

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**



Laboratorio de Ficología

Evaluación taxonómica de *Sargassum buxifolium*  
(Chauvin) M.J. Wynne de dos localidades de Veracruz  
con datos moleculares

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A**  
**LISANDRO HERNANDEZ ANAYA**  
ÁREA: FICOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. SERGIO DÍAZ MARTÍNEZ

ASESOR INTERNO: DRA. ALEJANDRINA GRACIELA AVILA ORTIZ

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **HERNANDEZ ANAYA LISANDRO**, con número de cuenta **410042902**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **7 de abril de 2015** a las **14:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en B.E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ

*E. Mendieta Márquez*

**VOCAL** M. en C. SERGIO DÍAZ MARTÍNEZ\*

*Sergio Díaz Martínez*

**SECRETARIO** Dra. ALEJANDRINA GRACIELA AVILA ORTIZ

*Alejandrina Graciela Avila Ortiz*

**SUPLENTE** Biól. ANGÉLICA ELAINE GONZÁLEZ SCHAFF

*Angélica Elaine González Schaff*

**SUPLENTE** M. en C. ISAURA ESCALANTE VARGAS

*Isaura Escalante Vargas*

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación taxonómica de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne de dos localidades de Veracruz con datos moleculares.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
México, D.F., a 3 de marzo de 2015

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**

**DIRECTOR**  
**ZARAGOZA**  
**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme la oportunidad de formarme como Biólogo.

A la DGAPA por el Proyecto PAPIME PE208612, el financiamiento de las salidas a campo y la beca otorgada.

A la Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez por su asesoría y préstamo de equipo del Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM.

A los miembros del sínodo M. en C. Sergio Díaz Martínez, Dra. Alejandrina G. Avila Ortiz, M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez, Biol. Angélica Elaine González Schaff y M. en C. Isaura Escalante Vargas por la revisión del escrito y sus observaciones que lo enriquecieron.

Con especial dedicación

A mis padres **Isabel Anaya** y **Felipe Hernandez**

A mis hermanos **Cristina, Erika, Eloisa, Isabel, Omar y Enrique**

A mi sobrino **José Miguel**

Por los que día con día me esforcé teniendo siempre su apoyo, siendo una gran familia a la que amo y no cambiaría por nada. Siempre caminando juntos. Este logro es de mi familia.

**“Es intentando lo imposible como se realiza lo posible”**

**Henri Barbusse**

<b>Contenido</b>	<b>Páginas</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO TEÓRICO.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 General.....	15
5.2 Particulares.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	16
6.1 Material ficológico.....	16
6.2 Análisis morfológico.....	17
6.3 Análisis molecular.....	17
6.3.1 Extracción de ADN.....	17
6.3.2 Amplificación.....	18
6.3.3 Secuenciación.....	23
6.3.4 Análisis cladísticos.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Análisis morfológico.....	24
7.2 Análisis molecular.....	28
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
9. CONCLUSIÓN.....	37
10. CONSIDERACIONES FINALES.....	37
11. REFERENCIAS.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Páginas

Figura 1. Zona de estudio, comprende a las localidades Punta Delgada (PD) y Playa Muñecos (PM).	16
Figura 2. Caracteres morfológicos presentes en <i>Sargassum</i> . Modificado de Taylor (1960).	19
Figura 3. Caracteres morfológicos presentes en <i>Sargassum</i> . Modificado de Littler & Littler (2000).	20
Figura 4. Consenso estricto del marcador molecular <i>rbcLS</i> .	29
Figura 5. Consenso estricto del marcador molecular <i>cox3</i> obtenido mediante MP.	30
Figura 6. Árbol obtenido mediante NJ para el marcador molecular <i>rbcLS</i> .	32
Figura 7. Árbol obtenido mediante NJ del marcador molecular <i>cox3</i> .	33
Figura 8. Árbol de Máxima verosimilitud de ITS-2, <i>rbcLS</i> y <i>cox3</i> . Tomado de Camacho <i>et al.</i> , 2014.	36

## ÍNDICE DE LÁMINAS

## Páginas

Lamina 1. Ejemplares revisados de <i>Sargassum buxifolium</i> de Playa Muñecos y Punta Delgada.	21
Lamina 2. Primer y segundo morfotipo y caracteres que presentan.	26
Lámina 3. El tercer y cuarto morfotipo con margen y caracteres que presentan	27

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Páginas</b>
Tabla 1. Primers utilizados en amplificación	22
Tabla 2. Condiciones de amplificación para los genes <i>cox3</i> y <i>rbcLS</i>	22
Tabla 3. Morfotipos encontrados en ambas localidades	24
Tabla 4. Caracteres morfológicos revisados para los cuatro morfotipos de Playa Muñecos y Punta Delgada	25

<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>Páginas</b>
Anexo1. Resumen de los caracteres del género <i>Sargassum</i>	43
Anexo 2. Listado de ejemplares revisados y depositados en la colección ficológica del herbario FEZA	44
Anexo 3. Secuencias utilizadas en este estudio	45
Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia de ADN	50
Anexo 5. Electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación para los marcadores moleculares a) <i>rbcLS</i> y b) <i>cox3</i>	50

## RESUMEN

El género *Sargassum* (Phaeophyceae) tiene importancia económica, ecológica y farmacológica. Recientemente en México se han realizado estudios de los efectos citostáticos de los extractos de *Sargassum buxifolium* en cáncer cervicouterino. Sin embargo existe incertidumbre sobre la identidad taxonómica de los especímenes utilizados debido a la plasticidad morfológica, variación poblacional en los caracteres diagnósticos o su estado fenológico. Con el fin de evaluar la conespecificidad de los individuos utilizados en este estudio se analizaron los caracteres morfológicos de dos poblaciones de *S. buxifolium* y las secuencias de ADN (con los marcadores moleculares *cox3* y *rbcLS*) mediante los métodos de Máxima Parsimonia y Neighbor Joining. El análisis morfológico indicó que *S. buxifolium* presentó cuatro morfotipos en las dos poblaciones. Sin embargo el análisis molecular confirma la conespecificidad de los ejemplares en ambas localidades.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las algas pardas (clase Phaeophyceae) son organismos casi exclusivamente marinos que abundan en costas rocosas, en aguas frías, agitadas y bien aireadas con morfología muy variada, reconociéndose cerca de 285 géneros (Mauseth, 1995 y De Reviere *et al.*, 2007), entre ellos el género *Sargassum*.

Este género tiene importancia económica, ecológica y farmacológica destacando su actividad anti-inflamatoria, antibacteriana, antiviral, anticoagulante, anti-melanogénica, hepatoprotector y neuroprotector (Liu *et al.*, 2012). En particular *S. hornery*, presenta actividad anticancerígena (Ermakova *et al.*, 2011) y *S. pallidum* presenta propiedad antitumoral y antioxidante (Ye *et al.*, 2008). Recientemente en México se han realizado estudios de los efectos citostáticos de los extractos de *Sargassum buxifolium* en cáncer cervicouterino (Luna, 2012 y Santiago, 2014). Sin embargo, es necesario conocer con certeza si los ejemplares utilizados pertenecen a la misma especie, ya que de lo contrario se añade nueva variable a los resultados obtenidos en dichos estudios.

La determinación taxonómica y clasificación tradicional de *Sargassum* está basada en caracteres morfológicos principalmente: presencia o ausencia de disco de fijación, ramificación de los ejes, la forma de los filoides, vesículas y receptáculos (Yoshida, 1983 y Graham & Wilcox, 2000). Generalmente la forma del talo puede ser más o menos lineal o arbustivo, en hábitats expuestos mide pocos centímetros pero llega a medir varios metros en áreas protegidas. Presencia o ausencia de pedicelos (en filoides, receptáculos y aerocistos). La línea media puede ser corta y gruesa o delgada (Mattioli & Payri, 2011) (Anexo 1). Sin embargo, la determinación taxonómica de las especies resulta conflictiva, principalmente debido a la plasticidad morfológica de los individuos, variación poblacional en los caracteres diagnósticos o su estado fenológico.

Para el género *Sargassum* se han descrito 933 especies a nivel mundial, con cerca de 1000 epítetos de los cuales son aceptados taxonómicamente 339 (Guiry

y Guiry, 2014). Dreckmann (1998) registró para las costas de Veracruz siete especies de *Sargassum*: *S. cymosum* C. Agardh, *S. filipendula* C. Agardh, *S. fluitans* (Borgesen) Borgesen, *S. natans* (Linnaeus) Gaillon, *S. polyceratium* Montagne, *S. vulgare* C. Agardh y dos variedades *S. polyceratium* var. *ovatum* (F.S.Collins) W.R.Taylor y *S. hystrix* var. *buxifolium* Chauvin, Además Ortega y colaboradores (2001) reportan *S. affine* J. Agardh, *S. brevipes* Kützinger, *S. filipendula* C. Agardh var. *filipendula*, *S. filipendula* C. Agardh var. *montagnei* (Bailey ex Harvey) Grunow, *S. hystrix* J. Agardh var. *subcristatum* Grunow y *S. polyceratium* Montagne var. *polyceratium*, *S. buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne (= *S. hystrix* var. *buxifolium* Chauvin), esta última fue descrita por Chauvin en 1848 y se ha elevado a la categoría taxonómica de especie por Wynne (2011).

Dreckmann (1998) registra esta especie en las siguientes localidades del estado de Veracruz: Playa Hotel Pensiones, Isla Sacrificios, Isla de En medio, Punta de Antón Lizardo, Laguna de Alvarado, Arrecife los Hornos.

## 2. MARCO TEÓRICO

La identificación de especies mediante el código de barras con secuencias de ADN fue comenzada por Hebert y colaboradores (2003), quien propuso al marcador molecular COI (citocromo c oxidasa I) como la base de un sistema de bioidentificación global para animales, este sistema brindará una solución confiable, efectiva y accesible para el problema de la identificación de especies así como la generación de conocimientos nuevos sobre la diversificación de la vida y las reglas de la evolución molecular.

La identificación de especies de algas utilizando este enfoque se ha llevado a cabo por diversos autores entre los que se encuentran Le Gall & Saunders que resolvieron 29 especies de la familia Phylloporaceae (2010a) y 18 grupos genéticos del orden Nemaliales (Rhodophyta) (2010b) basados en el análisis del código de barras. Manghisi y colaboradores (2011) confirmaron con el marcador COI a los especímenes de *Hypnea cornuta* identificados con caracteres morfológicos. Vergés y colaboradores (2014) confirmaron seis especies de *Kallymenia* pertenecientes a la flora algal del Mediterráneo.

El uso del código de barras en las algas pardas se ha llevado a cabo por Kucera & Saunders (2008) empleando el marcador COI para las especies del género *Fucus*, McDevit & Saunders (2009) trabajaron con 29 especies pertenecientes a 20 géneros en 9 familias, donde se incluye a *Sargassum* y otros taxones de la familia Sargassaceae y consideraron a COI como un marcador capaz de diferenciar entre especies. Los mismos autores (2010) confirmaron la presencia de 12 especies de la familia Laminariaceae con el marcador COI-5'. Finalmente Mattio y Payri (2010) evaluaron el potencial de cinco marcadores para identificar especies de *Sargassum* subgénero *Sargassum*, reportando los marcadores mitocondriales *cox3* (citocromo c oxidasa 3), COI y *mtsp* (mitocondrial spacer) con potencial para el código de barras y a los marcadores ITS-2 y al operon parcial cloroplástico RubisCO como marcadores inadecuados.

Entre otros estudios realizados para el género *Sargassum* utilizando diferentes marcadores moleculares, destacan Mattio y colaboradores (2008), quienes revisaron taxonómicamente ejemplares de la Polinesia Francesa. En el estudio se encontró la atribución de 18 diferentes epítetos para la especie de este género registradas desde 1828 de los cuales solo consideraron tres válidos, los demás fueron transferidos a *S. pacificum* (debido al polimorfismo). Asimismo, Mattio y colaboradores (2009) llevaron a cabo una revisión enfocándose en el subgénero *Sargassum*, en donde reconocieron cuatro morfotipos pertenecientes a *S. aquifolium*, *S. ilicifolium*, *S. polycystum* y *S. polyphyllum*. Mattio y colaboradores en el 2010 hicieron una revisión con énfasis en la sección *Acanthocarpicae*, en la cual los caracteres diagnósticos para discriminar a las secciones dificultaron la identificación debido a la convergencia morfológica y al alto polimorfismo. Los tres estudios fueron basados en análisis morfológicos y moleculares utilizando los marcadores nuclear (ITS2), mitocondrial (*cox3*) y de plastidio (*rbclS*).

Cho y colaboradores (2012) evaluaron la diversidad del género al sur de Corea, utilizando cuatro marcadores moleculares (ITS2, *rbcl*, *psaA* y *cox3*), destacando que los resultados del análisis individual y combinado de los datos moleculares fueron consistentes con la identificación tradicional.

Finalmente Camacho y colaboradores (2014) encontraron 9 morfotipos del género *Sargassum* en la región tropical oeste del Caribe Colombiano, ocho de los cuales fueron congruentes con las descripciones originales, el análisis molecular (*rbclS*, *cox3*, *mtsp* y ITS-2) los recupera en una politomía.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en México se ha estudiado el efecto citostático de muestras de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne provenientes Veracruz, Golfo de México. Sin embargo, esta especie presenta variaciones morfológicas entre sus poblaciones lo que dificulta su determinación taxonómica y puede conducir a la confusión con otras especies. En el presente trabajo se evaluó la conespecificidad de individuos utilizados para los estudios de cáncer los cuales putativamente se han asignado a *S. buxifolium*. Para ello se analizaron los caracteres morfológicos y las secuencias de ADN mitocondrial y de plastidio.

### 4. HIPÓTESIS

Los especímenes determinados taxonómicamente como *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne recolectados en Playa Muñecos y Punta Delgada, Veracruz presentan variación morfológica, sin embargo el análisis de secuencias moleculares (*cox3* y *rbcLS*) confirmará su conespecificidad.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 General

Evaluar la conespecificidad de individuos de dos poblaciones de *Sargassum buxifolium* utilizados en estudios anticancerígenos utilizando caracteres morfológicos y marcadores moleculares.

#### 5.2 Particulares

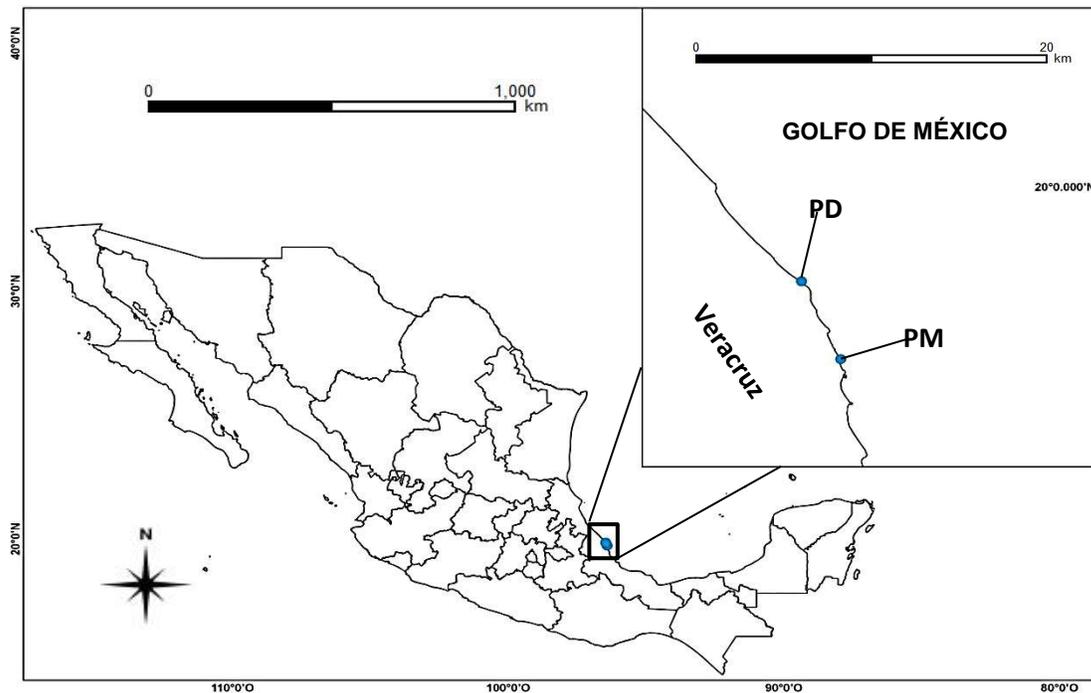
Analizar los caracteres morfológicos entre los ejemplares de *Sargassum buxifolium* de ambas localidades.

Obtener y analizar las secuencias de ADN con los marcadores *rbcLS* (Plastidio) y *cox3* (Mitocondria) de *Sargassum buxifolium*.

Contrastar los resultados generados de datos morfológicos vs. moleculares.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

La zona de estudio comprende dos localidades ubicadas en la región central del estado de Veracruz, corresponde a Playa Muñecos (PM) y a Punta Delgada en donde fueron colectados los ejemplares de *Sargassum* sp. (Figura 1).



**Figura 1.** Zona de estudio, comprende a las localidades Punta Delgada (PD) y Playa Muñecos (PM).

### 6.1 Material ficológico

El material biológico fue recolectado de manera manual con ayuda de una espátula desde el disco de fijación. Algunos ejemplares se fijaron en formol al 4% para revisión morfológica de caracteres, mientras que otros fueron seleccionados para el análisis molecular. Para los últimos se tomó un fragmento al que se le retiraron impurezas y las epífitas con un cepillo de cerdas suaves y agua destilada, se introdujo en bolsas con sílica gel para su deshidratación anotando los datos de recolecta, y el resto del ejemplar (Voucher) se herborizó y secó en una prensa botánica, Los ejemplares fueron depositados en la colección ficológica del herbario FEZA.

## 6.2 Análisis morfológico

Se revisaron 20 ejemplares para cada población (Lamina 1 y Anexo 2). Con ayuda de un microscopio estereoscopio se observaron y midieron los siguientes caracteres macroscópicos (Figura 2 y 3): ancho y largo de los filoides, tipo de margen, disposición de los criptostomatas. Con ayuda de un microscopio de campo claro se midió el diámetro de los criptostomatas. Posteriormente se revisaron los caracteres que comparten los ejemplares de ambas poblaciones.

## 6.3 Análisis molecular

Se emplearon nueve ejemplares determinados como *Sargassum buxifolium*. Para evaluar la afinidad con otras especies a nivel mundial se utilizaron 162 secuencias del género *Sargassum* disponibles en GenBank (disponible en línea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y como grupo externo se emplearon a *Turbinaria turbinata* y *T. ornata*, género hermano de *Sargassum* (Anexo 3).

### 6.3.1 Extracción de ADN

El ADN de los organismos se extrajo con el método del 2X CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Doyle & Doyle, 1987 modificado por Salazar comp. Pers. 2014). Un fragmento de alga se cargó en tubos para TissueLyser de QIAGEN y fueron congelados a -70 °C durante 24 horas. Posteriormente fueron trituradas durante dos minutos en el TissueLyser para producir un polvo fino.

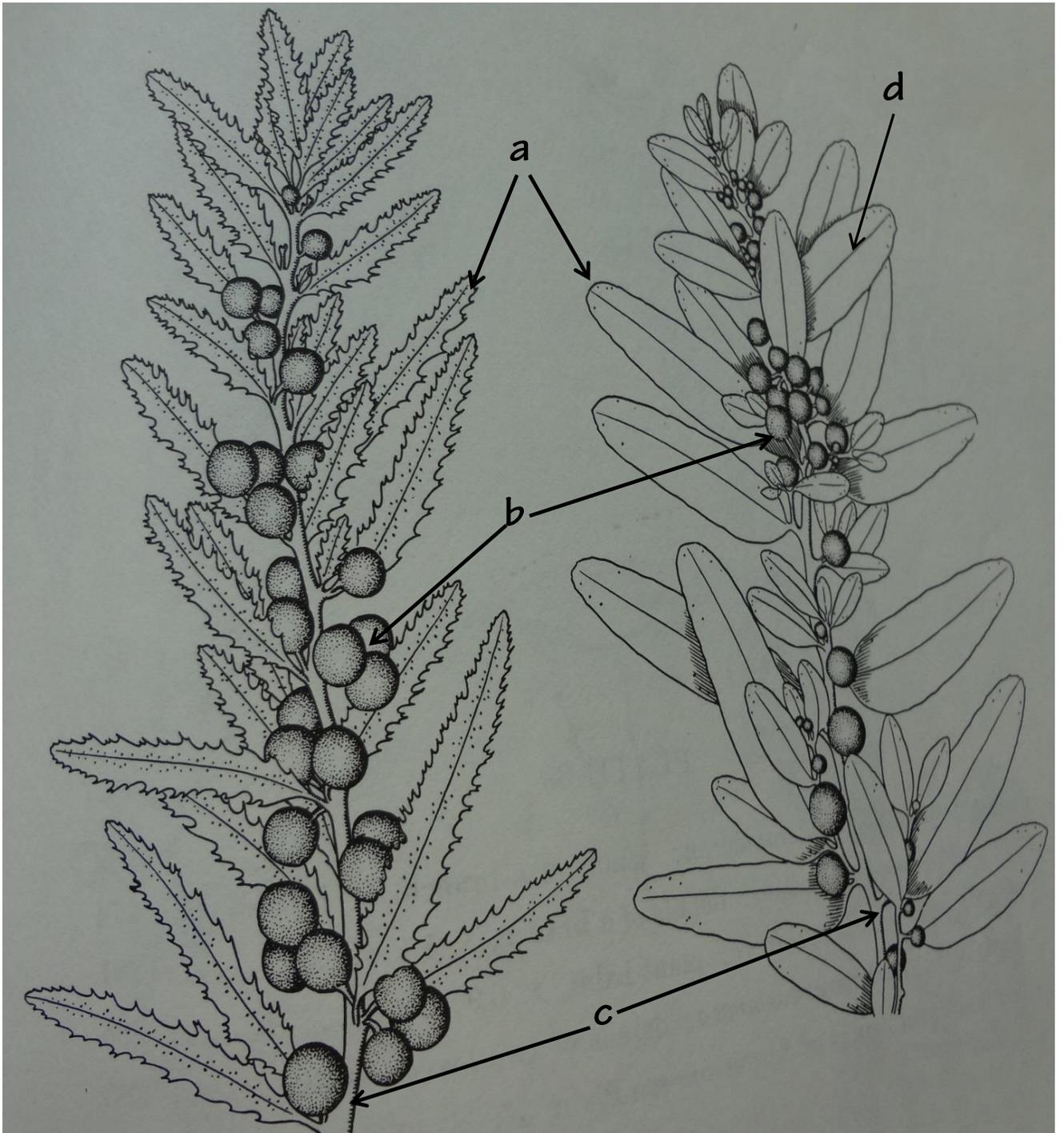
Se adicionó 500 µL de solución CTAB precalentada a cada tubo y se dejó incubar a 65 °C durante 30 min. Posteriormente el ADN fue precipitado con 350 µL de isopropanol a -20° C, invirtiendo suavemente el tubo varias veces hasta observar la precipitación como un enturbiamiento de la mezcla extracto-alcohol. Se dejaron reposar los extractos a -20° C durante una hora. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13, 000 RPM durante 5 min y se descartó el líquido. Se lavó el ADN con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugaron las muestras nuevamente a 13, 000 RPM durante 3 min y se desechó el líquido cuidando de no perder el precipitado. Las muestras fueron secadas en una centrifuga de vacío durante 10

min. a temperatura ambiente. Ya seco el precipitado, fue re-suspendido en 50  $\mu$ L de tampón Tris bajo EDTA y se le preservó a  $-20^{\circ}$  C. se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gelred<sup>+</sup> Nucleic Acid para verificar la presencia de ADN (Anexo 4).

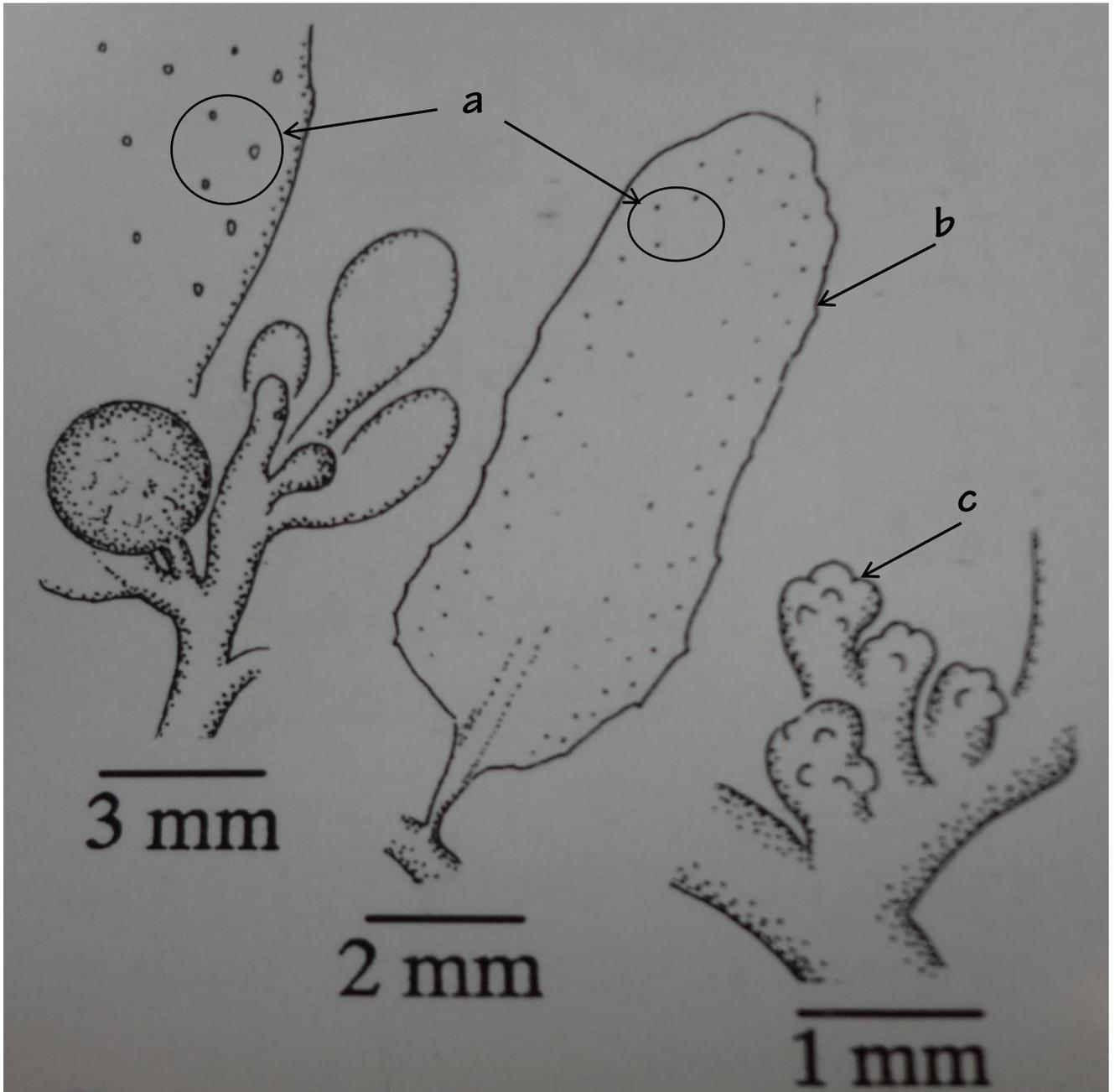
### 6.3.2 Amplificación

Las regiones de ADN de interés para el estudio fueron amplificadas mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando "Taq PCR Core Kit" (Qiagen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para el gen *rbclS* se utilizaron los primers 3F y S97R y el gen *cox3* se amplificó con los primers CF34 y C3R20 (Tabla 1). Las condiciones de amplificación para ambos genes se muestran en la Tabla 2.

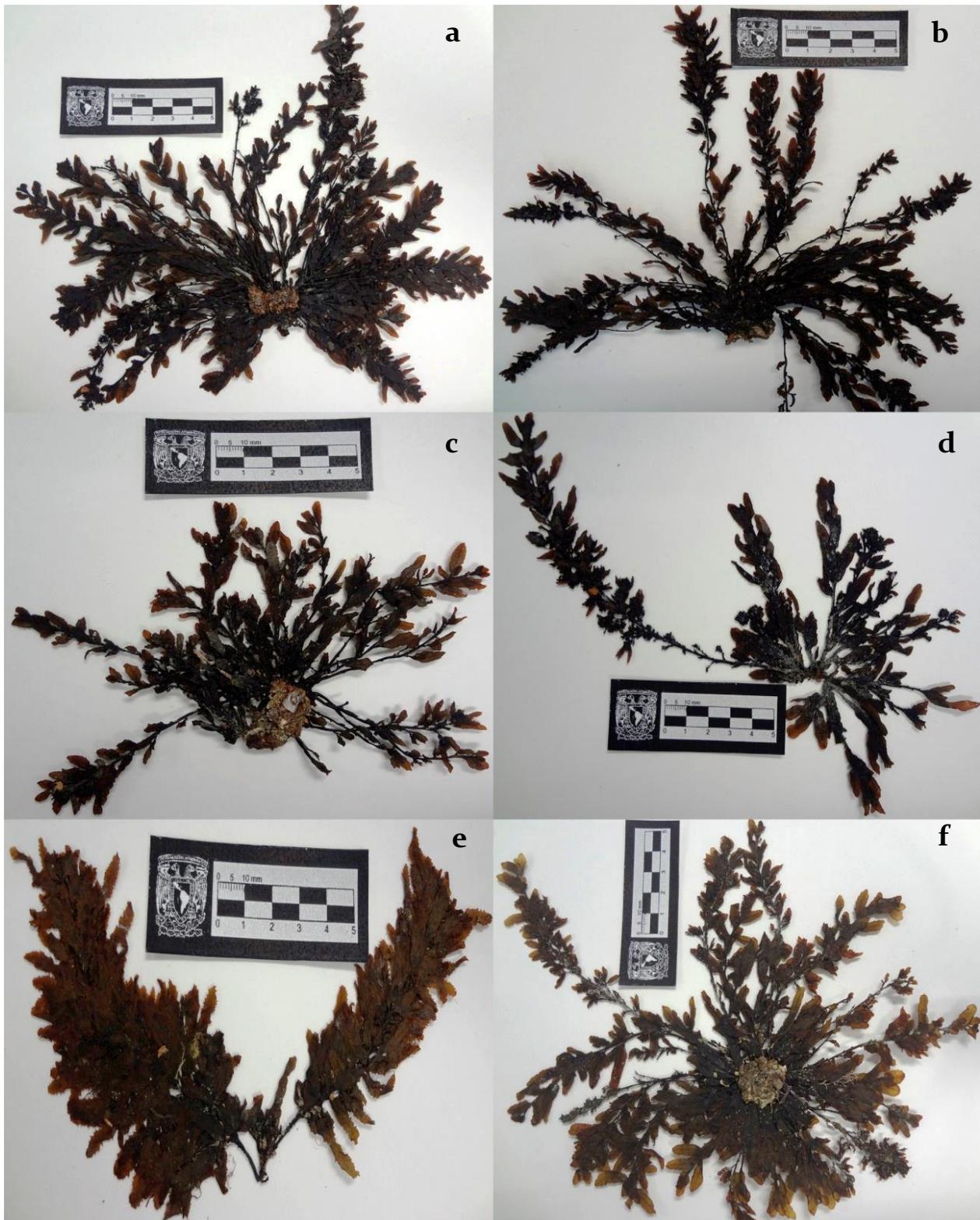
Para confirmar la amplificación de ADN, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gelred<sup>+</sup> Nucleic Acid (Anexo 5).



**Figura 2.** Caracteres morfológicos presentes en *Sargassum*, a) filoides, b) aerocistos (vesículas de aire), c) eje principal del talo y d) línea media del filoide. Modificado de Taylor (1960).



**Figura 3.** Caracteres morfológicos presentes en *Sargassum*, a) criptostomas, b) margen del filoide y c) receptáculos. Modificado de Littler & Littler (2000).



**Lamina 1.** Ejemplares revisados de *Sargassum buxifolium*, a) Punta Delgada FEZA 3221(colectó O. Sierra y L. Hernandez, 2012, AGAO 57), b) Punta Delgada FEZA 3222 (colectó A. Avila y A. Ubaldo, 2012, AGAO 58), c) Playa Muñecos FEZA 3217 (colectó A. Ubaldo y L. Hernandez, 2012, AGAO 59) d) Playa Muñecos FEZA 3218 (colectó A. Avila y L. Hernandez, 2012, AGAO 60), e) Playa Muñecos FEZA 3215 (colectó A. Avila y A. Ubaldo, 2013, AGAO76), f) Villa Rica FEZA 3225 (colectó L. Hernandez y O. Sierra, 2012, AGAO 64).

**Tabla 1.** Primers utilizados en amplificación

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>rbclS</i></b>	3F	CAT CGT GCT GGT AAC TCT AC	Matio <i>et al.</i> , 2008
	S97R	CAT CTG TCC ATT CWA CAC TAA C	
<b><i>cox3</i></b>	CF34	CCA TTT CAT TTA GTN GAY CCH AG	Boo <i>et al.</i> , 2011
	C3R20	AAC AAA RTG CCA ATA CCA KG	

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para los genes *cox3* y *rbclS*

	<i>cox3</i>		<i>rbclS</i>	
Desnaturalización inicial	94° C/ 4 min		94° C/ 5 min	
Desnaturalización	94° C/ 30 s	35 ciclos	94° C/ 40 s	35 ciclos
Annealing	40° C/ 30 s		44° C/ 30 s	
Extensión	72° C/ 1 min		72° C/ 45 s	
Extensión final	72° C/ 10 min		72° C/ 7 min	

### 6.3.3 Secuenciación

Las reacciones de secuenciación cíclica (“cycle sequencing”) de ADN se efectuaron en el laboratorio de “High-Throughput Sequencing Solutions” de la Universidad de Washington, Estados Unidos ([www.htseq.org](http://www.htseq.org)), de acuerdo con las especificaciones marcadas por el laboratorio prestador del servicio. Posteriormente, los cromatogramas obtenidos fueron editados con el programa Geneious 6.1.7. Las secuencias fueron alineadas visualmente para la creación de una matriz para cada gen.

### 6.3.4 Análisis cladísticos

Las matrices de secuencias de nucleótidos (*rbclS* y *cox3*) fueron analizadas por separado, bajo el criterio de parsimonia con el programa PAUP\* versión 4.02 (Swofford, 2002). Los análisis consistieron en búsquedas heurísticas con 1000 réplicas de adición aleatoria de terminales guardando todos los árboles más parsimoniosos. El intercambio de ramas se realizó por medio de la opción “TBR” (Tree Bisection-Reconnection). Todos los caracteres fueron considerados como no ordenados y de igual peso. El apoyo interno de los clados se evaluó mediante un análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985), efectuando 300 repeticiones cada una de 20 réplicas de secuencias de adición de terminales al azar y TBR, salvando hasta 20 cladogramas más parsimoniosos por repetición. También fueron analizadas mediante un criterio de distancia por Neighbor Joining (NJ) y se evaluó el soporte de las ramas mediante análisis de bootstrap.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis morfológico

Con base en la observación de caracteres morfológicos los ejemplares fueron determinados taxonómicamente como *Sargassum buxifolium*.

Sin embargo se observaron un total de cuatro morfotipos. Los ejemplares de los morfotipos uno, dos y tres se encontraron en Playa muñecos, mientras que para Punta Delgada se registraron los morfotipos tres y cuatro (Tabla 3).

El primer morfotipo presenta el margen del filoide entero con criptostomas dispuestos en una o dos hileras paralelas al margen (Lamina 2, A); el segundo se caracteriza por filoides con margen serrado y con criptostomas dispersos (Lamina 2, B y B'), el tercero presenta el margen serrado/entero con los criptostomas dispersos sobre el filoide (Lamina 3, B y B'), el cuarto tiene como características el margen del filoide entero y los criptostomas dispuestos en hilera paralela a la línea media (Lamina 3, A y A') (Tabla 4).

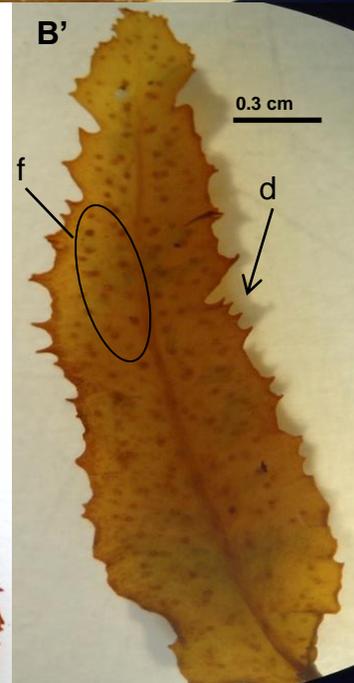
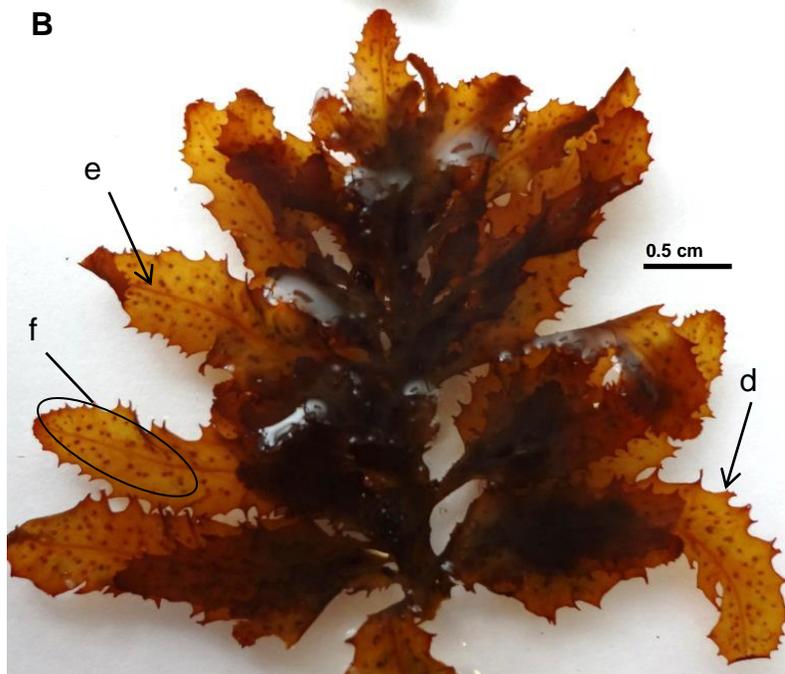
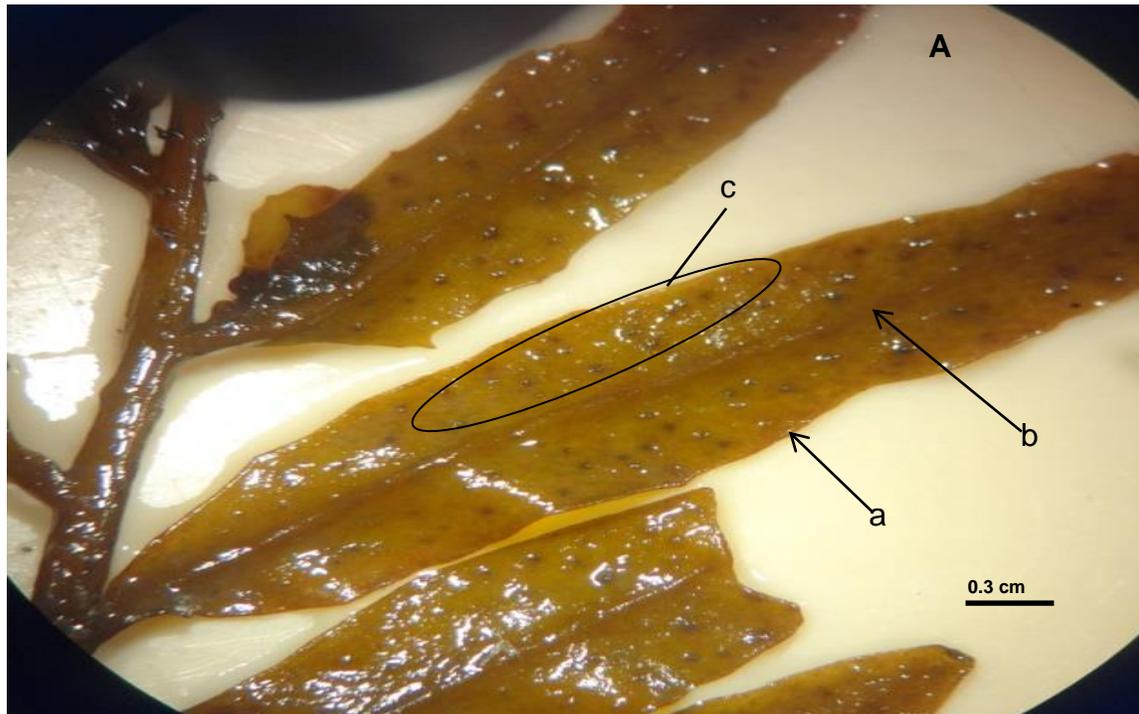
Los ejemplares de ambas localidades alcanzan una talla máxima de 15 cm y a excepción de un ejemplar (de Playa Muñecos) todos presentan receptáculos, es decir, son fértiles (Lamina 3, B').

**Tabla 3.** Morfotipos encontrados basados en el margen del filoide y disposición de los criptostomas en ambas localidades, Playa Muñecos (PM) y Punta Delgada (PD).

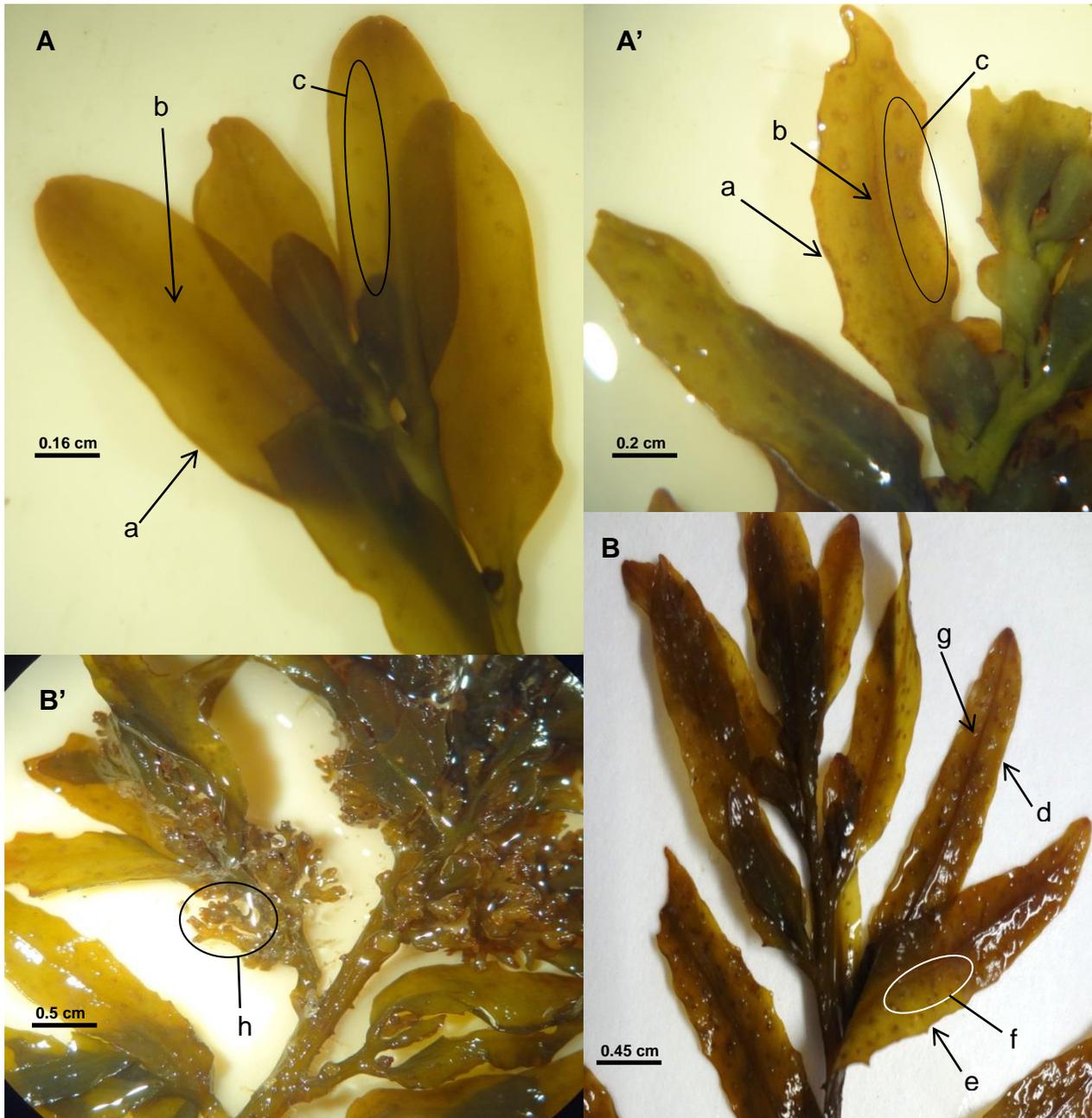
Morfo	Margen del filoide			Disposición de criptostomas			
	Entero	Serrado	Ambos	Dispersos	Línea media	Margen	Localidad
1	X					X	PM
2		X		X			PM
3			X	X			PM y PD
4	X				X		PD

**Tabla 4.** Caracteres morfológicos revisados para los cuatro morfotipos de Playa Muñecos y Punta Delgada

Carácter/Morfotipo	1	2	3	4
Talla del organismo	14-15 cm	12-15 cm	13-14 cm	12-13 cm
Adherido por un disco de fijación	Si	Si	Si	Si
Arreglo	Radial	Radial	Radial	Radial
Ejes	Liso	Algunos segmentos con espinas	Liso	Algunos segmentos con espinas
Aerocistos (vesículas de aire)	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Forma de filoide	Oblongo-lanceolada	Lanceolada	Lanceolada	Lanceolada
Ancho del filoide	0.5-0.7 cm	0.6-0.8 cm	0.6-0.8 cm	0.8-1.0 cm
Longitud del filoide	1.0-2 cm	2-3 cm	2-3.5 cm	1.5-2.5cm
Base del filoide	Asimétrica	Asimétrica	Asimétrica	Asimétrica
Línea media	Presente	Presente	Presente	Presente
<b>Margen del filoide</b>	<b>Entero</b>	<b>Serrado</b>	<b>Entero y serrado</b>	<b>Entero</b>
Cantidad de criptostomas	Abundantes	Abundantes	Escasos	Escasos
Diámetro de los criptostomas	98-122.5 µm	140-150 µm	117.6-156.6 µm	127.4-156.6 µm
<b>Disposición de criptostomas</b>	<b>Paralelos al margen</b>	<b>Dispersos en el filoide</b>	<b>Dispersos en el filoide</b>	<b>Paralelos a la línea media</b>
Receptáculos	Presentes	Ausentes	Presentes	Presentes
Forma de receptáculos	Cilíndricos	Cilíndricos	Cilíndricos	Cilíndricos
Arreglo de receptáculos	Cima	Cima	Cima	Cima
Superficie de receptáculos	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Total de organismos revisados	11	4	14	11



**Lamina 2.** A) Primer morfotipo con margen entero (a), criptostomas en hilera paralelos al margen (c), línea media (b); B) y B') el segundo presenta una marcada línea media (e), con el margen serrado (d), criptostomas dispersos sobre todo el filoide (f)

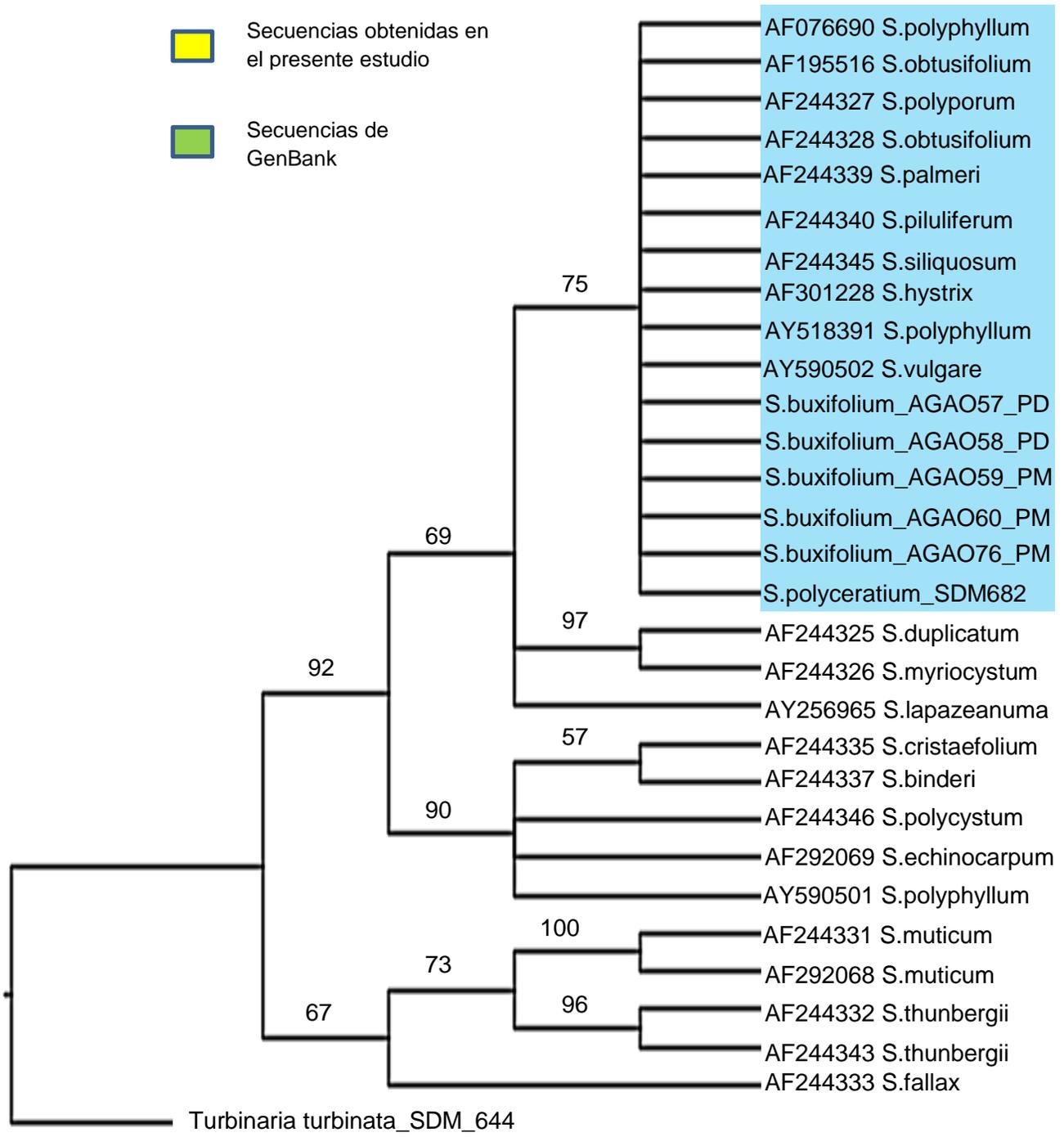


**Lámina 3.** B) y B') El tercer morfotipo con margen entero (d) y serrado (e), criptostomas en hilera paralelos a la línea media (f), línea media (g); A) y A') el cuarto presenta el margen entero (a), con criptostomas (c) en hilera paralelos a la línea media, línea media (b), (h) receptáculos presentes en los ejemplares revisados

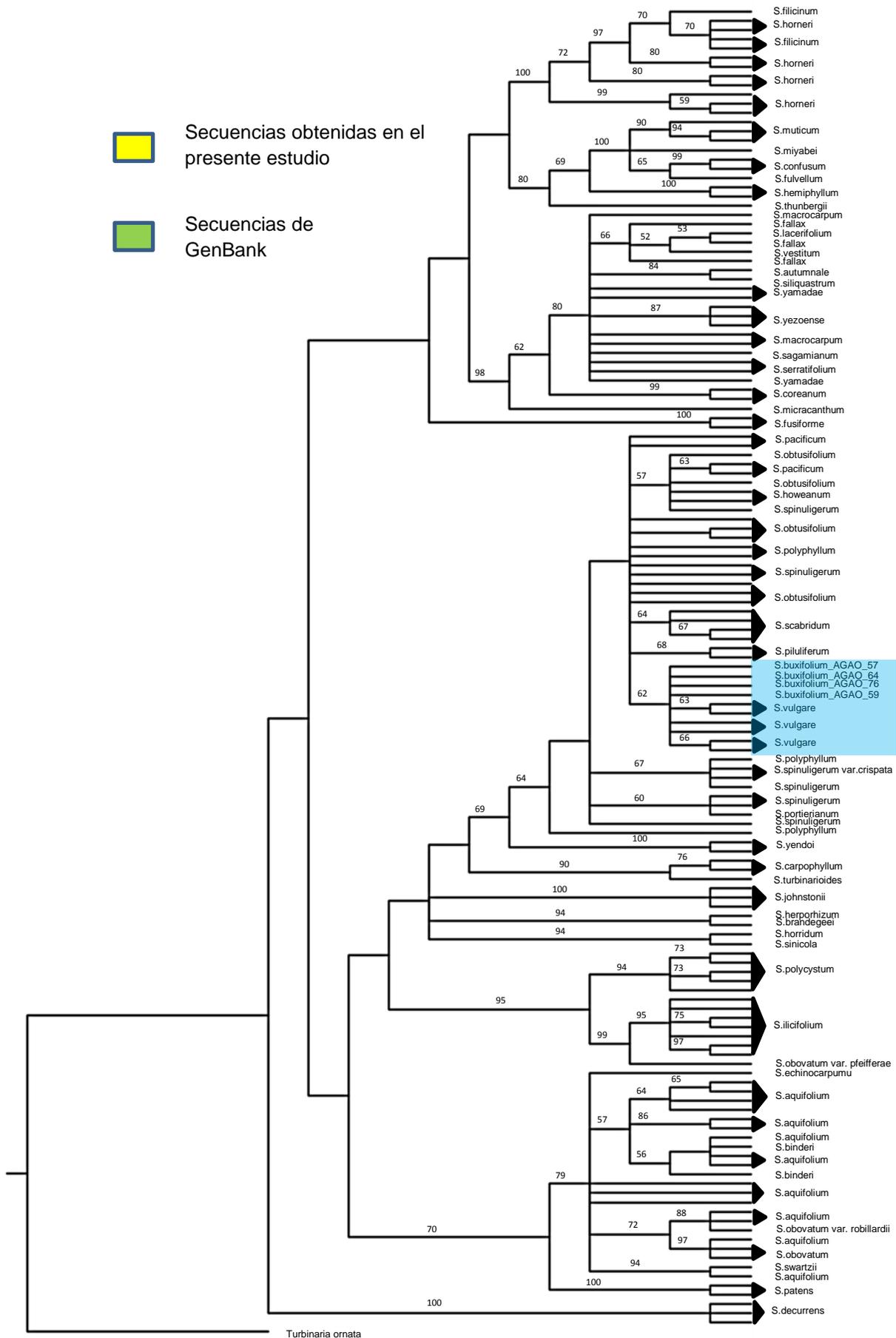
## 7.2 Análisis molecular

El análisis para *rbcL*S recuperó 16555 árboles más parsimoniosos con una longitud de 225 pasos, el índice de consistencia (IC) corresponde 0.7511 y el índice de retención (IR) fue de 0.7813. El consenso estricto se muestra en la figura 4. La matriz consistió de 780 caracteres de los cuales 144 caracteres fueron variables y 69 informativos. Las secuencias de ejemplares mexicanos de *Sargassum buxifolium* forman un clado junto con otra especie determinada como *S. polyceratium* obtenida en este estudio y secuencias de otras especies asignadas a *S. polyphyllum*, *S. obtusifolium*, *S. polyporum*, *S. obtusifolium*, *S. palmeri*, *S. piluliferum*, *S. siliquosum*, *S. hystrix*, *S. polyphyllum* y *S. vulgare* las cuales fueron descargadas de GenBank. Soporte de bootstrap (PB) de 75%. El árbol presenta soportes de ramas muy heterogéneos donde algunos clados tienen un soporte muy bajo de 57, mientras que otros presentan valores muy altos como las secuencias de *S. muticum* y *S. thunbergii*.

El análisis para el marcador *cox3* recuperó 15480 árboles más parsimoniosos con una longitud de 542 pasos, el índice de consistencia (IC) de 0.5185 y el índice de retención (IR) de 0.9143. La matriz consistió de 648 caracteres de los cuales 213 caracteres fueron variables y 182 informativos. El consenso estricto se muestra en la Figura 5. Se obtuvo un clado formado por las muestras de Playa Muñecos y Punta delgada, que incluye otras secuencias correspondientes a *S. vulgare*. El clado presenta un soporte de 62 y forma una politomía con otras especies. De forma similar, muchos de los clados presentan soportes muy bajos, incluso en secuencias que putativamente pertenecen a la misma especie como es el caso de *S. aquifolium* con soporte de 65, *S. scabridum* (PB 64), *S. pacificum* (PB 63).



**Figura 4.** Consenso estricto del marcador molecular *rbcLS*, los números indican valores de bootstrap (PB), recuadro indica la politomía de los individuos del presente estudio con 11 especies de *Sargassum*.

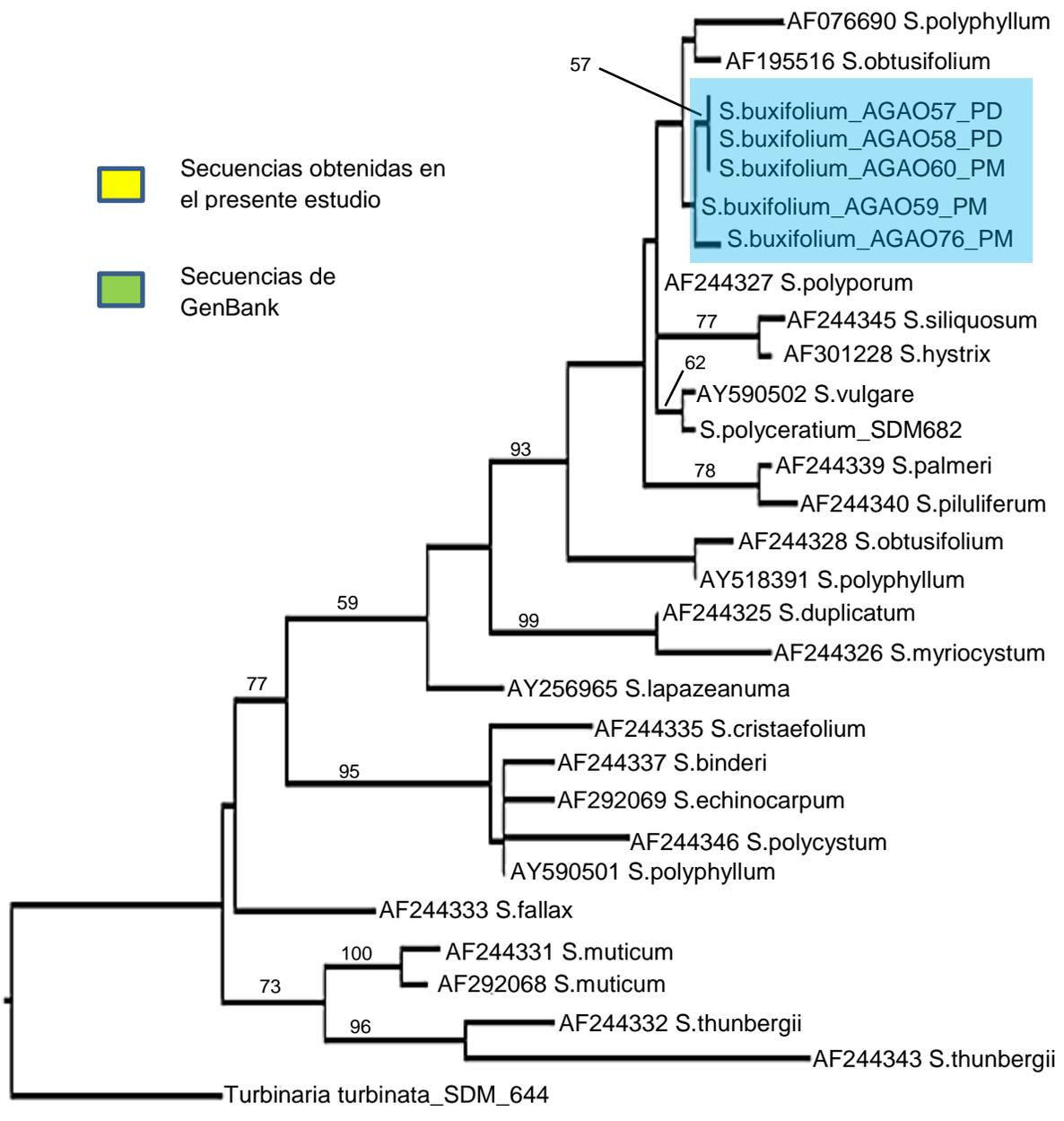


**Figura 5.** Consenso estricto del marcador molecular *cox3* obtenido mediante Máxima Parsimonia (MP), los números indican valores de bootstrap

El árbol obtenido mediante Neighbor Joining (NJ) para el marcador ***rbcLS*** (Figura 6) recupera a todas las secuencias dentro de un clado pero sin soporte bootstrap. Las secuencias de ambas localidades se relacionan cercanamente con otras secuencias de *S. polyphyllum* y *S. obtusifolium*, descargadas de GenBank.

El análisis con ***cox3*** (Figura 7) recupera las secuencias de *S. buxifolium* en un clado soportado por un PB de 60. Sin embargo se observa la inclusión de secuencias de *S. vulgare*.

El análisis de las secuencias mediante el método de NJ para *cox3* nos brinda información semejante que el de MP para el mismo marcador. En ambos análisis las secuencias de *S. buxifolium* forman un clado con otras etiquetadas como *S. vulgare*, mientras que con el marcador *rbcLS* formaron un clado independiente y las secuencias de *S. vulgare* se ubicaron en un clado distinto.



**Figura 6.** Árbol obtenido mediante NJ para el marcador molecular *rbcLS*, los números indican valores de bootstrap, en el recuadro clado independiente formado por las secuencias bajo estudio

- Secuencias obtenidas en el presente estudio
- Secuencias de GenBank



Figura 7. Árbol obtenido mediante NJ del marcador molecular *cox3*, los números indican valores de bootstrap

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A pesar de considerarse más de 20 caracteres morfológicos para separar a las especies de *Sargassum* algunos de éstos complican aún más la adecuada determinación taxonómica, por ejemplo la longitud, el diámetro de los criptostomas, el tamaño de los filoides (Taylor 1960, Littler & Littler, 2000) debido a que pueden variar de acuerdo a las condiciones en la que se encuentra. Los caracteres ancho, longitud del filoide, cantidad de criptostomas y talla del individuo son compartidos entre *S. buxifolium*, *S. vulgare* y *S. polyceratium*.

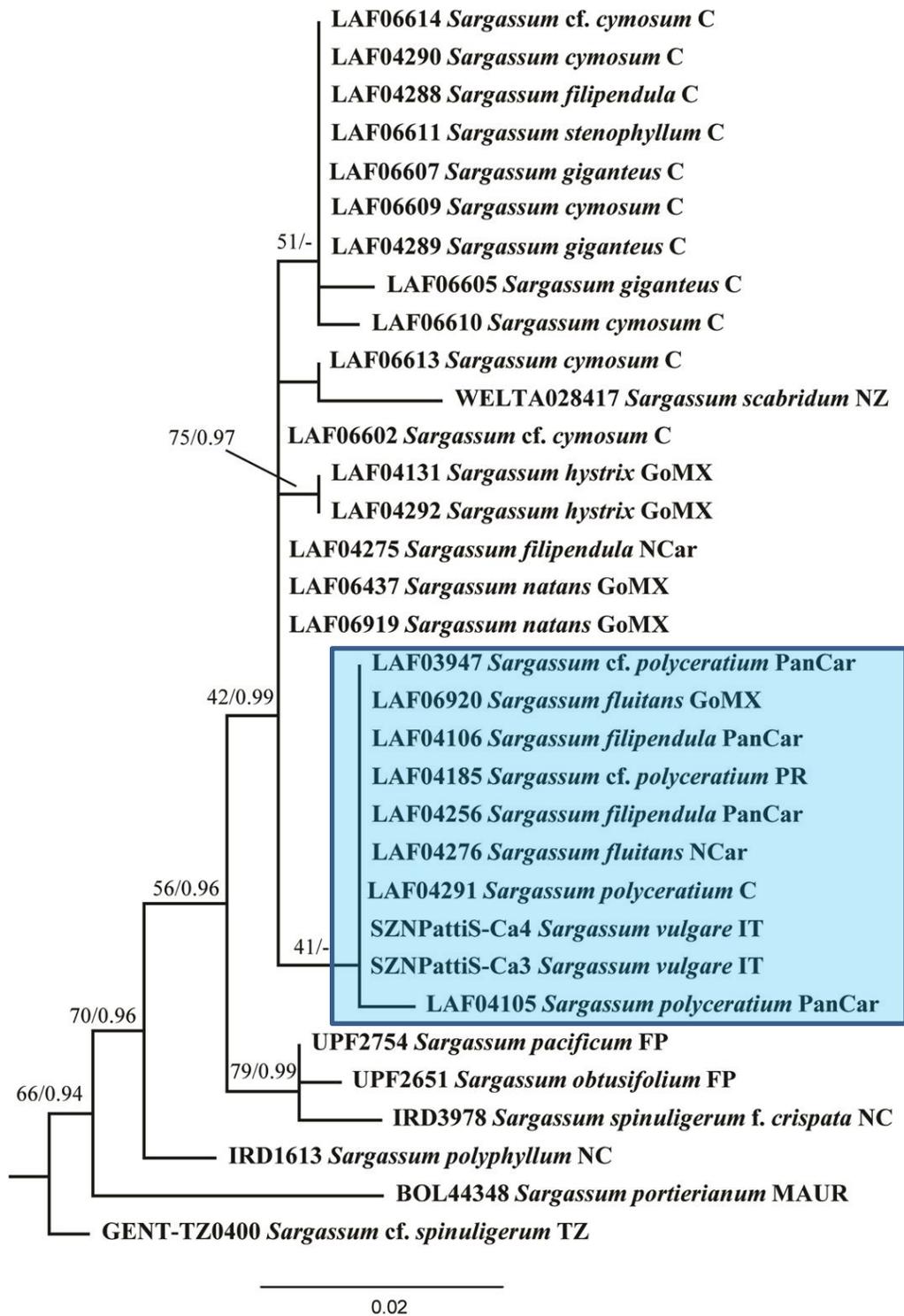
Con base en la observación de caracteres morfológicos de las dos poblaciones de *Sargassum buxifolium* se reconocieron cuatro morfotipos debido a la variación que presentaron los ejemplares en el margen del filoide y la disposición de los criptostomas, la cual podría ser resultado de la alta plasticidad intraespecífica como lo menciona Mattio & Payri (2011) y Moreira & Cabrera (2007). Esta variación se puede dar entre poblaciones, dentro de las poblaciones o incluso en un individuo, tal como los ejemplares de *S. buxifolium* revisados en este estudio. Es importante mencionar que a excepción de uno, todos los ejemplares presentaron estructuras reproductivas, por lo que se descarta la variación de los caracteres por el estadio en el que se encuentran (vegetativo o reproductivo).

El análisis por el método de Máxima Parsimonia (MP) y Neighbor Joining (NJ) de las secuencias obtenidas con el marcador *cox3* recupera a las secuencias de *Sargassum buxifolium* en un solo clado con la inclusión de *S. vulgare*, lo mismo pasa con el marcador *rbcLS*, esto corrobora la conespecificidad de las muestras utilizadas en el presente estudio pero no se tiene la seguridad de la aplicación de nombre correcto de la especie. Se debe resaltar que en la topología de *rbcLS* por MP se incluyen 10 especies lo que posiblemente indica que sea la misma o se deba recurrir a otro marcador. Las topologías de los árboles obtenidos para *cox3* por ambos métodos pueden ser consideradas fiables debido a que Mattio y Payri (2010) reportan al marcador *cox3* como potencial para el código de barras, es decir, es funcional para la identificación de especies.

Los resultados de este estudio arrojan una politomía para el marcador *rbcLS* de manera similar sucede en el estudio realizado por Camacho y colaboradores (2014) en el cual se observó una politomía (Figura 8) con las especies *Sargassum fluitans*, *S. polyceratum*, *S. filipendula* y *S. vulgare*, con esta última se relacionan las muestras trabajadas en el presente estudio. Estos resultados sugieren que el gen no es el indicado para utilizarlo en el código de barras.

Es importante recalcar que no hay secuencias de *Sargassum buxifolium* en GenBank para comparar y las secuencias de *S. hystrix*, de la cual *S. buxifolium* era una subespecie, no tienen relaciones filogenéticas cercanas con las secuencias obtenidas. Por otra parte de confirmarse la correcta aplicación del nombre para los ejemplares mexicanos y las secuencias de GenBank, se podría confirmar la identidad taxonómica independiente de *S. buxifolium*. Sin embargo la relación cercana a secuencias etiquetadas con distintos nombres, pone en duda la taxonomía general del género, haciendo necesaria una revisión taxonómica con profundidad.

La identificación taxonómica de *Sargassum buxifolium* tomando en cuenta un solo enfoque (morfológico o molecular) sería erróneo, en ambos casos se presentan ventajas y desventajas, por un lado el uso de caracteres morfológicos dificulta la identificación de los ejemplares debido a su variación. De la misma manera si solamente se utilizan las secuencias de ADN no se podría explicar la relación que existe entre las especies.



**Figura 8.** Árbol de Máxima verosimilitud de ITS-2, *rbcLS* y *cox3*. Tomado de Camacho *et al.*, 2014. Se indica la politomía formada por *Sargassum polyceratium*, *S. fluitans*, *S. filipendula* y *S. vulgare*

## **9. CONCLUSIÓN**

El análisis morfológico indica que *Sargassum buxifolium* presenta cuatro morfotipos que podrían dificultar su determinación taxonómica sobre todo si no se conocen los caracteres taxonómicos del grupo. Por otro lado el análisis molecular confirma que los ejemplares de ambas poblaciones (Punta Delgada y Muñecos) son la misma especie. Finalmente los resultados del presente estudio descartan el problema en la determinación taxonómica de los ejemplares utilizados en los estudios anticancerígenos.

## **10. CONSIDERACIONES FINALES**

Se deben analizar un mayor número de individuos de cada población, de ser posible incluir más localidades con poblaciones de *Sargassum buxifolium* y de otras especies que sirvan de comparación, analizar los ejemplares con otro marcador molecular como lo es COI o *mtsp*.

Es recomendable aplicar este tipo de estudios a las especies que tengan problemas similares para descartar el problema de determinación taxonómica.

## 11. REFERENCIAS

Boo, G.H., S.C. Lindstrom, N.G. Klochkova, N. Yotsukura, E.C. Yang, H.G. Kim, J.R. Waaland, G.Y. Cho, K.A. Miller & S.M. Boo. 2011. Taxonomy and biogeography of *Agarum* and *Thalassiophyllum* (Laminariales, Phaeophyceae) based on sequences of nuclear, mitochondrial, and plastid markers. *Taxon* 60: 831-840.

Camacho, O., L. Mattio, S. Draisma, S. Fredericq & G. Diaz-Pulido. 2014. Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity* 1-26.

Cho, S.M., S.M. Lee, Y.D. Ko, L. Mattio, & S.M. Boo. 2012. Molecular systematic reassessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in Korea using four gene regions. *Botanica Marina* 55: 473-484.

De Reviere, B., F. Rousseau & S.G.A. Draisma. 2007. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges. In: Brodie, J. & J. Lewis (Eds.). *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press. USA, 402 p.

Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.

Dreckman, M.K, 1998. *Clasificación y nomenclatura de las macroalgas marinas bentónicas del atlántico mexicano*, CONABIO, México D.F., 140 p.

Ermakova, S., R. Sokolova, S. Kim, B. Um, V. Isakov & T. Zvyagintseva. 2011. Fucoïdanes from Brown Seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural Characteristics and Anticancer Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164: 841-850.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Graham, L.E. & L.E. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall. USA. 640p.

Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society of London*. B 270: 313-321.

Kucera, H. & G.W. Saunders, 2008. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany* 86:1065-1079.

Le Gall, L. & G.W. Saunders. 2010a. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in Canadian Flora. *Journal of phycology* 46: 374-389.

Le Gall, L. & G.W. Saunders. 2010b. Establishment of a DNA barcode library for the Nemaliales (Rhodophyta) from Canada and France uncovers overlooked diversity in the species *Nemalion helminthoides* (Vellay) Batters. *Cryptogamie, Algologie*, 31: 403–421.

Little S.D. & M.M. Little. 2000. *Caribbean reef plants: an identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida, and Gulf of Mexico*. Offshore Graphics Inc. USA. 542 p.

Liu, L., M. Heinrich, S. Myers & S.A. Dworjanyn. 2012. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 142: 591-619.

Luna, C.N.E. 2012. Determinación de las fases del ciclo celular de las líneas de Carcinoma de cerviz CALO e INBL cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum hystrix buxifolium* Chauvin. Tesis de licenciatura en biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico. 74 p.

Manghisi, A., C. Bertuccio, S. A. Minicante, V. Fiore, L. Le Gall, G. Genovese & M. Morabito. 2011. Identifying alien macroalgae through DNA barcoding: the case of *Hypnea cornuta* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Transitional Waters Bulletin* 5: 42-49.

Mattio, L., C.E. Payri & V. Stiger-Pouvreau. 2008. Taxonomic revision of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from French Polynesia based on morphological and molecular analyses. *Journal of Phycology* 44: 1541-1555.

Mattio, L., C.E. Payri & M. Verlaque. 2009. Taxonomic revision and geographic distribution of the subgenus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in the western and central Pacific islands based on morphological and molecular analyses. *Journal of Phycology* 45: 1213-1227.

Mattio, L., C.E. Payri, M. Verlaque & B. de Reviers. 2010. Taxonomic revision of *Sargassum* sect. *Acanthocarpicae* (Fucales, Phaeophyceae). *Taxon* 59: 896-904.

Mattio, L. & C.E. Payri. 2010. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales). *Cryptogamie, Algologie* 31: 467-485.

Mattio, L. & C.E. Payri. 2011. 190 Years of *Sargassum* Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies. *Botanical Review* 77: 31-70.

Mauseth, J.D., 1995. Botany. An introduction to plant biology: Algae and the origin of eukaryotic cells. Division Phaeophyta: brown Algae. 624 p.

McDevit, D.C. & G.W. Saunders. 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological research* 57: 131-141.

McDevit, D.C. & G.W. Saunders. 2010. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia* 49: 235-248.

Moreira, L. y Cabrera R., (2007). Anatomía de las estructuras reproductoras en dos variedades de *Sargassum* (Fucales, Sargassaceae). *Revista de investigaciones marinas*, 28: 91-93.

Ortega, M.M, J.L. Godínez & G.G. Solórzano. 2001. Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del golfo de México y mar caribe. Instituto de Biología, UNAM, México. 594p.

Santiago, C.R. 2014. Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de CaCu, cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne. Tesis de licenciatura en biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico. 83 p.

Swofford, D.L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taylor, W.R., 1960. Marine Algae of the Eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. The University of Michigan Press. USA, Michigan, 870 p.

Wynne, MJ. 2011. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. *Nova Hedwigia Beihefte* 140: 7-166.

Vergés, A., D. Gey, J. Utgé, C. Cruaud & L.L. Gall. 2014. Recognition of a new species of *Kallymenia* (Gigartinales, Rhodophyta) from Croatia (Mediterranean Sea) based on morphology and DNA barcode. *European Journal of Phycology* 49: 332-344.

Ye, H., K. Wang, C. Zhou, J. Liu & X. Zeng. 2008. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry* 111: 428-432.

Yoshida, T. 1983. Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* (Phaeophyta, Fucales). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series V (Botany)* 13: 99-246.

## Citas electrónicas

GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Guiry, M.D. & G.M. Guiry, 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 21 November 2014.

Laboratorio “High-Throughput Sequencing Solutions” de la Universidad de Washington, Estados Unidos ([www.htseq.org](http://www.htseq.org)).

**Anexo1.** Resumen de los caracteres del género *Sargassum* (Mattio & Payri, 2011)

CARACTER	ESTADO DE CARACTER	DESCRIPCIÓN	
Disco de fijación	Discoidal		
	Cónico		
	Rizoidal		
Ejes principales	Cilíndricos		
	Aplanados		
Ramas secundarias	Cilíndricas	Superficie lisa o con espinas (protuberancias), y son dísticas o dispuestas en espiral.	
	Aplanadas (parte)		
Forma de la hoja	Simple	Redondeada, espatulada, turbinada, lanceolada, ovoide, linear o intermedio de las formas.	
	Bífida		
	Dividida varias veces		
Base de las hojas	Redondeada	Simétrica o no.	
	Atenuada		
Margen de las hojas	Liso	Simple o doble hacia el ápice	
	Ondulado		
	Finamente serrado		
	Con dientes agudos		
	Aspecto intermedio		
Criptostomas	Dispuestos azorosamente	Tamaño y número variable	
	Alineados en una o varias hileras a cada lado de la línea media		
Vesículas (aerocistos)	Esféricas	Tienen un pedicelo de tamaño variable, cilíndrico, aplanado o foliar.	
	Ovoides		
	Piriformes		
	alguna forma intermedia		
Receptáculos	Solitarios	Lanceolados o lineares, lisos o con espinas, cilíndricos o aplanados	
	Grupo		Simple
			Ramificados
			Estrechos
Tipo de receptáculos	Zigocárpico (compuesto o mixto)	Carpofilos o pseudocarpofilos	
	Malacocárpico (cilíndrico y liso)		
	Acantocárpico ( con espinas)		
Disposición de receptáculos	Cimas		
	Racimos		
	Glómerulos		

**Anexo 2.** Listado de ejemplares revisados y depositados en la colección ficológica del herbario FEZA

No. FEZA	ESPECIE	LOCALIDAD
2585	<i>Sargassum buxifolium</i>	Playa Muñecos
2588	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2589	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2593	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2594	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2606	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2607	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
2614	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3215	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3216	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3217	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3218	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3219	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3220	<i>S. buxifolium</i>	Playa Muñecos
3221	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada
3222	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada
3223	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada
3227	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada
3228	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada
3229	<i>S. buxifolium</i>	Punta Delgada

**Anexo 3.** Secuencias utilizadas en este estudio

ESPECIE	LOCALIDAD	ACCESO GENBANK	
		<i>cox3</i>	<i>rbcLS</i>
<i>Sargassum aquifolium</i>	Hawaii	EU833389	-----
<i>S. aquifolium</i>	Fiji	EU833406	-----
<i>S. aquifolium</i>	Fiji	EU833411	-----
<i>S. aquifolium</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170409	-----
<i>S. aquifolium</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170410	-----
<i>S. aquifolium</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170408	-----
<i>S. aquifolium</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170406	-----
<i>S. aquifolium</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170407	-----
<i>S. aquifolium</i>	Islas Salomón	EU833400	-----
<i>S. aquifolium</i>	Tanzania	HQ416126	-----
<i>S. aquifolium</i>	Tanzania	HQ416127	-----
<i>S. aquifolium</i>	Reunion	HQ416138	-----
<i>S. aquifolium</i>	Australia	JN243774	-----
<i>S. aquifolium</i>	Australia	JN243775	-----
<i>S. aquifolium</i>	Australia	JN243776	-----
<i>S. autumnale</i>	Corea del Sur: Sodol, Gangreung	JF931730	-----
<i>S. binderi</i>	Indonesia	KF437911	-----
<i>S. binderi</i>	Indonesia	KF437910	-----
<i>S. binderi</i>	Pan-pacífico	-----	AF244337
<i>S. brandegeei</i>	México: Golfo de California	JX560119	-----
<i>S. buxifolium_AGA057</i>	México: Veracruz, Punta Delgada	*	*
<i>S. buxifolium_AGA058</i>	México: Veracruz, Punta Delgada	-----	*
<i>S. buxifolium_AGA059</i>	México: Veracruz, Playa Muñecos	*	*
<i>S. buxifolium_AGA060</i>	México: Veracruz, Playa Muñecos	-----	*
<i>S. buxifolium_AGA064</i>	México: Veracruz, Villa Rica	*	-----
<i>S. buxifolium_AGA076</i>	México: Veracruz, Playa Muñecos	*	*
<i>S. carpophyllum</i>	Nueva Caledonia	EU833415	-----
<i>S. carpophyllum</i>	Nueva Caledonia	EU833416	-----
<i>S. confusum</i>	Corea del Sur: Eocheongdo, Gunsan	JF931732	-----
<i>S. confusum</i>	Corea del Sur: Namae Harbor, Yangyang	JF931734	-----
<i>S. coreanum</i>	Corea del Sur: Seodo, Geomundo	JF931735	-----
<i>S. coreanum</i>	Corea del Sur: Hado, Jeju	JF931737	-----
<i>S. cristaefolium</i>	Pan-pacífico	-----	AF244335
<i>S. decurrens</i>	Nueva Caledonia	EU100822	-----
<i>S. decurrens</i>	Nueva Caledonia	EU882246	-----
<i>S. decurrens</i>	Nueva Caledonia	EU882247	-----
<i>S. duplicatum</i>	Pan-pacífico	-----	AF244325

<i>S. echinocarpum</i>	Polinesia Francesa	EU100833	-----
<i>S. echinocarpum</i>	Hawaii	EU100835	-----
<i>S. echinocarpum</i>	Pan-pacífico	-----	AF292069
<i>S. fallax</i>	-----	GQ368281	-----
<i>S. fallax</i>	Australia	JN243782	-----
<i>S. fallax</i>	Australia	JN243781	-----
<i>S. fallax</i>	Pan-pacífico	-----	AF244333
<i>S. filicinum</i>	Japón: Seto Inland Sea	AB264797	-----
<i>S. filicinum</i>	Corea del Sur: Euihang-ri, Seosan	JF931740	-----
<i>S. filicinum</i>	Pacífico mexicano	JN695629	-----
<i>S. fulvellum</i>	Corea del Sur: Sinyang, Jeju	JF931741	-----
<i>S. fusiforme</i>	Corea del Sur: Yeocha, Geoje	JF931742	-----
<i>S. fusiforme</i>	Corea del Sur: Yongdang, Jeju	JF931743	-----
<i>S. hemiphyllum</i>	Corea del Sur: Uhyoung, Jeju	JF931744	-----
<i>S. hemiphyllum</i>	Corea del Sur: Yongdang, Jeju	JF931745	-----
<i>S. herporhizum</i>	México: Golfo de California	JX560118	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Nagasaki, Iki island	AB430550	-----
<i>S. horneri</i>	China: Zhejian, Zoushan islands	AB430557	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Kumamoto, Amakusa	AB430574	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Kumamoto, Amakusa	JF461045	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Mie, Gokasyo Bay	AB430575	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Kanagawa, Yokosuka, Kan-non-zaki	JF461046	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Miyagi, Shizugawa	JF461051	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Miyagi, Shizugawa	AB430579	-----
<i>S. horneri</i>	Japón: Miyagi, Shizugawa	JF461050	-----
<i>S. horridum</i>	México: Golfo de California	JX560120	-----
<i>S. howeanum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170411	-----
<i>S. howeanum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170412	-----
<i>S. hystrix</i>	Panamá	-----	AF301228
<i>S. ilicifolium</i>	Nueva Caledonia	EU833390	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Nueva Caledonia	EU833391	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Nueva Caledonia	EU882238	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Nueva Caledonia	FJ170416	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Tanzania	HQ416129	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Australia	JN243778	-----
<i>S. ilicifolium</i>	Australia	JN243779	-----
<i>S. johnstonii</i>	México: Golfo de California	JX560115	-----
<i>S. johnstonii</i>	México: Golfo de California	JX560116	-----
<i>S. lacerifolium</i>	Australia	JN243780	-----
<i>S. lapazeanum</i>	México: Golfo de California	JX560117	-----

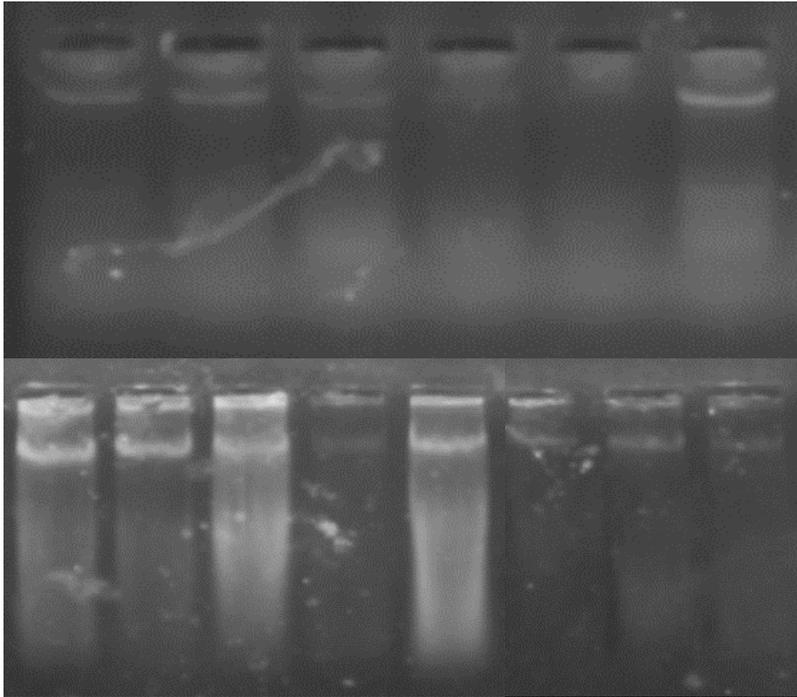
<i>S. lapazeanuma</i>	-----	-----	AY256965
<i>S. macrocarpum</i>	Japón: Nagasaki	AB586743	-----
<i>S. macrocarpum</i>	Corea del Sur: Yongdang, Jeju	JF931748	-----
<i>S. macrocarpum</i>	Corea del Sur: Beomseom, Jeju	JF931751	-----
<i>S. micracanthum</i>	Corea del Sur: Haengwon, Jeju	JF931752	-----
<i>S. miyabei</i>	Corea del Sur: Homigot, Pohang	JF931753	-----
<i>S. muticum</i>	Japón: Kanagawa, Yokosuka, Kan-non-zaki	AB430582	-----
<i>S. muticum</i>	-----	EU681463	-----
<i>S. muticum</i>	Corea del Sur: Sudo, Jinhae	JF931755	-----
<i>S. muticum</i>	Pan-pacífico	-----	AF244331
<i>S. muticum</i>	Pan-pacífico	-----	AF292068
<i>S. myriocystum</i>	Pan-pacífico	-----	AF244326
<i>S. nigrifolium</i>	Corea del Sur: Anin, Gangreung	JF931756	-----
<i>S. obovatum</i>	Reunion	KF413709	-----
<i>S. obovatum</i>	Mauricio	KF413713	-----
<i>S. obovatum</i> var. <i>pfeifferae</i>	Mauricio	KF413716	-----
<i>S. obovatum</i> var. <i>robillardii</i>	Mauricio	KF413711	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Polinesia Francesa	EU100831	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Polinesia Francesa	EU100832	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Polinesia Francesa	EU100829	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Hawaii	EU100834	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Hawaii	EU833386	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Chile: Isla de Pascua	HQ416134	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Chile: Isla de Pascua	HQ416136	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Chile: Isla de Pascua	HQ416137	-----
<i>S. obtusifolium</i>	Pan-pacífico	-----	AF195516
<i>S. obtusifolium</i>	Pan-pacífico	-----	AF244328
<i>S. pacificum</i>	Polinesia Francesa	EU100823	-----
<i>S. pacificum</i>	Polinesia Francesa	EU100824	-----
<i>S. pacificum</i>	Polinesia Francesa	EU100827	-----
<i>S. pacificum</i>	Polinesia Francesa	EU100828	-----
<i>S. palmeri</i>	Pan-pacífico	-----	AF244339
<i>S. patens</i>	Corea del Sur: Sinyang, Jeju	JF931757	-----
<i>S. patens</i>	Corea del Sur: Munseom, Seosan	JF931758	-----
<i>S. piluliferum</i>	Corea del Sur: Goseong-gun, Gyeongnam	JF931759	-----
<i>S. piluliferum</i>	Corea del Sur: Beomseom, Jeju	JF931760	-----
<i>S. piluliferum</i>	Pan-pacífico	-----	AF244340
<i>S. polyceratum</i>	México: Playa Maya	-----	*
<i>S. polycystum</i>	Australia	JN243783	-----
<i>S. polycystum</i>	Vanuatu	EU833387	-----

<i>S. polycystum</i>	Vanuatu	EU833388	-----
<i>S. polycystum</i>	-----	KF545575	-----
<i>S. polycystum</i>	-----	KF545576	-----
<i>S. polycystum</i>	Pan-pacifico	-----	AF244346
<i>S. polyphyllum</i>	Fiji	EU833401	-----
<i>S. polyphyllum</i>	Fiji	EU833402	-----
<i>S. polyphyllum</i>	Nueva Caledonia	EU833385	-----
<i>S. polyphyllum</i>	Tanzania	HQ416132	-----
<i>S. polyphyllum</i>	Pan-pacifico	-----	AF076690
<i>S. polyphyllum</i>	-----	-----	AY518391
<i>S. polyphyllum</i>	-----	-----	AY590501
<i>S. polyporum</i>	Pan-pacifico	-----	AF244327
<i>S. portierianum</i>	Mauricio	KF413715	-----
<i>S. sagamianum</i>	Corea del Sur: Dadae Harbor, Geoje	JF931761	-----
<i>S. scabridum</i>	Nueva Zelanda: Isla Norte	FJ170418	-----
<i>S. scabridum</i>	Nueva Zelanda: Isla Norte	FJ170419	-----
<i>S. scabridum</i>	Nueva Zelanda: Isla Norte: Kermadec	FJ170423	-----
<i>S. scabridum</i>	Nueva Zelanda: Isla Norte: Kermadec	FJ170424	-----
<i>S. serratifolium</i>	Corea del Sur: Heodong, Jindo	JF931762	-----
<i>S. serratifolium</i>	Corea del Sur: Seopseom, Jeju	JF931764	-----
<i>S. siliquastrum</i>	Corea del Sur: Haengwon, Jeju	JF931765	-----
<i>S. siliquosum</i>	Pan-pacifico	-----	AF244345
<i>S. sinicola</i>	México: Golfo de California	JX560121	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170427	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170428	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170426	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170425	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Tanzania	HQ416131	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Australia	JN243784	-----
<i>S. spinuligerum</i>	Australia	JN243785	-----
<i>S. spinuligerum var. crispata</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170430	-----
<i>S. spinuligerum var. crispata</i>	Francia: Nueva Caledonia	FJ170429	-----
<i>S. swartzii</i>	Nueva Caledonia	KF413706	-----
<i>S. thunbergii</i>	Corea del Sur: Sangjokam, Goseong-gun, Gyeongnam	JF931766	-----
<i>S. thunbergii</i>	Pan-pacifico	-----	AF244332
<i>S. thunbergii</i>	Pan-pacifico	-----	AF244343
<i>S. turbinarioides</i>	Nueva Caledonia: Ile des Pins	EU882245	-----
<i>S. vestitum</i>	Australia	JN243787	-----
<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572503	-----

<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572504	-----
<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572500	-----
<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572501	-----
<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572507	-----
<i>S. vulgare</i>	Italia	KJ572495	-----
<i>S. vulgare</i>	-----	-----	AY590502
<i>S. yamadae</i>	Corea del Sur: Anin, Gangreung	JF931767	-----
<i>S. yamadae</i>	Corea del Sur: Hamdeok, Jeju	JF931768	-----
<i>S. yamadae</i>	Corea del Sur: Suryeom-ri, Gyeongju	JF931769	-----
<i>S. yendoi</i>	Corea del Sur: Sagye, Jeju	JF931770	-----
<i>S. yendoi</i>	Corea del Sur: Munseom, Jeju	JF931771	-----
<i>S. yezoense</i>	Corea del Sur: Youngjin, Gangreung	JF931772	-----
<i>S. yezoense</i>	Corea del Sur: Sodol, Gangreung	JF931773	-----
<i>Turbinaria turbinata</i>	México: Playa La Morena	-----	*
<i>T. ornata</i>	Nueva Caledonia	-----	EU833384

\*Pendientes de número de acceso

**Anexo 4.** Electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia de ADN



**Anexo 5.** Electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación para los marcadores moleculares a) *rbclS* y b) *cox3*

