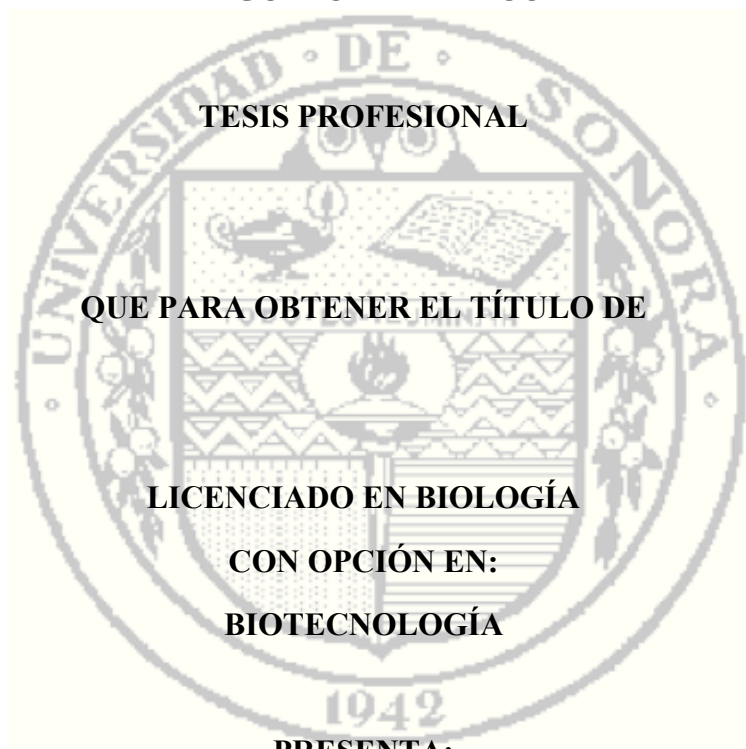


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Corollospora maritima* Werderm. EN DIFERENTES  
PLAYAS DEL OCÉANO PACÍFICO, MAR CARIBE, EL GOLFO DE CALIFORNIA Y  
EL GOLFO DE MÉXICO**



**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**CON OPCIÓN EN:**

**BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**QUINTERO CORRALES CHRISTIAN ARMANDO**

**Hermosillo, Sonora**

**09 septiembre del 2014**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO ACEPTACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis titulada “DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Collorospora maritima* EN DIFERENTES PLAYAS DEL OCEANO PACÍFICO, MAR CARIBE, EL GOLFO DE CALIFORNIA Y EL GOLFO DE MÉXICO” de Christian Armando Quintero Corrales la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.

M. en C. Patricia Vélez Aguilar

Directora

Dr. Francisco Molina Frenar

Sinodal

M. en C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña

Sinodal

Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor

Sinodal

## DEDICATORIA

“..Siempre estará al acertijo que no encajará en ninguna hipótesis. Claro está, esto puede ser en parte porque no tenemos toda la información necesaria. Pero sería un mundo muy triste cuando sepamos todo, y entonces no habrá nada que nos sorprendería ni nada difícil de comprender”.

J.W. Hedpeth (1979)

Para mis Padres

- Nada de esto hubiera ocurrido si no fuera por su ayuda y guía, los amo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, mi alma máter, y al Departamento de Investigación Científica y Tecnológica (DICTUS) en donde me formé como estudiante y como persona.

Al M. en C. **Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña**, al Dr. **Martin Esqueda** y al M. en C. **Eduardo Hernández Navarro** quienes fueron mis ejemplos a seguir, y quienes me mostraron el maravilloso mundo de los hongos al cual estoy profundamente apegado.

Al Instituto de Geología Estación Regional del Noroeste (ERNO), principalmente al Laboratorio de Ecología Molecular y Funcional a cargo del Dr. **Francisco Molina Freaner** y de **Jechu (Q.B. José Martínez Rodríguez)** quienes me orientaron y enseñaron a lo largo de mi carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)) en donde descubrí mi vocación por la genética de poblaciones (gracias a los extraordinarios profesores **Jaime Gasca** y **Enrique Scheinvar**), y donde conocí a mi directora de tesis, **Patricia Vélez Aguilar**.

Al Instituto de Biología, en especial al laboratorio 121 a cargo de la Dra. **María del Carmen Auxilio González Villaseñor**, quien me aceptó y confió desde el principio, y quien me presentó a los ascomicetos marinos.

A **Viridiana Pineda Reyes**, mi pareja, quien siempre me apoyó en todo.

A cada uno de mis compañeros y amigos, quienes siempre estuvieron a mi lado.

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
II.1. Historia de la Micología Marina	4
II.2. Hongos Marinos	6
II.2.1. Diversidad de hongos marinos	7
II.2.2. Biogeografía de los Hongos Marinos	10
II.2.3. Taxonomía de los Hongos Marinos	12
II.3. Genética de Poblaciones	14
II.3.1. Genética de poblaciones en el reino de los hongos	15
II.3.1.1. Genética de poblaciones de los hongos marinos	16
II.4. Marcadores Moleculares	17
II.4.1. ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat)	18
II.5. Género <i>Corollospora</i> (Werdermann, 1922)	20
II.5.1. <i>Corollospora maritima</i> (Werderm. 1922)	23
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA</b>	26
<b>V. OBJETIVOS</b>	27
V.1. Objetivos Generales	27
V.2. Objetivos Específicos	27
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	28
VI.1. Área de Estudio	28

VI.2. Muestreo	36
VI.3. Aislamiento y Cultivo Monospórico de Muestras	37
VI.4. Extracción de ADN	37
VI.5. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)	38
VI.6. Amplificación	39
VI.7. Análisis Estadístico de los datos	40
<b>VII. RESULTADOS</b>	41
VII.1. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)	41
VII.1.1. Estandarización de ISSRs	41
VII.2. Análisis Estadístico de los Datos	44
VII.2.1. Variación genética	44
VII.2.2. Estructura genética.	48
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	53
VIII.1. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)	53
VIII.1.1. Estandarización de ISSRs	54
VIII.2. Variación genética	54
VIII.3. Estructura Genética	56
VIII.4. Comparación con Resultados de Otros Autores	59
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	61
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	62
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla I	Número estimado de hongos marinos	8
Tabla II	Localidades de muestreo	36
Tabla III	Marcadores moleculares utilizados en el estudio	38
Tabla IV	Número de individuos utilizados para cada marcador	39
Tabla V	Marcadores de ISSRs probados en el presente trabajo	41
Tabla VI	Estandarización del marcador <i>UBC-842</i>	42
Tabla VII	Estandarización del marcador <i>UBC-857</i>	42
Tabla VIII	Estandarización del marcador <i>UBC-809</i>	43
Tabla IX	Programa de PCR utilizado para los marcadores <i>UBC-842</i> <i>UBC-857</i> y <i>UBC-809</i>	43
Tabla X	Diversidad genética obtenida con el marcador <i>UBC-842</i>	44
Tabla XI	Diversidad genética obtenida con el marcador <i>UBC-857</i>	45
Tabla XII	Diversidad genética obtenida con el marcador <i>UBC-809</i>	46
Tabla XIII	Diversidad genética global	47
Tabla XIV	Diversidad genética obtenida en los litorales de estudio	47
Tabla XV	Comparación de la diversidad genética obtenida con los tres marcadores utilizados	48
Tabla XVI	Valores del coeficiente de coancestría $\Theta$ de Weir y Cockerham (1984) y de $F_{ST}$ , para cada marcador de ISSR utilizado en el presente trabajo	49
Tabla XVII	Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR <i>UBC-842</i> , datos originados por AMOVA	50
Tabla XVIII	Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR <i>UBC-857</i> , datos originados por AMOVA	50
Tabla XIX	Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR <i>UBC-809</i> , datos originados por AMOVA	51
Tabla XX	Cuadro comparativo de resultados de diversos autores	60



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de especies de hongos marinos descritas a través de los años	9
Figura 2	Regionalización geográfica para los hongos marinos	11
Figura 3	Representación esquemática del marcador molecular ISSRs	19
Figura 4	Fotografía de <i>C. maritima</i>	20
Figura 5	Ascoma de <i>C. maritima</i>	21
Figura 6	Ascospora de <i>C. maritima</i>	22
Figura 7	Zonas de muestreo en México	34
Figura 8	Zonas de muestreo	35
Figura 9	Porcentaje de asignación de cada individuo analizado los diferentes grupos genéticos, según el software STRUCTURE	52

## RESUMEN

La micología marina es un área de la micología relativamente nueva, por lo que los estudios realizados con hongos marinos son escasos, principalmente de interés taxonómico o biogeográficos. Los estudios de ecología molecular permiten cuantificar la diversidad genética de las poblaciones, y hacer inferencias sobre el estado de éstas. *Corollospora maritima* es un ascomicete marino que habita entre los granos de arena de las playas costeras cuya función ecológica es descomponer la gran biomasa de lignocelulosa. Es una especie con un rango de distribución cosmopolita cuya diversidad genética se desconoce, En este estudio se examinó la diversidad genética de *C. maritima* en algunas playas del Océano Pacífico, mar Caribe, Golfo de California y Golfo de México, utilizando tres marcadores moleculares ISSRs. Dada la falta de información y trabajos previos, parte del presente trabajo se enfocó en la estandarización de los marcadores utilizados. Los valores de diversidad genética se obtuvieron con el programa TFPGA, el AMOVA con el programa ARLEQUIN V.3.5.12. y la estructuración genética con el programa STRUCTURE V.2.3.4. A nivel playa, las poblaciones de La Paz y Cancún obtuvieron los valores de diversidad más altos (41.269%P; 0.124 y 0.120  $H_E$ , respectivamente). A nivel litoral, el mar Caribe obtuvo los valores más altos de diversidad (38.88%P .y 0.116  $H_E$ ). El análisis de AMOVA demostró que el mayor porcentaje de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones para cada marcador. Se detectaron 3 grupos genéticos entre las poblaciones analizadas. Pese a las barreras geográficas representadas por continentes entre las poblaciones, no se detectó una estructuración genética marcada, los grupos genéticos formados demostraron la existencia de posible flujo genético entre éstas

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, han existido varias definiciones de hongo marino en la literatura. Mientras algunos autores los definen basándose en su habilidad para crecer en concentraciones salinas determinadas (Johnson y Sparrow, 1961; Tubaki, 1969), otros los definían basados en su fisiología (Meyers, 1968 b; Jones y Jennings, 1964). Actualmente, en un sentido más estricto y formal, con base a sus adaptaciones al medio ambiente marino en donde habitan y sus características ecológicas, se pueden definir como: a) estricto: aquellos capaces de crecer y esporular exclusivamente en un hábitat marino o estuarino; y b) facultativo: aquellos organismos de agua dulce o de ambientes terrestres capaces de crecer (y posiblemente también esporular) en medios ambientes marinos (Kohlmeier 1974a).

Los hongos marinos los podemos encontrar en todas las zonas oceánicas. Desde las zonas pelágicas, flotando junto a comunidades planctónicas; hasta las zonas abisales, alcanzado profundidades de 5000 m. En las playas costeras existen comunidades microscópicas poco estudiadas, que abarcan desde bacterias, algas filamentosas, y flora y fauna intersticial. Entre todos estos organismos que se adaptaron a la vida entre y sobre los granos de arena se puede encontrar un grupo de hongos, denominado hongos arenícolas. Los hongos arenícolas *sensu stricto* se pueden definir como un grupo ecológico microscópico que habita entre o sobre los granos de arena, más esto no quiere decir que obtengan sus nutrientes de estos (Kohlmeier y Kohlmeier, 1979). En su mayoría, los hongos arenícolas pertenecen al filum Ascomycota, familia *Halosphaeriaceae* con 78 géneros, de estos solo tres géneros corresponden a los hongos arenícolas. *Corollospora* es considerado como el género más diverso dentro de la familia *Halosphaeriaceae*, y actualmente incluye 23 especies. Destacando la especie *Corollospora maritima* Werdermann (1922) por su alto potencial como organismo biorremediador, bioprospector y bioindicador.

La función ecológica de los hongos marinos no se encuentra muy lejos de la que realizan en tierra firme. Su importancia radica en su habilidad para degradar la lignocelulosa de la madera, la cual otros organismos no pueden. Esto es de vital importancia cuando consideramos la vasta biomasa representada por lignocelulosa en restos derivados de manglares y otros

materiales vegetales que llegan a las costas (restos de madera, algas, entre otros). Además son organismos descomponedores de animales muertos y partes de estos (estructuras ósea, calcáreas y cartilaginosas). Por otra parte, algunos hongos marinos son patógenos para animales, y pueden afectar negativamente la acuicultura (camarón, bivalvos y gran variedad de peces) (Alderman y Polglase, 1986). Asimismo, los hongos marinos pueden establecer relaciones simbióticas mutualistas (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979; Khan y Belik, 1995).

La mayoría de los trabajos actuales respecto a hongos marinos se refiere a estudios taxonómicos, fisiológicos y sobre su distribución geográfica, en contraste, estudios con un enfoque molecular, como la genética de poblaciones, se encuentran limitados. La genética de poblaciones es una rama de la genética que estudia las poblaciones de las distintas especies, como éstas interactúan entre sí y con el medio ambiente que les rodea. Enfocándose a la investigación de las fuerzas responsables al cambio a nivel microevolutivo: mutación, selección natural, flujo génico y deriva génica, y cómo cada uno de estas fuerzas evolutivas se relacionan entre sí. La genética de poblaciones es una parte central de la teoría evolutiva moderna, y sus aportaciones a la biología de la conservación han ido creciendo conforme su teoría y práctica han ido integrándose a la disciplina que ahora se conoce como “Genética de la Conservación” (Eguiarte y Piñero, 1990).

La diversidad genética es una característica esencial que les permite a las especies responder y adaptarse al medio ambiente en donde se encuentran, pudiendo responder de manera óptima ante cambios en su hábitat natural. Por lo tanto, tomando en cuenta la importancia de la diversidad genética en las poblaciones, la pérdida de esta resultaría en la disminución de dichas capacidades para responder adecuadamente a los cambios del ambiente (fitness o adecuación). Por lo tanto, la pérdida de la diversidad genética puede causar una disminución en la adecuación de las poblaciones, dejándolos vulnerables ante enfermedades y a cambios ambientales radicales. Las poblaciones que presentan estructura poblacional (poco o nulo flujo génico) y de tamaño pequeño (alta deriva genética, posible endogamia y con tamaños efectivos pequeños), son las que principalmente pueden verse afectadas por disminución de la diversidad genética.

El inicio de estudios de genética en organismos pertenecientes al reino de los hongos (*Fungi*) es reciente, a mediados del siglo XX. La mayoría de los estudios se han realizado principalmente en aquellos hongos que tienen algún tipo de interés para el hombre (médico, industrial o alimenticio) menospreciando otros grupos de hongos de interés ecológico. Los

ascomicetes de hábitats terrestres, en comparación con los de hábitats marinos son los que han sido más estudiados, incluso en el área de la genética. Por lo que la información y conocimiento respecto a los hongos marinos es escasa.

Varios estudios han podido confirmar la gran utilidad que poseen algunos hongos marinos. Aún conociendo su utilidad para el desarrollo de plantas y animales (ya que en la naturaleza, ocurren interrelaciones casi constantes con todos los seres vivos), e incluso para el hombre (producción de metabolitos secundarios de interés industrial, comercial, textil y farmacéutico), la micología marina ha sido muy poco estudiada.

*Corollospora maritima*, es un hongo marino arenícola que habita en las playas, con un potencial significativo para las áreas de la biorremediación y la bioprospección. Desgraciadamente, las costas arenosas están expuestas a impactos antropogénicos día a día. En gran medida, estos impactos están influenciados por la ignorancia de la existencia de comunidades marinas de interés ecológico, y el poco interés que se tiene para la protección de estas áreas. El turismo es una de las principales causas de la destrucción de ecosistemas marinos. Los desechos tóxicos producidos y liberados por la industria y las granjas acuícolas en las costas, afectan negativamente las diversas poblaciones de organismos costeros, incluyendo a las poblaciones de hongos marinos. El presente trabajo estudia a *Corollospora maritima* desde una perspectiva de genética de poblaciones.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Historia de la Micología Marina

La existencia de los verdaderos hongos marinos saprobios fue cuestionada por Bauch (1936), quien escribió “los ascomicetes saprobios quienes juegan un papel muy importante en bosques y suelos como degradadores de materia orgánica, especialmente madera, parecen estar completamente ausentes en ambientes marinos”. Posteriores investigaciones realizadas por Barghoorn y Linder (1944), y más tarde por otros autores demostraron indiscutiblemente la existencia de estos hongos en los ambientes marinos. “*Marine Fungi: Their Taxonomy and Biology*” por Barghoorn y Linder (1944) fue la publicación que impulsó la micología marina como rama nueva de la micología. Estos autores observaron que existe una alta diversidad de micota marina, sin embargo, se encuentra poco estudiada, aún hoy en día. En el mismo escrito, Barghoorn y Linder (1944), demostraron el crecimiento y la reproducción de hongos en madera sumergida después de periodos de tiempo definidos.

Dicha publicación representó un estímulo a nivel mundial para el estudio de la micología marina. Como resultado hubo un aumento en la descripción de especies (la mayor parte de los hongos marinos descritos actualmente se dio por la publicación de Barghoorn y Linder) y una proliferación en la literatura sobre el tema. Por ejemplo: los trabajos realizados por I.M. Wilson en Gran Bretaña (1951), W. Höhnk en Alemania (1952), S.P. Meyers en Estados Unidos (1953), A.B. Cribb y J.W. Hernert en Australia (1954), T.W. Johnson en Estados Unidos (1956), G. Feldmann en Francia (1957), J. Kohlmeyer en Alemania (1958), G. Duguet en Francia (1962), E.B.G. Jones en Gran Bretaña (1962) y M. C. González en México (1993) Otra publicación de gran impacto fue la primer monografía de micología marina publicada por Johnson y Sparrow (1961). El descubrimiento y descripción de nuevas especies de hongos marinos fue aumentando poco a poco. Sin embargo, la mayoría de los autores no eran micólogos marinos *sensu stricto*, ya que trabajaban con una amplia diversidad de hongos, sin algún interés en particular por los

hábitats marinos. Por lo que la micología marina no presentó avances significativos como rama nueva.

Hughes (1975) en una extensa revisión, recopiló trabajos del tema publicados desde 1961. Sin embargo, no existen descripciones taxonómicas extensas ni claves taxonómicas completas para los hongos marinos. Las publicaciones “*Icones Fungorum Maris*” y “*Synoptic Plates of Higher Marine Fungi*” (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1964-1969, 1971b) enfatizan el área, ya que incluyen diagnósticos de hasta 90 especies, y claves de identificación de todos los taxa descritos hasta 1971, respectivamente.

Los primeros micólogos marinos *sensu stricto* fueron los hermanos Crouan (1867), quienes dieron los primeros pasos (al igual que Desmazieres) hacia la micología marina como rama nueva. Ellos describieron cinco nuevas especies de hongos marinos en su “*Florule de Finistère*”, y junto con Sutherland realizaron aportaciones importantes (1915c, 1916 a,b). Desmazières (1849) describió el primer hongo marino facultativo, *Phaeosphaeria typharum*. Posteriormente, Durieu y Montagne (1869) describieron el primer hongo marino estricto en los rizomas de un pasto marino, *Posidonia oceánica*.

En la actualidad, gracias a los avances tecnológicos, la micología marina ha podido avanzar en diferentes áreas de su estudio, principalmente en la taxonomía e incluso en genética. Sin embargo, desgraciadamente muy pocos estudios han usado un enfoque de genética de poblaciones. De los pocos trabajos sobre genética de poblaciones existentes en ascomicetes se centran en especies patógenas o de interés económico (Vélez, 2012). Según Jones (2011), en las últimas décadas son cinco los tópicos en los cuales la micología marina ha avanzado considerablemente: 1. Biodiversidad, 2. Estudios taxonómicos basados en análisis moleculares, 3. Ultraestructuras de los hongos marinos, con particular referencia en las estructuras de los apéndices de esporas y su capacidad de adhesión, 4. Detección de componentes bioactivos, y 5. Su habilidad de degradación de la lignocelulosa.

## II.2. Hongos Marinos

Todos los organismos pertenecientes al reino *Fungi* son eslabones importantes en la naturaleza como saprobios degradadores de materia orgánica muerta, simbioses con plantas, bacterias y animales, e incluso parásitas, así como biorremediadores, limpiadores y recuperadores de áreas contaminadas (micorecuperación). Particularmente, en ecosistemas costeros la actividad fúngica es de esencial importancia, ya que participan en vías de biodegradación de compuestos tóxicos y de materia orgánica muerta en dichos ecosistemas.

Incluso conociendo que los hongos marinos son una parte significativa de la biodiversidad marina, y tienen la capacidad para degradar un amplio rango de biomoléculas recalcitrantes, no son considerados de interés por la comunidad científica.

Los macromicetes terrestres crecen en un sinnúmero de superficies que están en el suelo de bosques, necesitando un micelio extenso para absorción de nutrientes, y un hábitat sin perturbación para su óptimo desarrollo. De la misma manera, un amplio número de especies marinas se desarrollan en su mayoría en hábitats protegidos, anclados firmemente en madera/granos de arena, o resguardados en grietas, en corteza o sustrato calcáreo. Los hongos marinos costeros actualmente descritos son organismos microscópicos con estructuras reproductivas diminutas.

Uno de los motivos del desarrollo de cuerpos diminutos en estos ambientes costeros es por la abrasión, que producen las olas y los granos de arena, que no permite el crecimiento de cuerpos grandes. Por otra parte, los hábitats de algunos hongos marinos como *Amylocarpus encephaloides* que posee un ascocarpo de aproximadamente 3 mm de diámetro (siendo la especie con dicha estructura más grande actualmente descrito) y *Digitatispora marina* con un basidiocarpo de 4 mm de diámetro son organismos que habitan zonas calmadas permitiendo el desarrollo de estos cuerpos grandes (Kohlmeyer y Kolhmeyer, 1979)



### II.2.1. Diversidad de hongos marinos

El número total estimado de especies fúngicas varía mucho dependiendo del autor, pero por lo menos alcanza un millón de especies y según nuevas estimaciones pueden alcanzar alrededor de 1.5 a 1.6 millones de especies (Hawksworth 1991, 2001). En la actualidad se han descrito alrededor de 100000 especies (Kirt *et al.* 2008), siendo la mayoría de especies procedentes de ambientes terrestres, y tan solo alrededor de 500 marinos. Varias estimaciones del número de especies de hongos marinos han sido propuestas, como la de Jones y Mitchell (1996) que calcularon alrededor de 1500 especies. Más tarde esto se consideró como sobrestimado por Liberra y Lindequist (1995) y Clement *et al.* (1999). Jones (2011) estimó que puede haber alrededor de 10000 especies de hongos marinos, sugiriendo a la vez probables errores en donde se pudieran encontrar especies nuevas (Tabla I). Dichos errores son: 1) especies no identificadas o mal identificadas, 2) derivados de hongos marinos (facultativos), 3) otros grupos de hongos (e.g. *Chytridiomycetes*), 4) muestreos geográficos más amplios, 5) hongos no cultivables, 6) especies cripticas/hermanas o con morfología similar, y 7) caracterización de especies parásitas específicas.

Tabla I. Número estimado de hongos marinos, tomado de Jones 2011.

<b>Grupo</b>	<b>Número de especies</b>
<b>Hongos marinos</b>	560
<b>Hongos marinos facultativos</b>	100
<b>Levaduras marinas</b>	1,500
<b>Hongos mal identificados</b>	100
<b>Derivados marinos</b>	1,500
<b>Hongos de las profundidades</b>	300
<b>Hongos planctónicos</b>	500
<b>Especies endófitas, algícolas y cripticas</b>	7,500
<b>Total</b>	12,060

Gran parte de los hongos marinos pertenecen al filo *Ascomycota* y en menor proporción a fila de *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zigomycota*, incluyendo a hongos mitosporicos. Los hongos marinos filamentosos incluyen alrededor de 209 especies (basidiomicetes y ascomicetes), las levaduras marinas con alrededor de 177 especies, y los hongos marinos no filamentosos (*i.e.* quitridiomycetes, zygomycetes, etc.) comprenden alrededor de 100 especies (Kohlmeyer, 1979). Jones *et al.* (2009a) reportaron 530 especies de hongos marinos que incluyen 424 ascomicetes (251 géneros), 94 hongos mitospóricos (61 géneros) y 12 basidiomicetes (9 géneros).

La mayoría de las especies de hongos marinos fueron descritas entre los años de 1980 - 1999, y tan solo 54 especies entre los años del 2000 - 2011. En la actualidad la cifra es de 549 especies descritas, con 16 nuevos géneros. Diecinueve nuevas especies fueron descritas desde Jones *et al.* (2009, Figura 1). Sin embargo, aún hay más especies que están en proceso de ser descritas (Jones, 2011). Esto es ciertamente notable para especies de manglares (42 especies descritas en Kohlmeyer y Kolhmeyer, 1979; 170 especies en Hyde *et al.*, 2000), y en áreas

tropicales donde continúa el incremento de la descripción de una amplia gama de nuevos taxa (Jones *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2007).

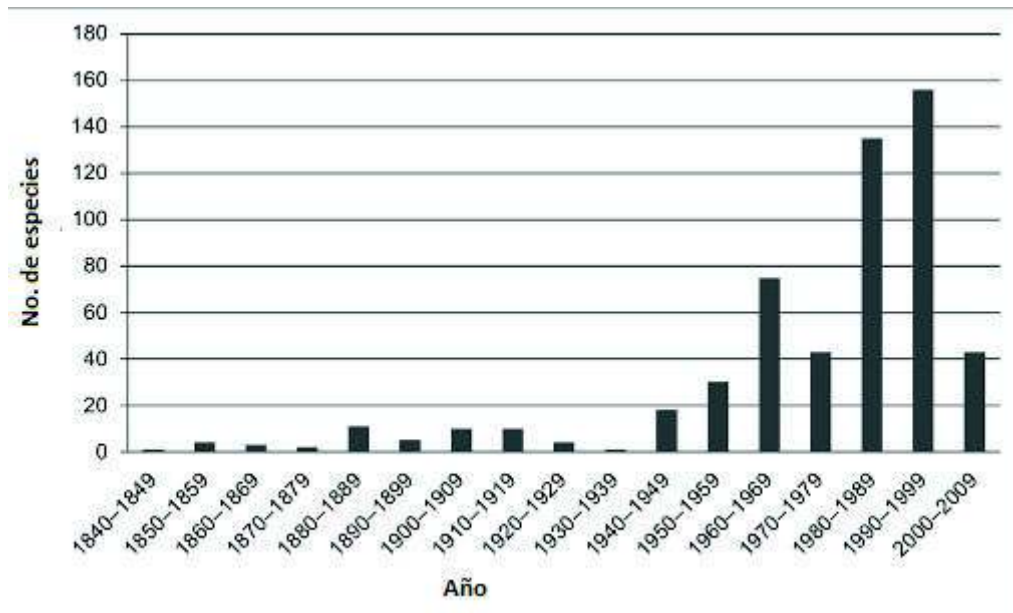


Figura 1. Número de especies de hongos marinos descritas a través de los años de Jones *et al* 2009

Hawksworth (1991) menciona que menos del 10% de la biodiversidad fúngica ha sido descubierta. Kohlmeyer y Kohlmeyer (1979) declararon, “la disminución en las descripción de nuevas especies de hongos marinos durante el periodo de 1970 – 1977 indica que las especies más comunes han sido ya nombradas, y que la adición de nuevos taxa en el futuro es muy poco probable”. Sin embargo, el estudio de nuevos sustratos y de nuevas áreas geográficas está siendo tomadas en cuenta para la búsqueda de hongos marinos, y está resultando en un aumento del número de nuevas especies descritas.

## **II.2.2. Biogeografía de los Hongos Marinos**

Lo sustratos orgánicos como algas, plantas acuáticas, madera, entre otros se encuentran en su mayoría a lo largo de las costas, donde proveen los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de los hongos. La mayoría de los hongos marinos se encuentran parasitando plantas y animales, como simbioses formando líquenes, y como saprobios en material orgánica de origen animal o vegetal. Algunos otros se encuentran flotando en la superficie de los océanos, y otros tantos anclados en una amplia diversidad de superficies. Todos estos organismos marinos los podemos encontrar desde la superficie hasta las profundidades oceánicas, e incluso en tierra firme. La distribución de los hongos marinos está limitada principalmente por factores físicos y químicos: concentración de oxígeno, temperatura y pH (Jones, 2000).

La biogeografía de los hongos marinos no está del todo clara. Por lo general, la información básica obtenida de la distribución de especies fúngicas marinas coincide con la ubicación de los laboratorios cercanos a las costas, o muestras tomadas por personas no relacionadas con la micología marina. Basados en números limitados de estudios de hongos marinos, no es posible establecer una región micogeográfica como con otros organismos (Van den Hoek, 1975). G.C. Hughes (1974), dividió los océanos en 5 regiones biogeográficas determinadas principalmente por la temperatura: ártica, templado norte, templado sur, sub-tropical norte, sub-tropical sur, tropical y antártica. Proponiendo a la vez el mapa con las divisiones de las áreas. Este esquema permite una precisa clasificación y terminología para la distribución de los hongos marinos y sirvió como base para futuros estudios biogeográficos (Figura 2).

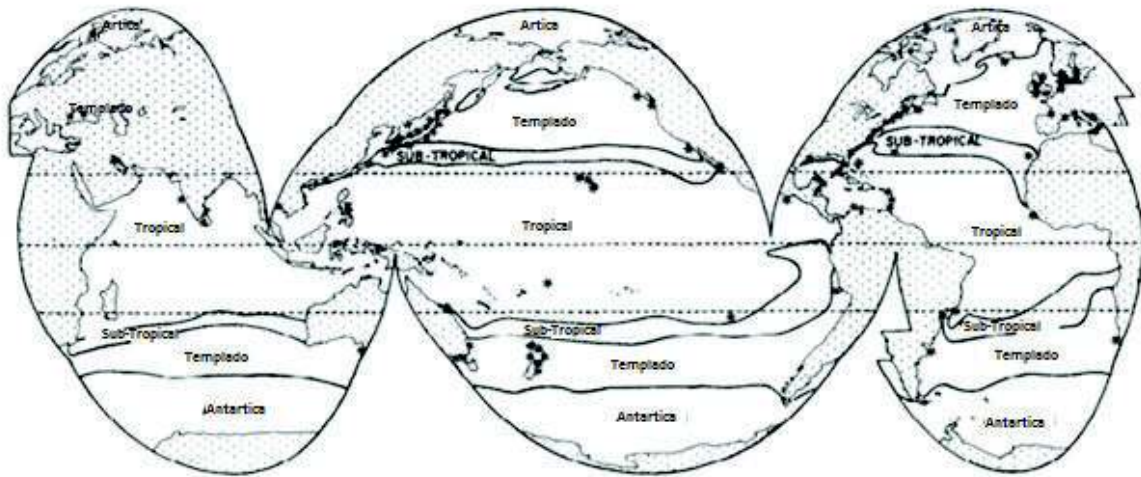


Figura 2. Regionalización geográfica para los hongos marinos (Hughes, 1974).

Kohlmeyer y Kohlmeyer (1979, 1983) no lograron asignar especies de hongos marinos a las áreas propuestas por Hughes (1974), ya que la información de la distribución de especies es tan escasa que no es posible hacer una generalización significativa. Los principales problemas que se tuvo con estas divisiones fueron con las especies cosmopolitas, en el momento de intentar colocarlas dentro de alguna región en particular, perdiendo el sentido del término.

Los estudios biogeográficos aplicados para hongos marinos son insuficientes, por lo que será un camino muy largo por recorrer para poder tener un conocimiento completo del tema. Uno de los mayores problemas es la incapacidad de cuantificar el número de hongos marinos. Por lo que será esencial realizar estudios donde no hay registros de colecciones, particularmente en el hemisferio sur, el Ártico, Antártica, y el Océano Índico (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979).

### II.2.3. Taxonomía de los Hongos Marinos

Algunos micólogos no están interesados exclusivamente en la caracterización y descripción de especies, sino también en demostrar una relación entre la filogenia y evolución de los taxa. Generalmente se espera que la relación entre especies ayude no sólo al desarrollo de los esquemas de clasificación, sino también para poder entender como los hongos han evolucionado. Las especies fúngicas pueden estar relacionadas unas con otras morfológica-, fisiológica-, bioquímica-, y ecológicamente. Todos estos datos pueden utilizarse para la clasificación de los hongos marinos (Shearer, 1986).

Los hongos en general constituyen un grupo independiente llegando al rango de reino junto con los animales, plantas, protistas y bacterias. De la misma manera que los animales, los hongos poseen la capacidad de generar enzimas hidrolíticas para metabolizar polímeros. Pero a diferencia de los animales, los hongos son capaces de sintetizar enzimas degradadoras para obtención de sus nutrimentos por absorción. El reino *Fungi* representa un clado muy diverso de organismos heterótrofos que comparten algunas características con los animales, como las estructuras con quitina, el almacenamiento de glucógeno y el codón mitocondrial UGA que codifica para el triptófano. La rama que une a los hongos con los animales está bien apoyada con base en datos moleculares, entre los que se encuentran los trabajos de Wainwright *et al.* (1993), Baldauf y Palmer (1993), Lang *et al.* (2002) y Steenkamp *et al.* (2006), entre otros.

Los hongos marinos no son un grupo taxonómico, ya que es un conjunto heterogéneo de especies que crecen en hábitats marinos, que puede ser dividido tanto en especies marinas primarias como en especies marinas secundarias (Kohlmeyer, 1974; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). Las especies marinas primarias evolucionaron directamente de un ancestro marino y nunca dejaron el ambiente marino, mientras que las especies marinas secundarias derivaron de un ancestro terrestre y regresaron a los hábitats marinos. El primer intento de una clasificación supragenerica de los hongos marinos filamentosos empezó con el “*Icones*” de Kohlmeyer y Kohlmeyer (1964,1969) y fue complementado después por Kohlmeyer (1974a).

En su mayoría, todos los hongos que se describían del medio marino se colocaban dentro del filo *Ascomycota*, en el grupo de los *Halosphaeriales*, familia *Halosphaeriaceae* debido a su

similitud morfológica. Sin embargo, gracias a los avances en la exploración de diversos ecosistemas marinos y a la aplicación de nuevas metodologías de estudio, la familia *Halosphaeriaceae* creció y empezaron a describirse hongos pertenecientes a otros órdenes y familias e incluso en otros filos (*Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zigomycota*). Asimismo, fue Kohlmeyer (1972) quien revisó por primera vez la familia *Halosphaeriaceae*. Posteriormente Kohlmeyer y Kohlmeyer (1979) modificaron dicha clasificación. En 1980 la revisión realizada por Kohlmeyer fue aceptada por los micólogos marinos por su practicidad.

El valor de los caracteres taxonómicos dentro de los *Halosphaeriales*, no es claro. Johnson y Sparrow (1961) creían que el desarrollo de las ascosporas, y la naturaleza de sus apéndices, representan los caracteres de mayor importancia. Kohlmeyer (1960, 1962, 1972, 1974) consideró el desarrollo y la morfología del ascoma como los caracteres de mayor importancia. Cavaliere (1966a, b, c) y Cavaliere y Johnson (1966a,b) propusieron que el ascoma es una estructura extremadamente variable y no podía usarse como carácter para separar géneros. Por otra parte Jones y Moss (1978, 1980) consideraron las estructuras de los ascoma como un rasgo significativo sólo a nivel familia y creyeron que a nivel género puede ser separado por las estructuras de las ascosporas y la ontogenia de los apéndices. También concluyeron que el modo en que se desarrollan los apéndices, es únicamente homólogo para algunos géneros dentro de *Halosphaeriaceae*, mientras que otros géneros muestran una ontogenia diferente. El criterio taxonómico más importante dentro de los *Halosphaeriaceae*, es la morfología de la ascospora y de los apéndices (Jones, 1995; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1997). Actualmente el criterio con mayor validez sigue siendo la morfología de la espora y ascoma. A pesar que la clasificación de los hongos marinos está basada principalmente en la caracterización del estado sexual, la fase mitosporica puede ser un carácter taxonómico de suma importancia, especialmente a niveles genéricos o específicos, en donde puede servir para delimitar especies estrechamente relacionadas.

En la última década, el uso de técnicas moleculares para examinar la filogenia de los organismos ha avanzado considerablemente (Spatafora y Blackwell, 1994). Las técnicas moleculares han sido también aplicadas para examinar la relación entre varios taxa marinos a niveles ordinales y en niveles de género/especie.

### **II.3. Genética de Poblaciones**

El objetivo principal que la genética de poblaciones es cuantificar, describir y explicar la variación genética dentro y entre las poblaciones, así como evaluar tanto de manera experimental como teórica los mecanismos, procesos o eventos evolutivos que pudieron ocurrir para originar tal variación en las poblaciones (Lewontin, 1991).

Lewontin (1991) aclaró que el uso de la electroforesis de proteínas (primer método de análisis de diversidad genética) en los años 60s, fue el hito que impulsó el primer paso para el inicio de la genética de poblaciones como la conocemos hoy en día, pudiendo diferenciar entre distintos organismos, no sólo por diferencias fenotípicas y morfológicas, sino también a un nivel molecular. Pese a su utilidad para la diferenciación por medio de comparación de proteínas entre organismos, la eficiencia de esta técnica era muy superficial, ya que no detectaba mutaciones puntuales en el DNA, es decir, no detectaba las mutaciones sinónimas (cambio de una base en el codón sin alterar el aminoácido, por lo tanto sin alterar la proteína), y por lo tanto no detectaba toda la variación genética resultando en una pérdida de información valiosa. A partir de la aparición de la electroforesis de proteínas, nuevas técnicas se continuaron desarrollando, pudiendo ofrecer información más precisa, permitiendo identificar mutaciones más discretas en las muestras examinadas.

En la ecología molecular se utilizan herramientas que brindan información para detectar las pequeñas diferencias a nivel molecular entre los individuos o las poblaciones de estudio. A dichas herramientas se les denominan como marcadores moleculares. Los marcadores moleculares permiten, entre otras cosas, cuantificar la diversidad genética, rastrear el movimiento de individuos, medir los niveles de endogamia, caracterizar nuevas especies y rastrear patrones históricos de dispersión. A lo largo de la historia de la genética de poblaciones, se han utilizado una gran variedad de marcadores moleculares para poder estimar que tan diversa puede ser una o varias poblaciones. Cada marcador dará información específica y única, por lo que, para poder obtener la información más precisa, se tiene que tener en cuenta qué es lo que el investigador está buscando y que pregunta quiere responder.



La ecología molecular, y por lo tanto la genética de poblaciones, opera en todos los niveles de análisis ecológicos: a nivel de las poblaciones, para poder definir las, conocer su historia y sus parámetros evolutivos, paternidades, adecuaciones y flujo génico. A nivel evolutivo es claro que provee de datos para analizar a los organismos, poblaciones y comunidades en términos de genética de poblaciones y evolución molecular, y ayuda en la estimación de las fuerzas evolutivas (selección natural, deriva génica, mutación, migración). A nivel comunidades sirve para definir las especies existentes y sus densidades, y a veces a detectar patrones co-evolutivos y de interacción. Y a nivel de los ecosistemas, brinda elementos para comprender su funcionamiento como parte de ésta misma (Eguiarte *et al.* 2007).

Nuevos avances en la tecnología han permitido impulsar el estudio genético a un mayor nivel, a una escala genómica. En la actualidad el estudio del genoma es lo que más se ha popularizado en la industria biotecnológica. Permitiendo analizar, no sólo cuantitativamente el número de genes, si no también que tanto se expresa un gen o genes, o en qué momento o etapas del desarrollo del organismo se expresan. Tomando en cuenta lo anterior, se puede sacar ventaja de ello, *i.e.* si se conoce en qué preciso momento se expresa un gen de interés, por medio de ingeniería genética se puede inhibir la expresión de tal gen. Por lo que los siguientes niveles del estudio genético son tanto el transcriptoma y el proteoma. El estudio del transcriptoma permite cuantificar el nivel de expresión de genes, empleando técnicas que permiten analizar miles de moléculas de ARNm al mismo tiempo, enfocándose en el total de transcritos producidos.

### **II.3.1 Genética de poblaciones en el reino en hongos.**

Los hongos desempeñan funciones críticas, no solo en la vida cotidiana sino también en la agricultura e industria alimentaria, la biotecnología, y además son útiles como organismos modelo para investigaciones científicas. Sin embargo, hasta hace poco, su importancia en dichas áreas no había sido completamente apreciada. Por ejemplo, las infecciones ocasionadas por hongos patógenos siempre han sido parte de la humanidad, pero su importancia no fue reconocida por la comunidad científica hasta el aumento dramático de dichas infecciones en las últimas décadas. Como resultado, éstos acontecimientos, originaron la necesidad del mejoramiento en la precisión y velocidad del diagnóstico de infecciones fúngicas. Además,

también se tornó necesario la identificación de las fuentes infecciosas y brotes de casos individuales. También para poder entender los patrones de variación genética entre las especies, y su posible potencial evolutivo. Éstas y otras cuestiones fundamentales no sólo se aplican a hongos patógenos de humanos, sino también a especies patógenas de plantas y otros animales, además de especies no patógenas (Xu, 2010).

En las últimas dos décadas ha existido un crecimiento exponencial en el desarrollo y aplicación de métodos moleculares en los análisis de especies y poblaciones fúngicas (Xu, 2010). En su mayoría, las investigaciones realizadas en el tema son con hongos patógenos en plantas (fitopatógenos), o animales de interés económico. Por ejemplo, comprender que las poblaciones de hongos fitopatógenos constantemente se encuentran en proceso de adaptación por los cambios ambientales (principalmente, causada por el humano), sería de gran utilidad para poder implementar estrategias efectivas para el control de enfermedades en cultivos de interés antropogénicos (Vélez, 2011).

### **II.3.1.1. Genética de poblaciones de los hongos marinos**

Los hongos marinos pueden ser organismos útiles para diversas investigaciones, ya que presentan características particulares que favorecen su uso en estudios bioquímicos, citológicos, fisiológicos y genéticos. Al contrario de plantas y animales, algunos hongos poseen un rápido desarrollo, y ciclo reproductivo de fácil manejo. Además en algunos hongos, su cultivo requiere poca infraestructura y espacio (Herrera y Ulloa, 1998).

Estudios han demostrado que algunas especies de hongos marinos son excelentes candidatos para este tipo de investigaciones. Fundamentalmente se consideran que presentan una fisiología única y producen un vasto número de metabolitos secundarios, los cuales requieren gran atención especialmente si se toma en cuenta que estos organismos se encuentran sometidos a un ambiente tamponado con niveles de salinidad, pH y temperatura relativamente constantes, pero que está siendo alterado por las actividades humanas rompiendo esta estabilidad (Velez, 2011). Dichas capacidades de adaptación a condiciones únicas sugieren la presencia de mutaciones requeridas que les permiten subsistir en estos ambientes cambiantes Por lo que

nuevos metabolitos secundarios o enzimas pudieran ser aislados, y quizás ser de interés para el hombre (Velez, 2011).

A pesar de los trabajos ecológicos y sistemáticos en hongos marinos, no hay información disponible respecto a la estructura poblacional y diversidad genética de estos organismos. Dicha información es necesaria para poder interpretar las relaciones ecológicas, evolutivas y sistemáticas; permitiendo evaluar la importancia de estudios de laboratorio con una o varias cepas; y proporcionar información adicional sobre la función y la diversidad de los hongos marinos (Michaelis *et al.* 1987).

Hasta ahora, el único trabajo realizado en el área de genética de poblaciones de hongos marinos se efectuó utilizando las especies *Dendryphiella renaria* y *D. salina*, donde se comprobó su diversidad genética y su relación sistemática (Michaelis *et al.* 1987). Sin embargo, el estudio se realizó hace más de 20 años, utilizando aloenzimas como marcador molecular. Estos marcadores, pese a su naturaleza co-dominante, no detectan toda la variación genética de las poblaciones estudiadas, por lo que sería deseable que en los nuevos estudios genéticos en hongos marinos se usaran marcadores más robustos y con un mayor poder de resolución.

#### **II.4. Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten estimar la diversidad genética en las poblaciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y pueden ser de dos tipos, dominantes o co-dominantes (Simpson, 1997).

Uno de los objetivos primordiales de los análisis de ecología molecular es medir la heterocigosis en las poblaciones analizadas, ya que esto indicará qué tanta diversidad poseerá las poblaciones. Los marcadores dominantes son utilizados cuando se desconoce la secuencia genética del organismos en estudio, siendo rápidos y costeados. Algunos marcadores con esta naturaleza, emplean marcadores para amplificar regiones anónimas del genoma, produciendo

patrones de bandas múltiples para cada individuo. Además, por sus cualidades para caracterizar múltiples regiones del genoma, pueden demostrar niveles significativos de polimorfismo que pueden ser utilizados para inferir relaciones genéticas estrechas; sin embargo no pueden usarse para demostrar relaciones evolutivamente distantes (*i.e.* divergencia de especies). El mayor inconveniente de los marcadores dominantes es su naturaleza, que impide poder diferenciar entre el homocigo dominante del heterocigo. Esto último es lo que dificultaría el cálculo de las frecuencias alélicas (Freeland, 2005), por lo que existen métodos de corrección para disminuir el error. Dentro de la categoría de marcadores dominantes podemos encontrar los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLP (Random Fragment Length Polimorphisms) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

En especies diploides, un marcador co-dominante permitirá identificar individuos homocigos y heterocigos. La capacidad de poder diferenciarlos es lo que hace tan fiables estos marcadores, facilitando el cálculo de las frecuencias alélicas. El inconveniente de trabajar con estos tipos de marcadores es el tiempo que tarda en dar resultados y en que son realmente costosos, lo que en la práctica puede limitar el número de *loci* que son analizados (Freeland, 2005). Dentro de este grupo de marcadores podemos encontrar a los aloenzimas/isoenzimas, SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), microsatélites y las secuencias completas de ADN.

#### **II.4.1. ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat)**

Las Inter Secuencias Simple Repetidas (ISSRs por sus siglas en inglés) son un tipo de marcador genético de naturaleza dominante que permite estimar los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Las repeticiones de microsatélites utilizados como marcadores pueden ser di-, tri-, tetra- o pentanucléotido. Usualmente tienen terminaciones ancladas en los extremos 3' o 5' de 1 a 4 bases extendidas en la secuencia flanqueante. Es una técnica basada en el método de PCR, en donde involucra amplificaciones de segmentos de ADN presentes a una distancia lo suficientemente cerca para ser amplificada entre dos regiones idénticas repetidas de microsatélites orientadas en direcciones opuestas (Figura 3) (Pradeep *et al.*, 2002). La molécula

generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites.

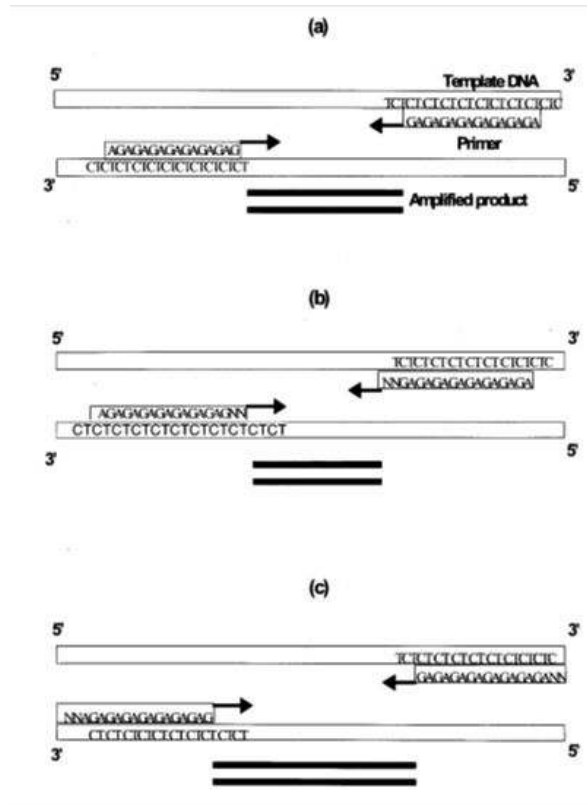


Figura 3. Representación esquemática del marcador molecular ISSR (Pradeep, *et al.*, 2002).

Es una técnica simple y rápida que combina las ventajas de los microsatélites (SSR's) y de los amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), hasta la característica universal de los ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD). Los ISSR son altamente polimórficos y útiles en estudios de diversidad genética, filogenia, marcación de genes y biología evolutiva (Refereicnia).

## II.5. Género *Corollospora* (Werdermann, 1922)

El género *Corollospora*, con la especie tipo *Corollospora maritima* fue descrito por Werdermann (1922, Figura 4), quien lo incluyó originalmente dentro del antiguo grupo de los *Coelomycetes*. Trabajos posteriores y al examinar con mayor detalle la especie, se probó que realmente pertenecía al filo *Ascomycota* (Kohlmeyer, 1962). Gracias a las revisiones dadas por Kohlmeyer, varias especies han sido agregadas al género, mientras otras tantas han sido removidas de este mismo (Jones *et al.*, 1983). Kosh (1986) describió a *C. cinnamomea* sumando otra nueva especie para el género. Con características distintivas, como sus ascosporas de tonalidad marrón con una superficie ornamentada. Nakagiri y Tokura (1987) describieron siete nuevas especies en las playas arenosas de Japón. Seguido de cinco descripciones nuevas por Kohlmeyer y Volkman-Kohlmeyer (1989, 1991, 1997), Sundari *et al* (1996) y Prasannarai *et al* (2000), siendo un total de 20 especies pertenecientes al género. En la actualidad son 23 especies oficialmente descritas para el género.



Figura 4. Fotografías de *C. maritima*. Izquierda, ascospora de *C. maritima*. Derecha, ascoma de *C. maritima* sobres grano de arena. (Vélez, 2007).

Todos los miembros de *Corollospora* se encuentran en hábitats similares, costas marinas arenosas, y forman su estructura de adhesión a los granos de arena u otro sustrato duro (como

madera, conchas de bivalvos o materia orgánica muerta). Las características más comunes de las especies del género *Corollospora* son ascomas carbonáceos, adheridos a los granos de arena por medio de una estructura denominada subículo (compuesto por pseudoparénquima con conexiones desordenadas) (Figura 5), papilas con un ostiolo abierto cerca del subículo, un pseudoparénquima con células de pared gruesa con un pozo engrosado, ascas delicuescentes/evanescentes sin una estructura apical, y ascosporas con apéndices fibrosos o en forma de cinta desarrollados por fragmentación de la exospora (Nakagiri y Tokura, 1987).

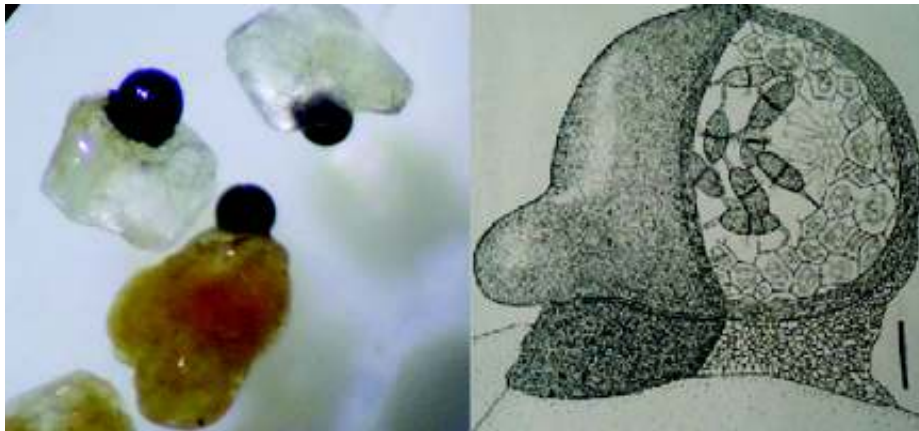


Figura 5. Ascoma de *C. maritima*. Izquierda, fotografía de asco de *C. maritima* (presente trabajo). Derecha, diagrama de ascoma de *Corollospora* spp., se observan las ascosporas dentro del cleistotecio, y al pie del cuerpo fructífero el subículo (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1997).

Una de las principales características que permiten diferenciar el género de otros organismos de la familia, son sus apéndices secundarios a manera de corona, el cual es considerado como carácter taxonómico dentro y fuera del grupo (Nakagiri y Tubaki, 1986) (Figura 6).

Las diferentes especies de *Corollospora* están delimitadas por la anatomía de la pared del ascoma, y el tamaño y septación de la ascospora. La pared del ascoma en las especies del género *Corollospora* tienen una estructura de doble capa, y en algunas especies, estas pueden tener una tercer capa externa (Nakarigi y Tubaki, 1986). Estas capas muestran diferencias en el tipo de células entre especies. En el caso de las especies con doble capa, la capa interna posee células aplanadas mientras la capa externa está compuesta de células esféricas o poliédricas. Por

otra parte, una tercera capa que poseen otras especies está compuesta de células esféricas poliformes. Lo interesante es que estos últimos organismos con capa triple están caracterizados por poseer ascosporas y ascomas más largos. Por lo cual se puede especular que estas modificaciones en la pared del peridio de ascomicetes marinos arenícolas puede ser una adaptación protectora para prevenir daño físico ocasionado por los granos de arena u otros materiales duros. Además en el género puede haber una tendencia evolutiva hacia ascosporas de mayor tamaño producidas en ascomas con pared engrosada (Nakarigi y Tubaki, 1987).

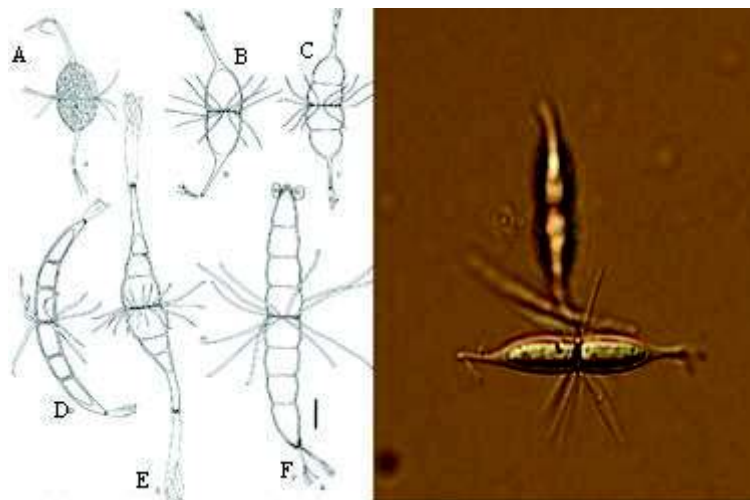


Figura 6. Ascosporas de *Corollospora*. Izquierda, diagrama de ascosporas de especies del género *Corollospora*, con sus apéndices secundarios en el centro de la espora, (A) *C. cinnamomea*; (B) *C. maritima*; (C) *C. intermedia*; (D) *C. luteola*; (E) *C. lacera*; (F) *C. pulchella* (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1997). Derecha, fotografía de espóra de *C. maritima* observada a 20x en microscopio (presente trabajo).

Estudios a nivel molecular, indican que los miembros del género forman un clado estadísticamente bien apoyado, basado en la comparación de secuencias del 18s RNA. Aunque los estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión y de barrido en la ontogenia de los apéndices de las ascosporas y estructura del ascoma en *Corollospora*, señalaron que dentro del género existen cuatro formas de desarrollo de los apéndices de las esporas (Johnson, 1980; Jones y Moss, 1980; Jones *et al.*, 1983).

El ciclo de vida de las especies del género *Corollospora* comienza cuando las olas depositan las esporas sobre la arena de la zona intermareal en la playa. Al cesar el movimiento,



de inmediato comienza la germinación de las esporas, favoreciendo el desarrollo si se encuentran sobre o cerca de un sustrato orgánico constituido por celulosa y lignina del cual se pueden nutrir (si las ascosporas no encuentran un sustrato al germinar, mueren). Forman un micelio abundante, el cual cubre una parte de la superficie del sustrato. También se puede desarrollar micelio sobre o entre los granos de arena adyacentes al sustrato que están degradando. Después de cierto tiempo, cuando los nutrimentos comienzan a disminuir o las condiciones ambientales no permiten obtener los nutrientes necesarios, se comienzan a formar las estructuras de dispersión o de latencia por mitosis (mitosporas/conidiosporas), y/o meiosis (meiosporas/ascosporas) dentro de los ascomas.

Los ascomas impermeables y oscuros, protegen las ascosporas de la fuerte deshidratación e intensidad solar. Las ascosporas son liberadas cuando los conidióforos/ascomas alcanzan la madurez y rompen por la abrasión entre los granos de arena debido al movimiento de las olas. Las esporas flotan sobre la superficie del agua y espuma del mar gracias a sus apéndices, que les confieren una mayor zona de contacto con la superficie. Estas se dispersan por medio de las corrientes marinas, repitiendo el ciclo (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

### **II.5.1. *Corollospora maritima* (Werderm. 1922)**

*Corollospora maritima* Werderm, 1922 es una especie de gran importancia ecológica (saprobia), con una distribución amplia (cosmopolita), ha sido la especie con mayor número de estudios dentro del género. Con un ascoma de 98 – 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, globoso o subgloboso, parcial o superficialmente inmerso, adherido a los granos de arena o a cualquier otro sustrato duro (incluso en conchas de moluscos o percebes; exoesqueletos de briozoos) por el subículo o agregado. Con peridio delgado (12 -40 $\mu\text{m}$ ), redondeado o poligonal por afuera, oblongado hacia el centro, formando una textura angular. Asca con ocho esporas, de apariencia fusiforme o subclavada, en veces apiculada, unitunicada con pared delgada. Las ascosporas poseen apéndices primarios y secundarios (carácter taxonómico), fusiformes con un solo septo (Kohlmeyer y Kohlmeyer 1979).

### III. JUSTIFICACIÓN

Existen varios estudios relacionados con la micología marina, los cuales en su mayoría son de carácter taxonómico, biogeográfico, fisiológico o ecológico, sin embargo, estudios respecto a genética, en especial ecología molecular son casi nulos. El único estudio relacionado hasta ahora es de Michaelis *et al.* 1978 con *Dendryphiella*. Los estudios con enfoques de ecología molecular son importantes, ya que ayudan a cuantificar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones. *Corollospora maritima* es uno de los hongos marinos con mayor realce, ya que se ha podido comprobar que tiene cualidades de interés antropogénico. Algunas de estas propiedades pueden ser aplicadas en áreas como la biotecnología, medicina y ecología como organismo biorremediador (Kirk *et al.* 1998), bioprospector (Ohzeki and Mori 2001; Neumann *et al.* 2006) y bioindicador, respectivamente.

Pese que *C. maritima* ha sido ampliamente estudiado en las diferentes áreas (*e.g.* taxonomía, biogeografía y fisiología), en otras áreas como en la genética no existen investigaciones hasta la fecha, por lo que el presente trabajo será una aportación significativa para la micología como para la genética.

#### **IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA**

La magnitud de la diversidad genética de *Corollospora maritima* se verá afectada por el tipo de ecosistemas adyacentes. Se espera que las masas continentales representarán una barrera geográfica significativa para el flujo génico entre las poblaciones del Golfo de México y Océano Pacífico con las poblaciones del mar Caribe y el Golfo de California. Debido a la dinámica de las corrientes oceánicas superficiales, las poblaciones pertenecientes al mismo litoral mostrarán niveles de flujo génico altos.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Evaluar ocho poblaciones de *Corollospora maritima* en diferentes playas del Océano Pacífico, mar Caribe, Golfo de California y Golfo de México, utilizando ISSRs como marcador molecular para conocer su diversidad y estructura genética.

### **V.2. Objetivos Específicos**

Comparar la magnitud de la diversidad genética entre las poblaciones de *C. maritima* estudiadas.

Analizar la distribución de la diversidad genética entre las poblaciones de *C. maritima* estudiadas.

Probar la eficacia de ISSRs como marcadores moleculares en *C. maritima*

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1. Área de Estudio**

#### **VI.1.1. Golfo de California**

Es una extensión del Océano Pacífico, ubicada entre la península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa, al noroeste de México. El clima es subtropical, lo cual ocasiona grandes variaciones climáticas anuales, e incluso diarias. Durante el invierno la temperatura desciende considerablemente en la parte norte, produciendo heladas. En el verano se presentan tormentas tropicales. La temperatura promedio es de 24 °C. Posee fuertes corrientes de marea. Además presenta una inmensa concentración de organismos microscópicos y una extraordinaria diversidad biológica gracias a la abundante luz solar y a sus aguas ricas en nutrientes. El Golfo de California tiene un total de 244 islas e islotes, y zonas costeras en los estados que lo rodean. En dichas islas se encuentran especies endémicas de la región, como un gran número de aves, plantas invertebrados y mamíferos. En general el Golfo de California se puede dividir en dos grandes regiones: región norte, al norte de las islas Ángel de la Guarda y Tiburón; y la región sur, desde la boca del golfo hasta estas islas (Álvarez-Borrego 1983). La parte norte es somera, con amplitudes de mareas de hasta 10 m, mientras que la región sur es profunda, tiene comunicación con el Océano Pacífico y está influenciada por sus condiciones oceanográficas.

##### **VI.1.1.1. La Paz, Baja California Sur, México**

El estado de Baja California Sur se ubica al noroeste del territorio mexicano, ocupando la región sur de la Península de Baja California. Limita al norte con el estado de Baja California, al este con el Golfo de California y al sur y oeste con el Océano Pacífico. Su capital es la ciudad de La Paz, la cual presenta una de las dos capitales del país que están sobre el litoral del mar.

Predomina el clima muy seco (92% del estado). Se encuentra también clima seco y semiseco (7%), y Templado subhúmedo (1%) (INEGI, 2014). Con una temperatura media de 18 a 22°C. Las corrientes en el golfo varían según la estación en verano; la corriente de California (CC) la temperatura superficial es aproximadamente de 20°C y en invierno alrededor de 13°C (Winant y Bratkovich, 1981). El mayor ingreso económico recae en el turismo y sus actividades pesqueras.

#### **VI.1.1.2. Puerto Peñasco, Sonora, México**

El municipio de Puerto Peñasco se encuentra situado en la porción noroeste del estado de Sonora, México. Colinda al norte con los Estados Unidos de Norteamérica y el municipio Gral. Plutarco Elías Calles, al noroeste con San Luis Río Colorado, al sureste con Caborca y su límite al sur es el Golfo de California. Su territorio es principalmente plano, pero se destaca la serranía de Sonoyta al norte y al este del municipio. Asimismo, su territorio constituye una parte de la biosfera del Pinacate y el gran desierto de Altar (INEGI, 2014). El clima de Puerto Peñasco es seco semi-cálido con una temperatura media máxima mensual de 28.7° C y una media mínima mensual de 12.1° C. La época de lluvia se presenta en el verano con una precipitación media anual de 90.6 milímetros

#### **VI.1.2. Océano Pacífico**

Es el mayor océano de la Tierra, ya que ocupa una tercera parte de su superficie. Se extiende aproximadamente 15 000 km desde el mar de Bering y el Ártico por el norte, hasta los márgenes congelados del mar de Ross en la Antártida por el sur. Las temperaturas en el Pacífico varían desde el punto de congelación cerca de los polos a unos 29 °C cerca del Ecuador. La salinidad también varía con la latitud. El agua que se encuentra cerca del ecuador es menos salina que la de las latitudes medias debido a la precipitación ecuatorial abundante a lo largo del año. Hacia los polos, la salinidad, así como la temperatura, también son bajas, ya que existe poca evaporación de agua del mar en estas áreas. La circulación superficial de las aguas del Pacífico

es generalmente en el sentido de las agujas del reloj en el Hemisferio Norte y en el contrario en el Sur.

#### **VI.1.2.1. Acapulco de Juárez, Guerrero, México**

Es una ciudad con puerto ubicada en el estado de Guerrero, en la costa sur del país, a 304 km. de la Ciudad de México. Al norte colinda con los municipios de Coyuca de Benítez, Chilpancingo y Juan R. Escudero; al este con Juan R. Escudero y San Marcos; al Sur con el municipio de San Marcos y el Océano Pacífico; al oeste con el Océano Pacífico y el Municipio de Coyuca de Benítez. El clima en Acapulco es predominantemente subhúmedo cálido, sin embargo presenta ciertas variaciones. Caliente y húmedo en las partes bajas (24° C a 33° C), y templadas en las tierras altas (22° C a 28° C).

#### **VI.1.2.2. Panamá, República de Panamá.**

Es la capital de la República de Panamá, localizada a orillas del Golfo de Panamá, en el Océano Pacífico, al este de la desembocadura del Canal de Panamá. La ciudad posee un clima tropical de tipo sub-ecuatorial caracterizado por una prolongada estación lluviosa de mayo a diciembre y una corta estación seca de enero a abril. La precipitación anual promedio cercana a los 2.000 mm, una humedad relativa promedio de 75% y una temperatura media de 27 °C, con máximas absolutas de hasta 39 °C y mínimas de 20 °C. Las grandes masas oceánicas del Atlántico y Pacífico son las principales fuentes del alto contenido de humedad en el ambiente y debido a lo angosto de la franja que separa estos océanos, el clima refleja una gran influencia marítima (ETESA, 2012).

### **VI.1.2.3. Kauai, Hawái, Estados Unidos.**

El archipiélago Hawaiano está formado por 19 islas y atolones, además de islotes, arrecifes y bancos de arena en una alineación del noroeste al sureste a lo largo de 2.450 km. en el Pacífico Norte. Las islas Hawái tienen una gran cantidad de especies endémicas. Las islas son más húmedas en el norte y al este. Las áreas litorales en general, y especialmente en el sur y al oeste son más secas. La temperatura media al nivel del mar varía entre los 29 y los 32 °C en verano y entre los 18 y los 21 °C en invierno.

Kauai es la isla más antigua y la cuarta en tamaño del archipiélago de Hawái. También se la conoce como "Isla Jardín" o "Garden Isle". Es de origen volcánico.

### **VI.1.3. Mar Caribe**

El Caribe es un mar semicerrado adyacente a las masas continentales de Centro y Sudamérica. La cadena de pequeñas islas, bancos y alféizares del arco de las islas de las Antillas separan el Caribe del Océano Atlántico, y actúan como un tamiz de la entrada de agua de este último (Murphy *et al.* 1999). Es uno de los mares salados más grandes del mundo. La ubicación tropical del mar ayuda a que el agua se mantenga a una temperatura alta moderada, en un rango entre 21 y 32.2 °C durante el año. Se comunica con el Océano Pacífico a través del Canal de Panamá. En promedio, entre un 15 y 20% del agua de la superficie que entra hacia el Caribe es proveniente de las aguas dulces de los estuarios de los ríos Orinoco y Amazonas, conducidas hacia el noroeste por la Corriente Caribeña. La fauna del Caribe es característica de clima subtropical, principalmente influida por las corrientes marinas calientes, es endémica en un 42%. La flora del mar Caribe presenta una gran biodiversidad, de la cual alrededor del 50% es endémica de la zona (Kurt, 1997).



#### **VI.1.3.1. Cancún, Quintana Roo, México.**

Cancún está ubicado en la costa noreste del estado de Quintana Roo en el este de México. Se encuentra a una distancia de 370 km de la capital del estado, a 70 km de Playa del Carmen. Colinda hacia el este con el mar Caribe, al norte con el municipio de Isla Mujeres, al oeste con el municipio de Lázaro Cárdenas, y al sur con el municipio de Solidaridad. El 99% de la superficie del estado presenta clima cálido subhúmedo y el 1% cálido húmedo, localizado en la isla de Cozumel (INEGI, 2014). Cancún está situado en la costa oriental del continente. Por lo que recibe la influencia de corrientes marinas calientes, principalmente la Corriente del Golfo de México que propicia un clima cálido y lluvioso. La temperatura media anual oscila entre 25.5 grados centígrados.

#### **VI.1.3.2. La Habana, República de Cuba:**

Es un archipiélago constituido por la mayor isla de las Antillas, llamada Cuba, la Isla de la Juventud, y otros 4,195 cayos, islotes e islas adyacentes. Está ubicada en el mar Caribe, cerca de la costa de los Estados Unidos y México. Sus límites son al norte con el Estrecho de la Florida, al este con el Paso de los Vientos, al sur con el mar Caribe y el oeste con el Golfo de México. Los valores medios anuales de temperatura van desde los 24 °C en las llanuras, hasta 34 °C y más en las costas orientales, reportándose magnitudes inferiores a 20 °C en las partes más altas de la Sierra Maestra. La flora cuenta con más de 6.500 especies de angiospermas, especialmente en los bosques; entre las que se encuentran plantas tropicales, de río y frutales.

#### **VI.1.4. Golfo de México**

El Golfo de México es una frontera internacional de México, Estados Unidos y Cuba, hacia la región del Gran Caribe en la zona noroccidental tropical, subtropical y templada del Océano

Atlántico. Tanto el Golfo de México como el mar Caribe están unidos al Océano Atlántico a través de numerosos estrechos y pasos. No obstante, el intercambio de masas de agua entre las distintas cuencas marinas es limitado, dado que las zonas de comunicación suelen ser de aguas poco profundas. Recibe como elemento central en su circulación aguas del Caribe procedentes del Canal de Yucatán (Lara-Lara *et al.* 2008). Las mayores precipitaciones tienen lugar a lo largo del cálido verano tropical. Es un área de gran diversidad de especies de aves y zona importante en las rutas migratorias del este del continente americano. Por otra parte, presenta graves problemas de origen antropogénico. En esta región marítima hay miles de plataformas de prospección petrolífera y refinerías, por lo que es inevitable que se produzcan vertidos accidentales e incendios en las plataformas que son difíciles de controlar (Toledo, 2005).

#### **VI.1.4.1. Paraíso, Tabasco, México.**

El estado de Tabasco se encuentra en la región sureste de México; desde la planicie costera del Golfo de México, hasta las montañas del norte de Chiapas. Al norte limita con el Golfo de México y Campeche; al sur con Chiapas y la república de Guatemala; al oeste con el estado de Veracruz, mientras que al este, con el estado de Campeche y la República de Guatemala. Se localiza en la zona del trópico. Tiene una temperatura de 26°C en su media anual, y la temperatura máxima es de 42°C. La mayor parte del territorio de Tabasco está cubierta por selva tropical y pantanos. Paraíso es uno de los municipios del estado de Tabasco que ha tenido un desarrollo destacado en estos últimos años, principalmente en turismo por sus playas y lagunas, como así una variada fauna y flora.

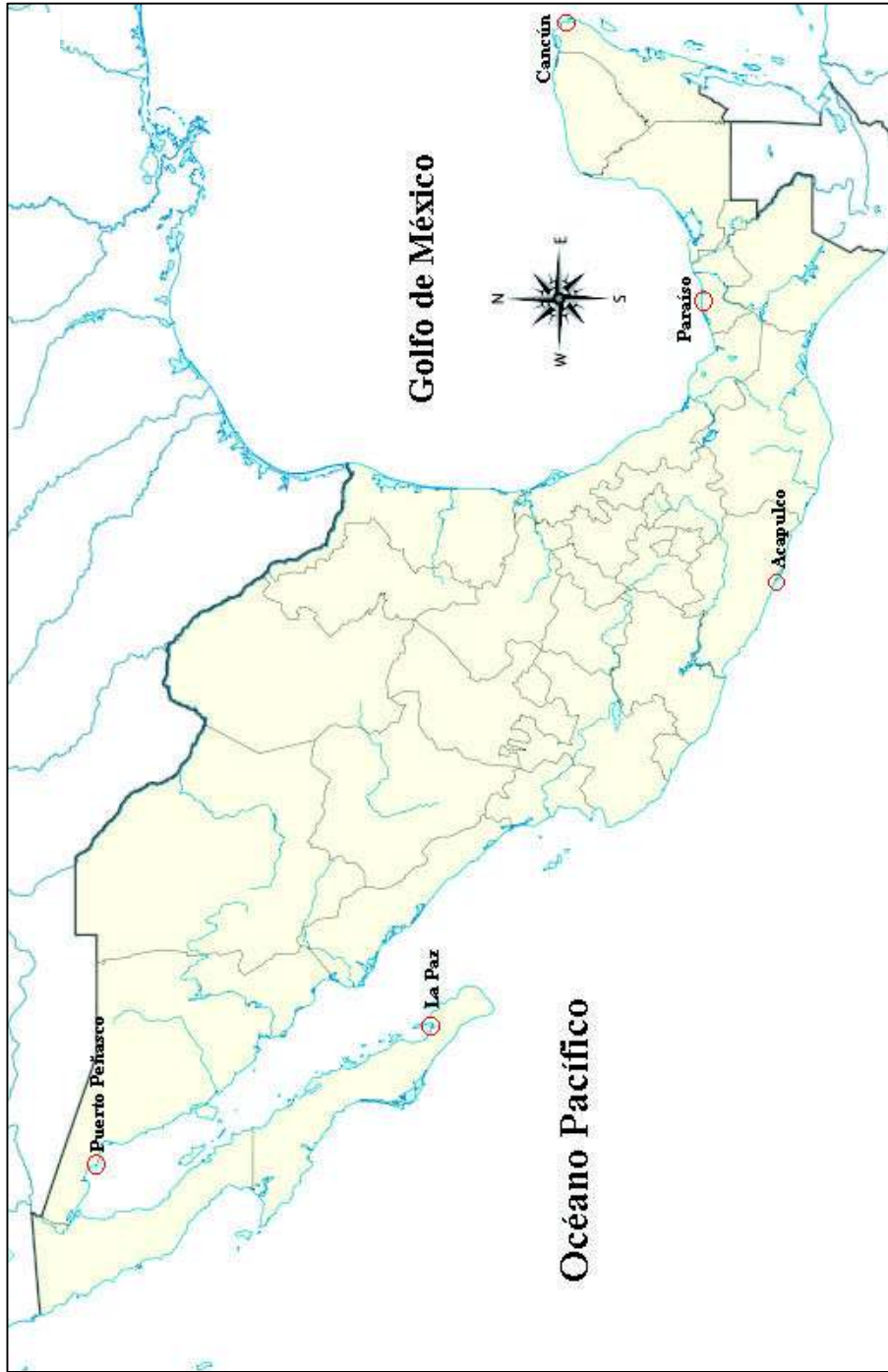


Figura 7. Zonas de muestreo en México. Mapa de la República Mexicana, señalando con círculos rojos los diferentes lugares de muestreo (Puerto Peñasco, Sonora; La Paz, Baja California Sur; Acapulco de Juárez, Guerrero; Cancún, Quintana Roo; Paraiso, Tabasco).

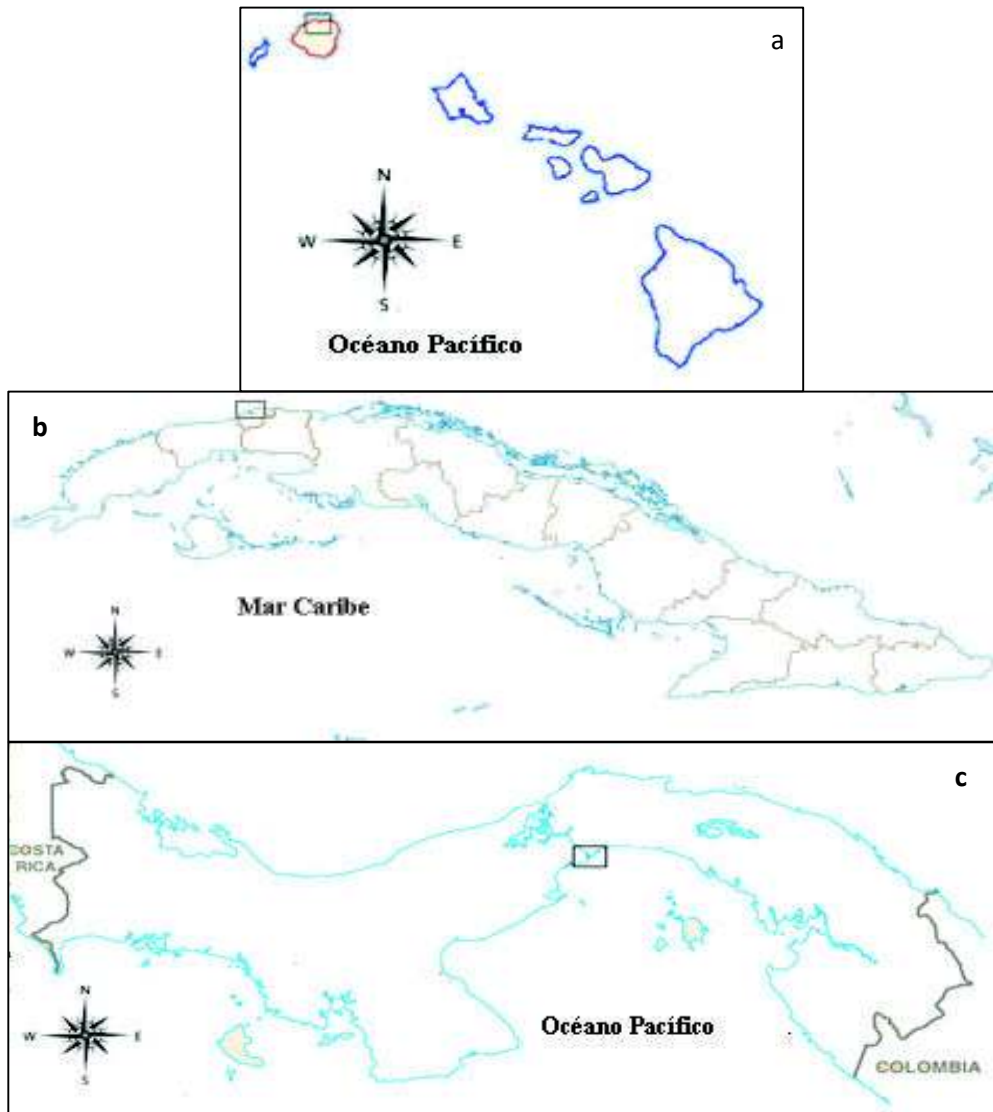


Figura 8. Zona de muestreo. **a:** Kauai, Hawái, EUA. **b:** La Habana, República de Cuba. **c:** Panamá, República de Panamá.

## VI.2. Muestreo

Las muestras utilizadas en el presente estudio pertenecen a la colección del Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a cargo de la Doctora María del Carmen Auxilio González Villaseñor (Figura 7 y 8, Tabla II). Cada una de las muestras de la colección consta de una porción de arena con materia vegetal (pedazo de corteza o alga, fuente de carbono para los hongos) selladas en bolsas Ziploc® herméticas.

Tabla II. Localidades de muestreo.

<b>Localidad</b>	<b>Litoral</b>
<b>La Paz, Baja California Sur, México</b>	Golfo de California
<b>Puerto Peñasco, Sonora, México</b>	Golfo de California
<b>La Habana, Republica de Cuba</b>	Mar Caribe
<b>Cancún, Quintana Roo, México</b>	Mar Caribe
<b>Panamá, República de Panamá</b>	Océano Pacífico
<b>. Lumahai Beach, Kaua'i, Hawái, EUA</b>	Océano Pacífico
<b>Acapulco de Juárez, Guerrero, México</b>	Océano Pacífico
<b>Paraíso, Tabasco, México</b>	Golfo de México

### **VI.3. Aislamiento y Cultivo Monospórico de Muestras**

Se extrajo una porción de arena de las bolsas Ziploc® hermética colocándola sobre una caja Petri. Se observó la muestra bajo un microscopio estereoscópico para localizar el ascoma de *C. maritima* sobre los granos de arena. Una vez localizado el hongo, utilizando una pinza de relojero se trasladó el grano de arena a un portaobjetos. En el porta objetos, se adicionaron tres gotas de agua estéril y una gota del detergente Tween, con lo que se realizó el lavado del ascoma, posteriormente se separó dicha estructura del grano de arena. Para la siembra, se trasladó el ascoma estéril a una caja Petri con medio solido de almidón agua de mar agar adicionado con antibióticos (penicilina, estreptomycin y cloranfenicol). Se perforó la estructura reproductiva del hongo, para la liberación de sus ascosporas (con extrema precaución para evitar dañar las ascosporas), esparciéndolas cuidadosamente por toda la superficie del medio sólido. Se incubaron las cajas sembradas durante 24 horas. El aislamiento monospórico se realizó según la metodología modificada por Hyde (1987). Posteriormente, el aislado monospórico se transfirió a un medio de cultivo líquido PDA (Papa Dextrosa Agar, por sus siglas en ingles). Dejándolo durante 10 días en un agitador, con periodo de luz y oscuridad de 12 h para un crecimiento óptimo a temperatura de laboratorio, para la extracción de ADN.

### **VI.4. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1987). Para este estudio se utilizaron 39 individuos de 8 poblaciones distintas, de playas del Océano Pacífico, Golfo de California, mar Caribe y Golfo de México. El ADN se obtuvo del micelio de las cepas monospóricas previamente cultivadas en medio líquido PDA. Se realizó una electroforesis para evaluar la calidad y concentración del ADN extraído de las muestras. Para la electroforesis se

utilizó gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1%, con un voltaje de 100V. La electroforesis se corrió durante 30 minutos. Posteriormente se observó el gel de agarosa bajo luz ultravioleta.

### VI.5. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

En la tabla número III se pueden observar los marcadores moleculares de ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) utilizados en el presente estudio. Los marcadores pertenecen a la serie No. 9 elaborados por la Unidad de Servicios de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, B.C., Canadá (Tabla 3). En la tabla 4 se puede observar la cantidad de individuos que se utilizaron para cada marcador.

Tabla III. Marcadores moleculares utilizados en el estudio.

\*Y, puede ser C o T.

ISSRs	Secuencia
UBC- 842	<b>GAG AGA GAG AGA GAG AY*G</b>
UBC- 857	<b>ACA CAC ACA CAC ACA CY*G</b>
UBC- 809	<b>AGA GAG AGA GAG AGA GG</b>

Tabla IV. Número de individuos utilizados para cada marcador

<b>Localidad</b>	<b>Marcador</b>		
	842	857	809
<b>La Paz, Baja California Sur, México.</b>	5	5	5
<b>Acapulco de Juárez, Guerrero, México.</b>	5	4	5
<b>Cancún, Quintana Roo, México.</b>	5	3	5
<b>Puerto Peñasco, Sonora, México.</b>	4	3	0
<b>Panamá, República de Panamá.</b>	5	5	5
<b>. Lumahai Beach, Kaua'i, Hawái, EUA.</b>	5	5	5
<b>La Habana, Republica de Cuba.</b>	5	5	5
<b>Paraíso, Tabasco, México.</b>	5	5	4

## VI.6. Amplificación

Dado que no existen estudios previos que utilicen los ISSRs como marcadores moleculares en la especie *C. maritima*, las condiciones de reactivos y programa de PCR utilizadas fueron estandarizados para cada uno de los marcadores utilizados en el presente estudio.



## VI.7. Análisis Estadístico de los Datos

Dada la naturaleza de los ISSRs como marcadores dominantes no se pueden obtener frecuencias de los heterócigos, ya que la presencia de bandedo indica un alelo de carácter homocigo dominante o heterocigo. Por otra parte, sí se puede calcular la frecuencia de alelos recesivos por la ausencia de bandedo. Para poder obtener dichas frecuencias de heterócigos, se supone que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando la corrección de Lynch y Milligan (1994) para reducir el sesgo estadístico. Para obtener los valores de diversidad genética como el porcentaje de polimorfismo con criterio de 95% y heterocigosis esperada ( $H_E$ ), y el coeficiente de coancestría  $\theta$  (Weir y Cockerham 1984), análogo a  $F_{st}$ , se utilizó el programa Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA, M. P. Miller, 1997, Northern Arizona University).

Para evaluar la distribución de la variación genética, inter- e intra- poblacional, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) usando el programa ARLEQUIN V.3.5.12., asumiendo que los datos son haplotipos y de la misma naturaleza que los RFLPs. El programa STRUCTURE V2.3.4 se utilizó para inferir en la distancia genética y el nivel de estructuración poblacional de las diferentes poblaciones analizadas, así como para inferir grupos genéticos entre las poblaciones estudiadas.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Los ocho marcadores de ISSRs que se utilizaron en el presente trabajo, fueron inicialmente desarrollados para plantas. Como resultado, se seleccionaron 3 de los 8 marcadores utilizados ya que produjeron un bandeo claro y reproducible, demostrando ser polimórficos para *C. maritima* (Tabla V).

Tabla V. Marcadores de ISSRs probados en el presente trabajo.

Marcador	Secuencia del marcador	Fragmentos amplificados
<i>UBC-817</i>	<b>CACACACACACACAAA</b>	<b>No</b>
<i>UBC-842</i>	<b>GAGAGAGAGAGAGAYG</b>	<b>Si</b>
<i>UNC-845</i>	<b>CTCTCTCTCTCTCTRG</b>	<b>No</b>
<i>UBC-857</i>	<b>ACACACACACACACYG</b>	<b>Si</b>
<i>UBC-858</i>	<b>TGTGTGTGTGTGTGTG</b>	<b>No</b>
<i>UBC-810</i>	<b>GAGAGAGAGAGAGAGAT</b>	<b>No</b>
<i>UBC-853</i>	<b>TCTCTCTCTCTCTCRT</b>	<b>No</b>
<i>UBC-809</i>	<b>AGAGAGAGAGAGAGAGG</b>	<b>Si</b>

#### VII.1.1. Estandarización de ISSRs

Se estandarizó cada uno de los ISSRs (*UBC-842*, *UBC-857* y *UBC-809*) utilizados en el presente trabajo, debido a que no existe literatura de referencia donde se reporten las condiciones óptimas

de PCR. En las siguientes tablas (VI, VII, VIII y IX) se describen las condiciones óptimas necesarias para realizar las reacciones de PCR para cada marcador.

Tabla VI. Estandarización del marcador *UBC-842*.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>1 Reacción</b>
Agua (H <sub>2</sub> O)		<b>13.8 µl</b>
Buffer	<b>0.5X</b>	<b>5 µl</b>
[MgCl <sub>2</sub> ]	<b>1.5mM</b>	<b>2.5 µl</b>
dNTP	<b>0.2mM</b>	<b>0.5 µl</b>
Primer	<b>0.4 µM</b>	<b>1 µl</b>
DNA		<b>2 µl</b>
Taq Polimerasa	<b>1 U/µl</b>	<b>0.2 µl</b>
Total		<b>25 µl</b>

Tabla VII. Estandarización del marcador *UBC-857*.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>1 Reacción</b>
Agua (H <sub>2</sub> O)		<b>14.3 µl</b>
Buffer	<b>0.5X</b>	<b>5 µl</b>
[MgCl <sub>2</sub> ]	<b>1.5mM</b>	<b>2 µl</b>
dNTP	<b>0.2mM</b>	<b>0.5 µl</b>
Primer	<b>0.4 µM</b>	<b>1 µl</b>
DNA		<b>2 µl</b>
Taq Polimerasa	<b>1 U/µl</b>	<b>0.2 µl</b>
Total		<b>25 µl</b>

Tabla VIII. Estandarización del marcador *UBC-809*.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>1 Reacción</b>
Agua (H <sub>2</sub> O)		<b>14.3 µl</b>
Buffer	<b>0.5X</b>	<b>5 µl</b>
[MgCl <sub>2</sub> ]	<b>1.5mM</b>	<b>2 µl</b>
dNTP	<b>0.2mM</b>	<b>0.5 µl</b>
Primer	<b>0.4 µM</b>	<b>1 µl</b>
DNA		<b>2 µl</b>
Taq Polimerasa	<b>1 U/µl</b>	<b>0.2 µl</b>
Total		<b>25 µl</b>

Tabla IX. Programa de PCR utilizado para los marcadores *UBC-842* *UBC-857* y *UBC-809*

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización			
Inicial	<b>95 °C</b>	<b>4 minutos</b>	<b>1</b>
Desnaturalización	<b>94 °C</b>	<b>30 Segundos</b>	
Alineación	<b>50 °C (UBC-842)/</b> <b>53.9 (UBC-857 y</b> <b>809)</b>	<b>40 segundos</b>	<b>37</b>
Extensión	<b>72 °C</b>	<b>1 minuto</b>	
Extensión Final	<b>72 °C</b>	<b>5 minutos</b>	<b>1</b>
	<b>4 °C</b>	$\infty$	<b>1</b>

## VII.2. Análisis Estadístico de los Datos

### VII.2.1. Variación genética

Se utilizó el software TFPGA para la obtención del porcentaje de sitios polimórficos y los valores de heterocigosis esperada. Para el marcador *UBC-842*, se obtuvo un total de 90.0% de *loci* polimórficos, con un promedio de heterocigosis de 0.156. Al examinar el mismo marcador para cada una de las poblaciones por separado, se observó que la población de Cancún tiene un mayor porcentaje de sitios polimorfismos (61.904 %) y de heterocigosis esperada ( $H_E = 0.189$ ), seguido de la población de La Paz (57.142 %P y 0.170 de heterocigosis). Por otra parte, la población de Puerto Peñasco presento un porcentaje de polimorfismo bajo (4.761 %) con un valor de heterocigosis esperada de 0.023 (Tabla X). Por los marcadores de ISSR utilizados se obtuvieron un total de 49 loci, 16 loci para *UBC-842*, 16 para el *UBC-857* y 17 para el *UBC-809*.

Tabla X. Diversidad genética obtenida con el marcador *UBC-842*.

# Población	n	%Polimorfismo	$H_E$
La Paz	5	57.142	0.170
Acapulco	5	38.095	0.119
Cancún	5	61.904	0.189
Panamá	5	19.047	0.058
Hawái	5	38.095	0.123
La Habana	5	33.333	0.126
Paraíso	5	23.809	0.087
Pto. Peñasco	4	4.761	0.023

Para el marcador *UBC-857*, tanto las poblaciones de La Paz como de La Habana tuvieron el mayor porcentaje de polimorfismo (42.857%), con una heterocigosis de 0.117 y de 0.119, respectivamente. Seguido de la población de Panamá con 33.333% de polimorfismo y 0.092 de heterocigosis. En este marcador, tanto la población de Acapulco y de Puerto Peñasco presentan el menor porcentaje de polimorfismo (4.761%) con valores de heterocigosis esperada de 0.011 y 0.013, respectivamente (Tabla XI).

Tabla XI. Diversidad genética obtenida con el marcador *UBC-857*.

# Población	N	%Polimorfismo	$H_E$
La Paz	5	42.857	0.117
Acapulco	4	4.761	0.011
Cancún	3	28.571	0.103
Panamá	5	33.333	0.092
Hawái	5	19.047	0.071
La Habana	5	42.857	0.119
Paraíso	5	28.571	0.087
Pto. Peñasco	3	4.761	0.013

Para el marcador *UBC-809*, las poblaciones con el mayor porcentaje de sitios polimórficos fueron de Cancún, Panamá y La Habana (33.333 %), con una heterocigosis esperada de 0.070, 0.105 y 0.0901, respectivamente. Seguido de la población de Acapulco con un 28.571 % de polimorfismo y 0.090 de heterocigosis esperada. La Paz, Hawái y Paraíso obtuvieron los valores más bajos de sitios polimórficos (23.809 %), con valores de heterocigosis de 0.086, 0.092 y 0.076, respectivamente (Tabla XII).

Tabla XII. Diversidad genética obtenida con el marcador *UBC-809*.

# Población	N	%Polimorfismo	$H_E$
La Paz	5	23.809	0.086
Acapulco	5	28.571	0.090
Cancún	5	33.333	0.070
Panamá	5	33.333	0.105
Hawái	5	23.809	0.092
La Habana	5	33.333	0.091
Paraíso	4	23.809	0.076

Obtenidos cada uno de los valores de heterocigosis esperada y porcentaje de polimorfismo para cada población de cada marcador usado, se sacó un promedio para cada una de las poblaciones, con la finalidad de identificar las poblaciones con los mayores índices de diversidad genética en todo el estudio (Tabla XIII). Las poblaciones de La Paz y Cancún fueron las dos poblaciones con un mayor índice de porcentaje de polimorfismo (41.269 %), al igual que de heterocigos esperados con 0.124 y 0.120, respectivamente. Seguido de la población de La Habana con 36.507 % de polimorfismo y 0.112 de  $H_E$ .

Tabla XIII. Diversidad genética global.

Población	N	%P	$H_E$
La Paz	15	41.269	0.124
Acapulco	14	23.809	0.073
Cancún	13	41.269	0.120
Panamá	15	28.571	0.085
Hawái	15	26.983	0.095
La Habana	15	36.507	0.112
Paraíso	14	25.396	0.083
Pto. Peñasco	7	4.761	0.018

En la tabla XIV se muestra el promedio de la diversidad genética a nivel litoral: El Golfo de California que incluye las poblaciones de La Paz y Puerto Peñasco; Océano Pacífico central que comprende las poblaciones de Acapulco y Panamá; Océano Pacífico Oeste con la población de Kauai; mar Caribe que abarca las poblaciones de la Habana y Cancún; y Golfo de México que incluye a la población de el Paraíso.

Tabla XIV. Diversidad genética obtenida en los litorales de estudio.

Litoral	%P	$H_E$
Golfo de California	26.189	0.082
Océano Pacífico	26.19	0.079
Océano Pacífico Oeste	26.983	0.095
Mar Caribe	38.888	0.116
Golfo de México	25.396	0.083



A nivel litoral, el mar Caribe tiene los valores más altos de diversidad, tanto en porcentaje de polimorfismo como de heterocigosis esperada, mientras que el Golfo de México presento el valor más bajo de porcentaje de polimorfismo, y el Océano Pacífico con el valor más bajo en heterocigosis.

En la tabla XV se muestran los valores de porcentaje de polimorfismo y de heterocigosis esperada a un nivel de marcador. En esta tabla se puede observar que *UBC- 842* fue el marcador que presenta un mayor porcentaje de polimorfismo con 90.47 %, y una heterocigosis esperada de 0.156. Seguido el marcador *UBC- 809* con 80.952 % de polimorfismo, pero con el número más bajo de heterocigosis esperada con 0.102. Al contrario a este último, el marcador *UBC- 857* mostró el porcentaje de polimorfismo más bajo de 76.19 %, pero con el segundo valor de heterocigosis esperada más alto con 0.108. También se puede observar el promedio del porcentaje de polimorfismo y heterocigosis esperada de los tres marcadores, con valores de 82.417 % y 0.122 respectivamente.

Tabla XV. Comparación de la diversidad genética obtenida con los tres marcadores utilizados.

Marcador	%Polimorfismo	$H_E$
UBC-842	<b>90.47</b>	<b>0.156</b>
UBC- 857	<b>76.19</b>	<b>0.108</b>
UBC- 809	<b>80.952</b>	<b>0.102</b>
Promedio	<b>82.417</b>	<b>0.122</b>

### VII.2.2. Estructura genética

Con el software TFPGA se obtuvieron los valores del coeficiente de coancestría Weir y Cockerham (1984) (con un 95% I.C y 5000 réplicas), los cuales son valores análogos al parámetro de  $F_{ST}$  (Tabla XVI). Los valores de Theta ( $\Theta$ ) de coancestría se compararon entre los distintos marcadores de ISSR usados en el presente trabajo. *UBC- 842* mostró un mayor grado

de diferenciación (0.324), seguido de *UBC-857* con (0.303). Por otra parte, los valores más bajos de  $\Theta$  se obtuvieron en *UBC-809* (0.174).

Con el software ARLEQUIN V.3.5.12. se realizó el AMOVA, para analizar la distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones. Para esto, se organizaron las distintas poblaciones en cinco grupos basándonos en los litorales a los cuales pertenecen. El grupo 1 representa al litoral del Golfo de California e incluyó las poblaciones de La Paz y Puerto Peñasco; el grupo 2 representa el litoral del Océano Pacífico central e incluyó las poblaciones de Acapulco y Panamá; el grupo 3 representa al litoral del Océano Pacífico Oeste con la población de Kauai; el grupo 4 representa al litoral del mar Caribe incluyó las poblaciones de La Habana y Cancún; y el grupo 5 representa al litoral del Golfo de México e incluyó a la población de Paraíso.

El AMOVA mostró que el mayor porcentaje de variación genética se encuentra dentro de las poblaciones: con un 68.6% (*UBC-842*), un 74.44% (*UBC-857*) y un 75.41% (*UBC-809*) (Tablas XVI, XVII, XVIII y XIX).

Tabla XVI. Valores del coeficiente de coancestría  $\Theta$  de Weir y Cockerham (1984) y de  $F_{ST}$ , para cada marcador de ISSR utilizado en el presente trabajo.

Marcador	$\Theta$	$F_{ST}$
<i>UBC-842</i>	<b>0.324</b>	<b>0.313</b>
<i>UBC- 857</i>	<b>0.303</b>	<b>0.255</b>
<i>UBC- 809</i>	<b>0.174</b>	<b>0.237</b>
Promedio	<b>0.267</b>	<b>0.268</b>

Tabla XVII. Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR *UBC-842*, datos originados por AMOVA.

<i>Fuente de variación</i>	<i>d.f.</i>	<i>% Variación</i>
<b>Entre grupos (por litorales)</b>	5	3.67
<b>Entre poblaciones dentro de grupos (entre poblaciones)</b>	2	27.68
<b>Dentro de poblaciones (muestra total)</b>	31	68.65
<b>Total</b>	38	
<b>FST</b>	0.313	

Tabla XVIII. Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR *UBC-857*, datos originados por AMOVA.

<i>Fuente de variación</i>	<i>d.f.</i>	<i>% Variación</i>
<b>Entre grupos (por litoral)</b>	4	-8.55
<b>Entre poblaciones dentro de grupos (entre poblaciones)</b>	3	34.11
<b>Dentro de poblaciones (muestra total)</b>	27	74.44
<b>Total</b>	34	
<b>FST</b>	0.255	

Tabla XIX. Valores de distribución de la variación e índices de fijación para el ISSR *UBC-809*, datos originados por AMOVA.

<i>Fuente de variación</i>	<i>d.f.</i>	<i>% Variación</i>
<b>Entre grupos (por litoral)</b>	5	-12.53
<b>Entre poblaciones dentro de grupos (entre poblaciones)</b>	1	36.24
<b>Dentro de poblaciones (muestra total)</b>	27	76.29
<b>Total</b>	33	

<b>F<sub>ST</sub></b>	0.237
-----------------------	-------

Una tercer prueba se realizó para inferir los grupos genéticos y la estructuración de las poblaciones examinadas de *C. maritima*. Utilizando STRUCTURE, se realizó una corrida de 200000 iteraciones “burning” y 500000 iteraciones “pres-burning”, con una modelo de ancestría sin cruza y con el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas. Con un set *k* de 1 a 10 con 20 iteraciones cada una. El análisis infirió que existen tres grupos genéticos en las muestras. En la mayoría de los individuos examinados se presentan dos grupos genéticos distintos (azul y verde), pero en algunos casos, como en la población de Panamá, el tercer individuo de La Paz, el primer individuo Acapulco sólo presenta un solo grupo genético (rojo). De la misma manera, en la población de Paraíso, se observa con mayor frecuencia el grupo rojo, con excepción del quinto individuo de esta población, ya que presenta los tres grupos genéticos (en mayor parte el rojo) (Figura 9). Los valores de  $F_{ST}$  para cada uno de los grupos indican un alto grado de estructura genética: el grupo rojo con 0.352, el grupo verde con 0.229 y el grupo azul con 0.234.

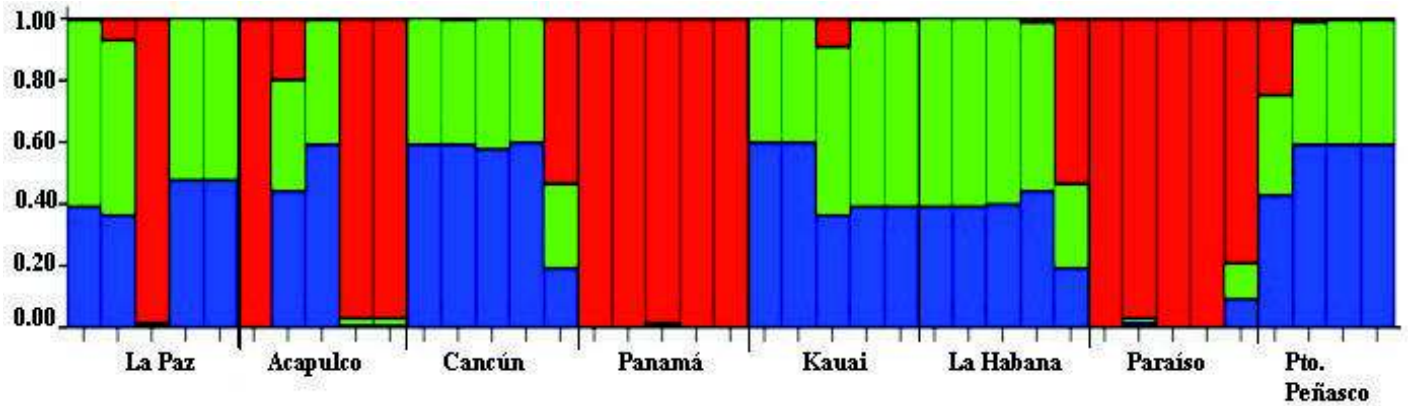


Figura 9. Asignación de cada individuo analizado para cada uno de los diferentes grupos genéticos, según el análisis mediante el software STRUCTURE. Grupo en 1 rojo, grupo 2 en verde y grupo 3 en azul.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Seleccionar un marcador molecular adecuado es esencial para plantear cualquier investigación en el campo de la genética, ya que no todos los marcadores nos serán útiles para resolver la pregunta científica planteada en la investigación. Por ejemplo, si se requiere un marcador muy específico para identificar especies del mismo género, comúnmente se utilizan los ITS o beta-tubulina. Si el objetivo es realizar una evaluación de la diversidad genética a una escala más fina, por ejemplo, comparar individuos de la misma especie se recomienda usar SNPs. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta el tiempo, dinero e infraestructura del laboratorio en donde se valla a realizar el trabajo (Freeland, 2005).

Los ISSRs demostraron ser marcadores moleculares confiables, ya que son baratos, fáciles de montar y la obtención de resultados es rápida. En el presente trabajo se puede confirmar que dichos marcadores son útiles para estimar la diversidad genética del organismo de interés, presentando también un bandeo muy bien definido y principalmente, con alta reproducibilidad. Investigaciones previas han demostrado que los ISSRs pueden detectar niveles de polimorfismo mayores que otros marcadores, como los RFLPs o los RAPDs (Esselman *et al.* 1999). Esto se debe principalmente a la naturaleza del marcador, ya que al ser una secuencia simple di o tri nucleotídica repetida, la frecuencia y distribución de los motivos microsatélite repetidos complementarios serán abundantes en el genoma, sobre todo en el ADN nuclear (Pradeep, 2002).

Por otro lado, algunas desventajas que tienen los ISSRs es que son extremadamente sensibles a los contaminantes, como son secuencias aleatorias pueden amplificar cualquier otro organismo eucarionte, incluyendo al ser humano. Otra dificultad que comúnmente se presenta al trabajar con ISSRs es la evaluación de los geles de electroforesis, ya que éstos, frecuentemente son interpretados a simple vista, por lo que se puede agregar un error al momento de determinar la variación. Este trabajo demuestra la utilidad que tienen los ISSRs como marcadores

moleculares para hacer genética de poblaciones en organismos del reino *Fungi*, por su alto nivel de polimorfismo y su reproducibilidad.

### VIII.1.1. Estandarización de ISSRs

Algo en particular que se puede observar con las muestras *C. maritima* en relación con los marcadores probados, es la preferencia por el contenido de A y G en la secuencia de los marcadores, ya que el marcador *UBC- 842* (GA<sub>8</sub>) y *UBC- 809* (AG<sub>8</sub>) fueron los que mostraron más polimorfismo a comparación al marcador *UBC-857* (AC<sub>8</sub>).

## VIII.2. Variación genética

De los tres marcadores utilizados en el presente trabajo, el marcador *UBC-842* fue el que presentó el valor más alto de porcentaje polimórfico (%P) (90.47%) y una heterocigosis esperada ( $H_E$ ) de 0.156. Examinando detalladamente cada una de las poblaciones con este marcador se puede apreciar que Cancún fue la población más diversa (%P =61.90 %;  $H_E$ = 0.189), seguido de La Paz con un 57.14 % de polimorfismo y 0.17 de heterocigos. Hacia el otro extremo, la población con los valores más bajos de diversidad fue Puerto Peñasco (%P= 4.76%;  $H_E$ = 0.023). Para el marcador *UBC-857*, los valores de polimorfismo fueron los más bajos comprado con los otros dos marcadores. Por otra parte, los valores de heterocigosis fueron los segundos más altos (%P= 76.19%;  $H_E$ = 0.108). Para este marcador la población más diversa fueron tanto La Paz como La Habana, con valores de heterocigosis levemente más altos para este último (%P= 42.85 %;  $H_E$  = 0.117 y 0.119). Nuevamente, Puerto Peñasco fue la población con valores de %P y de  $H_E$  más bajos (%P= 4.76 %;  $H_E$  =0.013). Por último, el marcador *UBC-809*, presento el segundo valor más alto de porcentaje de polimorfismo (%P= 80.95%), pero con el valor más bajo de heterocigosis ( $H_E$ =0.102). Para el caso de este marcador, las poblaciones con mayor porcentaje de polimorfismo son Cancún, Panamá y La Habana (%P= 33.333), pero difieren en heterocigosis, con valores de 0.070, 0.105 y 0.090, respectivamente. Al analizar detalladamente los resultados de diversidad genética (Tablas X, XI y XII), se aprecia que tanto

Cancún como La Habana resultaron ser las poblaciones con mayor diversidad en dos de los marcadores de ISSR (*UBC-842* y *UBC-809* para Cancún; 857 y 809 para la Habana), seguidas de La Paz (*UBC-842* con 57.1 % y en *UBC-857* con 42.85% de polimorfismo). Los 3 marcadores para cada población, Cancún y La Paz resultaron ser las poblaciones más diversas con 41.269 % de polimorfismo y, con valores de heterocigosis esperada de 0.120 para Cancún y 0.124 para La Paz. Seguidos de La Habana con 36.507% de polimorfismo con 0.112 de heterocigosis.

A nivel litoral, para el marcador *UBC-842* el mar Caribe fue quien presentó un mayor nivel de polimorfismo con 47.618 % y 0.157 de heterocigosis. Para el marcador *UBC-857*, fue el litoral del mar Caribe con los valores de diversidad más altos, con 35.714% y heterocigosis esperada de 0.111. Y para el marcador *UBC-809*, el mar Caribe resultó con el valor más alto de polimorfismo con 33.333 %, pero fue el litoral de Océano Pacífico Central quien tuvo el valor más alto de heterocigosis con 0.095. Con un promedio de 38.888 % de polimorfismo y 0.116 de heterocigosis esperada, resultando el litoral más diverso para el presente trabajo. Las dos poblaciones pertenecientes al litoral Mar Caribe resultaron ser las más diversas. Este resultado se puede deber a que las playas ubicadas en el litoral del Mar Caribe reciben una amplia variedad de nutrientes provenientes de los ecosistemas aledaños, y transportados hacia estos lugares por los ríos. Sin embargo, pese a que la playa de Paraíso está localizada cerca de las playas del Mar Caribe, y recibe las masas de agua proveniente del Mar Caribe, mostró niveles de diversidad genética bajos. Ésto puede deberse al nivel alto de perturbación antropogénica que se ha reportado en el Golfo de México (Toledo, 2005). En contraste, las playas de Cancún son reconocidas mundialmente como un destino turístico, por lo que están sujetas a estrictos controles ambientales que garantizan sus óptimas condiciones (Toledo, 2005). Por otra parte, La Paz, Baja California Sur, está dentro de lo que se es considerado “el acuario del mundo”, declarado patrimonio de la humanidad por su inmensa biodiversidad (UNESCO, 2005). El título de patrimonio de la humanidad hace destacar todas las playas del litoral como lugares turísticos a nivel internacional, siendo sus hábitats, tanto marinos como terrestres, sus principales fuente de ingreso económico, por lo que la conservación del ecosistema de sus playas es una prioridad.

Cabe resaltar que, los individuos de Puerto Peñasco mostraron valores de heterocigosis bajos (en comparación a las demás poblaciones. Dado que esta playa se encuentra geográficamente cercana a La Paz, se esperaría que esta población presentara niveles altos de



diversidad genética. Esto pudo deberse a que el tamaño de las muestras analizadas de esta zona fueron pequeñas.

### VIII.3. Estructura Genética

Los valores del coeficiente de coancestría  $\theta$  (Weir y Cockerham 1984) análogos del  $F_{st}$ , obtenidos del programa TFGA son altos. Se calcularon los valores de coancestría  $\theta$  para cada uno de los marcadores, con la finalidad de distinguir las diferencias entre éstos. En la tabla XVII en la sección de resultados podremos observar los valores de  $\theta$  para cada uno de los marcadores. *UBC-842* con valores altos de diferenciación (0.324), seguido del *UBC-857* (0.303). Por último el *UBC-809* con los valores más bajos (0.174). En general, el valor de  $\theta$  obtenido por los tres marcadores fue de 0.267, el cual es un valor alto de diferenciación, comparado con trabajos de otros autores (véase en la sección de Comparación con Resultados de Otros Autores en Discusión del presente trabajo). Tomando en consideración los altos valores del coeficiente de coancestría  $\Theta$  y de  $F_{ST}$  obtenidos, podemos inferir que las poblaciones están estructuradas, ya que algunas de ellas se encuentran separadas por grandes distancias, *i.e.* la población del Golfo de México (Paraíso) no podría mantener flujo genético con poblaciones como de La Paz o de Puerto Peñasco, o Kauai. De la misma manera para las poblaciones que se encuentran en el Océano Pacífico o Golfo de California con las poblaciones del Golfo de México y del mar Caribe. La presencia de masas continentales parece ser una barrera importante que limita el flujo genético entre las poblaciones de *C. maritima*, así como las corrientes oceánicas que se encargan de dispersar las ascosporas.

Respecto a la distribución de la variación genética en las poblaciones para cada uno de los marcadores, el AMOVA indicó que el porcentaje de variación más alto se encuentra dentro de las poblaciones (muestra total) con 68.65%Para *UBC-842*, 74.44%Para *UBC-857* y 76.29%Para *UBC-809*. Estos porcentajes indicarían los valores análogos del estadístico  $F$  alto, pero pese a eso, los resultados de AMOVA indican que no existe una diferenciación entre las poblaciones de estudio de *C. maritima*.

El programa STRUCTURE identificó tres grupos genéticos entre las poblaciones del presente estudio (Figura 9). Al observar detalladamente las poblaciones de Paraíso y Panamá,

comparten en su mayoría el mismo grupo genético (rojo), lo cual nos confirma un flujo genético entre dichas poblaciones pese a que pertenecen a distintos litorales (Golfo de México y Océano Pacífico). Sin embargo, pese a que Cancún y La Habana se encuentran en mar Caribe, más cerca al Golfo de México que el Océano Pacífico, comparten muy poco del grupo rojo (un individuo). Por otra parte, ambas poblaciones comparten frecuencias con los otros dos grupos (azul y verde). Esto se ve reflejado en los valores de  $\theta$  alto. Por otra parte, el grupo rojo no es exclusivo de la costa este mexicana, ya que en el Golfo de California también se presenta este grupo. Por otra parte, la población de Kauai presentan muy poco del grupo rojo (solo un individuo de la población posee parte del grupo). Al enfocarnos en los grupos azul y verde, la mayoría de las poblaciones comparten rasgos genéticos de éstos, incluso Paraíso, en muy bajas proporciones (una pequeña parte de un individuo), y Panamá con el grupo azul (un solo individuo). Al examinar la gráfica generada con STRUCTURE, se puede notar que aunque no existe un grupo genético exclusivo a un litoral o población en específico, se pueden identificar pequeños grupos levemente definidos.

El diagrama nos demostró que no hay una estructuración poblacional marcada, indicando flujo genético entre las poblaciones. Lo anterior coincide con el resultado obtenido con el AMOVA. Los resultados muestran que las poblaciones de *C. maritima* no se encuentran aisladas, a pesar de estar separadas por distancias geográficas o masa continental, lo cual podría deberse al amplio rango de distribución que presenta la especie. El flujo genético entre las poblaciones examinadas, se puede deber a las corrientes marinas. *e.g.* las corrientes del mar Caribe lleva aguas al Golfo de México por el canal de Yucatán, por otra parte, el mar Caribe y el Océano Pacífico se conectan por el canal de Panamá, y estas mismas aguas suben por el litoral oeste de la República Mexicana, incluso entran al Golfo de California y/o viaja por la Corriente Norte Ecuatorial llegando al archipiélago de Hawái. Además, el flujo genético observado se puede deber indirectamente a la globalización, *i.e.* los apéndices de *C. maritima* tienen una propiedad adhesiva (con la que se adhieren a los sustratos en las playas) y pueden adherirse a las superficies de barcos, también puede ser a causa de la transportación de arena de unas playas a otras, como medidas para combatir la erosión. Por otra parte también puede deberse a una intervención natural, utilizando los apéndices de las ascosporas para adherirse a aves migratorias o a otras especies marinas migratorias, pero estudios más detallados serían necesarios para poder sustentar estas hipótesis. Asimismo, las poblaciones de *C. maritima* podrían tener las mismas

presiones selectivas en todas las playas, esto ocasionaría que no haya una diferenciación marcada entre las poblaciones. Sin embargo, dicha hipótesis es la que se considera más alejada de la realidad, ya que cada playa presenta diferentes propiedades (físico-químicas), y pese a que las playas estudiadas presentan climas sub-tropical/tropical, están rodeadas por diferentes ecosistemas. Un último factor que explicaría lo sucedido en el presente trabajo, es que la población de *C. marittima* se haya separado recientemente, pero para comprobar dicho argumento se requerirían análisis más específicos.

#### VIII.4. Comparación con Resultados de Otros Autores

Actualmente existen en la literatura una gran cantidad de estudios relacionados con la genética de poblaciones. Sin embargo, estos trabajos se han enfocado principalmente a estudiar poblaciones de animales o plantas, existiendo pocos trabajos con relación a organismos del reino *Fungi*. Las escasas investigaciones que integran la micología con la genética de poblaciones se enfocan principalmente en especies de hongos patógenos (Fan *et al.*, 2010; Barrès *et al.* 2007; Milgroom y Lipari 1995) o de interés comercial (Wang *et al.*, 2012; Itten y Honegger 2010; Riccioni *et al.* 2008; Barnes *et al.* 2004; Abesha *et al.* 2003), pero muy pocos en relación a especies saprobias. Todos los ejemplos de estudios anteriormente mencionados están enfocados a hongos de hábitats terrestres, por lo que, estudios relacionados con hongos de hábitats marinos son escasos, casi nulos. La única referencia disponible en la literatura sobre hongos en estos ambientes es el trabajo realizado por Michaelis *et al.* (1987) con dos especies del género *Dendryphiella*, utilizando como marcador molecular las isoenzimas. Los autores reportaron resultados de diversidad genética bajos ( $H_E= 0.0033$ ), incluso comparándolos con los resultados de diversidad bajos de la presente investigación (Pto. Peñasco,  $H_E= 0.018$ ). Es importante mencionar, los marcadores moleculares que utilizaron, Michaelis *et al.* fueron isoenzimas, las cuales revelan poca variación en comparación con otros marcadores. Otros ejemplos de genética de poblaciones en hongos se muestran en la tabla XX, utilizando marcadores moleculares diferentes. Los valores obtenidos en diversidad genética, porcentaje de polimorfismo y/o estructura genética son diferentes en algunos, lo cual no resulta inusual, ya que son especies de hongos diferentes (incluso a nivel filo).

Tabla XX. Cuadro comparativo de resultados de diversos autores

<i>Corollospora maritima</i>	ISSR	H <sub>E</sub> /%P/F <sub>ST</sub>	0.112/82.41%/0.268	<i>Presente estudio</i> 2014
<i>Dendryphiella spp.</i>	Isoenzimas	H <sub>E</sub>	0.0033	<i>Michaelis et al.</i> 1987
<i>Monilinia fructicola</i>	ISSR	H <sub>E</sub>	0.337	<i>Fan et al. 2010</i>
<i>Cryphonectria parasítica</i>	RFLP	H <sub>E</sub>	0.43	<i>Milgroom M. y Lipari S. 1995</i>
<i>Xanthoria parietina</i>	RAPD	%P	73.5%	<i>Itten y Honegger 2010</i>
<i>Tuber melanosporum</i>	SSR, ITS, AFLP	F <sub>st</sub>	SRR: 0.215 ITS: 0.120 AFLP: 0.153	<i>Riccioni et al.</i> 2008
<i>Pleurotus eryngii</i>	RAPD/ISSR	%P	84.2%/84.3%	<i>Wang et al.</i> 2012
<i>Ustilago maydis</i>	RFLP	F <sub>st</sub>	-0.25	<i>Barnes et al.</i> 2004
<i>Melampsora larici-populina</i>	SSR	H <sub>E</sub>	0.352	<i>Barrès et al.</i> 2007
<i>Marasmius oreades</i>	DAF	%P/F <sub>st</sub>	79.7%/ -0.004	<i>Abesha et al.</i> 2003

## IX. CONCLUSIONES

Gran parte de la metodología de amplificación de ADN por medio PCR y de los marcadores de ISSR del presente trabajo se realizó desde la estandarización y comprobación de la eficiencia de estos marcadores en hongos marinos. Esto debido a la falta de referencias de genética de poblaciones en dichos organismos.

Los ISSR resultan ser marcadores moleculares muy útiles para trabajos de diversidad genética, por lo que en el presente trabajo se demostró que dichos marcadores resultaron ser reproducibles, repetibles y repetibles. Además se comprobó lo altamente polimórficos que puede ser estos marcadores en hongos marinos.

Las playas que presentaron los valores más altos de diversidad genética fueron la de La Paz, Baja California Sur (%P= 41.26;  $H_E$ = 0.124); Cancún, Quintana Roo (%P= 41.26;  $H_E$ = 0.126) y La Habana, Republicana de Cuba (%P= 36.507;  $H_E$ = 0.112). La mayoría de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones.

Pese a la barrera continental y las grandes distancias geográficas entre las poblaciones de estudio del presente trabajo, no se encontró estructuración poblacional de las poblaciones de *C. maritima*. Esto podría deberse a las dinámicas de las corrientes superficiales marinas y/o la globalización.

El presente trabajo representa una contribución importante tanto para la genética de poblaciones como para la micología marina, y también como antecedente para futuras investigaciones relacionadas con *Corollospora maritima*.

## X. RECOMENDACIONES

Al realizar futuros trabajos similares al presente trabajo, se recomienda utilizar más individuos por población e incluso más poblaciones. De la misma manera, utilizar herramientas moleculares modernas como marcadores bajo selección o específicos.

Para otros tipos de investigaciones genéticas que sea quieran realizar con *Corollospora maritima* sería necesario conocer el genoma de dicho organismo.

Los únicos trabajos de genética de poblaciones en hongos marinos son el de Michaelis *et al.* (1987), y el presente trabajo. Ambos resultaron con valores de diversidad genética bajos, por lo que serían necesario otros trabajos de genética poblacional en hongos marinos para corroborar si es normal los niveles de diversidad genética bajos estos organismos a comparación a sus parientes terrestres.

## XI. LITERATURA CITADA

- Abesha, E., G. Caetano-Anollés y K. Høiland. 2003. Population genetics and spatial structure of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* in a Norwegian sand dune ecosystem. *Mycologia*. 95:1021–1031.
- Alderman, D. J. y J.L. Polglase. 1986. Are fungal diseases significant in the marine environment?. 189-198p. (S.T. Moss, Ed.). En *The Biology of Marine Fungi*, London: Cambridge University Press.
- Baldauf, S. L. y J. D. Palmer. 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence form multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:11558-11562.
- Barghoorn, E. S. y D. H. Linder. 1944. Marine Fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia* 1: 395-467.
- Barnes, C., L. Szabo, G. May y J. Groth. 2004. Inbreeding levels of two *Ustilago maydis* populations. *Mycologia*, 96:1236–1244.
- Barrès, B., F. Halkett, C. Dutech, A. Andrieux, J. Pinon y P. Frey. 2007. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution*. 8:577–587
- Burgaud, G., T. Le Calvez, D. Arzur, P. Vandenkoornhuyse y G. Barbier. 2009. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environment. Microbiology*. 11:1588–600.
- Burgaud, G., D. Arzur, L. Durand, M. A. Cambon-Bonavita y G. Barbier. 2010. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS Microbiology. Ecology*. 73: 121-133.



- Campbell, J., C. A. Shearer, J. I. Mitchell y R. A. Eaton. 2002. *Corollospora* revisited: a molecular approach. 15–33 p. Hyde KD (Ed) En: Fungi in marine environments. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Cavaliere, A. 1966a. Marine ascomycetes: ascocarp morphology and its application to taxonomy. I. *Amylocarpus* Currey, *Ceriosporella* gen. nov., *Lindra* Wilson. *Nova Hedwigia* 10: 399-424.
- Cavaliere, A. 1966b. Marine ascomycetes: ascocarp morphology and its application to taxonomy. II. *Didymosporae*. *Nova Hedwigia* 10: 399-424.
- Cavaliere, A. 1966c. Marine ascomycetes: ascocarp morphology and its application to taxonomy. IV. Stromatic species. *Nova Hedwigia* 10: 438-452.
- Chandralata, R., R. D. Damare y S. Purnima. 2010. A Review on Deep-sea Fungi: Occurrence, Diversity and Adaptations. *Botanica Marina*, vol.53: 479-492.
- Clement, D. J., M. S. Stanley, J. O’Neil, N. A. Woodcock, D. A. Fincham, N. J. W. Clipson y P. Hoole. 1999. Complementation cloning of salt tolerance determinants from the marine hyphomycete *Dendryphiella salina* in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*. 103:1252–1258.
- Connell, L., A. Barrett, A. Templeton y H. Staudigel. 2009. Fungal diversity associated with an active deep sea volcano: Vailulu’u Seamount, Samoa. *Geomicrobiology*. J. 26: 597-605.
- Crouan, P. L. y H. M. Crouan. 1867. *Florule du Finistère*. Klincksieck, Paris and Brest
- Desmazieres, J. B. H. J. 1849. “Plantes Cryptogames de France” No. 1778. Lille.
- Duché, J. y R. Heim. 1931. Recherches sur la flore mycologique des sols sableux. *Recueil Travaux mycologiques dédiés a Louis Mangin*. 431-458.
- Dupont, J., S. Magnin, F. Rousseau, M. Zbinden, G. Frebourh, S. Samadi, B. Richer de Forges y E. B. G. Jones. 2009. Molecular and ultrastructural characterization of two ascomycetes found on sunken wood off Vanuatu Islands in the deep Pacific Ocean. *Mycologia. Research*. 113:1351–1364.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular. Introducción a la ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. México, D.F.

- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. Crawford, J. Windus y D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insoerata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*. 8: 443-451.
- ETESA. 2012. Clima de Panamá. Consultado en mayo del 2014. ([http://www.hidromet.com.pa/clima\\_panama.php](http://www.hidromet.com.pa/clima_panama.php))
- Fan, J., L. Guo, J. Xu, Y. Luo y T. Michailide. 2010. Genetic Diversity of Populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. *The Journal of Eukaryot. Microbiology*. 57: 206–212.
- Fell, J. W., A. Stätzell-Tallman, G. Scorzetti y M. H. Gutiérrez. 2010. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 99:533-49. doi:10.1007/s10482-010-9521-6
- Höhnk, W. 1952. Studien zur Brack-und Seewassermykologie 1. Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung, Bremerhaven 1:115–125.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycologia. Research*. 95:641–55.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycologia. Research*. 105:1422–32.
- Hosoya, T., D. Hirose, M. Fujisaki, T. Osono, T. Kubono, S. Tokumasu y M. Kakishima. 2010. Internal transcribed spacer haplotype diversity and their geographical distribution in *Dasyscyphella longistipitata* (*Hyaloscyphaceae*, Helotiales) occurring on *Fagus crenata* cupules in Japan. *Mycoscience*. 51:116–122
- Hughes, G. C. 1974. Geographical distribution of the higher marine fungi. Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung, Bremerhaven (Suppl. 5):419-441.
- Hughes, G. C. 1975. Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. I. Lignicolous, caulicolous and foliicolous species. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 13: 69-180.

- Hyde, K. D. 1989a. Ecology of tropical marine fungi. *Hydrobiologia* 178: 199-208.
- Hyde, K. D. y S. A. Alias. 2000. Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans*. *Biology and Conservation* 9: 393- 402.
- Hyde, K. D., E. B. Gareth Jones, E. Leñaño, S. B. Pointing, A. D. Poonyth y L. L. P. Vrijmoed. 1998. Role of the fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation*. 7: 1147-1161.
- INEGI. Carta de climas, Baja California sur. Consultado en mayo 2014. (<http://cuentame.inegi.gob.mx/monografias/informacion/bcs/territorio/clima.aspx?tema=me&e=03>)
- INEGI. Carta de climas, Sonora, Consultado en mayo 2014. (<http://cuentame.inegi.gob.mx/monografias/informacion/son/territorio/default.aspx?tema=me&e=26>).
- INEGI. Carta de climas, Quintana Roo, Consultado en mayo de 2014. (<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/qroo/territorio/clima.aspx?tema=me&e=23>).
- Itten, B. y R. Honegger. 2010. Population genetics in the homothallic lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina*. *The Lichenologist*. 42: 751–761.
- Johnson, R. G. 1980. Ultrastructure of ascospore appendages of marine ascomycetes. *Botanica Marina*. 23: 501-527.
- Johnson, T. W. y F. Sparrow. 1961. *Fungi in Oceans and Estuaries*. Weinheim J. Cramer, New York.
- Jones, E. B. G. 1995. Ultrastructure and taxonomy of the aquatic ascomycetous order Halosphaeriales. *Canadian Journal of Botany*. 73: S790-S801.
- Jones E. B. G. y S. T. Moss. 1978. Ascospore appendages of marine ascomycetes: an evaluation of appendages as taxonomic criteria. *Marine Biology*. 49: 11-26.

- Jones E. B. G., R. G. Johnson y S. T. Moss. 1983. Taxonomic studies of the *Halosphaeriaceae*: *Corollospora*. Botanical Journal of the Linnean Society. 87: 193-212.
- Jones, E. B. G., I. Chatmala y K. L. Pang. 2006. Two new genera of the *Halosphaeriaceae* isolated from marine habitats in Thailand: *Pseudoligninicola* and *Thalespora*. Nova Hedwigia. 83: 219-232.
- Jones, E. B. G., y D. H. Jennings. 1964. The effect of salinity on the growth of marine fungi in comparison with non-marine species. Transactions of the British Mycological Society. 47, 619-625.
- Jones, E. B. G. y S. T. Moss. 1978. Ascospore appendages of marine ascomycetes: an evaluation of appendages as taxonomic criteria. Marine Biology. 49: 11-26.
- Jones, E. B. G. y S. T. Moss. 1980. Further observations on the taxonomy of the *Halosphaeriaceae*. Botanica Marina. 23: 483-500.
- Jones, E. B. G. y J. I. Mitchell. 1996. Biodiversity of marine fungi. 31–42p. (A Cimerman Gunde-Cimerman N., Eds) En Biodiversity: International Biodiversity Seminar. National Institute Chemistry and Slovenia National Commission for UNESCO.
- Jones, E. B. G., J. Sakayaroj, S. Sakayaroj, S. Somrithipol y K. L. Pang. 2009a. Classification of marine *Ascomycota*, anamorphic taxa and *Basidiomycota*. Fungal Diversity. 35:1–187.
- Khan, A. G. y M. Belik. 1995. Occurrence and ecological significance of mycorrhizal symbiosis in aquatic plants. 628-660p. (A. Varma and B. Hock, Eds). In Mycorrhiza. Berlin: Springer Verlag.
- Kirk, P. W., B. J. Dyer y J. Noé. 1991. Hydrocarbon utilization by higher marine fungi from diverse habitats and localities. Mycologia. 83: 227-230.
- Koch J. 1986. Some lignicolous marine fungi from Thailand, including two new species. Nordic Journal of Botany. 6: 497–499
- Koch, J., K. L. Pang y E. B. G. Jones 2007. *Rostrupiella danica* gen. et sp. nov., a *Lulworthia*-like marine lignicolous species from Denmark and the USA. Botanica Marina 50: 1-8.

- Kohlmeyer, J. 1960. Wood inhabiting marine fungi from the Pacific North West and California. *Nova Hedwigia*. 2: 293-343.
- Kohlmeyer, J. 1962. Halosphile Pilze von den Ufern Frankreichs. *Nova Hedwigia* 4: 389-420.
- Kohlmeyer, J. 1966b. Ecological observations on arenicolous marine fungi. *Z. Allg. Microbiology*. 6, 94-105.
- Kohlmeyer, J. 1972. A revision of *Halosphaeriaceae*. *Canadian Journal of Botany*. 50: 1951-1963.
- Kohlmeyer, J. 1974. On the definition and taxonomy of higher marine fungi. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven (Suppl. 5)*: 263-281.
- Kohlmeyer, J. 1977. New genera and species of higher fungi from the deep sea. (1615-5315m). *Reviews in Mycology*. 41, 189-206.
- Kohlmeyer, J. 1981. Marine fungi from Easter Island and notes on *Thalassoascus*. *Mycologia*. 5: 833-843
- Kohlmeyer, J. 1984. Tropical marine fungi. *Marine Ecology*. 5: 329-378.
- Kohlmeyer, J. y E. Kohlmeyer. 1964-1969. *Icones Fungorum maris*. Vol. 1. Tabs. 1-90. Weinheim/Lehr., J.Cramer.
- Kohlmeyer, J. y E. Kohlmeyer. 1971b. *Synoptic Plates of Higher Marine Fungi. An Identification Guide For the Marine Environment*. Cramer, Lehre.
- Kohlmeyer, J. y E. Kohlmeyer. 1979. *Marine Mycology The Higher Fungi*. Academic Press. Nueva York. 690 p.
- Kohlmeyer, J. y B. Volkmann-Kohlmeyer. 1987. Reflections on the genus *Corollospora* (ascomycetes). *Transactions of the British Mycological Society*. 88:181-188.
- Kohlmeyer, J. y B. Volkmann-Kohlmeyer. 1989. *Corollospora armoricana* sp. nov., an arenicolous ascomycete from Brittany (France). *Canadian Journal of Botany*. 67:1281-1284

- Kohlmeyer, J. y B. Volkmann-Kohlmeyer. 1991. Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina*. 34:1–61.
- Kohlmeyer, J. y B. Volkmann-Kohlmeyer 1997. A new *Corollospora* from Californian beaches. *Botanica Marina*. 40: 225–228.
- Lara-Lara, J. R., V. A. Fuentes, B. G. Carmen, D. C. Victoria, E. B. Elva, G. A. María de la Cruz, G. C. Gilberto, R. J. Guadalupe, S. Á. Ramón, S. G. Luis Arturo, T. G. Margarito, J. Eduardo Valdez-Holguín. 2008. Los ecosistemas marinos.. 135-159 p. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México
- Lewontin, R. C. 1991. Twenty-five years ago in Genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or Millstone?. *Genetics*. 128: 657-662.
- Liberra, K. y U. Lindequist. 1995. Marine fungi: a prolific resource of biologically active natural products? *Pharmazie*. 50: 583–588
- Meyers, S. P. 1968. Observations on the physiological ecology of marine fungi. *Bull. Misaki Marine Biology Inst. Kyoto Univ.* 12: 207-225.
- Michaelis, K. C., R. V. Gessner y M. A. Romano. Population genetics and systematics of marine species of *Dendryphiella*. *Mycologia*. 79: 514-518.
- Milgroom, M. y S. Lipari. 1995. Population Differentiation in the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*, in Eastern North America. *The American Phytopathological Society*. 85: 155-160.
- Mueller, G. M. y J. P. Schmit. 2007. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodiversity Conservation*. 16: 1–5.
- Murphy, S. J., H. E. Hurlburt, y J. J. O'Brien, 1999: The connectivity of eddy variability in the Caribbean Sea, the Gulf of Mexico, and the Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research*. 104, 1431-1453.
- Nakagiri, A. 1985. Teleomorph and anamorphs relationships in marine ascomycetes (*Halosphaeriaceae*). *Botanica Marina*. 28: 485-500.

- Nakagiri, A. y K. Tubaki. 1986. Ascocarp peridial wall structure in *Corollospora* and allied genera on *Halosphaeriscaeae*. 245-251p. Moss S.T. (Eds). En *The Biology of Marine Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge
- Nakagiri, A. y R. Tokura. 1987. Taxonomic studies of the genus *Corollospora* (*Halosphaeriaeae*, *Ascomycotina*) with descriptions of seven new species. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 28: 413-436.
- Neumann, H., D. Strübing, M. Lalk, S. Klaus, S. Hübner, A. Spannenberg, U. Lindequist y M. Beller. 2006. Synthesis and antimicrobial activity of N-analogous corollosporines. *The Royal Society of Chemistry*. 4: 1365–1375.
- O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo y R. Vilgalys. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5544–50.
- Ohzeki, T. y K. Mori. 2001. Synthesis of Corollosporine, an Antibacterial Metabolite of the Marine Fungus *Corollospora maritima*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 65: 172-175.
- Prasannarai, K., K. Ananda y K. R. Sridhar. 2000. *Corollospora indica*, a new marine fungal species from west coast of India. *Journal of Environmental Biology*. 21: 235–239.
- Pradeep, R. M., N. Sarla y E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Riccioni, C., B. Belfiori, A. Rubini, V. Passeri, S. Arcioni y F. Paolocci 2008. *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under. *New Phytologist*. 180: 466–478.
- Rees, G., R. Johnson y E. Jones. 1979. Lignicolous marinefungi from Danish sand dunes. *Transactions of the British Mycological Society*. 72: 99-106.
- Scherrer, P. y G. Miller. 1989. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. *Marine Pollution Bulletin*. 20: 430-32.

- Shearer, C. A. 1986. The significance of teleomorph/anamorph connections in the classification of marine Ascomycotina. In the Biology of marine Fungi.
- Singh, P., C. Raghukumar, P. Verma y Y. Scouche. 2010 Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. Fungal Diversity. 40: 89–102.
- Spatafora, J. W. y M. Blackwell. 1994. The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. Mycological Research 98:1-9.
- Steenkamp, E. T., J. Wright y S. L. Baldauf. 2006. The protistan origins of animals and fungi. Molecular Biological Evolution. 23: 93-106.
- Sundari, R., S. Vikineswary, M. Yusoff y E. B. G. Jones. 1996. *Corollospora besarispora*, a new arenicolous marine fungus for Malasya. Mycological Research. 100: 1259-1262.
- Toledo Ocampo, A., 2005. Marco conceptual: caracterización ambiental del Golfo de México, 25-52 p. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología.
- Tokura, R. 1984. Sand-inhabiting marine fungi from Japanese beaches. Botanica Marina. 27: 567-569.
- Tubaki, K. 1969. Studies on the Japanese marine fungi, lignicolous (III), algicolous group and a general consideration. Annual Report Institute of Fermentation, Osaka 4: 12-41.
- Wainright, P. O., G. Hinkle, M. L. Sogin y S. K. Stickel. 1993. Monophyletic origins of the Metazoa: an evolutionary link with fungi. Science 260: 340-342.
- Wang, S., Y. Yin, Y. Liu y F. Xu. 2012. Evaluation of Genetic Diversity Among Chinese *Pleurotus eryngii* Cultivars by Combined RAPD/ISSR Marker. Current Microbiology. 65:424–431.
- Warner-Merner, D. 1972. Arenicolous fungi from the South and Central Gulf Coast of Florida. Nov Hedwig 23: 915-922.



Werdermann, E. 1922. *Corollospora maritima* W, ein salzliebender Pilze von des Nordseeküste.  
Notizblatt des Königl. botanischen Gartens und Museums zu Berlin. 8:248–250.

Winant, C. y A. Bratkovich. 1981 Temperature and currents on the Southern California shelf:  
a description of the variability. *Journal of Physical. Oceanography*. 11:71-86.