, colocados en bolsas plásticas con 20-30 g de cristales de sílica gel para los análisis moleculares y conservados en frío para análisis morfológicos. Una réplica del espécimen se secó a temperatura ambiente para ser depositada como voucher de referencia en el Herbario de la Universidad de Panamá. El procesamiento de las muestras de Coiba se realizó en el Laboratorio de Ecología Marina y Oceanografía de la Estación Científica Coiba AIP, en Isla Coiba.

Cuadro 7. Localidades de los sitios de colecta al noreste del Parque Nacional Coiba y sus características

#	Sitio	Latitud	Longitud	Profundidad (m)	Sustrato
1	Don Juan	7.39809	-81.638688	13	arenoso, rocoso
2	Granito de Oro	7.59473	-81.712234	2	arenoso
3	Playa Machete	7.63583	-81.732707	2	rocoso
4	Cocos	7.74455	-81.752404	3	arenoso, coralino
5	Iglesias	7.64541	-81.691662	10	arenoso
6	Buffet	7.68537	-81.610606	17	grava
7	Canales de Afuera	7.68887	-81.634189	14	arenoso

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Extracción de ADN de rodolitos del PNC

El trabajo molecular se realizó en varios centros de investigación: Laboratorio de Biología Molecular de la Estación Científica Coiba AIP, el Laboratorio de Análisis y Biología Molecular de IDIAP, el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética y Biología Molecular, el Centro de Investigación en Criobiología de la Universidad de Panamá y el Laboratorio de Genética de organismos acuáticos del Centro de Investigación en Ciencias de mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica. Se tomó aproximadamente 2 cm de rodolito y se limpió la superficie de cada fragmento para eliminar los epífitos. Se pulverizó el fragmento con un mortero para obtener aproximadamente 10 mg de polvo de cada individuo.

La extracción de ADN se realizó probando diferentes métodos, el método convencional CTAB (modificado de Murray y Thompson, 1980) (Fig. 10) y cuatro kits comerciales de extracción de ADN: 1) Kit nucleospin plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania), 2) Kit AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit para tejido animal (Bioneer, Yuseong-gu, República de Corea), 3) Kit de purificación de DNA GeneJET Plant Genomic (Thermo, Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y 4) Kit Dneasy Plant miniKit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) siguiendo protocolos modificados para la extracción de ADN de plantas y tejido calcificado (Cuadro 8, Anexo 1 y 2).

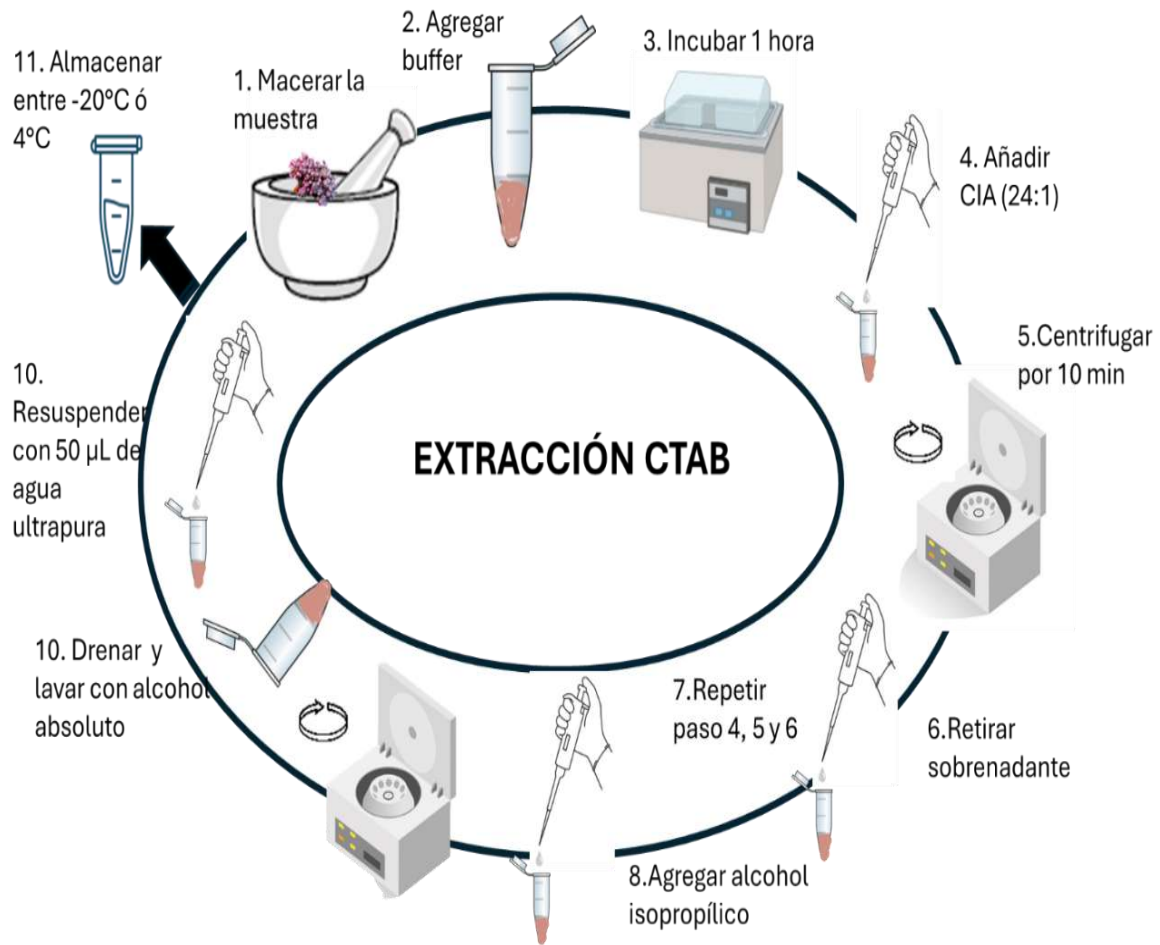


Fig. 10. Protocolo para la extracción de ADN de algas utilizando el método CTAB. Fuente: Pérez et al., 2024.

Para comprobar la calidad del material extraído se cuantificó la concentración de ADN (ng) en un microlitro (μ l) de la muestra mediante el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) del Laboratorio de Biología Molecular de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado en la Universidad de Panamá.

Los análisis de estadística descriptiva y pruebas no paramétricas se realizaron con el software PAST ver 4.17 (Hammer y Harper, 2024).

Cuadro 8. Métodos utilizados para la extracción de ADN de rodolitos de Panamá.

#	Kit	Homogenizado	Método	Lisis	Captura de DNA
1	----	mortero	CTAB	1 hora 65° C	CIA
2	BIO	mortero	Proteinasa K + RNasa A	1 hora 60°C	fibras de vidrio
3	TFI	mortero	RNasa A	10 min 65°C	membrana de silica
4	QIA	mortero	RNasa A	10 min 65°C	membrana de silica
5	MANA Ia	mortero	CTAB+ RNasa A	10 min 65°C	membrana de silica
	MANA Ib	mortero	SDS+ RNasa A	10 min 65°C	membrana de silica
6	MANA IIa	mortero	CTAB + RNasa A	30 min 65°C	membrana de silica
	MANA IIb	mortero + arena	CTAB + RNasa A	30 min 65°C	membrana de silica
7	MANA IIIa	mortero	CTAB+ RNasa A	2 horas a 65°C	membrana de silica
	MANA IIIb	mortero	CTAB+ RNasa A	Proteínasa K + 2 horas a 65°C	membrana de silica
8	MANA IVa	mortero	SDS+ RNasa A	2 h 65°C	membrana de silica
	MANA IVb	mortero + arena	SDS+ RNasa A	2 h 65°C	membrana de silica

CTAB= bromuro de cetiltrimetilamonio, **BIO**=Bioneer, **TFI**= Thermo Fisher, **QIA**= Qiagen y **MANA**= Macherey-Nagel.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR), cuantificación y secuenciación

La amplificación de ADN fue realizada utilizando fragmentos de dos genes: psbA del cloroplasto y UPA ribosomal. El marcador UPA (universal plastid amplicon) tiene una longitud de ~370 pb y se encuentra en la región 23 S del dominio V de la unidad ribosomal larga, es un gen no codificante y posee actividad peptidil transferasa (Saunders y Moore, 2013). Este marcador ha sido utilizado para revelar diversidad de algas rojas de Punta Burica, Panamá (Freshwater et al., 2017) y se considera un marcador universal para código de barra de un amplio rango taxonómico de algas (Sherwood y Presting, 2007).

Por su parte el marcador psbA tiene una longitud de ~950 pb, codifica para la proteína de membrana del tilacoide D1 del fotosistema II (cloroplasto), es un marcador útil para esclarecer relaciones de parentesco, fue desarrollado por Yoon et al., (2022), amplifica una gran cantidad de algas rojas y ha sido utilizado en estudios genéticos donde incluyen entre las muestras rodolitos de Panamá (Robinson N., 2013; Richards et al., 2016, 2021).

Para la reacción en cadena de polimerasa se utilizó el máster mix Taq PCR de Qiagen (Qiagen GmbH., Hilden, Germany) con la combinación de primers para cada marcador molecular detallado en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Marcadores utilizados para la amplificación de genes en este estudio.

Gen	Primer	Secuencia	Referencia
psbA	psbAFl	5'- ATGACTGCTACTTTAGAAAGACG-3'	Yoon et al., 2002
	psbA600R	5'- CCAAATACACCAGCAACACC-3'	
UPA	p23SrV-fl	5'-GGACAGAAAGACCCTATGAA-3'	Sherwood y Presting 2007
	p23SrV-r1	5- 'TCAGCCTGTTATCCCTAGAG-3'	

La optimización del PCR de ambos marcadores se realizó mediante siete experimentos y nueve mezclas de máster mix:

UPA- LSU (23S), dominio V del plastidio

Experimento 1- Protocolo Sherwood y Presting (2007)

Mezcla 1: 20 µl de H₂O, 25 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 2 µl de cada primer (forward y reverse) y volúmenes entre 1 y 5 µl de ADN dependiendo de su concentración.

Experimento 2- Disminución del volumen total de reacción de la mezcla

Mezcla 2: 9,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 1 µl de cada primer (forward y reverse) y entre 1 y 5 µl de ADN dependiendo de su concentración.

PSBA- proteína D1 de la membrana tilacoidal del fotosistema II en el cloroplasto

Experimento 1- Protocolo modificado Taq PCR Máster Mix Kit (2016)

Mezcla 3: 5,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 1 µl de cada primer (forward y reverse) y 5 µl de ADN independientemente de su concentración.

Experimento 2- Disminución concentración de primer y variación en volúmenes de ADN

Mezcla 4: 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 0,50 µl de cada primer (forward y reverse) y volúmenes variables de agua y ADN dependiendo de la concentración extraída.

Mezcla 5: 9,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 1 µl de cada primer (forward y reverse) y volúmenes entre 1 y 5 µl de ADN dependiendo de su concentración

Experimento 3- Adición de BSA como coadyuvante del PCR

Mezcla 6: 3,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 1 µl de cada primer (forward y reverse), 6 µl de ADN independientemente de su concentración y 1 µl de BSA.

Experimento 4- Adición de BSA, MgCl₂ + variación en la concentración de primer y de ADN.

Mezcla 7: 11 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 0,25 µl de cada primer (forward y reverse), 0,8 µl de MgCl₂ y 1 µl de ADN.

Mezcla 8: 10,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 0,50 µl de cada primer (forward y reverse), 0,8 µl de MgCl₂, 1 µl de BSA y volúmenes entre 1 y 5 µl de ADN dependiendo de su concentración.

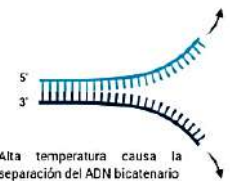
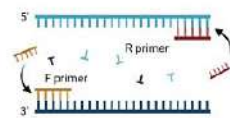
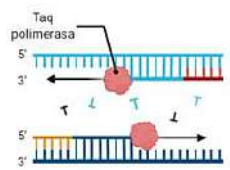
Experimento 5- Disminución del volumen de MgCl₂

Mezcla 9: 8,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix Kit Qiagen, 0,50 µl de cada primer (forward y reverse), 0,5 µl de MgCl₂, 1 µl de BSA y volúmenes entre 1 y 2 µl de ADN, dependiendo de su concentración.

En este estudio se prepararon 343 reacciones, en donde la mayor parte se realizaron en el termociclador BIORAD T100 del Centro de Investigación de Criobiología de la Universidad de Panamá. Otras reacciones se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Estación Científica Coiba AIP y el Laboratorio de Análisis y Biología Molecular de IDIAP.

Se configuraron y ejecutaron reacciones de PCR de 35 ciclos siguiendo los protocolos térmicos de Sherwood y Presting (2007) para UPA y para *psbA* el protocolo modificado de Richards et al. (2014) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Protocolos térmicos para amplificar marcadores UPA y *psbA* de rodolitos del Parque Nacional Coiba .

Etapa	UPA		<i>psbA</i>	
	°T	Tiempo	°T	Tiempo
<i>Activación</i> 	94°C	2 min	95°C	3 min
<i>Desnaturalización</i> 	94°C	20 s	95°C	30 s
<i>Hibridación</i> 	55°C		55,8°C	0,30 s
<i>Extensión inicial</i>	72°C	0,30 s	72°C	1 min
<i>Extensión final</i>	72°C	10 min	72°C	5 min
				
<i>Temperatura final</i>	4°C		4°C	

Para la obtención de los amplicones del marcador psbA, se realizó un ensayo de gradiente (59°C a 55°C) para conocer la temperatura óptima de hibridación de los primers (Fig. 11).

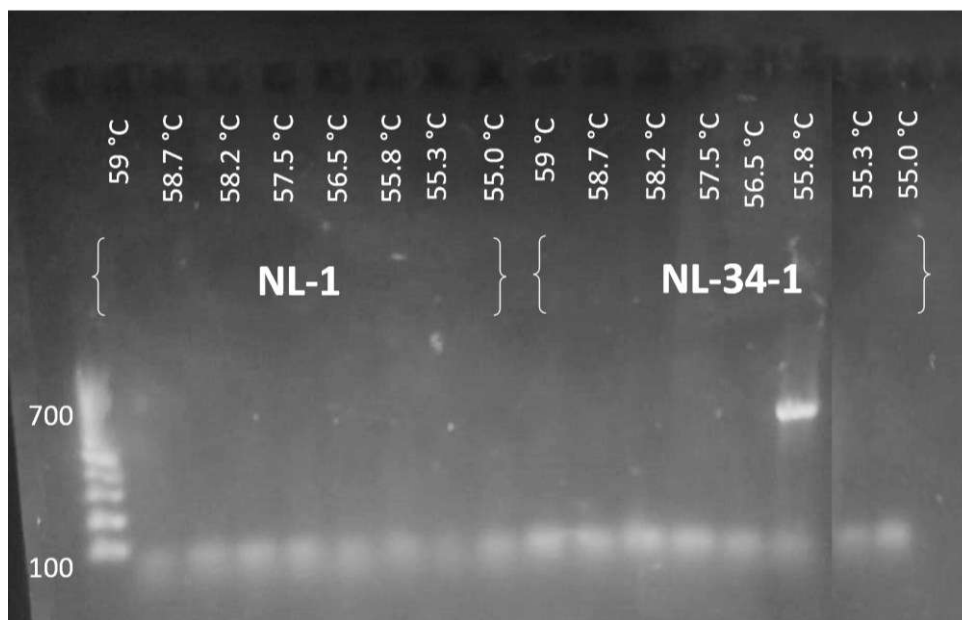


Fig. 11. Temperatura óptima de hibridación para la reacción en cadena de polimerasa con los primers psbAF1 y psbA600R.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.0 % (0.35 g agarosa + 35 ml de TBE 1x), teñidos con red gel y cuantificados visualmente en el gel mediante una escalera molecular de 100 bp (Promega). Las bandas claras de aproximadamente ~400 pb (UPA) y ~600 pb (psbA) fueron enviadas al servicio Psomagen (Maryland, USA) en donde se purificaron y secuenciaron con el mismo par de primers que en la reacción de PCR.

Los datos moleculares de rodolitos de Costa Rica han sido procesados en el Laboratorio de genética de organismos marinos del Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica (CIMAR-UCR), obtenidos a partir de las investigaciones realizadas por la Dra. Cindy Fernández García y Celeste Díaz.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RODOLITOS DEL PNC Y COSTA RICA.

Búsqueda de homologías

Las secuencias de rodolitos del PNC recibidas del servicio de secuenciación Psomagen se editaron y compararon con la información existente en GenBank, utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997). Lo mismo se realizó también para las secuencias de Isla del Coco recibidas del Laboratorio de genética de organismos marinos del CIMAR-UCR. Las secuencias que mostraron similitud con organismos no correspondientes al orden Corallinales, Sporolithales y Hapalidiales fueron excluidas del análisis.

Edición y alineamiento de secuencias

La edición manual de las secuencias se realizó con el programa MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., 2021) asegurándonos que lo obtenido en el cromatograma coincida con el producto de la secuenciación. Para comprobar la complementariedad de los pares de secuencias, se comparó la secuencia forward con su reverso y se obtuvo la secuencia consenso mediante el algoritmo Muscle (Edgar, 2004).

El alineamiento informático del set de secuencias para cada marcador se realizó mediante MAFFT v7.505 (Kato y Standley, 2013) utilizando la estrategia L-INS-i y el modo de alineación normal, implementado en el software Phylosuite (Zhang et al., 2020; Xiang et al., 2023) y curado manualmente con el programa MEGA 11.

Las homologías entre especies formadoras de rodolitos se construyeron mediante alineamientos para cada género por marcador.

Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se fundamentan sobre la base de la selección del mejor modelo evolutivo que genere una filogenia veraz con alto valor de soporte. El modelo evolutivo infiere, mediante la información de nuestros alineamientos, cuál es la probabilidad de cambio de una base nitrogenada a otra y la proporción de estas. Para seleccionar el mejor modelo de ajuste para las secuencias generadas en este estudio se utilizó el programa Model Finder v2.2.0 (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Los cladogramas se realizaron utilizando los programas Mr. Bayes para inferencia bayesiana, implementado en el software Phylosuite y se visualizaron y editaron mediante la herramienta en línea iTOL (<https://itol.embl.de/>).

Para inferir la existencia o no de especies nuevas o diferentes entre sí, se analizó la cantidad de cambio genético reflejado mediante la longitud de las ramas de los cladogramas y las variaciones en la distancia genética entre secuencias. Una rama larga suele indicar una mayor cantidad de diferencias genéticas entre dos grupos, lo que podría sugerir divergencia evolutiva más temprano, diferencias genéticas que corresponden a especies diferentes.

Delimitación de especies

Los programas basados en este método confían en que la distancia genética entre organismos de la misma especie es menor que la distancia entre especies distintas, ya que al reproducirse entre ellas comparten material genético. Para conocer la cantidad de especies en las secuencias de estudio se utilizó el programa en línea *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP), (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>). Se probó con los tres modelos de sustitución (JC69, Kimura y p-distance) para comprobar si existía alguna diferencia entre ellos. La mejor partición de número de especies fue aquella con mejor puntaje ASAP (ASAP-score)

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE RODOLITOS DEL COMPLEJO *Lithophyllum coibense*

Análisis morfométricos y morfoanatómicos

La caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, en inglés), utilizando las facilidades del Laboratorio de Microscopía Electrónica y Confocal del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), Earl S. Tupper, Panamá.

El material fue preparado a partir de pequeños fragmentos completamente deshidratados, fracturando las protuberancias manualmente con pinzas o navajas de bisturí después de observar los caracteres vegetativos y reproductivos de interés bajo un microscopio estereoscópico Zeiss modelo Stemi 305.

Los fragmentos seccionados (sonicadas y sin sonicar) fueron montados en pines de aluminio con adhesivo doble de cobre, los cuales fueron colocados en un portamuestra que se introdujo en SEM marca ZEISS modelo EVO 40 vp para observar y fotografiar de forma digital los detalles estructurales del material observado.

Se trabajó en condiciones de presión variable a un voltaje de aceleración de 20 Kv como unidad de potencia y para la formación de imágenes se empleó un detector de captura de electrones retrodispersados (BSED) (Fig. 12).



Fig. 12. Microscopio electrónico de barrido con el cual se realizó el análisis de los ejemplares de especies formadoras de rodolitos del PNC.

La medición de las células vistas en secciones transversales y longitudinales, secciones del epitalo y cámaras tetraesporangiales se realizaron según el listado de caracteres utilizados para identificar algas coralinas crustosas de Riosmena Rodríguez (2007b) (Cuadro 11, Fig. 13) y medidos con el software Image J IJ1.46r (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide.>).

Cuadro 11. Caracteres vegetativos y reproductivos para identificar rodolitos

<i>Carácter</i>	<i>Descripción</i>
<i><u>Datos vegetativos</u></i>	
Forma de crecimiento del talo	Woelkerling et al., 1993
Organización del talo	monomérico/dimérico
Tipo de conexiones entre filamentos	conexiones secundarias/fusiones celulares/ambas/ninguna
Tricocistos	presente/ausente
Número relativo de tricocistos	individual/mucho
Organización relativa de tricocistos	vertical/horizontal
Células epiteliales	acampanadas/planas/ enlongadas
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Células subepiteliales iniciales (μm)	largas o cortas
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Células periféricas (μm)	
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Células centrales (μm)	
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Células palizadas	presente/ausente
Poros	Presente/ausente

Datos reproductivos

Tipo de poro	uniporado/multiporado/calcificado
Talo gametangial	monoico/dioico
Conceptáculo carposporangial	presente/ausente
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Grosor del techo	cantidad de células
Conceptáculo espermatangial (μm)	presente/ausente
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Grosor del techo	cantidad de células
Posición de donde surgen los espermacios	piso/fondo o ambos
Tipos de espermacios	simples/dendroides
largo	datos en μm
diámetro	datos en μm
Diámetro externo del conceptáculo (μm)	datos en μm
Diámetro de la cámara del conceptáculo (μm)	datos en μm
Largo del tetra/biesporangio (μm)	datos en μm
Techo del conceptáculo	
- Células	cantidad
- Grosor (μm)	
Poros en el techo del conceptáculo	cantidad

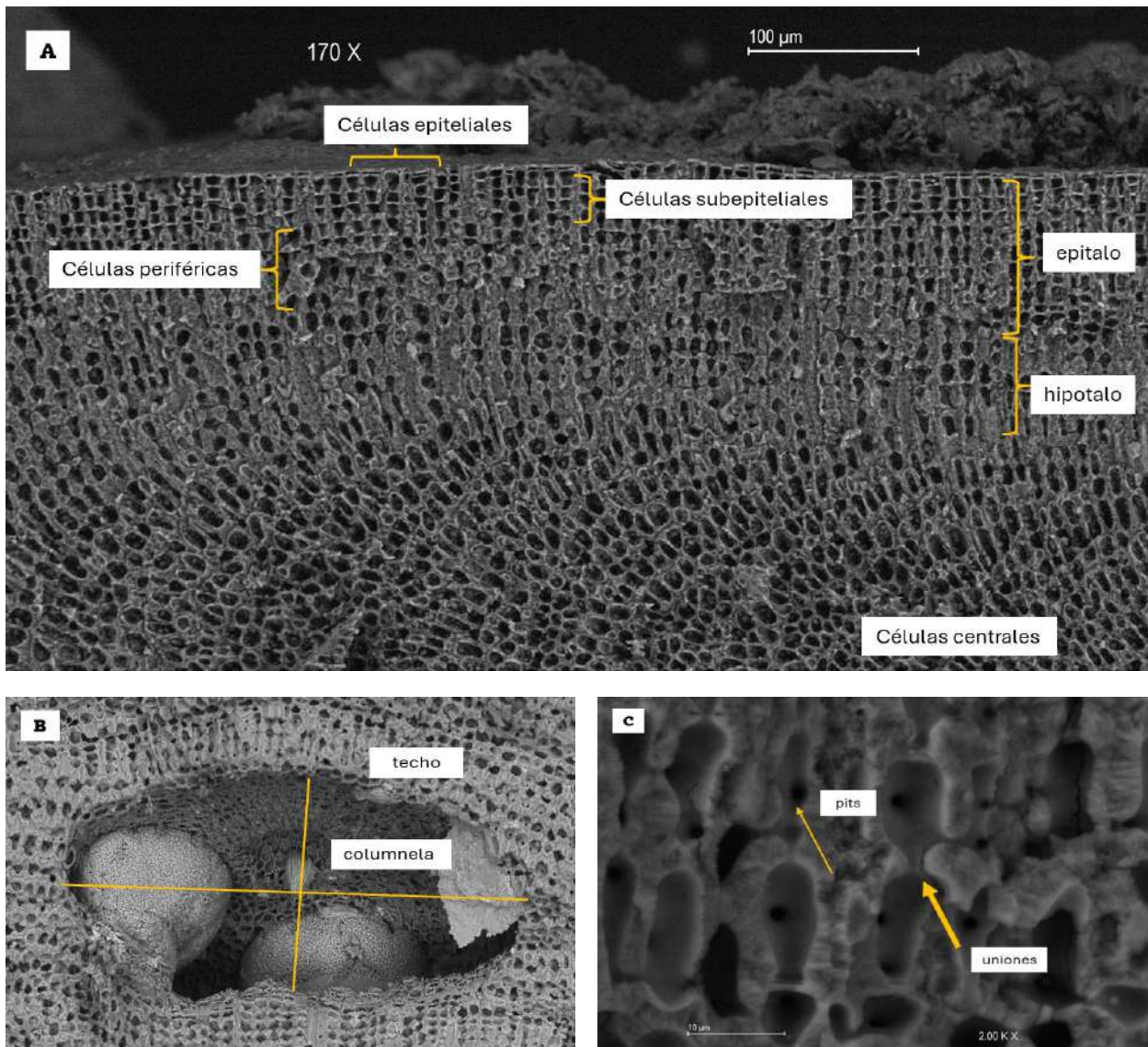


Fig. 13. Características morfológicas de rodolitos vistas al microscopio electrónico: A) Corte transversal del talo, B) estructuras reproductivas y C) conexiones entre filamentos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Las 82 extracciones realizadas mediante métodos CTAB y kits de extracción comerciales resultaron en valores variables de concentración de ADN y absorbancias: A260, A280, 260/280 y 260/230 (Anexo 3).

En el Cuadro 12 se observan los promedios de los valores de concentración del ADN (ng/μl) y DO (A260/280) de rodolitos del PNC para los diferentes métodos de extracción utilizados en este estudio. Con el método de extracción convencional CTAB se obtuvieron altas concentraciones de ADN, pero de baja calidad ($>1,8$), lo que demuestra contaminación por proteínas o detritos. Los métodos comerciales Macherey Nagel en donde se homogenizó la muestra con arena, MAN IIb y MAN VIb mostraron las más bajas concentraciones de ADN (3.95 y 2.00 ng/μl), mientras que los métodos MAN Ia y MAN IIa presentaron valores de baja calidad (1.40), en comparación con los otros métodos de la misma casa comercial.

El kit Qiagen produjo valores más bajos de concentración de ADN y densidad óptica entre todos los métodos probados (0.75,-3.66), demostrando poca efectividad para la ruptura de la matriz celular de carbonato de calcio que caracteriza a los rodolitos.

Por su parte, el método Bioneer en donde se utilizó proteinasa K mostró lecturas de absorbancia con valores más altos (1.80) en comparación con el resto de los métodos, mientras que el método MAN IIIb en donde también se utilizó proteinasa K extrajo mayor concentración de ADN que Bioneer (15.95). De igual forma el kit TFI en donde se aplicó mayor volumen de RNAasa extrajo un valor más alto de concentración de ADN (38.66), con un DO de 1.62.

Cuadro 12. Promedios de los valores de concentración del ADN (ng/μl) y DO (A260/280) de rodolitos del Parque Nacional Coiba. $\bar{x}$ = media aritmética o promedio, SE= error estándar

#	ABREV	MÉTODO	n	Concentración de DNA (ng/ml)		Absorbancia 260/280	
				$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE
1	BIO	<i>Kit AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit para tejido animal (Bioneer)</i>	6	10.51	3.66	1.8	0.05
2	CTAB	<i>CTAB</i>	26	89.33	22.62	2.19	0.13
3	MANA Ia	<i>Kit nucleospin plant II/CTAB/lisis 10 min (Macherey-Nagel)</i>	2	113.45	116.55	1.34	0.39
	MANA Ib	<i>Kit nucleospin plant II/SDS/lisis 10 min (Macherey-Nagel)</i>	2	6.85	5.75	1.79	0.72
4	MANA IIa	<i>Kit nucleospin plant II/CTAB/macerado sin arena/lisis 30 min (Macherey-Nagel)</i>	4	4.00	4.03	1.40	0.85
	MANA IIb	<i>Kit nucleospin plant II/CTAB/macerado con arena/lisis 30 min (Macherey-Nagel)</i>	2	3.95	1.48	1.48	0.17
5	MANA IIIa	<i>Kit nucleospin plant II/CTAB/lisis 2 h (Macherey-Nagel)</i>	5	5.18	1.74	1.55	0.16
	MANA IIIb	<i>Kit nucleospin plant II/CTAB/proteinasaK/lisis 3 h (Macherey-Nagel)</i>	24	15.95	2.52	1.56	0.05
6	MANA IVa	<i>Kit nucleospin plant II/SDS/macerado sin arena/lisis 2 h (Macherey-Nagel)</i>	4	14.20	6.81	1.40	0.11
	MANA IVb	<i>Kit nucleospin plant II/SDS/macerado con arena/lisis 2 h (Macherey-Nagel)</i>	1	2.00	0	1.45	0
7	QIA	<i>Kit Dneasy Plant miniKit (Qiagen)</i>	2	0.75	0.05	-3.66	1.37
8	TFI	<i>Kit de purificación de DNA GeneJET Plant Genomic (Thermo, Fisher Scientific)</i>	6	38.66	13.98	1.62	0.03

Se observó que el tiempo de lisis es crucial para obtener mayor concentración y mejor calidad de ADN. Por ejemplo, mediante la utilización del método MAN IIIb en donde la

incubación fue tres, se obtuvo mayor concentración en comparación con las modificaciones de los otros métodos de la misma casa comercial.

No se observó evidencia de bandas íntegras en el gel de calidad de ADN para ninguno de los métodos. La presencia de un barrido en los métodos Bioneer, Macherey Nagel+PRK (MAN IIIb), TFI (Thermo Fischer Plant Kit) y Qiagen indicó la presencia de ADN degradado (Fig. 14).

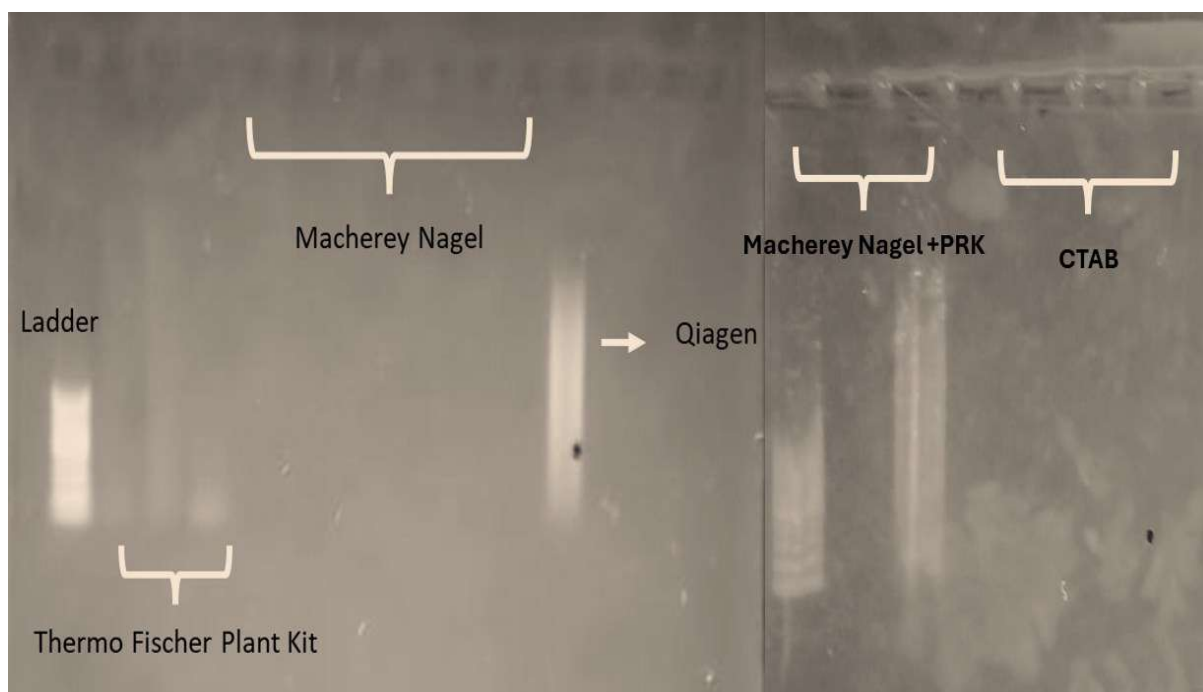


Fig. 14. ADN aislado de muestras de rodolitos del PNC por cinco métodos de extracción en gel de agarosa al 1% (m/v).

Las muestras extraídas con valores de concentración superiores a 1.0 ng/ μ l y absorbancias entre 1.40 y 2.0 fueron seleccionadas para la aplicación de la técnica de PCR. Aquellas extracciones cuyos valores no cumplieran con estos parámetros no fueron utilizadas para la reacción en cadena de polimerasa.

Dado que los valores de concentración y pureza de ADN resultaron muy variables, se optó por aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre los métodos de extracción y escoger el mejor. A pesar de que los resultados de la prueba indicaron que no existen diferencias significativas entre los métodos ($H=8.425$; $p=0.6745$), se observó que las muestras con valores de concentración y pureza de ADN más cercanos a los estándares mostraron amplificaciones positivas.

En el cuadro 13 se detalla que el método MAN IIIb fue el que generó la mayor cantidad de amplicones en este estudio. El protocolo térmico de Sherwood y Presting (2007) para el marcador UPA generó 28 amplicones, mientras que para el marcador *psbA* se obtuvieron 6 amplicones como se detalla en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Amplificaciones por método de extracción para marcadores UPA y *psbA*. N° EXT

(+)= número de extracciones positivas.

MÉTODO	N° EXT (+)	AMPLIFICACIONES	
		<i>UPA</i>	<i>psbA</i>
BIO	6	4	1
CTAB	26	0	0
MANA Ia	2	1	1
MANA Ib	2	1	0
MANA IIa	3	1	1
MANA IIb	2	0	0
MANA IIIa	5	4	1
MANA IIIb	24	18	2
MANA IVa	3	2	0
MANA IVb	1	0	0
QIA	2	0	0
TFI	6	1	0
Total	82	28	6

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RODOLITOS DEL PNC Y COSTA RICA

Se generaron veintiún secuencias de algas rojas formadoras de rodolitos para el PNC, 17 para el marcador UPA y cinco (5) para psbA. Se utilizaron además en este estudio 12 secuencias de rodolitos del PN Isla del Coco y una secuencia de Isla del Caño para el marcador psbA. Las coberturas de las secuencias consultadas (query cover) resultaron en un rango entre 81% y 98 %, mientras que los porcentajes de identidad se distribuyen entre el 87% y 100 % (Cuadro 14, Fig. 15 y 16).

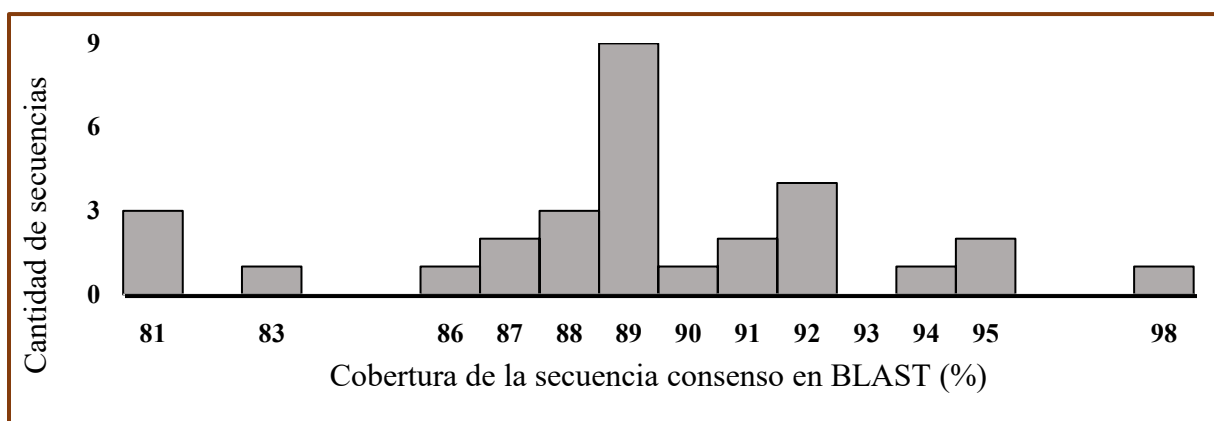


Fig. 15. Histograma del porcentaje de coberturas de 35 secuencias consenso (query cover) de rodolitos en este estudio.

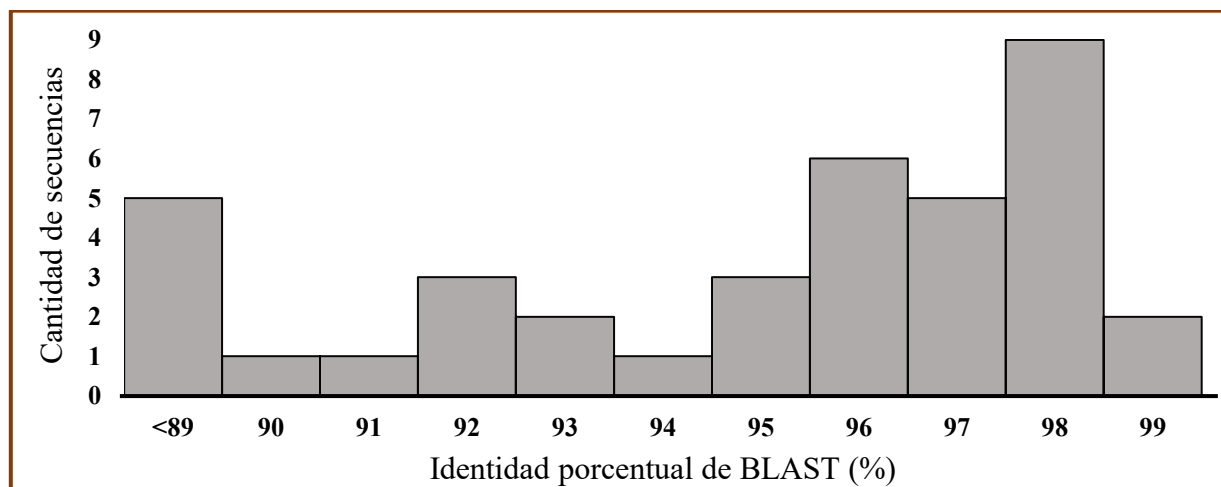


Fig. 16. Histograma del porcentaje de identidad de BLAST de 35 secuencias de rodolitos en este estudio.

Los valores de cobertura de la secuencia de consulta en este estudio pueden estar relacionados: con la corta longitud de la secuencia del marcador UPA (~410 pb), la cantidad de secuencias disponibles por marcador para la región de estudio y la naturaleza polifilética de los rodolitos (Cavalier-Smith, 2015). Solo se encontraron dos secuencias del marcador UPA, cuatro secuencias psbA para rodolitos de Panamá y no se encontraron secuencias correspondientes a Costa Rica u otros países del Pacífico de Centroamérica para ninguno de los dos marcadores.

En el Cuadro 14 y Figura 17 se observa que el algoritmo BLAST para el marcador UPA permitió caracterizar molecularmente cuatro géneros de rodolitos en el PNC: el 50% de las secuencias presentan similitud con *Lithophyllum*, 38% con *Lithothamnion* y 6% con *Neogoniolithon* y *Sporolithon*, respectivamente.

Cuadro 14. Caracterización molecular de 35 secuencias analizadas en este estudio. Resultados BLAST para 20 especímenes de rodolitos del Parque Nacional Coiba Panamá, 12 del Parque Nacional Isla del Coco y 1 del Parque Nacional Isla del Caño.

PARQUE NACIONAL COIBA								
#	ID	MARCADOR	DESCRIPCIÓN BLAST	ACCESO	ORIGEN	QUERY	IDENTIDAD	LONGITUD (pb)
1	NL-25	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	89	98.11	370
		psbA	<i>Peysonneniales</i>	OM902388	Guam, USA	92	98.25	893
2	NL-102	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	89	97.57	370
3	NL-40	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	89	96.76	370
		psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	MZ438372	Japon	81	96.48	543
4	NL-15-2	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	89	95.41	370
5	NL-23	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	89	95.16	370
6	NL-15	UPA	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	MG515134	USA	90	94.34	370
7	NL-79	UPA	<i>Lithophyllum corallinae</i>	MG521219	Brazil	81	92.26	338
8	NL-46	UPA	<i>Lithophyllum margaritae</i>	KP192378	Brazil,	89	96.76	370
9	NL-45	UPA	<i>Lithothamnion sp. A</i>	KU5114425	USA	91	95.1	370
10	NL-120-1	UPA	<i>Lithothamnion sp. D</i>	KU5197940	G. de Chiriquí Panamá	89	93.53	368
11	NL-50	UPA	<i>Lithothamnion sp.A</i>	KU514425	USA	89	98.65	368
12	NL-62-1	UPA	<i>Lithothamnion sp.B</i>	KU5114429	USA,	92	87.61	369
13	NL-81-2	UPA	<i>Lithothamnion sp.D</i>	KU5197940	G. de Chiriquí, Panamá,	88	97.28	370
14	NL-7	UPA	<i>Lithothamnion sp.J</i>	KU504275	Cébaco, Panamá	89	100	370
15	NL-77	UPA	<i>Lithothamnion sp. J</i>	KU504275	Cébaco, Panamá	86	89.9	370

16	NL-73-1	psbA	<i>Lithothamnion sp.B</i>	KU557501	USA	74	88	926
17	NL-18	UPA	<i>Neogoniolithon brassica-florida</i>	HQ421550	USA	98	93.07	409
18	NL-1	UPA	<i>Sporolithon sp.</i>	KP192383	Brazil	89	99.46	370
19		psbA	<i>Sporolithon erythraeum</i>	MZ201000	Taiwan	87	97.25	549
20	NL-36	psbA	<i>Sporolithon</i>	PP598582	China	99	91.65	888

PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO

#	ID	MARCADOR	DESCRIPCIÓN	ACCESO	ORIGEN	QUERY	IDENTIDAD	LONGITUD (pb)
21	UCR-2102	psbA	<i>Lithophyllum margaritae</i>	PP598553	Mexico	94	98.73	872
22	UCR-2106	psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	MZ438518	Japon	97	98.07	882
23	UCR-2108	psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	MZ438518	Japon	93	98.27	882
24	UCR-2109	psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	PP598553	Mexico	88	98.17	872
25	UCR-2110	psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	MZ438518	Japon	100	92.9	928
26	UCR-2072	psbA	<i>Lithophyllum okamurae</i>	MZ128802	Japon	99	98.58	966
27	UCR-2078	psbA	<i>Lithothamnion sp.</i>	KU557499	USA	100	98.59	966
28	UCR-2067	psbA	<i>Lithothamnion sp.</i>	MZ364375	Portugal	97	98.58	915
29	UCR-2090	psbA	<i>Lithothamnion sp.</i>	MZ364375	Portugal	92	92.39	844
30	UCR-2094	psbA	<i>Lithothamnion sp.</i>	MZ364375	Portugal	81	96.3	670
31	UCR-1513	psbA	<i>Lithothamnion sp.</i>	KP844865	Panamá	83	97.01	794
32	UCR-2073	psbA	<i>Mesophyllum sp.</i>	LT969635	Bélgica	83	96.22	873
33	UCR-2098	psbA	<i>Roseolithon crispatum</i>	KY485304	Brazil	95	96.06	915



Fig. 17 Rodolitos del Parque Nacional Coiba caracterizados según BLAST en este estudio. A-F) *Lithophyllum coibense* NL15, NL15-2, NL25, NL23, NL40 y NL102, G) *Lithophyllum corallinae*, NL79, H) *Lithophyllum margaritae*. NL46, I) *Lithophyllum insipidum*, NL123, J-O) *Lithothamnion J*, NL7, NL77 K - L) *Lithothamnion sp A*, NL45, NL50, M-N) *Lithothamnion sp B* , NL62-1, NL73, P) *Lithothamnion sp* , NL81-2, Q) *Lithothamnion sp D*, NL120-1, R) *Sporolithon indopacificum*, NL1, S) *Sporolithon sp*, NL36, R) *Neogoniolithon sp*, NL18 y U) *Polysrata erupta*, NL34.

Lithophyllum fue encontrado en siete de los ocho sitios de muestreo, *Lithothamnion* en cinco, mientras que *Sporolithon* se encontró en Playa Machete y Don Juan y *Neogoniolithon* solamente en el islote Cocos (Cuadro 15, Fig. 18).

Cuadro 15. Distribución de géneros de rodolitos por sitios de muestreo.

Género	Sitios de Muestreo
<i>Lithophyllum</i>	Granito de Oro, Iglesias, Buffet, Cocos, Canales de Afuera, Ranchería, Don Juan
<i>Lithothamnion</i>	Iglesias, Cocos, Canales de Afuera, Ranchería, Don Juan
<i>Sporolithon</i>	Playa Machete, Don Juan
<i>Neogoniolithon</i>	Cocos

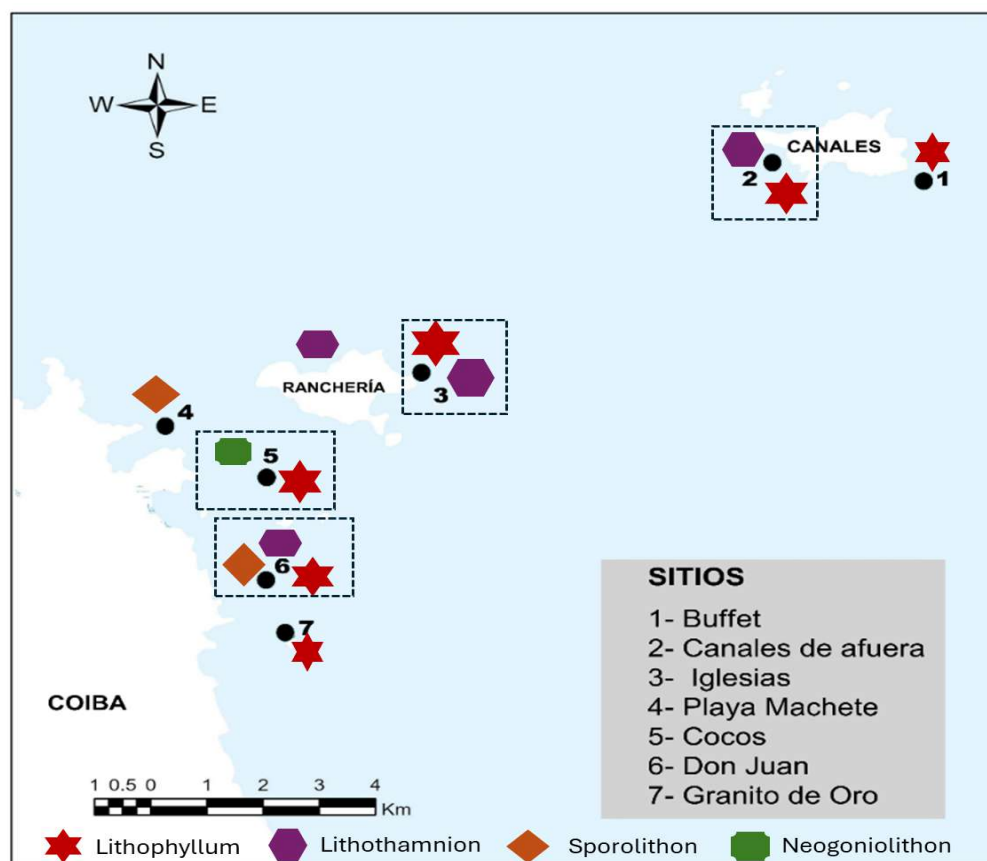


Fig. 18. Distribución de géneros de rodolitos en el PNC por sitio de muestreo.

Con el marcador psbA también se identificaron cuatro géneros de algas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos para Costa Rica: 46% de las secuencias presentan similitud con *Lithophyllum*, 38% con *Lithothamnion* y 8% con *Roseolithon* y *Mesophyllum*, respectivamente.

Análisis para el marcador 23S RNA, UPA (Amplicón universal del plastidio).

El análisis para el marcador UPA resultó en 17 nuevas secuencias generadas por primera vez para los rodolitos del PNC Coiba, permitiendo identificar 9 posibles especies, distribuidas entre cuatro géneros (*Lithophyllum*= 2 sp, *Lithothamnion*= 5 sp, *Sporolithon*= 1 sp, y *Neogoniolithon*=1 sp), mediante la reconstrucción de relaciones filogenéticas por Inferencia Bayesiana utilizando el modelo evolutivo K2P+I+G4 y análisis de distancia genética (ASAP).

Taxonomía molecular de *Lithophyllum*

El análisis de inferencia bayesiana alcanzó la convergencia después de 5 millones de generaciones, donde la desviación estándar entre cadenas fue de 0,004. La convergencia y la mezcla fueron satisfactorias, todos los parámetros tenían un tamaño de muestra efectivo de 3751 lecturas de secuencias de ADN o superior y la variación de soporte probabilístico entre grupos de *Lithophyllum* fue desde 1 a 0.1.

El cladograma de inferencia bayesiana para *Lithophyllum* (Fig.19) muestra dos clados principales en donde se agrupan las secuencias de Coiba. La topología entre los especímenes NL-40, NL-102, NL-25, NL-23, NL-15 y NL-15-2, forman un clado altamente soportado (probabilidad posterior= 0.951). Este clado está relacionado de manera más cercana con la especie *Lithophyllum atlanticum* (probabilidad posterior=1.00), no obstante, la longitud de rama

de 0.27 sugiere que los especímenes de Coiba representan una especie diferente a *L. atlanticum* de Brazil (MG515134) y USA (KP192373), utilizadas como referencia comparativa.

Los clados formados por NL 15-2, NL 15 y NL 40, NL 102 presentan una mayor diferencia entre los pares de bases de sus secuencias de ADN (longitudes de ramas=0.013, 0.014) , divergiendo del clado formado por NL 23 y NL25.

Ante la presencia de una leve variación intraespecífica en un rango estrecho de distribución de las muestras, se sugiere la utilización de datos morfológicos para corroborar esta identificación (ver sección de caracterización morfológica).

La topología de los linajes para los especímenes NL-79 y NL-46 no se resolvieron con el marcador UPA, sin embargo, aunque con bajo soporte (probabilidad posterior= 0.487) se observa un segundo clado para las secuencias de Coiba.

NL 46 tienen una longitud de rama de 0.003 y 0.002 con respecto a dos secuencias de *L. corallinae* de Brazil. Aunque podría tratarse de la misma especie por su baja variación intraespecífica esta relación muestra un bajo valor de probabilidad posterior de 0.282.

Por su parte la muestra NL-79, podría considerarse una especie distinta de *L. margaritae* debido a la longitud de rama de 0.012 observada entre ambas secuencias en la cladograma y a su vez, también es diferente de NL-46, con una longitud de rama de 0.057. Aunque se agrupa NL-79 en este clado, la probabilidad posterior de 0.487 no permite resolver las identidades de estos taxones.

Dado que las longitudes de las ramas entre los dos clados principales son relativamente largas y las probabilidades posteriores de la separación del clado uno es alta, es probable que NL-15, 15-2, 23, 24, 40, y 102 representen una misma especie de *Lithophyllum*, mientras que

NL-46 corresponda a *L. corallinae* y NL-79 represente otra especie distinta a *L. margaritae* caracterizada como esta especie según el algoritmo BLAST.

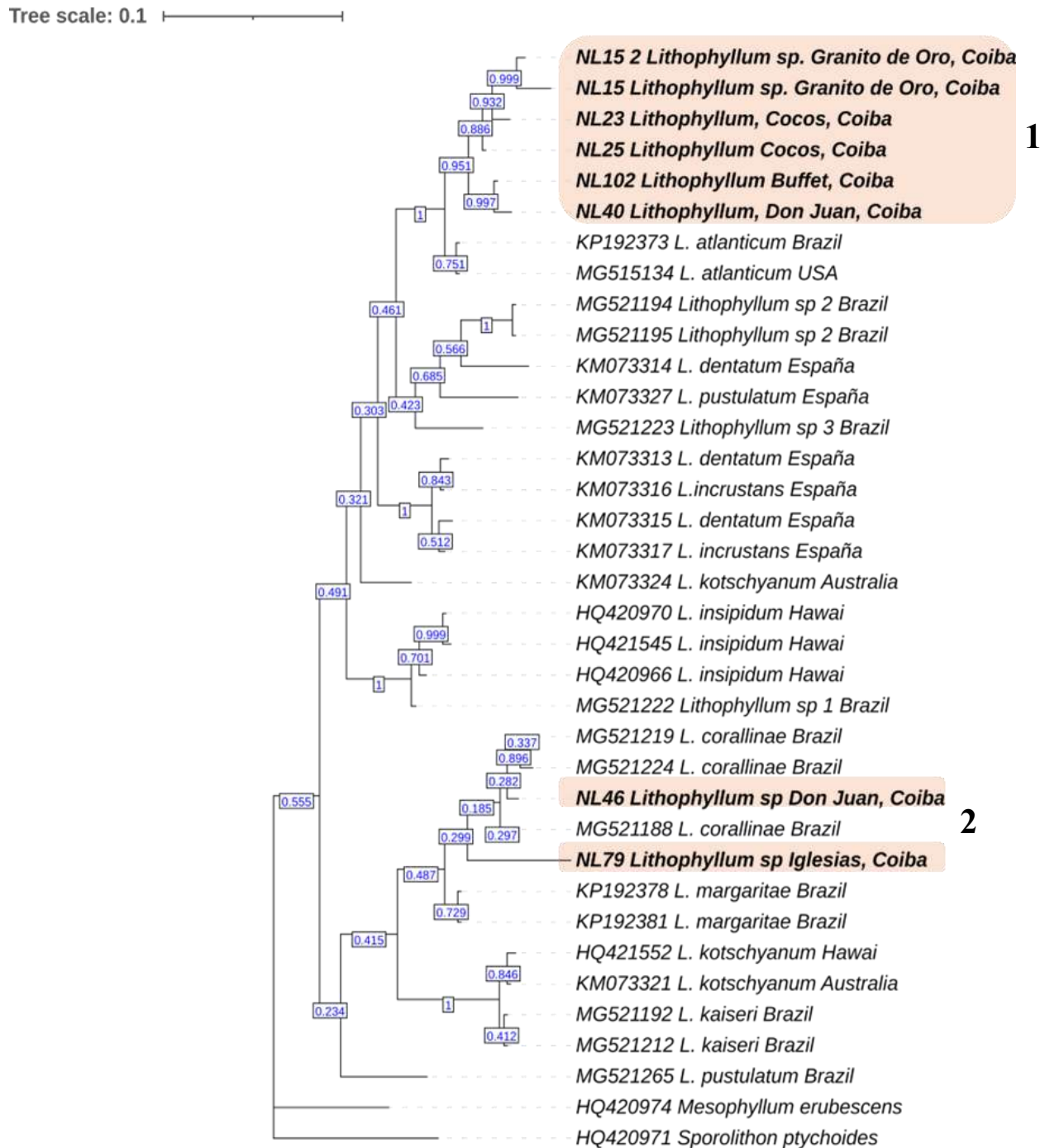


Fig 19. Cladograma de Inferencia Bayesiana para las secuencias de UPA del género *Lithophyllum* del PNC, 500000 réplicas, K2P+I+G4

Taxonomía molecular de *Lithothamnion*

El cladograma en la Fig. 20 representa las relaciones filogenéticas entre diferentes muestras de *Lithothamnion sp.* de Coiba, basadas en inferencia bayesiana. Los valores numéricos sobre las ramas indican las probabilidades posteriores, que son una medida del soporte bayesiano para cada relación inferida.

El análisis muestra dos grupos bien definidos:

El primer grupo agrupa a NL7 con soporte relativamente alto (probabilidad posterior de 0.947) junto a *Lithothamnion J* de Isla Cébaco (KU504275). Esto sugiere que hay una alta confianza en que esta muestra representa la misma especie que *Lithothamnion J* y que es un grupo distinto de las demás muestras.

Las secuencias de los especímenes NL62-1, NL81-2, NL120-1, NL45 y NL50 forman un segundo grupo, el cual tiene buen soporte, con una probabilidad posterior de 0.789, lo que sugiere la divergencia de estos dos grupos principales.

Dentro del segundo grupo, se distinguen tres subclados:

Subclado 1: Los especímenes NL-62-1 y NL-81-2 forman un subclado con una probabilidad posterior de 0.599. Este valor indica un soporte moderado, suficiente para sugerir que estas dos muestras están estrechamente relacionadas, posiblemente por su relación filogeográfica.

La longitud de la rama en NL-62-1 (0.065) respecto a NL-81-2 sugiere que estas muestras no pertenecen a la misma especie por la diferencia genética acumulada, a pesar de la relación sugerida. Para comprobar este hallazgo se necesitan datos morfológicos y ecológicos.

Subclado 2: La separación entre NL-120-1 y el subclado 3 formado por NL-45 y NL-50 tiene una probabilidad posterior baja de 0.297, lo que indica una relación menos confiable entre estas muestras, presentando incertidumbres o posibles divergencias, destacando la necesidad de más datos para una clasificación precisa.

Subclado 3: Se observa que la relación entre NL-45 y NL-50 tiene una probabilidad posterior de 0.471, lo que también indica un soporte bajo para la relación cercana entre estas dos muestras, sugiriendo que, aunque están relacionadas, podría haber diferencias significativas entre ellas.

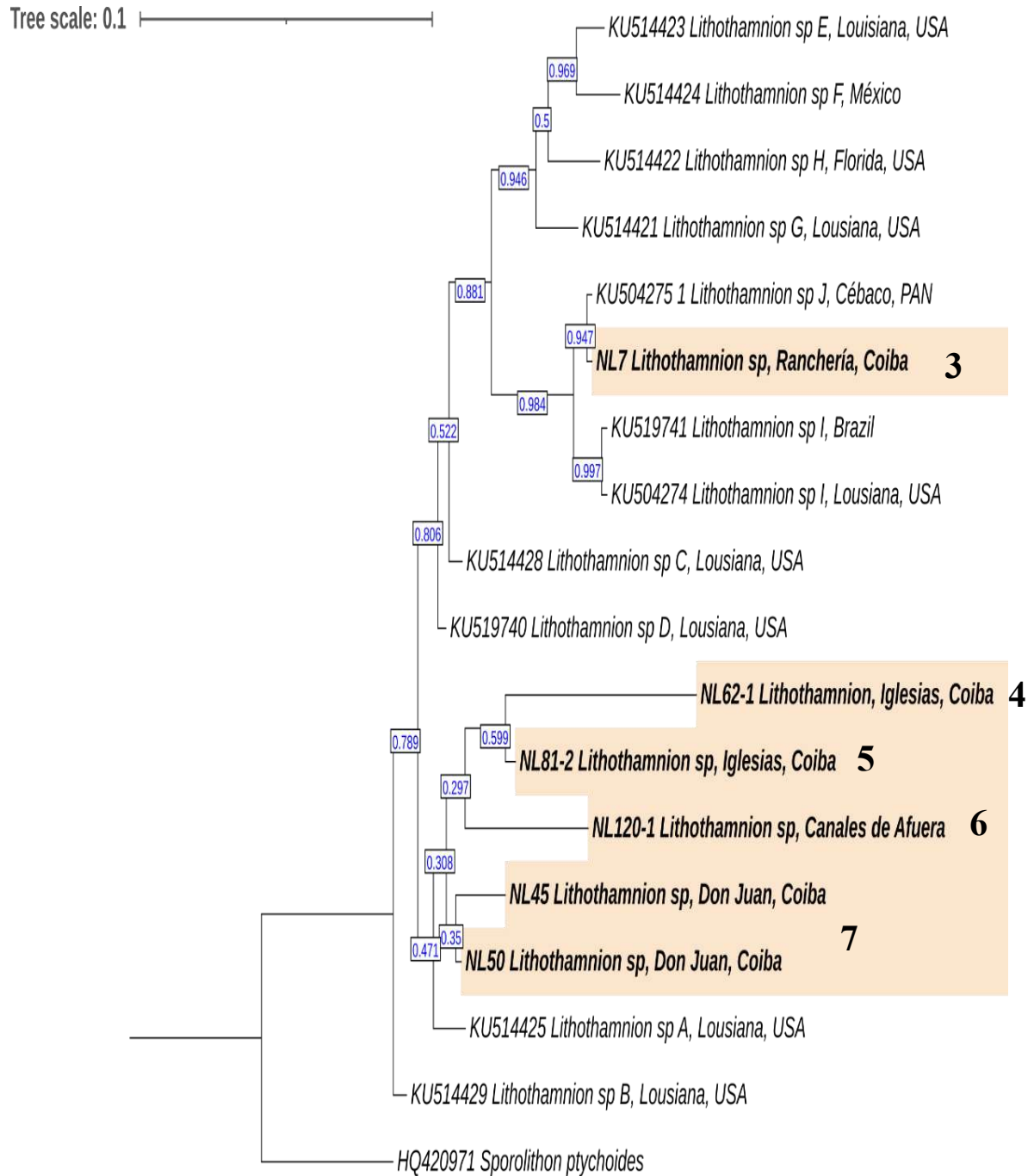


Fig 20. Cladograma de Inferencia Bayesiana para las secuencias UPA del género *Lithothamnion* del Parque Nacional Coiba, 500000 réplicas, K2P+I+G4

Taxonomía molecular de *Sporolithon* y *Neogoniolithon*

El cladograma de inferencia bayesiana para *Sporolithon* y *Neogoniolithon* se representa en la Fig. 21. La probabilidad posterior de 0.599 muestra dos grupos definidos, el grupo *Sporolithon* y el grupo *Neogoniolithon*.

El espécimen NL 1 se asocia con una alta probabilidad posterior (0.999) a tres secuencias de *Sporolithon* sp. de Brazil (KP192382, KP192385, KP192383), indicando que estas muestras pueden representar la misma especie ya que presentan una mínima variación intraespecífica. Por su parte, la alta confianza de probabilidad que también se indica con KY980429 (1.0) y sus valores de longitud variables es evidencia que nos señala que NL 1 podría considerarse una entidad diferente a *S. sinusmexicanum* debido a la gran cantidad de cambios genéticos acumulados.

Para validar si NL 1 representa una secuencia de otras especies de *Sporolithon* reportadas para Panamá o la región del Pacífico Tropical, es necesario generar comparaciones de homologías de secuencias para otros marcadores como 18S, psbA o COI, los cuales tienen secuencias disponibles en GenBank, además de los datos morfológicos que permitan describir la especie con mayor precisión.

Esta caracterización nos permite identificar a nivel molecular que *Sporolithon* sp. se encuentra tanto en el Atlántico como el Pacífico, lo que lo convierte en una especie de rodolito anfioceánico.

Para el caso del grupo *Neogoniolithon* se evidencia un valor de probabilidad aceptable (0.716) entre NL18 y *Neogoniolithon brassica-florida* (HQ421550) de Hawai. No obstante, dado a que la variación en las longitudes de las ramas entre las dos muestras es relativamente larga (0.06) y la probabilidad posterior es alta, es probable que NL 18 represente una especie diferente a *Neogoniolithon brassica-florida* caracterizada según el algoritmo BLAST. También se requieren de datos morfológicos y secuencias de otros marcadores para comparar con la información genética disponible en GenBank y corroborar la identidad de esta especie.

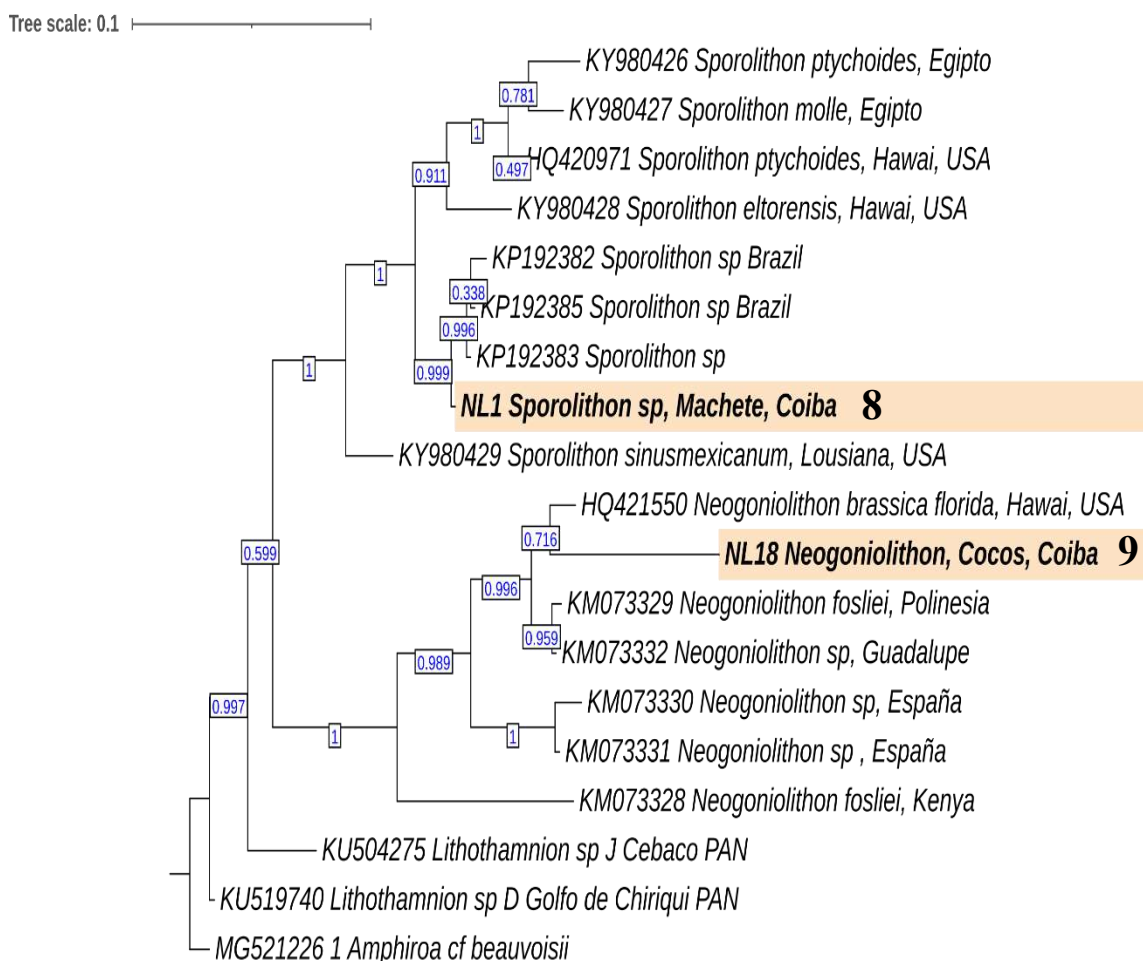


Fig. 21 Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de UPA para los géneros *Sporolithon* y *Neogoniolithon* del PNC, 500000 réplicas, K2P+I+G4

Análisis de delimitación de especies mediante distancias genéticas (ASAP) para el marcador UPA.

El análisis de distancia genética realizado mediante el método ASAP en un conjunto de secuencias de *Lithophyllum* y *Lithothamnion* reveló la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados para *Lithophyllum* y cuatro para *Lithothamnion*, lo que indica la posible presencia de al menos 6 especies distintas entre estos géneros para el conjunto de muestras evaluadas con el marcador UPA (Cuadro 16).

Los tres modelos de sustitución probados generaron el mismo puntaje ASAP para el mismo número hipotético de especies.

Cuadro 16. Número de especies hipotetizadas según las distancias genéticas (ASAP) para el marcador UPA.

	Modelo	Nº de especies	Puntaje ASAP
<i>Lithophyllum</i>	K80	2	1.00
	JC36	2	1.00
	p-distance	2	1.00
<i>Lithothamnion</i>	K80	4	1.00
	JC36	4	1.00
	p-distance	4	1.00

El valor de confianza asociado al puntaje ASAP para ambos géneros fue aceptable (tabla 15), lo que respalda la separación entre los grupos.

La distancia genética dentro del grupo *Lithophyllum* sp 1 obtenida en el filograma para el marcador UPA fue baja (0.02) (Anexo 4), lo que sugiere una variabilidad genética interna mínima. En cambio, la distancia entre NL 46 y NL 49 presenta mayor variabilidad (0.09) (Anexo

4), situación que también se corrobora con la longitud de las ramas obtenido en el cladograma de estas secuencias.

La variación en estos valores refleja la necesidad de analizar otros marcadores para esclarecer si realmente representan una entidad taxonómica diferente.

Los saltos observados en las distancias entre los grupos sugieren límites entre dos posibles especies moleculares (Fig. 22).

En cuanto a las particiones para *Lithothamnion*, se agrupa a NL45, NL50 y NL81-2 con una variación genética dentro del grupo de 0.04.

Se observa también en el clúster de distancia (Fig. 23) que NL120-1 y NL 62-1 se encuentran menos distantes entre ellas que NL 7. Situación que también se confirma en las relaciones obtenidas con el cladograma de inferencia bayesiana para este género

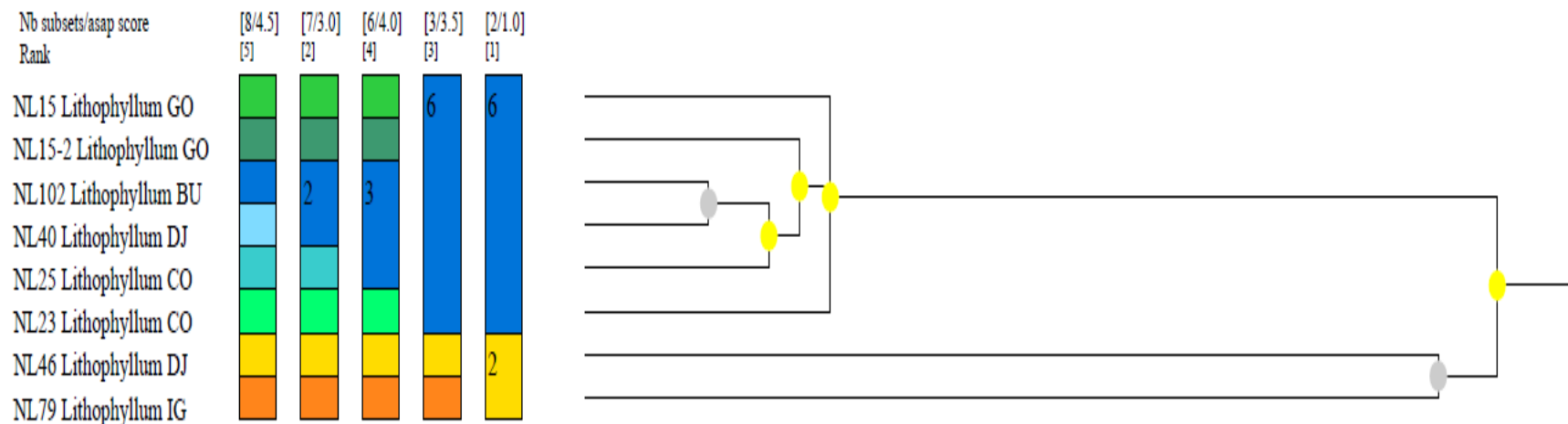


Fig. 22. Diagrama de particiones y clúster de distancia genética por ASAP para secuencias de *Lithophyllum* de Coiba.

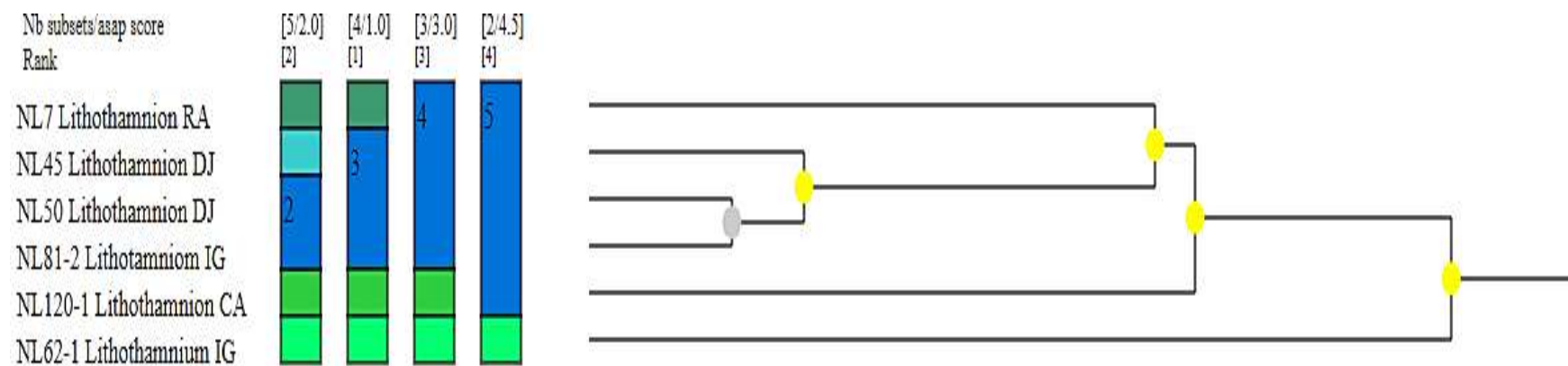


Fig. 23. Diagrama de particiones y clúster de distancia genética por ASAP para secuencias de *Lithophyllum* de Coiba.

Análisis para el marcador *psbA* del cloroplasto.

El análisis para el marcador *psbA* resultó en cinco secuencias para Isla Coiba y 13 para Costa Rica, permitiendo identificar 10 especies distribuidas en cinco géneros (*Lithophyllum*=3 sp , *Lithothamnion*=3 sp., *Sporolithon*= 2 sp., *Mesophyllum*= 1 sp. y *Roseolithon*=1 sp) mediante la probabilidad posterior del análisis de Inferencia Bayesiana utilizando el modelo evolutivo GTR+F+I+G4 y el análisis de delimitación de especies por distancia genética (ASAP).

Taxonomía molecular de *Lithophyllum*

El análisis de inferencia bayesiano para el marcador *psbA* (Fig. 24) alcanzó la convergencia después de 5 millones de generaciones, donde la desviación estándar entre cadenas fue de 0,07. La convergencia y la mezcla fueron satisfactorias, todos los parámetros tenían un tamaño de muestra efectivo de 3751 o superior .

Secuencias de Coiba para *Lithophyllum* (NL-40 y NL-25) se agrupan con un alto valor de soporte (0.99) entre ellas. Las longitudes de las ramas de estas secuencias en función de las especies de Costa Rica y de *Lithophyllum okamurae* y *margaritae* de Japón y México, indican que las secuencias de Coiba son una posible especie diferente a las antes mencionadas.

En cuanto al clado que agrupa a especies de *Lithophyllum* de Costa Rica se infiere una relación con soporte de 0.68 entre ellas y especímenes de *L. okamurae* de Japón y *L. margaritae* de México. Probablemente UCR-2102, UCR-2102, UCR-2108, UCR-2110, UCR-2072, UCR-2109 representen la misma especie considerando los valores de probabilidad posterior entre secuencias (0.997) y las variaciones intraespecíficas entre las longitudes de ramas.

Las evaluaciones morfológicas de estos especímenes permitirán esclarecer las identidades de los taxones, también se requieren secuencias de otros marcadores para robustecer la información.

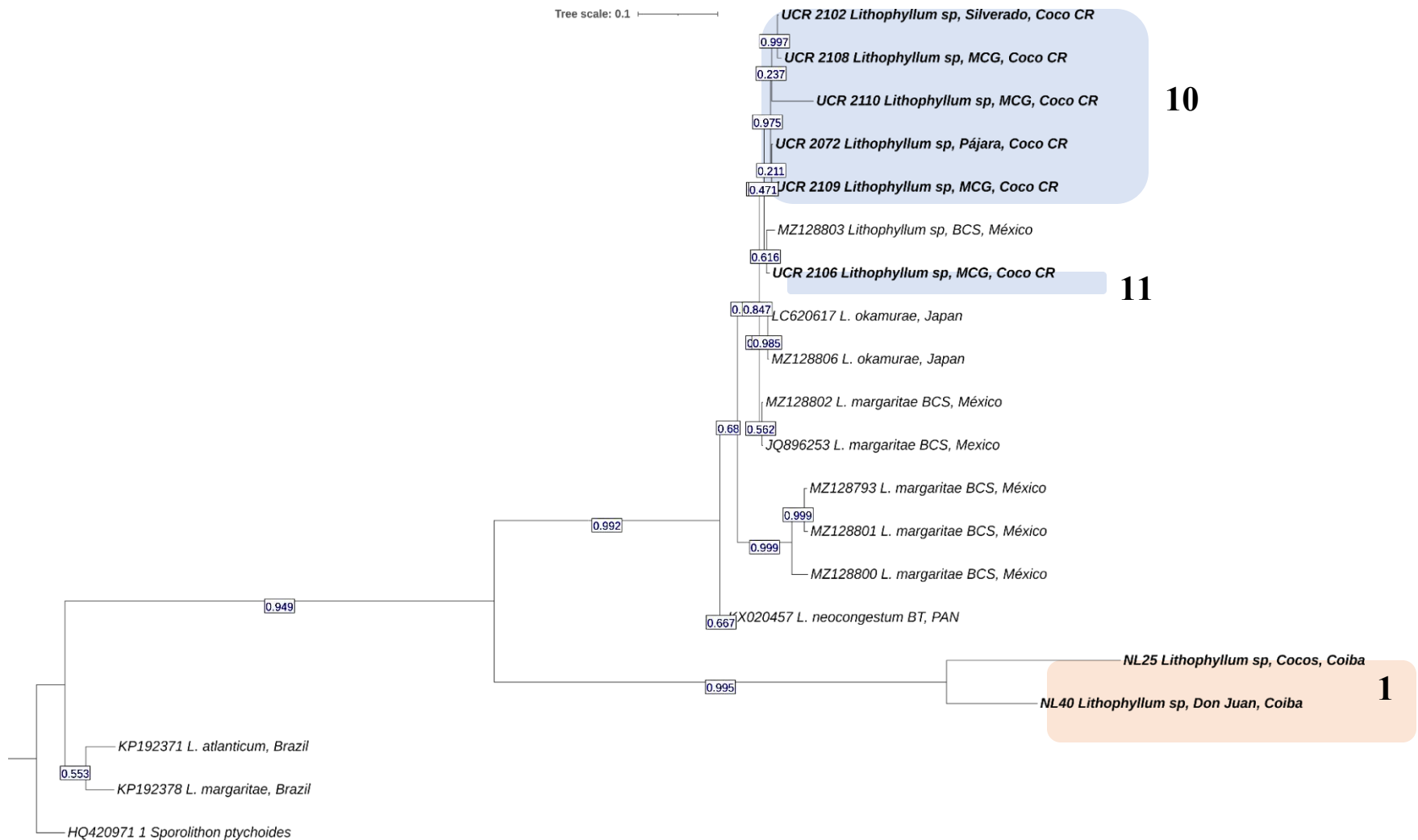


Fig. 24. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA del género *Lithophyllum* de Costa Rica y Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.

Taxonomía molecular para *Lithothamnion*

El cladograma en la Fig. 25 representa las relaciones filogenéticas entre diferentes muestras de *Lithothamnion* sp. de Coiba, Costa Rica y otras áreas insulares de ambos países (Golfo de Chiriquí, Cébaco e Isla Del Caño), basadas en inferencia bayesiana.

El análisis muestra tres posibles especies, en donde la secuencia de NL 73 de Coiba representa una identidad taxonómica distinta con un alto soporte de probabilidad posterior de 0.825 en referencia a las analizadas en este estudio para Costa Rica

El espécimen UCR-1513, el cual proviene de Isla del Caño en Costa Rica se une en el cladograma con *Lithothamnion* sp. J (KP844865) de Isla Cébaco con un alto valor de probabilidad (1.00) y una longitud de rama de 0.017. Esta relación nos sugiere que UCR-1513 es la misma especie encontrada en Isla Cébaco y en Ranchería, muestra que mostró un alto valor de probabilidad en su relación para el marcador UPA. Las diferencias en sus longitudes de rama indican la variación genética que presentan las especies, posiblemente debido a las presiones a las que se ven sometidas en las zonas donde habitan.

El valor de probabilidad posterior de 0.34 entre UCR -2067 de Bahía Wetson y UCR 2094 de Silverado en PN Isla del Coco sugiere una baja posibilidad de que compartan un ancestro común reciente, lo que indica que podrían ser dos posibles especies diferentes.

La relación con la tercera muestra UCR -2078 (0.595) tampoco ofrece un fuerte respaldo. Para concluir si son la misma especie, se deben realizar análisis complementarios (morfológicos o genéticos) que permitan una evaluación más sólida.

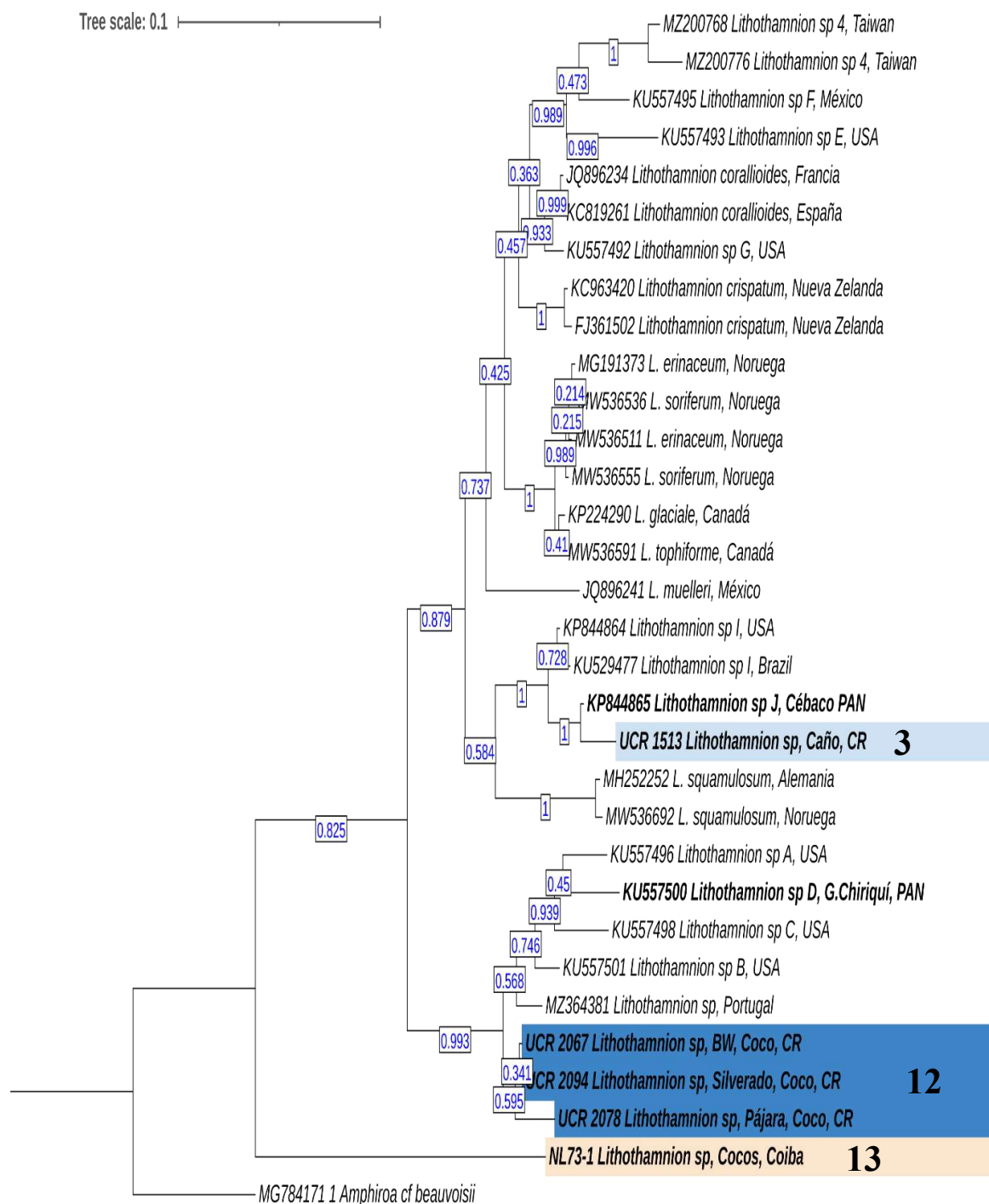


Fig. 25. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA para el género *Lithothamnion* de Costa Rica y Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.

Taxonomía molecular para *Sporolithon*

El cladograma de inferencia bayesiana para *Sporolithon* (Fig. 26) indica la presencia de dos especies para Coiba con valores de probabilidad posterior de 0.849 para NL-1 y 0.795 para NL-36.

La relación de NL-1 con *S. erythraeum* muestra bajos valores de probabilidad posterior, indicando que es posible que la muestra de Coiba sea una entidad taxonómica distinta. Por su parte la relación de alto soporte con la muestra MW916227 (0.992) y a su vez con *S. indopacificum* (0.849) sugieren que estas secuencias representan la misma especie. La longitud de la rama de NL-1 tiene un valor de 0.03, indicando que muestra mayor acumulación de cambios con respecto a la muestra de Tanzania. Los datos morfológicos son necesarios para confirmar la identificación de esta especie.

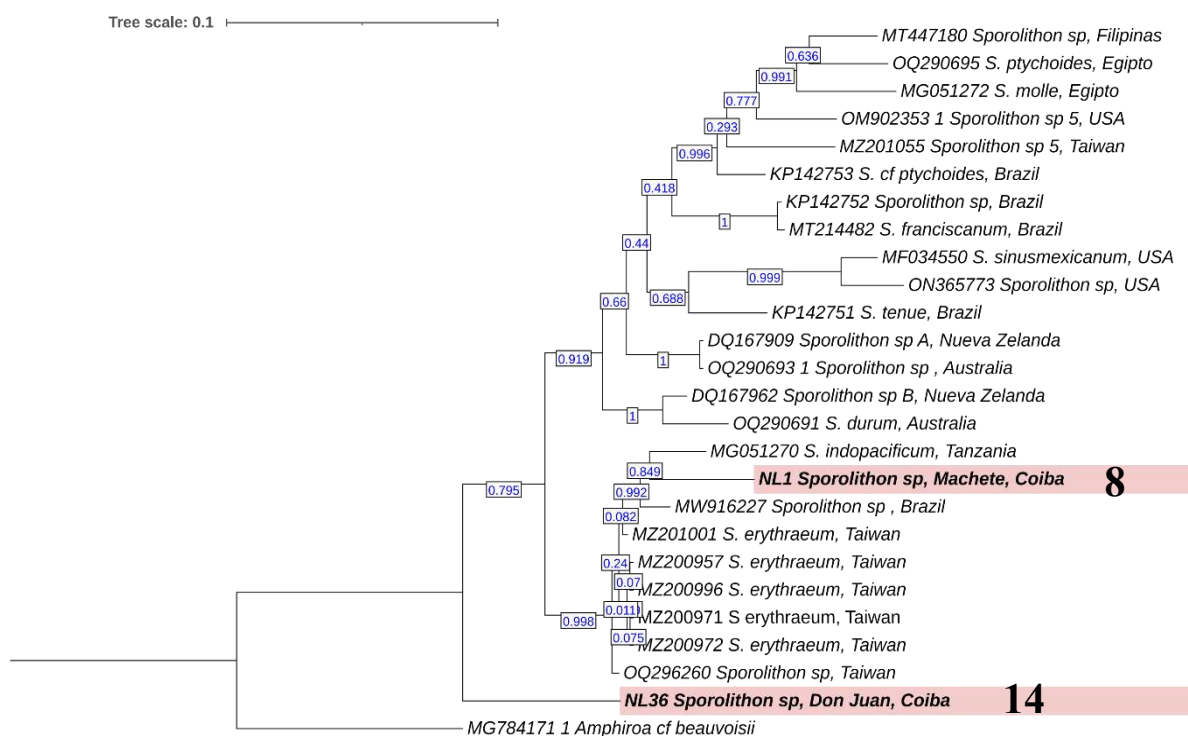


Fig. 26. Cladograma de consenso resultante del análisis de Inferencia Bayesiana de las secuencias de psbA del género *Sporolithon* de Coiba, 500000 réplicas, modelo GTR+F+I+G4.

Análisis de delimitación de especies mediante distancias genéticas (ASAP) para el marcador *psbA*.

El número de especies hipotetizadas para los dos géneros mejor representados en la caracterización molecular con el marcador *psbA* fueron analizadas según sus distancias genéticas, resultando en tres especies tanto para *Lithophyllum* como para *Lithothamnion*.

El valor de confianza asociado a la partición para ambos géneros fue aceptable (Cuadro 17), lo que respalda la separación entre los grupos.

Los valores en las distancias entre los grupos sobrepasan el umbral ASAP (0.58) (anexo 4) sugiriendo límites entre tres posibles especies moleculares; **especie 1**: representada por todas las secuencias de *Lithophyllum* de Costa Rica, **especie 2** por NL-40 y **especie 3** por NL-25, estas dos últimas más cercanas entre sí (Fig. 27).

Cuadro 17. Número de especies hipotetizadas según las distancias genéticas (ASAP) para datos moleculares obtenidos con el marcador *psbA*.

	Modelo	Nº de especies	Puntaje ASAP
<i>Lithophyllum</i>	K80	3	1.50
	JC36	3	1.50
	p-distance	3	1.50
<i>Lithothamnion</i>	K80	3	1.00
	JC36	3	1.00
	p-distance	3	1.00

La distancia genética dentro de los especímenes agrupados en la especie 1 fue baja (0.02), lo que sugiere una variabilidad genética interna mínima, por tal razón corresponden a la misma especie.

En cambio, la distancia entre la especie 1 y NL-40 fue de 0.58 y de NL-25 de 0.6, lo que refleja unidades taxonómicas diferentes respecto a las secuencias de Costa Rica, situación que también se refleja en la distancia de las ramas para el cladograma que relaciona estas secuencias.

En cuanto a las particiones para *Lithothamnion*, UCR-2067, UCR-2090, UCR-2094, UCR-2078 muestran una distancia promedio de 0.04 y las agrupa como una misma especie. Sin embargo, NL-40 y NL-25 mostraron distancias de 0.1, este valor supera el umbral de distancia por ASAP (0.04) lo que representa divergencia, por lo tanto, especies distintas (anexo 5).

Se observa también en el clúster de distancia (Fig. 28) que NL-73 de Coiba se encuentra más distante de las secuencias de Isla del Coco y de Isla del Caño.

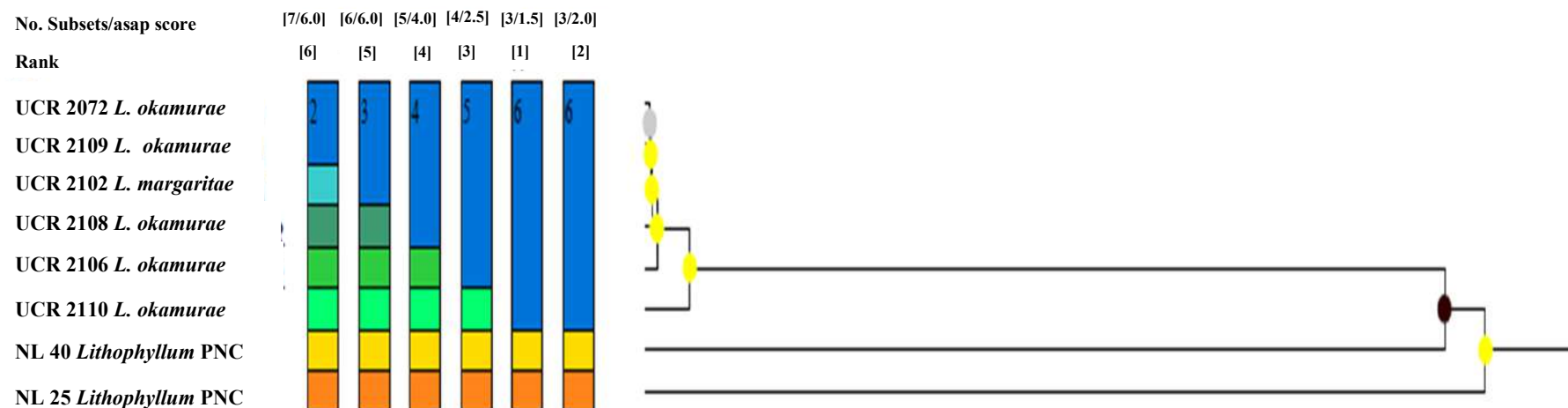


Fig. 27. Diagrama de particiones y clúster de distancia genética por ASAP para secuencias *psbA* de *Lithophyllum* de Coiba y Costa Rica.

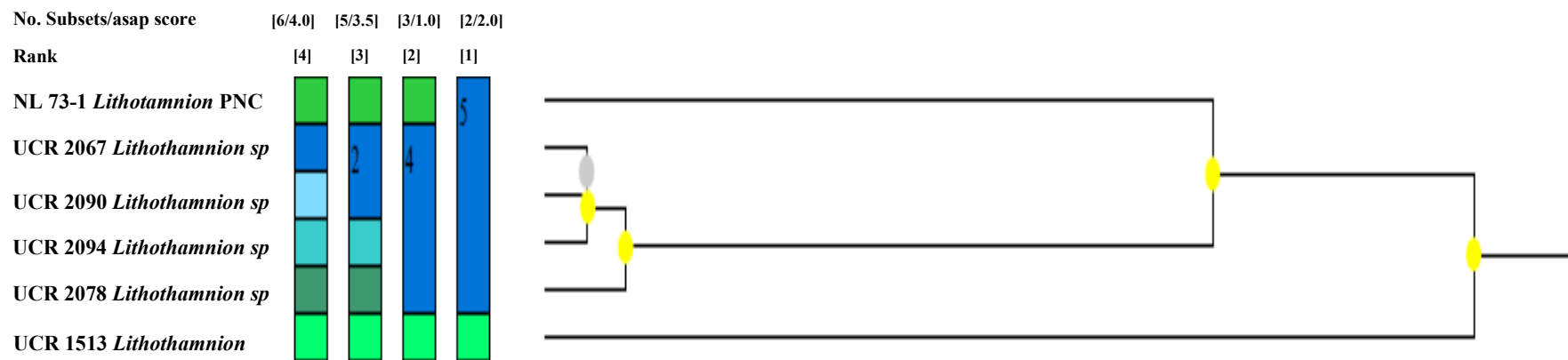


Fig. 28. Diagrama de particiones y clúster de distancia genética por ASAP para secuencias *psbA* de *Lithothamnion* de Coiba y Costa Rica.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECÍMENES DE RODOLITOS DEL CLADO '*Lithophyllum* sp. 1' del PNC

Lithophyllum es el género de algas coralinas no geniculadas con mayor número de especies, el cual actualmente incluye 146 especies taxonómicamente aceptadas (Guiry y Guiry, 2024).

Muchas de esas especies han sido descritas solo basadas en características morfo anatómicas, que es información necesaria para validar las identidades moleculares de las especies e inferir aspectos relevantes sobre su sistemática, filogenia, distribución y diversidad.

Las características que presentan los representantes del género *Lithophyllum* Philippi incluyen: talos dorsiventrales, con protuberancias o masas subglobosas no adheridas.

Talos monómeros o dímeros, si son monómeros dispuestos en capas de células decumbentes y arqueadas (anatomía coaxial) o curvándose hacia arriba hacia la superficie del talo (anatomía plumosa).

Las células de los filamentos de primer orden rara vez están estratificadas y alargadas (células en empalizada). Las paredes más externas de las células epiteliales son redondeadas o aplanadas, no ensanchadas.

Células en filamentos contiguos a menudo unidas por conexiones secundarias; fusiones celulares ausentes. Tricocistos presentes o ausentes, pero si están presentes aparecen solos.

Las células reproductivas se forman dentro de conceptáculos uniporados. Conceptáculos tetrasporangiales y bisporangiales que a veces contienen columelas. Tapones esporangiales apicales ausentes. Los gametangios son poco conocidos (Guiry y Guiry, 2024).

El análisis de la morfoanatomía de cinco especímenes del PNC (NL-15, NL-15-2, NL-25, NL-40 y NL-102) agrupados en este clado tanto para la caracterización molecular con los marcadores UPA y psbA de este estudio, revelan una incongruencia con la descripción hasta el momento utilizada para el género *Lithophyllum*.

Los especímenes del PNC presentan fusiones celulares en el eje Z entre células de los filamentos adyacentes, una organización dímera del talo, conexiones primarias y secundarias, así como tricocistos (en un espécimen), cristales a lo interno de sus conceptáculos y otras características morfométricas que se resumen en el Cuadro 18 -19 y que no se incluyen como propias del género.

Cuadro 18. Comparación morfoanatómica del clado A '*Lithophyllum sp*' del Parque Nacional Coiba. Las mediciones se representan como media $\pm$ desviación estándar, seguido del rango en corchetes. **L**=aterronado, **W**= verrugoso, **F**= fruticoso, **D**=dímera, **A**=aplanadas, **EC** =elongada/columnar.

	NL-15	NL-15-2	NL-25	NL-40	NL-102
<i>Características vegetativas</i>					
Forma de crecimiento	L-W	L-W	F	F	F-W
Organización del talo	D	D	D	D	D
Fusiones celulares en el eje Z	+	+	+	+	+
Conexiones	1° y 2°	1° y 2°	1° y 2°	1° y 2°	1° y 2°
<i>Células del epitelo</i>					
Forma	A	A	A	A	A
Número de células epiteliales	1	1	1	1	1
Alto (μm)	7 $\pm$ 4 [2-11]	5 $\pm$ 1 [3-6]	3 $\pm$ 1 [3-4]	10 $\pm$ 2 [8-13]	8 $\pm$ 1 [8-10]
Diámetro (μm)	11 $\pm$ 3 [13-27]	9 $\pm$ 1 [8-10]	8 $\pm$ 2 [6-10]	6 $\pm$ 1 [4-7]	8 $\pm$ 1 [6-10]
<i>Células del peritalo</i>					
Alto (μm)	9 $\pm$ 1 [7-10]	10 $\pm$ 3 [7-14]	13 $\pm$ 2 [9-14]	7 $\pm$ 1 [26-8]	11 $\pm$ 2 [8-14]
Diámetro (μm)	7 $\pm$ 1 [9-5]	8 $\pm$ 1 [9-6]	9 $\pm$ 1 [8-11]	7 $\pm$ 2 [5-9]	6 $\pm$ 1 [5-6]
<i>Células del hipotalo</i>					
Tricocistos	+	-	-	-	-
Cristales	-	+	+	+	+

Continuación. Cuadro 19. Comparación morfoanatómica del clado A '*Lithophyllum* sp. I' del Parque Nacional Coiba. Las mediciones se representan como media $\pm$ desviación estándar, seguido del rango en corchetes. **A**=a nivel del borde, **H**= hundido, **C**= calcificada, **NC**=no calcificada, **P**=piso del conceptáculo, **T** =techo del conceptáculo, **t**=tetrasporas, **b**=biesporas, **n.o**=no observado en este estudio.

	NL-15	NL-15-2	NL-25	NL-40	NL-102
Características reproductivas					
Tipo de poro	uniporado	uniporado	uniporado	uniporado	uniporado
<i>Conceptáculos tetraesporangiales</i>					
Diámetro de la cámara (μm)	294 $\pm$ 43 [249-359]	277 $\pm$ 38 [241-326]	256 $\pm$ 98 [123-360]	336 $\pm$ 29 [315-356]	170 $\pm$ 51 [83-207]
Alto de la cámara (μm)	133 $\pm$ 30 [90-164]	99 $\pm$ 11 [86-110]	130 $\pm$ 50 [58-173]	141 $\pm$ 17 [129-153]	90 $\pm$ 35 [52-142]
Elevación del techo	A, H	H	H	A, H	A,H
Profundidad del piso del conceptáculo a la superficie (número de células)	11-17	8-11	5-11	8-14	6-11
Columela	+	+	+	+	+
Tipo de columela	C/NC	C	C	C/NC	C
Posición	P/T	P	P	P/T	P
Naturaleza de las esporas	t	t	n.o.	b	t
<i>Conceptáculos gamentangiales</i>	+	+	+	n.o	n.o
<i>Conceptáculos carposporangiales</i>	+	n.o	+	+	+
Conceptáculos enterrados en el talo	+	+	+	+	+

A continuación, se presenta en detalle la caracterización morfológica de los especímenes analizados:

***Lithophyllum* sp.1 NL-15:** Granito de Oro, Isla Coiba, encontrada a ~2 m de profundidad (**Fig. 29**)

Descripción

Estructura vegetativa: Talos de vida libre, formando rodolitos de 3-4 cm de diámetro; aterronado, portando pequeñas protuberancias cilíndricas. La organización interna del talo es pseudoparenquimatosa y dímera. . Los filamentos de las protuberancias están terminados en una hilera de células epiteliales aplanadas de 2-11 μm de largo y 13-27 μm de diámetro. Células de los filamentos adyacentes unidas por conexiones primarias y secundarias y fusiones celulares en el eje z, tricocitos individuales presentes.

Reproducción: Conceptáculos bi/tetraesporangiales maduros uniporados, con techos a nivel de la superficie del talo y hundidos. Cámara del conceptáculo de 249-359 μm de diámetro y 90--164 μm de alto; el piso del conceptáculo situado de 11-17 hileras de células por debajo la superficie del talo, portando tetrasporangios alineados alrededor de una columela central que sale del piso y que algunos conceptáculos es calcificada y en otro no calcificada Se observaron tetraesporas/biesporas y variaciones anatómicas a lo interno de los diferentes conceptáculos.

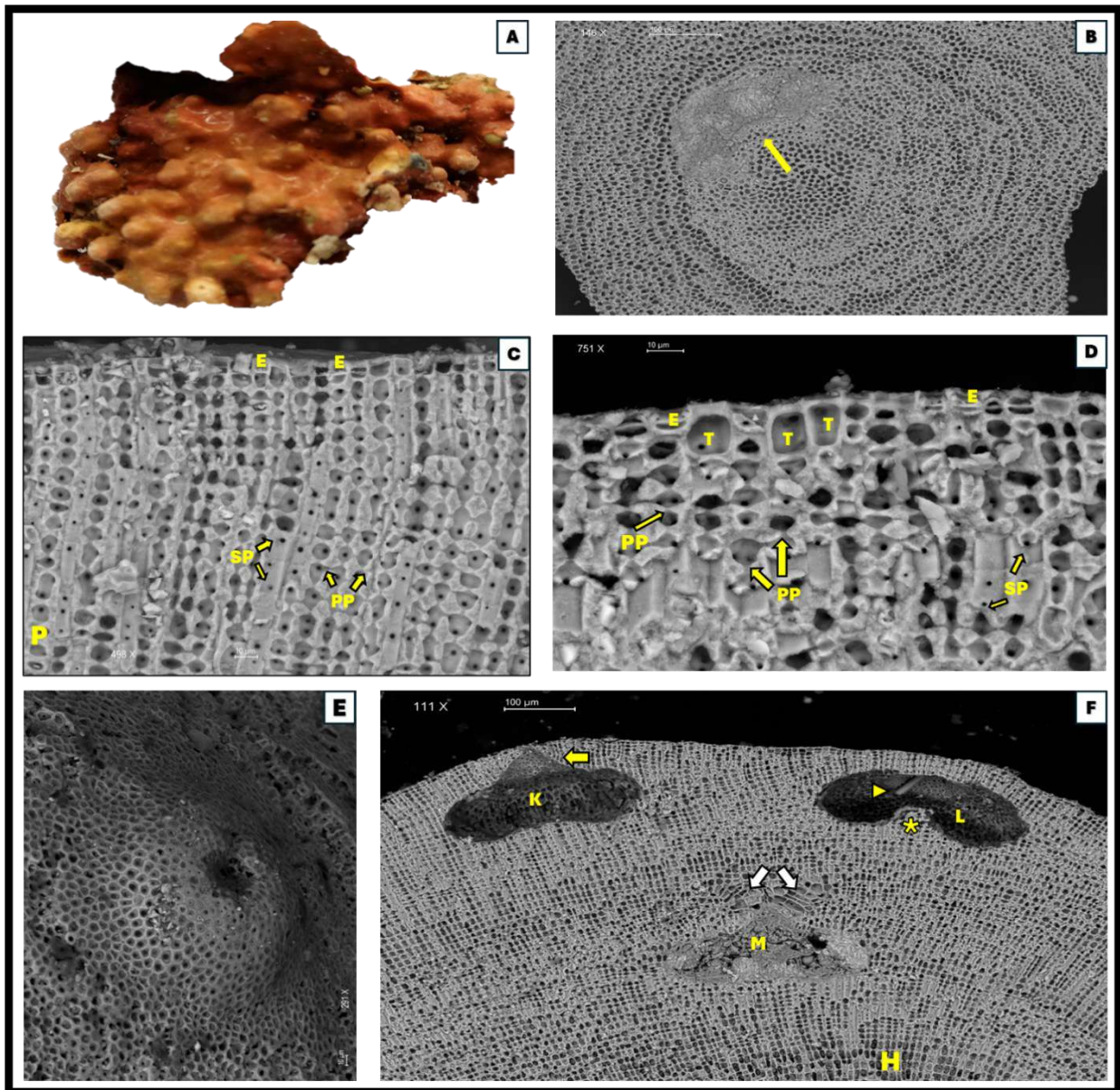


Fig. 29. *Lithophyllum* sp 1. NL-15. **Hábito del talo y morfoanatomía**

A) Hábito aterronado. B) Corte transversal del talo mostrando construcción radial y un conceptáculo en crecimiento (flecha), escala 100 μ m. C) Corte transversal del talo mostrando el peritalo (P), las células epiteliales (E), conexiones pit primarias (PP), conexiones pit secundarias (SP), escala 10 μ m. D) Superficie del talo mostrando células epiteliales aplanadas y tricocitos individuales (T), escala 10 μ m. E) Vista superficial de un conceptáculo uniporado, escala 10 μ m. F) Corte vertical del talo mostrando el hipotalo columnar (H), conceptáculos elevados (K) con cinco capas de células formando el techo, hundidos (L) con dos tipos de columnelas: en el piso del conceptáculo (asterisco) y en el techo del conceptáculo (triángulo) y enterrados en formación (M) con células del canal del poro compuestas por células papiladas (flechas blancas) que se proyectan hacia el interior del canal, escala 100 μ m.

***Lithophyllum* sp.1 NL 15-2:** Granito de Oro, Isla Coiba, encontrada a ~2 m de profundidad (Fig. 30).

Descripción

Estructura vegetativa: Talos incrustantes, formando rodolitos creciendo sobre NL-15; aterronado, portando pequeñas protuberancias cilíndricas. La organización interna del talo es pseudoparenquimatosa y dímera. . Los filamentos de las protuberancias están terminados en una hilera de células epiteliales aplanadas de 3-6 μm de largo y 8-10 μm de diámetro. Células de los filamentos adyacentes unidas por conexiones primarias y secundarias y fusiones celulares en el eje z, tricocistos ausentes.

Reproducción: Conceptáculos bi/tetraesporangiales maduros uniporados, hundidos en el talo. Cámara del conceptáculo de 241-326 μm de diámetro y 86-110 μm de alto; el piso del conceptáculo situado de 8-11 hileras de células por debajo la superficie del talo, portando tetrasporangios alineados alrededor de una columela central calcificada que sale del piso. Se observaron tetraesporas/biesporas y variaciones anatómicas a lo interno de los diferentes conceptáculos, incluidos cristales.

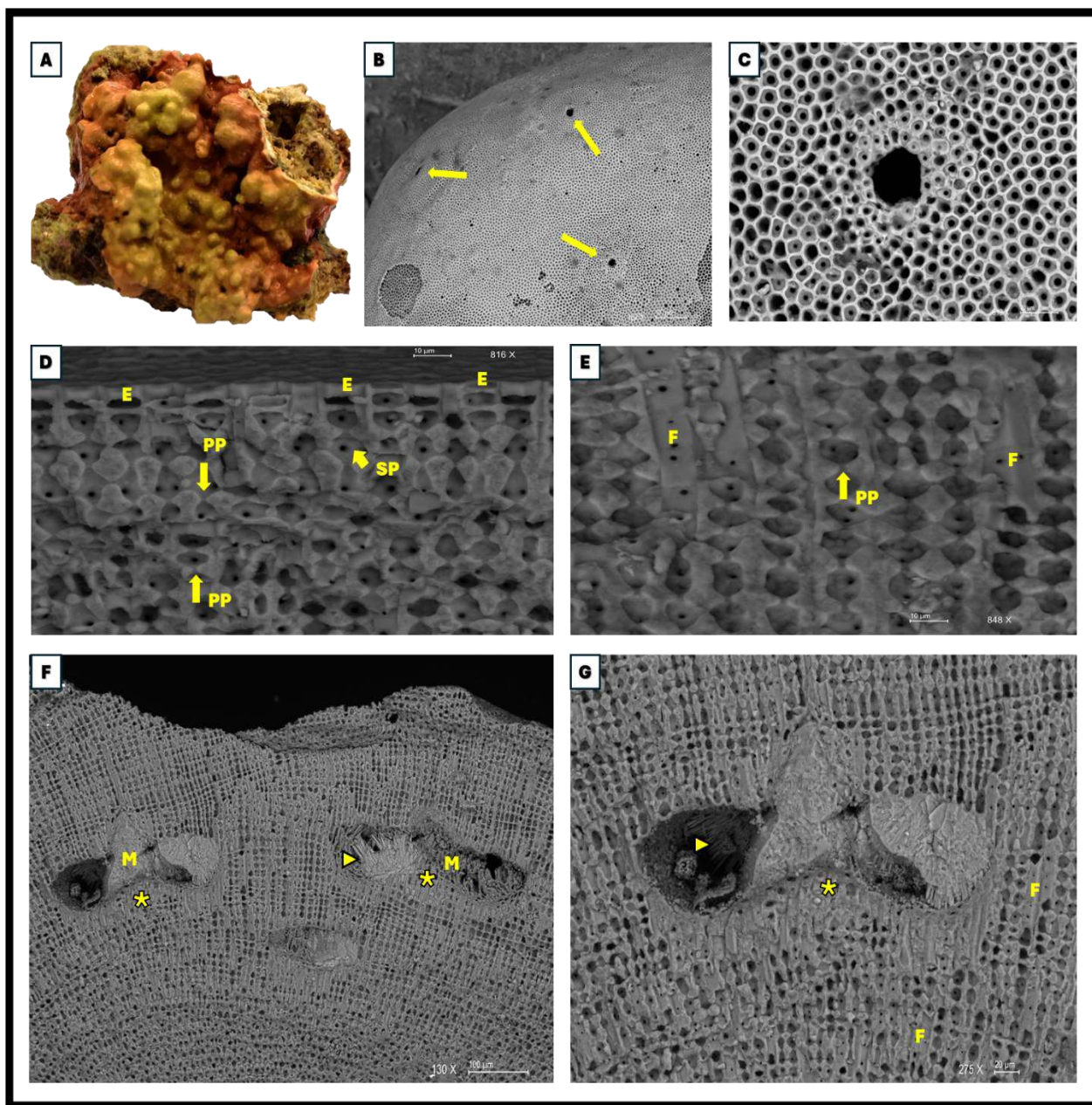


Fig. 30. *Lithophyllum* sp 1. NL-15-2. **Hábito del talo y morfoanatomía**

A) Hábito verrucoso. B) Vista superficial del talo mostrando poros de los conceptáculos (flechas), escala 100 µm. C) Poro del conceptáculo mostrando células rosetas que forman un anillo diferenciado. D) Corte transversal del talo mostrando el peritelo, las células epiteliales (E), conexiones pit primarias (PP), conexiones pit secundarias (SP), escala 10 µm. E) Vista transversal mostrando fusiones celulares en el eje z de los filamentos de células adyacentes), escala 10 µm. F) Corte vertical del talo mostrando el hipotelo columnar (H), conceptáculos, hundidos (M) con columnelas calcificadas en el piso (asterisco), escala 100 µm. G) Vista transversal de un conceptáculos, hundidos con columela calcificadas en el piso (asterisco), y cristales revistiendo las paredes del conceptáculo (triángulo), escala 20 µm.

***Lithophyllum* sp. 1 NL 25:** Cocos, Isla Coiba, encontrado a ~ 4 m de profundidad (**Fig. 31**).

Descripción

Estructura vegetativa: Talos de vida libre, formando rodolitos de 3-4 cm de diámetro; fruticoso, de tono rosa a lila, con protuberancias cilíndricas, formando una estructura esferoidal. La organización interna del talo es pseudoparenquimatosa y dímera. . Los filamentos de las protuberancias están terminados en una hilera de células epiteliales aplanadas de 3-4 µm de largo y 6-10 µm de diámetro.

Células de los filamentos adyacentes unidas por conexiones primarias y secundarias y fusiones celulares en el eje z, tricocistos ausentes.

Reproducción: Conceptáculos vacíos uniporados, hundidos en el talo. Cámara del conceptáculo de 123-360 µm de diámetro y 58-173 µm de alto; el piso del conceptáculo situado de 5-11 hileras de células por debajo la superficie del talo, portando tetrasporangios alineados alrededor de una columela central calcificada que sale del piso.

No se observaron tetraesporas/biesporas, en su lugar se observaron cristales y masas esféricas a lo interno de los diferentes conceptáculos, lo cual requiere mayor estudio para conocer si las mismas representan carposporangios.

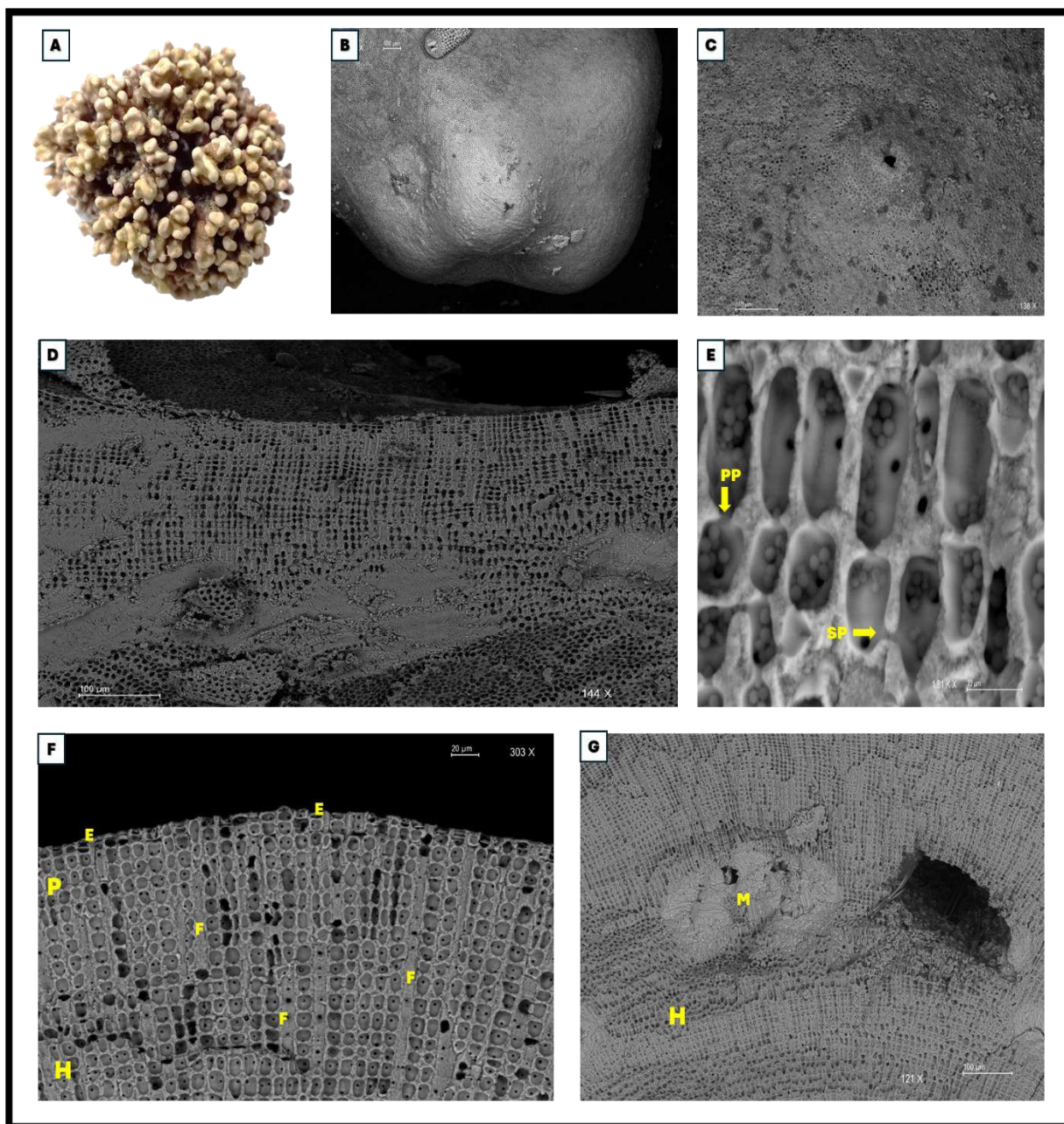


Fig. 31. *Lithophyllum* sp 1. NL-25. **Hábito del talo y morfoanatomía**

A) Hábito fúticoso B) Vista superficial de las protuberancias mostrando un poro, escala 100 µm. C) Vista superficial del poro de un conceptáculo, escala 100 µm. D) Corte transversal mostrando la conformación dímica del talo, escala 100 µm. E) Células del peritalo mostrando conexiones pit primarias (PP), conexiones pit secundarias (SP), escala 10 µm. F) Superficie del talo mostrando células epiteliales aplanadas (E) y fusiones celulares en el eje z de células de filamentos adyacentes, escala 20 µm. G) Corte vertical del talo mostrando el hipotalo columnar (H) y conceptáculos hundidos en formación (M), escala 100 µm.

***Lithophyllum* sp. 1 NL 40:** Don Juan, Isla Coiba, encontrado a ~ 13 m de profundidad. (Fig. 32).

Descripción

Estructura vegetativa: Talos de vida libre, formando rodolitos de 4-5 cm de diámetro; fruticoso, de tono rosa- naranja, portando pequeñas protuberancias cilíndricas. La organización interna del talo es pseudoparenquimatosa y dímera. Los filamentos de las protuberancias están terminados en una hilera de células epiteliales aplanadas de 8-13 μm de largo y 4-7 μm de diámetro.

Células de los filamentos adyacentes unidas por conexiones primarias y secundarias y fusiones celulares en el eje z, tricocistos ausentes.

Reproducción: Conceptáculos biesporangiados maduros uniporados, hundidos en el talo y otros con techos al borde de superficies del talo. Cámara del conceptáculo de 315-356 μm de diámetro y 129-153 μm de alto; el piso del conceptáculo situado de 8-14 hileras de células por debajo la superficie del talo, portando tetrasporangios en algunos conceptáculos alineados alrededor de una columela central calcificada que sale del piso y en otros se observa una columela no calcificada en el techo.

Se observaron cristales y masas esféricas a lo interno de algunos conceptáculos, lo cual requiere mayor estudio para conocer si las mismas representan carposporangios.

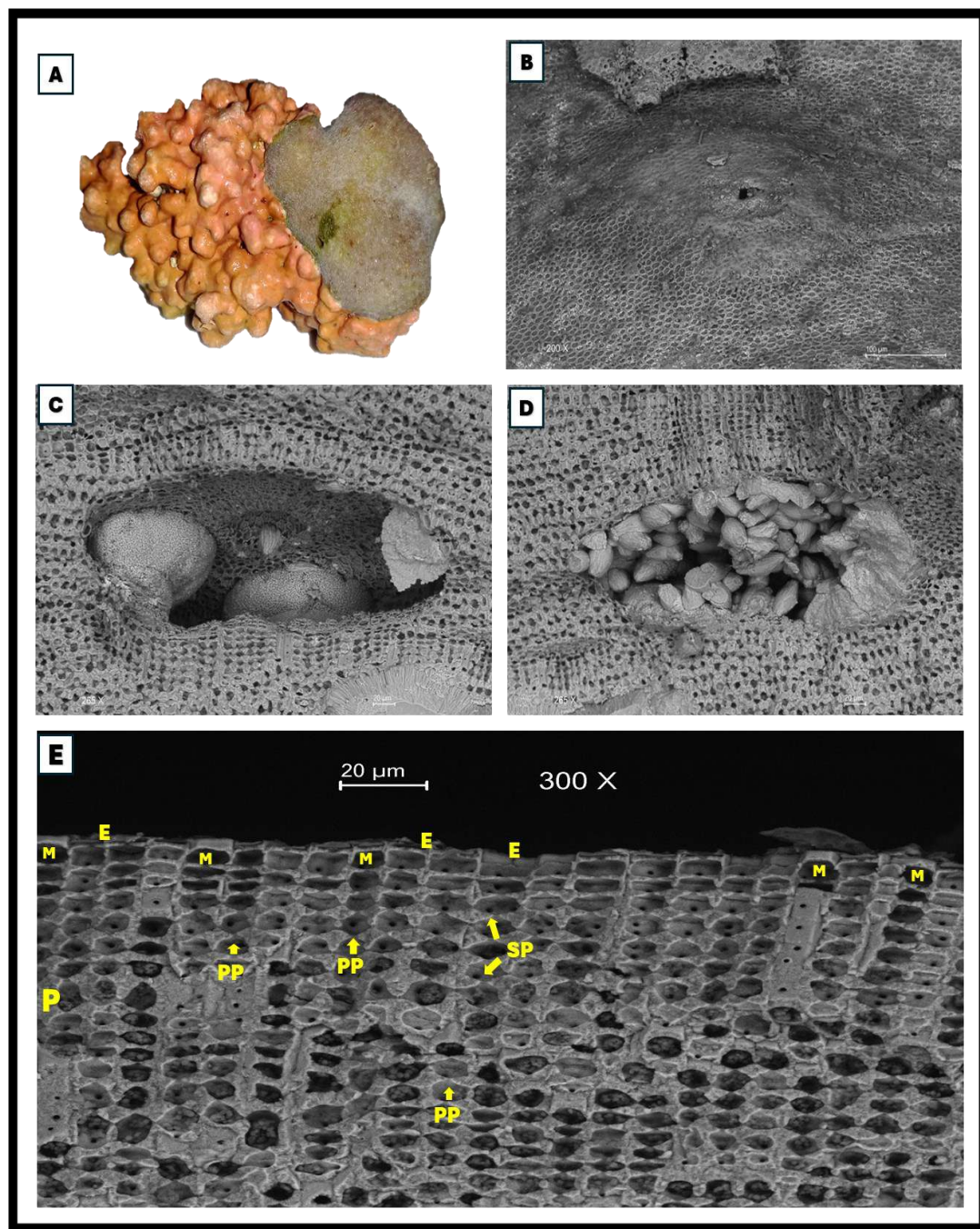


Fig. 32. *Lithophyllum* sp 1. NL-40. **Hábito del talo y morfoanatomía**

A) Hábito fruticoso donde se muestra un coral en crecimiento adherido al talo del rodolito. B) Vista superficial de un conceptáculo uniporado, escala 100 μm . C) Corte transversal de un conceptáculo espermatangial D) Corte transversal de un conceptáculo carpoesporangial, escala 20 μm . E) Corte transversal del talo mostrando el peritalo (P), las células epiteliales rectangulares (E) conexiones pit primarias (PP), conexiones pit secundarias (SP), células meristemáticas (M), escala 20 μm .

***Lithophyllum* sp. 1 NL 102:** Buffet, Isla Coiba, encontrado a ~ 17 m de profundidad. (Fig.33).

Descripción

Estructura vegetativa: Talos de vida libre, formando rodolitos de 2 cm de diámetro; verrucoso-aterronado, de tono rosa a naranja-amarillo claro, portando pequeñas protuberancias cilíndricas. La organización interna del talo es pseudoparenquimatosa y dímera. Los filamentos de las protuberancias están terminados en una hilera de células epiteliales aplanadas de 8-10 µm de largo y 6-10 µm de diámetro.

Células de los filamentos adyacentes unidas por conexiones primarias y secundarias y fusiones celulares en el eje z, tricocistos ausentes.

Reproducción: Conceptáculos biesporangiados maduros uniporados, hundidos en el talo y otros con techos al borde de superficies del talo. Cámara del conceptáculo de 83-207 µm de diámetro y 52-142 µm de alto; el piso del conceptáculo situado de 6-11 hileras de células por debajo la superficie del talo, portando tetrasporangios en algunos conceptáculos alineados alrededor de una columela central calcificada que sale del piso.

Se observaron cristales y masas esféricas a lo interno de algunos conceptáculos, lo cual requiere mayor estudio para conocer si las mismas representan carposporangios.

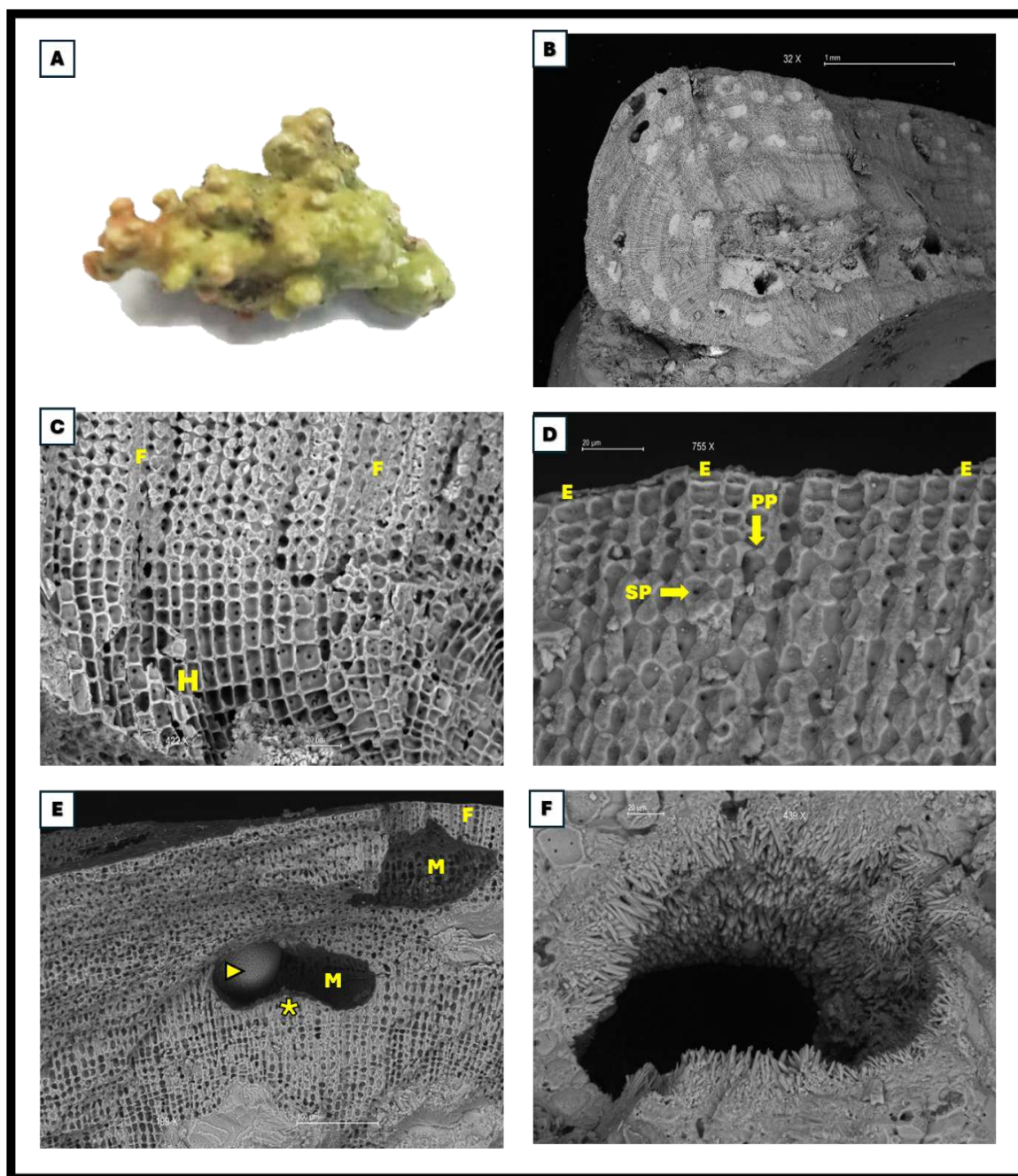


Fig. 33. *Lithophyllum* sp 1. NL-102. **Hábito del talo y morfoanatomía**

A) Hábito fruticoso verrucoso. B) Vista general de una fractura mostrando numerosos conceptáculos, escala 1 μ m. C) Corte transversal de talo mostrando un hipotalo (H) de células columnares y un peritalo con filamentos fusionados (F) en el eje Z, escala 20 μ m. D) Corte transversal del talo mostrando células epiteliales aplanadas (E), conexiones pit primarias (PP) y conexiones pit secundarias (SP), escala 20 μ m. E) Vista transversal de conceptáculos hundidos (M) con columela calcificadas en el piso (asterisco), y masas esféricas a lo interno (triángulo), escala 100 μ m. F) Cristales revistiendo las paredes del conceptáculo, escala 20 μ m.

A excepción de la presencia de tricocitos, las secuencias NL-15 y NL 15-2 presentan las mismas características morfológicas. La similitud de sus caracteres moleculares con el marcador UPA se recupera con un valor de probabilidad posterior de 0.98 y un valor $p=0.2$ de distancia genética, lo que indica que estas secuencias constituyen la misma especie y que a su vez son diferentes al resto de los especímenes del clado en estudio.

Las secuencias psbA de NL-25 y NL-40 generada por inferencia bayesiana difieren entre si un 1%, y se representan en el cladograma como una misma entidad taxonómica con un soporte de 0.995 según la caracterización molecular. Ambas secuencias se relacionan con la secuencia *Lithophyllum atlanticum* de Brazil difiriendo un 12% entre ellas. Para el caso del cladograma generado con el marcador UPA, las relaciones son las mismas; las secuencias NL-25 y NL- 40 se ubican en ramas distintas con un valor de probabilidad posterior de 0.95. Para ambos marcadores, NL-25 y NL-40 se alinean con la misma secuencia de *Lithophyllum atlanticum* de Brazil difiriendo un 9% y con otras especies como: *Lithophyllum margaritae* y *Lithophyllum corallinae*.

Al analizar 24 caracteres morfoanatómicos previamente empleados para discriminar entre especies de *Lithophyllum* (Cuadro 20-21), se observó que todos los especímenes del PNC para este clado presentan talos con construcción dímera y células fusionadas en el eje Z de filamentos de células adyacentes.

Estas características difieren de *L. margaritae*, *L. atlanticum*, *L. okamurae* y *L. neo okamurae* con quienes se agrupan cercanamente en el cladograma, lo que nos permiten confirmar que el clado '*Lithophyllum* sp. 1' es una entidad taxonómicamente distinta a las antes mencionadas.

La similar caracterización morfoanatómica, el alto valor de soporte de probabilidad posterior entre los marcadores moleculares y el bajo valor de distancia genética entre los cinco especímenes caracterizados molecularmente, indica que NL-15, NL-15-2, NL-23, NL-40 y NL-102 representan la misma entidad taxonómica.

Basados en la información morfológica obtenida en este trabajo, la descripción morfológica propuesta por Lemoine (1929) y los datos moleculares proponemos una resurrección taxonómica de *Lithophyllum coibense* para nombrar a los especímenes anteriormente caracterizados.

Cuadro 20. Comparación de características de *Lithophyllum atlanticum*, *Lithophyllum okamurae*, *Lithophyllum neookamurae* y *Lithophyllum margaritae*. **na**= no aplica al tipo de microscopía utilizada en el estudio.

	<i>L. atlanticum</i>	<i>L.okamurae</i>	<i>L.neookamurae</i>	<i>L. margaritae</i>	<i>L.margaritae</i>
Referencia	Viera Pinto et al., 2014	Kato et al., 2022	Kato et al., 2022	Robinson, 2013	Viera Pinto et al., 2014
País	Brazil	Japón	Japón	Mexico	Brazil
Características vegetativas					
<i>Forma de crecimiento</i>	liso, warty a verrugoso	in, warty, lump, folioso o frut	fruticoso a folioso	fruticoso a folioso	fruticoso a folioso
<i>Organización del talo</i>	pseudoparanquimatoso, monómera	dímera, con hipotalo uniestratificado	dímera, con hipotalo uniestratificado	monómera	pseudoparenquimatoso, dímera- monómera
<i>Fusiones celulares</i>	-	-	-	-	-
<i>Conexiones</i>	1° y 2°	2° (comunes)	2° (comunes)	1° y 2°	2°
<i>Células palisadas</i>	-	-	-	-	-
Células epiteliales					
<i>Forma</i>	aplanadas	aplanadas	rectangulares	aplanadas a redondeadas	aplanadas
<i>Número de células epiteliales</i>	1-2	1-2	1-2	1	1
<i>Alto (µm)</i>	3-6	2-4	2-5	2-5	1.5-5
<i>Diámetro (µm)</i>	6-11	7.5-10	7-10.5	7-10	5-13
Células periteliales					
<i>Alto (µm)</i>	8-16	7-9	12.3-3.4	12-30	7-16
<i>Diámetro (µm)</i>	5.5-11	5.5-11	8.2-0.9	7-12	3-10
<i>Células del hipotalo</i>	enlongadas, columnares	isodiamétricas, poco enlongadas	isodiamétricas, poco enlongadas	redondeadas	redondeadas
<i>Tricocistos</i>	-	-	-	-	-
<i>Cristales</i>	-	na	na	na	-

Continuación. Cuadro 21. Comparación de características de *Lithophyllum atlanticum*, *Lithophyllum okamurae*, *Lithophyllum neookamurae* y *Lithophyllum margaritae*. L= elevado, A=a nivel del borde, H= hundido, P=presente, A=ausente.

	<i>L. atlanticum</i>	<i>L.okamurae</i>	<i>L.neookamurae</i>	<i>L. margaritae</i>	<i>L.margaritae</i>
Referencia	Viera Pinto et al., 2014	Kato et al., 2022	Kato et al., 2022	Robinson, 2013	Viera Pinto et al., 2014
País	Brazil	Japón	Japón	Mexico	Brazil
Características reproductivas					
<i>Tipo de poro</i>	uniporado	uniporado	uniporado	uniporado	uniporado
<i>Conceptáculos tetraesporangiales</i>					
<i>Diámetro de la cámara (µm)</i>	(295) 315-345	167-314	248-380	190-230	180-220
<i>Alto de la cámara (µm)</i>	(75) 90-130	63-109	73-144	110-140	70-95
<i>Elevación del techo</i>	L,A o H	L, A o H	L, A o H	L	L
<i>Profundidad del piso del conceptáculo a la superficie (número de células)</i>	9-13	18-30	10-16	8-11	10-14
<i>Columela</i>	P	P/A	P	P	P
<i>Tipo de columela</i>	no calcificada	calcificada	calcificada	calcificada	no calcificada
<i>Posición</i>	piso	piso	piso	piso	en el canal del poro
<i>Naturaleza de las esporas</i>	tetraesporangio	tetraesporangio	tetraesporangio	tetraesporangio	tetraesporangio

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En el presente estudio se optimizó un método de extracción de ADN para rodolitos basado en la prueba de métodos orgánicos (CTAB) y no orgánicos de adsorción (proteínasa K+ membrana) modificando los tiempos de lisis entre diferentes kits comerciales. Los datos obtenidos muestran mejora en la calidad del ADN extraído para el kit Machery Nagel tratado con proteínasa K por un periodo de incubación de 3 horas.

La optimización del método de extracción de ADN para rodolitos, es esencial para mejorar la calidad y cantidad del material genético obtenido, especialmente por el desafío de presentar carbonato de calcio en sus estructuras.

Según Ramakrishnan *et al.* (2017), en general, las algas, incluidos los rodolitos, poseen características estructurales únicas que pueden complicar la extracción de ADN, requiriendo métodos especializados para obtener resultados óptimos.

Su alta mineralización en carbonato de calcio contribuye a una estructura rígida que precipita en la pared celular, contrario a corales y otras algas verdes calcificadas en los cuales ocurre en el espacio intracelular (Bergstrom et al., 2023; Nash et al., 2019). Esta característica dificulta la ruptura celular durante el proceso de extracción (Riosmena-Rodríguez, 2017; Fragoso et al., 2010).

Además, la pared celular robusta de los rodolitos que está enriquecida con polímeros complejos (Bergstrom et al., 2023) añade una capa adicional de dificultad, ya que requiere métodos de lisis más agresivos para liberar el ADN.

Por su parte, la densidad del material calcáreo también puede interferir con la homogeneización efectiva y la purificación del ADN, lo que a menudo requiere ajustes en el tiempo de incubación, ya que la matriz calcárea puede afectar las reacciones de PCR. En consecuencia, se genera la necesidad de técnicas adicionales para purificar el ADN y eliminar inhibidores.

En este sentido, se hace necesario, el uso de reactivos adicionales tales como: Albúmina Suero Fetal (BSA) y Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Díaz-Ferguson, 2012; Poma et al., 2012). En este contexto, la aplicación de proteinasa K ha demostrado ser efectiva en mejorar del rendimiento de extracción de ADN, tal como se evidencia en el trabajo de Quintero *et al.* (2015), que destaca se la optimización de protocolos de extracción de ADN de organismos marinos con dicho este método.

El uso de un período de incubación de la muestra por 3 horas con proteinasa K y el buffer de lisis del kit Machery Nagel ha mostrado mejoras en la calidad del ADN extraído, corroborando los hallazgos de Viera-Pinto *et al.* (2014) para especies de *Lithophyllum* de Brazil y Robinson (2012) para rodolitos del Pacífico Este Tropical.

La pureza de ADN obtenido no logró los valores óptimos que indican material genético de buena calidad, pero se acercó a valores estándares de densidad óptica (DO) (1.62-1.75). Lo anterior, o se explica por la posible contaminación de la muestra al utilizar las columnas de membranas de sílice del kit, resultando en exceso de fenol residual o de carbohidratos, el cual es un problema que se encuentra comúnmente en el aislamiento de DNA de plantas y algas (Pérez et al., 2024).

No obstante, las modificaciones realizadas en este estudio resultaron en una mayor cantidad de amplificaciones positivas para este método permitiendo generar por primera vez 17 secuencias de rodolitos con el marcador UPA y 5 con psbA para el PNC que es una zona crucial para el mundo y la región, por su una alta biodiversidad y su rol en el mantenimiento de la conectividad de especies.

Basado en los resultados del análisis molecular BLAST, Inferencia Bayesiana y ASAP (Cuadro 14-16, Figs. 16-25) se caracterizaron en total nueve 10 posibles especies tanto para el marcador UPA como psbA, en zonas insulares de Panamá y Costa Rica.

La caracterización molecular indica que el 45% de las secuencias analizadas para el PNC y el PN Isla del Coco, corresponden a *Lithophyllum*, 37% a *Lithothamnion*, 9% a *Sporolithon* y 3% a *Neogoniolithon*, *Roseolithon* y *Mesophyllum*, respectivamente.

Los trabajos de Díaz-Licona (2024), Costa et al., (2023), Centelles (2019), Robinson et al., (2017) y Matrínez (2013) coinciden con nuestros datos de abundancia ya que la subfamilia Lithophylloideae tiene mayor representatividad y el género *Lithophyllum* es el más común en ambas costas panameñas, en el Pacífico de Costa Rica y el Pacífico Este Tropical.

Con base a este estudio, se reportan por primera vez para Panamá las siguientes especies: *Lithophyllum corallinae*, *Lithophyllum margaritae*, *Sporolithon indopacificum*, *Neogoniolithon* sp. Igualmente, *L. corallinae*, *S. indopacificum* y *Neogoniolithon* sp. también se reportan como nuevos registros para el Pacífico de Centroamérica.

Las siete especies moleculares de *Lithothamnion* sp. y la secuencia de la muestra NL-36 caracterizada como *Sporolithon* sp., cuyas homologías en BLAST no hacen referencia a nombre de especies también parecen ser nuevas para todo el Pacífico, no obstante, su validación requiere de análisis morfoanatómicos.

El alto soporte de relación entre NL-7 del PNC y *Lithothamnion J* de Cébaco (KU504275) para el marcador UPA y entre esta última y UCR 1513 de Isla del Caño en Costa Rica para el marcador psbA, permite relacionarlas como una especie hermana entre Panamá y Costa Rica.

Las secuencias de especímenes analizados en esta investigación fueron comparadas con taxas similares estudiados en Costa Rica, México, USA y otras latitudes del mundo desde un enfoque de taxonomía integrativa (Díaz Licona, 2024; Kato et al., 2022; Gabrielson et al., 2018; Richards y Fredericq, 2018; Richards et al., 2017, 2016, 2014; Hernández Kantun 2016; Robinson et al., 2017; Viera-Pinto et al., 2014; Robinson, 2012; Harvey et al., 2005).

Encontramos especímenes que se ajustan a la caracterización molecular de los géneros *Lithophyllum*, *Lithothamnion*, *Sporolithon*, *Neogoniolithon*, *Mesophyllum* y *Roseolithon* con valores de probabilidad posterior entre moderados (0.75 a 0.95) y altos (>0.95), lo que permite interpretar que las relaciones entre las secuencias estudiadas presentan fuerte o buena evidencia para ser apoyadas. En general, los árboles de inferencia bayesiana para UPA y psbA revelaron una diversidad molecular previamente no documentada para estos géneros en la región del Corredor Marino del Pacífico Este Tropical.

Aunque no se lograron secuencias para los marcadores UPA y psbA en todos los especímenes, NL-25 y NL-40 fueron los únicos que presentaron amplicones para ambos. Los cladogramas para UPA y psbA recuperaron los mismos grupos, lo que confirma que estas secuencias corresponden a especies genéticamente similares. Además, el análisis de la región más variable (psbA) resolvió de manera más precisa las relaciones entre las especies en

comparación con el análisis de UPA, un resultado que coincide con el hallazgo de Freshwater et al. (2017) para las secuencias de algas de Punta Burica.

A pesar de esto, UPA es considerado un marcador útil debido a su universalidad para la identificación de especies algales, su facilidad para amplificarse y secuenciarse, y su tamaño, ya que permite amplificar la región de interés incluso en extracciones con baja calidad de ADN (Sherwood y Presting, 2007), razón por la cual fue utilizado en este trabajo. Sin embargo, es recomendable utilizarlo en combinación con otros marcadores más variables para aumentar la confiabilidad en las resoluciones de identidad (Saunders y Moore, 2013).

Cabe señalar que adicional a la limitada información disponible para cada marcador en la zona de estudio, los rodolitos son reflejo de una historia evolutiva independiente de diversos grupos de algas rojas calcáreas (Cavalier-Smith, 2015). Han desarrollado adaptaciones similares en su morfología y ecología, pese a no tener orígenes en un mismo ancestro común, característica conocida filogenéticamente como polifilia.

Dicha situación tiene importantes implicaciones, ya que, al no formar un grupo evolutivo sólido, las caracterizaciones moleculares preliminares obtenidas en este estudio y otras investigaciones (Richards et al., 2018, 2016, 2014) evidencian desafíos en la determinación precisa de las especies de rodolitos.

La caracterización morfoanatómica de los especímenes del clado "*Lithophyllum* sp.1" permite revivir taxonómicamente la especie *Lithophyllum coibense* mediante una re-descripción de sus caracteres morfonatómicos y un sustento molecular de probabilidad posterior de 0.99 y 0.95, valor que soporta la hipótesis de que estas secuencias se encuentran distantes de todas las

secuencias analizadas de otras partes del mundo, se relacionan entre ellas y forman una entidad taxonómica distinta.

Lithophyllum coibense fue descrita por primera vez en 1929 por M. Lemoine y se clasifica en la familia Corallinaceae, dentro del orden Corallinales. Hasta la fecha, su presencia ha sido documentada únicamente en la isla de Coiba. En las publicaciones originales de Lemoine (1929), se menciona como una nueva especie de alga roja que contribuye a los sedimentos marinos someros de la isla con crecimiento fruticoso. El hipotalo está compuesto de células rectangulares dispuestas en filas de 9-24 μm de alto y 4 a 7 μm de largo, el peritalo lo conforman células pequeñas de 3 a 4 μm de alto y 3 a 4 μm de ancho. Los conceptáculos tienen forma cónica y miden entre 80 a 350 μm de alto y de 250 a 500 μm de diámetro. Aunque *L. coibense* posee una descripción formal, no había sido estudiada o citada nuevamente desde su descripción, hasta este estudio, lo que suele denominarse una especie olvidada, con un nombre válido, pero poco utilizado.

No es sorpresa que una gran parte de las secuencias reportadas aquí, representen especies nuevas y diferentes a las de las otras regiones puesto que la investigación sobre los rodolitos del Pacífico está apenas cobrando auge y es una línea de investigación que no se ha desarrollado formalmente en Latinoamérica.

CONCLUSIONES

Se confirma el uso de análisis moleculares como herramientas fundamentales para el estudio de la diversidad de rodolitos. Los métodos modificados de extracción por adsorción y la lisis química con proteinasa K, resultaron en amplificaciones positivas y permitieron caracterizar molecularmente nueve potenciales especies de rodolitos para el PNC: *Lithophyllum coibense*, *Lithophyllum corallinae*, *Lithothamnion sp 1*, *Lithothamnion sp 2*, *Lithothamnion sp 3*, *Lithothamnion sp J*, *Sporolithon indopacificum*, *Sporolithon sp* y *Neogonilimon sp*.

Siete secuencias fueron caracterizadas molecularmente como *L. coibense*, especie que representa una entidad distinta de *L. atlanticum*, *L. okamurae* y *L. neo-okamurae*, reportadas en Brazil, Japón, México y Costa Rica. Con las caracterizaciones morfológicas concluimos que no existe una descripción previa de *L. coibense* y que existen inconsistencias en los caracteres morfológicos utilizados para la identificación de rodolitos. Es necesario realizar un estudio detallado para realizar los ajustes taxonómicos, incluyendo las características propuestas en este estudio para *L. coibense*: 1) talo dímero, 2) fusiones celulares en el eje Z de los filamentos y 3) incrustaciones de carbonato de calcio dentro de los conceptáculos.

Otras caracterizaciones moleculares señalan a la posible especie *Sporolithon indopacificum* como una especie anfiocéánica y que las caracterizaciones moleculares del género *Lithothamnion* presentan una gran variabilidad genética. Solo en las secuencias de Coiba documentamos 4 entidades taxonómicas diferentes (de siete secuencias analizadas) para este género y 3 para Isla del Coco, lo que representa una gran variabilidad para zonas geográficas pequeñas. Estudios detallados de morfoanatomía son de interés para determinar si representan especies nuevas para la ciencia.

La caracterización molecular de secuencias de Costa Rica señala que la especie mejor representada en Isla del Coco es *L. okamurae* , la cual exhibe un gran patrón de variación intraespecífica. Como esta especie suele confundirse morfológicamente con las especies hermanas *L. margaritae*, y *L. neo-okamurae* es necesaria la identificación molecular para discriminar entre ellas con veracidad.

La secuencia caracterizada como *Lithothamnion* sp J., de Isla Cébacó, presentó un alto soporte de relación entre secuencias de Isla del Caño y Ranchería, lo que las confirma como una misma identidad taxonómica.

Las potenciales especies caracterizadas por primera vez en este estudio para zonas insulares del Corredor Marino del Pacífico Este Tropical, nos demuestran que sigue siendo necesario realizar más estudios basales de la diversidad genética y morfológica de rodolitos, un ecosistema marino poco conocido, resiliente y con muchos servicios ecosistémicos a ofrecer.

RECOMENDACIONES

A partir de este estudio han surgido nuevas preguntas tales como: ¿cuáles son las especies de rodolitos en otros puntos de la isla? ¿cómo están las poblaciones de rodolitos del PNC en términos de diversidad genética? ¿existen patrones de conectividad genética entre las poblaciones de Coiba y Costa Rica? y ¿en otras zonas del corredor Marino del Pacífico Este Tropical?

Para contestar estas interrogantes, el primer paso es generar mayor cantidad de secuencias para los loci UPA, psbA y otros marcadores: como COI, rbcL, lo que permitirá contar con data molecular que le brinde soporte a los análisis, y así conocer las implicaciones que brinda el conocimiento sobre la diversidad de genética de estos organismos en función al establecimiento de normas de conservación .

LITERATURA CITADA

Adey, W. H., & Macintyre, I. G. (1973). Crustose coralline algae: A re-evaluation in the geological sciences. *Geological Society of America Bulletin*, 84(3), 883-904.

Adey, W., Halfar, J., & Williams, B. (2013). *The coralline genus Clathromorphum Foslíe emend. Adey; biological, physiological and ecological factors controlling carbonate production in an Arctic/Subarctic climate archive* (Vol. 40). Smithsonian Contributions to the Marine Sciences.

Aguirre J., Braga J., & Bassi D. (2017). *Chapter 5: Rhodoliths and Rhodolith Beds in the Rock Record*. En R. Riosmena-Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective*, (1ª ed., pp. 105-138). Editorial Springer.

Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., & Lipman D.(1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.

Amado-Filho G., Bahia R, Guilherme H., Pereira-Filho G., & Longo L. (2017). *Chapter 12: South Atlantic Rhodolith Beds: Latitudinal Distribution, Species Composition, Structure and Ecosystem Functions, Threats and Conservation Status*. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1ª ed., pp. 299-317). Editorial Springer.

- Andersson, A., Bates, N., & Mackenzie, F. (2007). Dissolution of carbonate sediments under rising pCO₂ and ocean acidification: observations from Devil's Hole, Bermuda. *Aquatic Geochemistry*, 13(3), 237–264.
- Bailey, J. & Chapman, R. (1996). *Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) determined by 18S rRNA gene sequence analysis*. En B. R. Chaudhary & S. Agrawal (Eds.), *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. (1^a ed., pp. 363-376). Academic Publishing.
- Bailey, J. & Chapman, R. (1998). A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *Journal of Phycology*, 34(4), 692–705.
- Bailey, J., Gabel, J. & Freshwater, D. (2004). Nuclear 18S rRNA gene sequence analyses indicate that the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta) is a polyphyletic taxon. *Phycologia*, 43(1), 3–12.
- Bassi D., Simone L., & Nebelsick J. *Chapter 6: Re-sedimented Rhodoliths in Channelized Depositional Systems*. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1^a ed, pp. 139-168). Editorial Springer.
- Basso D., & Rodondi, G. (2006). The polyphyletic nature of rhodoliths: A morphological and molecular study. *Marine Biology Research*, 2(2), 83-90.
- Bergstrom E., Lahnstein J., Collins H., Page T., Bulone V., & Diaz-Pulido G. (2023). Cell wall organic matrix composition and biomineralization across reef-building coralline algae under global change. *Journal of Phycology*, 59(1), 111-125.

- Binda, P. (1973) Form and internal structure of recent algal nodules (rhodolites) from Bermuda: a discussion. *The Journal of Geology*, 81:283.
- Bosellini A., y Ginsburg R. (1971). Form and internal structure of recent algal nodules (rhodolites) from Bermuda. *The Journal of Geology*, 79(6):669–682.
- Bosence, D. (1976). Ecological studies on two unattached coralline algae from western Ireland. *Palaeontology*, 19(2):365–395.
- Bosence, D. (1983). *Description and classification of rhodoliths (rhodoids, rhodolites)*. En: T. Peryt (ed.), *Coated grains* (1ª ed., pp 217–224). Editorial Springer.
- Bracchi, V., Caronni, S., Meroni, A., Burguett, E., Atzori, F., Cadoni, N., Marchese, F., & Basso, D. Morphostructural Characterization of the Heterogeneous Rhodolith Bed at the Marine Protected Area “Capo Carbonara” (Italy) and Hydrodynamics. *Diversity* 14(1):51.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E. E., & Lewis, R. (2018). Multigene phylogeny and cell evolution of chromist infrakingdom Rhizaria: contrasting cell organisation of sister phyla Cercozoa and Retaria. *Protoplasma*, 255(5), 1517-1574.
- Centelles, L. (2019). *Distribución y ambientes de desarrollo de rodolitos en el pacífico y caribe de Costa Rica*. [Tesis de grado, Universidad Católica de Valencia, San Vicente Mártir, España] Repositorio institucional de la Universidad Católica de Valencia.
- Coletti G., Basso D., & Frixa A. (2017). *Chapter 4: Economic Importance of Coralline Carbonates*. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1ª ed, pp. 87-101). Editorial Springer.

Costa, D., Dolbeth, M., Christoffersen, M., Zúñiga-Upegui, P., Venâncio, M. & de Lucena, R. (2023). An Overview of Rhodoliths: Ecological Importance and Conservation Emergency. *Life* 13(7), 1556. <https://doi.org/10.3390/life13071556>

Crouan P., & Crouan, H. (1867). *Florule du Finistère*. Contenant les descriptions de 360 espèces nouvelles de sporogames, de nombreuses observations, et une synonymie des plantes cellulaires et vasculaires qui croissent spontanément dans ce département, Paris & Brest: Friedrich Klincksieck & J.B. et A. Lefournier.

Dawson, E. (1959). Marine algae from the 1958 Cruise of the Stella Polaris in the Gulf of California. *Los Angeles County Museum Contributions in Science*, 27, 1–39. **(1)**

Dawson, E. (1960). New records of marine algae from Pacific Mexico and Central America. *Pacific Naturalist*, 1, 31–52. **(2)**

Dawson, E. (1961). A guide to the literature and distributions of Pacific benthic algae from Alaska to the Galapagos Islands. *Pacific Science*, 15(3), 370–461. **(3)**

Del Río J., Ramos D., Sánchez-Tocino L., Peñas J., & Braga J. (2022). The Punta de la Mona Rhodolith Bed: Shallow-Water Mediterranean Rhodoliths (Almuñecar, Granada, Southern Spain). *Frontiers in Earth Science*, 10:884685. <https://doi.org/10.3389/feart.2022.884685>

Díaz-Ferguson, E. (2012). *Introducción a la Ecología Molecular Marina: aplicaciones y perspectivas*. Panamá, Universal Books.

Díaz Licon, C. (2024). *Mantos de rodolitos (rhodophyta) del pacífico costarricense: caracterización e identificación de posibles servicios ecosistémicos para generar recomendaciones de manejo*. [Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica].

- Earle, S. (1972). A review of the marine plants of Panama. *Bulletin of Biological Society of Washington* 2, 69–87. **(4)**
- Edgar R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Excoffier, L. & Lischer H. (2010). Arlequin Suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fernández-García C., Riosmena-Rodríguez R., Wysor B., Tejeda O. L. & Cortés J. (2011). Checklist of the Pacific marine macroalgae of Central America. *Botánica Marina*, 54(1), 53-73. **(5)**
- Fragoso, D., Ramírez-Cahero, F., Rodríguez-Galván, A., Hernández-Reyes, R., Heredia, A., Rodríguez, D., Aguilar-Franco, M., Bucio, L., & Basiuk, V. (2010). Caracterización del biomineral CaCO_3 en algas rojas coralinas (Corallinales) de las costas del Pacífico Mexicano. *Ciencias marinas*, 36(1), 41-58.
- Fredericq S., Kravesky-Self S., Sauvage T., Richards J., Kittle R., Arakaki N., Hickerson E. & Schmidt W. (2019). The Critical Importance of Rhodoliths in the Life Cycle Completion of Both Macro- and Microalgae, and as Holobionts for the Establishment and Maintenance of Marine Biodiversity. *Frontiers in Marine Science*, 5. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2018.00502>
- Freshwater, W., Idol, N., Parham, L., Fernandez-García, C., León, N., Gabrielson W. & Wysor, B. (2017). Molecular assisted identification reveals hidden red algae diversity from The Burica Peninsula, Pacific Panama. *Diversity*, 9(2), 19. <https://doi.org/10.3390/d9020019>

Gabrielson, P., Hughey, R., & Diaz Pulido, G. (2018). Genomics reveals abundant speciation in the coral reef building alga *Porolithon onkodes* (Corallinales, Rhodophyta) *Journal of Phycology*, 54(4), 429-434. <https://doi.org/10.1111/jpy.12761> (6)

Gómez, D. & Pérez, H. 2004. *Estimación de la riqueza y abundancia de macroalgas en los arrecifes de Punta Galeta, 15 años después de un derrame de petróleo*. [Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Universidad de Panamá (Centro Regional de Colón), 80 p.] (7)

Guzmán H, Guevara C.A & Breedy O. (2004). Distribution, diversity, and conservation of coral reefs and coral communities in the largest protected area of Pacific Panama (Coiba Island). *Environmental Conservation* 3(2), 111-121.

Halfar, J., Adey, W. H., Kronz, A., Hetzinger, S., Edinger, E., & Fitzhugh, W. (2013). Arctic sea ice decline archived by multicentury annual-resolution crustose coralline algal proxy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 110(49), 19737–19741. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313775110>

Hall-Spencer J., Kelly J., & Maggs C.A. (2010). *Assessment of maerl beds in the OSPAR area and the development of a monitoring program*. Department of Environment, Heritage and Local Government, Ireland.

Hammer, Ø. & Harper, D. (2024). *Paleontological Data Analysis*. (2nd ed). Wiley

Hernandez-Kantun J., Gabrielson P., Hughey J., Pezzolesi L., Rindi F., Robinson N., Peña V., Riosmena-Rodriguez R., Gall L. & Adey W. (2016). Reassessment of branched

Lithophyllum spp. (Corallinales, Rhodophyta) in the Caribbean Sea with global implications. *Phycologia*, 55(6), 619-639. <https://doi.org/10.17615/8z39-9x57> **(8)**

Hernandez-Kantun, J., Riosmena-Rodriguez, R., Hall-Spencer, J., Peña, V., Maggs, C., & Rindi, F. (2014). Phylogenetic analysis of rhodolith formation in the Corallinales (Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 50(1), 46–61. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.984347>

Howe, M. 1910. Report on a botanical visit to the Isthmus of Panama. *Journal of the New York Botanical Garden* 11, 30–44. **(9)**

Hunter, M., Acuña V., Bauer D., Bell K., Calhoun A., Felipe-Lucia M., Fitzsimons J., González E., Kinnison M., Lindenmayer D., Lundquist C., Medellín R., Nelson E., & Poschlod P. (2017). Conserving small natural features with large ecological roles: A synthetic overview. *Biological Conservation*, 211(B), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.12.020>

Kamenos N., Burdett H., & Darrenougue N. (2017). *Chapter 2: Coralline Algae as Recorders of Past Climatic and Environmental Conditions*. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1^a ed, pp. 27-53). Editorial Springer.

Katoh, K., & Standley, D. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Lemoine, M. (1929). Les Corallinacees de l' Archipel des Galapagos et du Golfe de Panama. *Archives du Muséum d'Histoire Naturelle*, 6, 47–88. **(10)**

- Littler, M., & Littler D. (2008). Coralline algal rhodoliths form extensive benthic communities in the Gulf of Chiriqui, Pacific Panama. *Coral Reefs*, 27, 553. **(11)**
- Lundquist, C., Thrush, S., Coco, G., & Hewitt, J. (2010). Interactions between disturbance and dispersal reduce persistence thresholds in a benthic community. *Marine Ecology. Progress Series*, 413: 217–228. <http://dx.doi.org/10.3354/meps08578>
- Martin S., & Hall-Spencer J. (2017). *Chapter 3: Effects of Ocean Warming and Acidification on Rhodolith/Maërl Beds*. En R. Riosmena-Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1ª ed, pp. 55-80). Editorial Springer.
- Matrínéz J. (2013). *Extensiones de rango y nuevas especies de algas coralinas (Corallinales, Rodophyta) formadoras de mantos de rodolitos en el Caribe*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Mexico.]: <https://docplayer.es/95581800-Universidad-autonoma-de-baja-california-sur.html> **(12)**
- Ministerio de Ambiente. (2024). Actualización del Plan de Manejo del Parque Nacional Coiba. Panamá, República de Panamá.
- Morse, J., Andersson, A., & Mackenzie, F. (2006). Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric pCO₂ and “ocean acidification”: Role of high Mg-calcites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(23), 5814–5880. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.08.017>
- Murray M., & Thompson W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 10;8(19):4321-5. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

Nash, M., Diaz-Pulido, G., Harvey, A. & Adey, W. (2019). Coralline algal calcification: a morphological and process-based understanding. *PLoS ONE*, 14(9): e0221396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221396>

Nelson, W., Sutherland, J., Farr, T., Hart, D., Neill, K., Kim, H. & Yoon, H. (2015). Multi-gene phylogenetic analyses of New Zealand coralline algae: *Corallinapetra novaezealandiae* gen. et sp. nov. and recognition of the Hapalidiales ord. nov. *Journal of Phycology*, 51(3): 454-468.

Peña, V., Vieira, C., Braga, J., Aguirre, J., Rösler, A., Baele, G., De Clerck, O., & Le Gall, L. (2020). Radiation of the coralline red algae (Corallinophycidae, Rhodophyta) crown group as inferred from a multilocus time-calibrated phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 150(6), 106845 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106845>

Pérez, C., García P., López M., León N., González M., & Martínez I. (2024). Manual de técnicas moleculares básicas aplicadas a las algas marinas. Panamá, Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología.

Poma, H., Davies, C., Cacciabue, D., Gutiérrez M., Basombrío, M., & Rajal, V. (2012). Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR: Efecto de las sustancias inhibidoras. *Revista argentina de microbiología*, 44(3), 144-149.

Potin, P., Floc'h, J., Augris, C. & Cabioch, J. (1990). *Annual growth assessing the calcareous red alga Lithothamnion corallioides (Corallinales, Rhodophyta) in the Bay of Brest, France*. Thirteenth International Seaweed Symposium, 263-267.

- Quinteiro, J., Manent, P., Assunção, P., Medina, C., Sarmiento, R., González-Henríquez, N. & Rey-Méndez, M. (2015). *Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas*.
- Ragazzola, F., Foster, L. C., Form, A., Anderson, P. S. L., Hansteen, T. H., & Fietzke, J. (2012). Ocean acidification weakens the structural integrity of coralline algae. *Global Change Biology* 18(9), 2804–2812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02756.x>
- Ramakrishnan G., Fathima A., & Ramya M. (2017). A rapid and efficient DNA extraction method suitable for marine macroalgae. *3 Biotech*, 7(6):364. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0992-2>
- Rebelo A., Teichert S., Bracchi V., Rasser M., & Basso D. (2022). Crustose coralline red algae frameworks and rhodoliths: Past and present. *Frontiers Earth Science*, 10:1090091. <https://doi.org/10.3389/feart.2022.1090091>
- Richards J., Sauvage T., Schmidt W., Fredericq S., Hughey J. & Gabrielson P. (2017). The coralline genera *Sporolithon* y *Heydrichia* (Sporolithales, Rhodophyta) clarified by sequencing type material of their generitypes and other species. *Journal of Phycology*, 53(5), 1044-1059. <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12562> **(13)**
- Richards J., Schmidt W., Fredericq S., Sauvage T., Peña V., Gall L., Mateo-Cid L., Mendoza-González A., Hughey J., & Gabrielson P. (2021). DNA sequencing of type material and newly collected specimens reveals two heterotypic synonyms for *Harveyolithon munitum* (Metagoniolithoideae, Corallinales, Rhodophyta) and three new species. *Journal of Phycology*, 57(4), 1234-1253. <https://doi.org/10.1111/jpy.13161> **(14)**

Richards J., Vieira-Pinto T., Schmidt W., Sauvage T., Gabrielson P., Oliveira M. & Fredericq S. (2016). Molecular and Morphological Diversity of Lithothamnion spp. (Hapalidiales, Rhodophyta) from Deepwater Rhodolith Beds in the Northwestern Gulf of Mexico. *Phytotaxa*, 278(2), 81-114. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.278.2.1>

Riosmena-Rodríguez, R. (2007). *Guidelines to prepare the information from your specimens to assemble the species description that will be use for thesis/publications*. En: Riosmena Rodríguez (Ed), Cuso: "Conceitos modernos aplicados à taxonomia da Ordem Corallinales (Rhodophyta)", Universidad de Baja California Sur, México.

Riosmena-Rodríguez, R. (2017). Chapter 1: Natural History of Rhodolith/Maërl Beds: Their Role in Near-Shore Biodiversity and Management. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1ª ed, pp. 3-26). Editorial Springer.

Riosmena-Rodríguez, R., Nelson, W. & Aguirre, J. (2017). *Rhodolith/maërl beds: a global perspective*, Springer, Primera edición <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29315-8>

Robinson N., Fernández-García C., Riosmena-Rodríguez R., Rosas-Alquicira E., Konar B., Chenelot H., Jewett S., Melzer R., Meyer R., Försterra G., Häussermann V., & Macaya E. (2017). *Chapter 13: Eastern Pacific*. En R. Riosmena Rodríguez, W. Nelson & J. Aguirre (Eds.), *Rhodolith/maërl beds: a global perspective* (1ª ed, pp. 319-333). Editorial Springer.

Robinson, N. (2013). *Sistemática de las especies de algas coralinas (Corallinophycidae, Rodophyta) formadoras de mantos de rodolitos en el Pacífico Tropical Oriental*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México]. Repositorio institucional de la Universidad de Baja California Sur. **(15)**

- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34(12): 3299-3302. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Saunders, G. & Moore, T. (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. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.1.031>
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. NIH (2012). Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sherwood, A. & Presting, G. (2007). Universal primers amplify a 23s rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 43(3), 605-608. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00341.x>
- Sneed E., & Folk R. (1958) Pebbles in the lower Colorado River, Texas: a study in particle morphogenesis. *Journal of Geology*, 66(2), 114–150.
- Taylor, W. (1929). Notes on algae from the tropical Atlantic Ocean. *Revista americana de botánica*, 16, 621-630. **(16)**
- Taylor, W. (1942). Caribbean Marine Algae of the Allan Hancock Expedition, 1939. *Reports of the Allan Hancock Atlantic Expedition*, 2, 1-193. **(17)**
- Taylor, W. (1945). Pacific marine algae of the Allan Hancock expeditions to the Galapagos Islands. *Allan Hancock Pacific Expeditions*. 12(1), 1–528. **(18)**

Taylor, W. (1960). Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas. The University of Michigan Press, Ann Arbor. **(19)**

Tuya F., Schubert N., Aguirre J., Basso D., Bastos E., Berchez F., Bernardino A., Bosch N., Burdett H., Espino F., Fernández-García C., Francini-Filho R., Gagnon P., Hall-Spencer J., Haroun R., Hofmann L., Horta P., Kamenos N., Le Gall L., Magris R., Martin S., Nelson W., Neves P., Olivé I., Otero-Ferrer F., Peña V., Pereira-Filho G., Ragazzola F., Rebelo A., Ribeiro C., Rinde E., Schoenrock K., Silva J., Sissini M., & Tâmega F. (2023). Levelling-up rhodolith-bed science to address global-scale conservation challenges. *Science of the Total Environment*, 892,164818. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164818.

Vieira-Pinto, T., Oliveira, M., Bouzon, J., Sissini, M., Richards, J., Riosmena-Rodriguez, R. & Horta, P. (2014). *Lithophyllum* species from Brazilian coast: Range extension of *Lithophyllum margaritae* and description of *Lithophyllum atlanticum* sp. nov. (Corallinales, Corallinophycidae, Rhodophyta). *Phytotaxa*. 190(1), <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.190.1.21>

Woelkerling W., Irvine L. & Harvey A. (1993) Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany*, 6(4):277–293. <http://dx.doi.org/10.1071/SB9930277>

Xiang, Chuan-Yu, Fangluan Gao, Ivan Jakovlić, Hong-Peng Lei, Ye Hu, Hong Zhang, Hong Zou, Gui-Tang Wang, & Dong Zhang. (2023). Using PhyloSuite for molecular phylogeny and tree-based analyses. *iMeta*, 2, e87. <https://doi.org/10.1002/imt2.87>

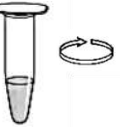
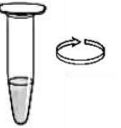
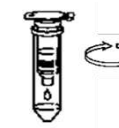
Yoon H., Hackett J., & Bhattacharya, D. (2002). A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(18), 11724-11719.
<https://doi.org/10.1073/pnas.172234799>

Zhang, D., Gao F., Jakovlić I., Zou H., Zhang J., Li W. & Wang G.T.(2020). PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 348–355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13096>

ANEXOS

Anexo 1. Protocolos de extracción de ADN modificados para los kits Bioneer, Thermo Fisher y Qiagen.

MÉTODO	BIONEER	THERMO FISHER	QIAGEN
1 Homogeniza do de la muestra	 25-50 mg	 100 mg + arena	 100 mg
2 Lisis celular	 200 µL TL Buffer + 20 µL Proteína K+ 10 µL RNasa A 60°C, 1 hora	 350 µL Lisis Buffer A + vortex, 50 µL Lisis Buffer B 20 µL RNasa A 65°C, 10 min	 400 µL AP1+ 4 µL RNasa A+ 65°C, 10 min
3 Precipitació n/ vinculación de ADN	 200 µL GB Buffer 60°C, 10 min, 400 µL etanol absoluto	 130 µL Solución de precipitación Hielo, 5 min	 130 µL Buffer P3 Hielo, 5 min
4 Filtración del lisado	 ≥ 8 000 rpm, 1 min	 ≥ 14 000 rpm, 5 min	 ≥ 14 000 rpm, 2 min
5 Ajustar condiciones para la adhesión de DNA	----	400 µL solución de adhesión gDNA para plantas + 400 µL etanol al 96%	----
5 Ahdesión de DNA	 ≥ 7 700 rpm, 1 min	 600-700 µL de la mezcla ≥ 8 000 rpm, 1 min	 ≥ 14 000 rpm, 20 min
6 Lavado y secado de la membrana de silica	 1° 500 µL WA1 ≥ 8 000 rpm, 1 min 2° 500 µL WB2 ≥ 8 000 rpm, 1 min 3° ≥ 13 000 rpm, 1 min	 1° 500 µL WBI ≥ 8 000 rpm, 1 min 2° 500 µL WBII ≥ 14 000 rpm, 3 min 3° ≥ 14 000 rpm, 1 min	 1° 1.5 vol AW1 650 µL mix ≥ 8 000 rpm, 1 min 2° 500 µL AW2 ≥ 8 000 rpm, 1 min 3° 500 µL AW2 ≥ 14 000 rpm, 2 min
7 Elución de DNA	 50-200 µL EA 15-25°C, 1 min ≥ 8000 rpm, 1 min	 50 µL EB °T del lugar, 5 min ≥ 8 000 rpm, 1 min	 100 µL AE 15-25°C, 5 min ≥ 8 000 rpm, 1 min
		Repetir el paso	Repetir el paso

Anexo 2. Protocolos de extracción de ADN modificados para el kit nucleospin plant II de Macherey-Nagel.

MÉTODO	MANA I		MANA II		MANA II	
1 Homogenizado de la muestra		100 mg		100 mg + arena		100 mg
2 Lisis celular		400 µL PL1+ 10 µL RNasa A 65°C, 10 min		450 µL PL1+ 15 µL RNasa A 65°C, 30 min		450 µL PL1+ 15 µL RNasa A+ 25 µL Proteína K 65°C, 1 hora
3 Filtración del lisado	  ≥ 7 700 rpm, 2 min					
4 Ajustar condiciones para la adhesión de DNA	450 µL PC (CTAB)					
5 Ahdesión de DNA	  ≥ 7 700 rpm, 1 min					
6 Lavado y secado de la membrana de silica	 1° 400 µL PW1 ≥ 7 700 rpm, 1 min					
	 2° 700 µL PW2 ≥ 7 700 rpm, 1 min					
	 3° 200 µL PW2 ≥ 7 700 rpm, 2 min					
7 Elución de DNA	 50 µL PE 65°C, 5 min  ≥ 7 700 rpm, 1 min					
Repetir el paso						

Anexo 2. Continuación. Protocolos de extracción de ADN modificados para el kit nucleospin plant II de Macherey-Nagel.

MÉTODO	MANA IV	MANA V	MANA VI
1 Homogenizado de la muestra	 100 mg	 100 mg	 100 mg + arena
2 Lisis celular	 450 µL PL1(CTAB) 15 µL RNasa A 25 µL Proteína K 65°C, 3 horas	 450 µL PL2 (SDS) 10 µL RNasa A 65°C, 10 min 75 µL PL3 Hielo, 5 min	 450 µL PL2 (SDS) 10 µL RNasa A 65°C, 10 min 75 µL PL3 Hielo, 5 min
3 Filtración del lisado	  ≥ 7 700 rpm, 2 min		
4 Ajustar condiciones para la adhesión de DNA	450 µL PC (CTAB)		
5 Ahdesión de DNA	  ≥ 7 700 rpm, 1 min		
6 Lavado y secado de la membrana de silica	 1° 400 µL PW1 ≥ 7 700 rpm, 1 min 2° 700 µL PW2 ≥ 7 700 rpm, 1 min 3° 200 µL PW2 ≥ 7 700 rpm, 2 min		
7 Elución de DNA	  50 µL PE 65°C, 5 min ≥ 7 700 rpm, 1 min		
Repetir el paso			

Anexo 3. Valores de concentración de ADN y absorbancia para las extracciones realizadas en este estudio.

#	ID	MÉTODO/KIT	ng/ml	A260	A280	260/280	260/230
1	NL-1	BIO	16.7	0.333	0.177	1.89	--
2	NL-7	BIO	25.5	0.510	0.298	1.71	--
3	NL-13	BIO	9.6	0.192	0.107	1.79	--
4	NL-15-2	BIO	4.9	0.097	0.051	1.92	--
5	NL-23	BIO	3.3	0.066	0.042	1.57	--
6	NL-25	BIO	3.1	0.062	0.032	1.94	--
7	NL-1	CTAB	2.4	0.048	0.028	1.74	-0.49
8	NL-2	CTAB	2.5	0.05	0.046	1.09	-0.34
9	NL-3	CTAB	-7.3	-0.147	-0.073	2.02	0.38
10	NL-4	CTAB	-7	-0.140	-0.065	2.15	0.37
11	NL-5	CTAB	-6.9	-0.137	-0.068	2.02	0.38
12	NL-6	CTAB	-6.2	-0.123	-0.059	2.09	0.36
13	NL-7	CTAB	-7.3	-0.147	-0.068	2.16	0.37
14	NL-8	CTAB	-4.7	-0.094	-0.036	2.62	0.32
15	NL-9	CTAB	-5.6	-0.112	-0.053	2.13	0.32
16	NL-10	CTAB	-0.1	-0.003	0.018	-0.16	0.02
17	NL-11	CTAB	-4.2	-0.084	-0.028	2.96	0.38
18	NL-1	CTAB	195.4	3.908	1.664	2.35	0.8
19	NL-2	CTAB	375	7.501	3.580	2.10	0.93
20	NL-3	CTAB	105.2	2.103	0.909	2.31	--
21	NL-4	CTAB	353.5	7.071	3.764	1.88	--
22	NL-5	CTAB	255.5	5.109	2.183	2.34	--
23	NL-6	CTAB	251.4	5.029	1.835	2.74	--
24	NL-7	CTAB	97.8	1.955	0.851	2.30	--
25	NL-8	CTAB	33.5	0.669	0.323	2.07	--
26	NL-12	CTAB	173.3	3.467	1.448	2.39	--
27	NL-13	CTAB	103.8	2.076	0.567	3.66	--

Anexo 3. Continuación. Valores de concentración de ADN y absorbancia para las extracciones realizadas en este estudio.

28	NL-14	CTAB	39.8	0.795	0.362	2.20	--
29	NL-15-2	CTAB	38.9	0.778	0.349	2.23	--
30	NL-23	CTAB	156.5	3.130	1.459	2.15	--
31	NL-25	CTAB	96.3	1.925	0.778	2.47	--
32	NL-30	CTAB	91.2	1.823	0.614	2.97	--
33	NL-16-1	MANA I	-3.1	-0.062	0.66	0.95	0.42
34	NL-25	MANA I	230	4.6	2.64	1.74	0.71
35	NL-34	MANA I	12.5	0.25	--	1.79	--
36	NL-36	MANA I	-0.6	--	--	--	--
37	NL-46	MANA I	2.4	0.047	--	1.98	--
38	NL-53	MANA I	1.7	0.034	--	1.84	--
39	NL-120-1	MANA I	10.7	0.213	0.15	1.42	0.82
40	NL-46	MANA II	5	0.099	--	1.31	--
41	NL-53	MANA II	2.9	0.059	--	1.65	--
42	NL-48	MANA III	3.3	-0.065	0.053	1.24	1.29
43	NL-73-1	MANA III	3.9	0.079	0.04	1.97	-2.58
44	NL-99	MANA III	3.9	0.078	0.056	1.38	0.7
45	NL-89-1	MANA III	4.1	0.082	0.046	1.77	1.64
46	NL-120-1	MANA III	10.7	0.213	0.15	1.42	0.82
47	NL-48 prk	MANA IV	1.8	0.036	0.016	2.26	-1.02
48	NL-73-1 prk	MANA IV	10.4	0.208	0.119	1.75	2.81
49	NL-99 prk	MANA IV	4.4	0.088	0.058	1.51	1.56
50	NL-89-1 prk	MANA IV	3.3	0.066	0.038	1.73	2.79
51	NL-120-1 prk	MANA IV	8.1	0.163	0.105	1.55	1.12
52	NL-17-2	MANA IV	10	0.2	0.156	1.29	0.59
53	NL-18	MANA IV	17.8	0.356	0.246	1.45	0.61
54	NL-24	MANA IV	22.8	0.456	0.315	1.45	0.63
55	NL-30-1	MANA IV	41.2	0.824	0.578	1.43	0.71

Anexo 3. Continuación. Valores de concentración de ADN y absorbancia para las extracciones realizadas en este estudio.

56	NL-40	MANA IV	36.2	0.724	0.495	1.46	0.72
57	NL-45	MANA IV	27.4	0.548	0.372	1.48	0.79
58	NL-50	MANA IV	17	0.341	0.235	1.35	0.69
59	NL-62-1	MANA IV	13.6	0.271	0.194	1.4	0.62
60	NL-77	MANA IV	13.1	0.262	0.179	1.46	0.63
61	NL-79	MANA IV	1.5	0.03	0.024	1.25	1.99
62	NL-81-2	MANA IV	49	0.981	0.56	1.75	1.52
63	NL-87	MANA IV	9.8	0.197	0.142	1.39	0.68
64	NL-88-1	MANA IV	8.9	0.177	0.13	1.36	0.62
65	NL-95	MANA IV	11.3	0.225	0.128	1.76	0.88
66	NL-97	MANA IV	11.9	0.237	0.128	1.85	0.94
67	NL-102	MANA IV	12.4	0.248	0.146	1.69	0.79
68	NL-114	MANA IV	18.1	0.361	0.249	1.45	0.73
69	NL-118	MANA IV	21.9	0.437	0.314	1.39	0.66
70	NL-123	MANA IV	10.9	0.219	0.108	2.03	1.36
71	NL-48	MANA PL1	3.3	-0.065	0.053	1.24	1.29
72	NL-73-1	MANA PL1	3.9	0.079	0.04	1.97	-2.58
73	NL-99	MANA PL1	3.9	0.078	0.056	1.38	0.7
74	NL-89-1	MANA PL1	4.1	0.082	0.046	1.77	1.64
75	NL-46	MANA V	30.6	0.613	--	1.4	--
76	NL-16-1	MANA V	1.1	0.023	0.01	2.31	-1.16
77	NL-25	MANA V	12.6	0.252	0.196	1.28	0.62
78	NL-34	MANA V	3.1	0.061	--	1.36	--
79	NL-36	MANA V	22.3	0.447	--	1.24	--
80	NL-53	MANA V	0.8	0.017	--	1.63	--
81	NL-46	MANA VI	2	0.039	--	1.45	--
82	NL-16-1	QIA	0.8	0.016	-0.007	-2.29	0.24
83	NL-25	QIA	0.7	0.015	-0.003	-5.04	2.12
84	NL-15-2	TFI	30.1	0.603	--	1.75	--
85	NL-25	TFI	24.6	0.492	--	1.58	--
86	NL-30-1	TFI	105.8	2.11	--	1.69	--
87	NL-48	TFI	9.7	0.194	--	1.55	--
88	NL-55	TFI	22.8	0.455	--	1.62	--
89	NL-16-1	TFI	39	0.78	--	1.58	--

Anexo 4. Valores de distancia genética para especies de *Lithopyllum* y *Lithothamnion* según marcador molecular analizado.

UPA								
<i>Lithopyllum</i> - PNC								
	NL15	NL15-2	NL102	NL23	NL25	NL40	NL46	NL79
NL15								
NL15-2	0.0213							
NL102	0.0294	0.0294						
NL23	0.0400	0.0347	0.0374					
NL25	0.0293	0.0187	0.0160	0.0213				
NL40	0.0400	0.0400	0.0107	0.0373	0.0267			
NL46	0.0907	0.0880	0.0802	0.0907	0.0800	0.0773		
NL79	0.1048	0.1048	0.1105	0.1102	0.1183	0.1156	0.0726	
<i>Lithopyllum</i> PNC-PN Cocos								
	UCR_2072	UCR_2109	UCR_2108	UCR_2106	UCR_2102	UCR_2110	NL40	NL251
UCR_2072								
UCR_2109	0.0000							
UCR_2108	0.0038	0.0038						
UCR_2106	0.0110	0.0110	0.0153					
UCR_2102	0.0018	0.0019	0.0057	0.0132				
UCR_2110	0.0556	0.0557	0.0546	0.0671	0.0566			0.0238
NL40	0.5820	0.5810	0.5842	0.5842	0.5881	0.5839		0.5839
NL251	0.6637	0.6630	0.6681	0.6681	0.6607	0.6696	0.5936	0.6655
PSBA								
<i>Lithothamnion</i> -PNC								
	NL7	NL120-1	NL45	NL50	NL62-1	NL81-2		
NL7								
NL120-1	0.0858							
NL45	0.0569	0.0623						
NL50	0.0428	0.0509	0.0163					
NL81-2	0.0536	0.0457	0.0272	0.0107	0.0643			
NL62-1	0.0909	0.1126	0.0759	0.0695				
<i>Lithothamnion</i> -PNC-PNCocos								
	NL731	UCR_2067	UCR_2094	UCR_2078	UCR_2090	UCR_1513		
NL731								
UCR_2067	0.08969							
UCR_2094	0.07786	0.00485						
UCR_2078	0.10748	0.01402	0.01754					
UCR_2090	0.09859	0.00469	0.01023	0.00955				
UCR_1513	0.14055	0.11264	0.10617	0.12559	0.11639			