



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Sargassum lapazeanum*
(Sargassaceae: Phaephyceae) EN ESCALAS
INTRAPOBLACIONAL, LOCAL Y REGIONAL:
ESTIMACIÓN DE POSIBLES PATRONES DE DISPERSIÓN**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)**

Presenta

Gabriela Mendoza Carrión

La Paz, Baja California Sur, febrero del 2003.

RESUMEN

“Estructura genética de *Sargassum lapazeanum* (Sargassaceae:Phaeophyceae) en escalas intrapoblacional, local y regional: estimación de posibles patrones de dispersión”

Sargassum lapazeanum es una macroalga parda endémica del golfo de California. Las especies del género *Sargassum* dominan la costa oriental de B.C.S. y resultan importantes en el ecosistema al proporcionar sustrato, refugio y alimento tanto a invertebrados como a peces. También tienen un amplio potencial de utilización para la obtención de alginatos, como fertilizante, forraje, o complemento alimenticio. Su sistema de reproducción es oogámico y monofásico con meiosis gamética y presentan vesículas de flotación o aerocistos. Estas características le confieren la capacidad de dispersar frondas reproductivas a grandes escalas y con ello la posibilidad de establecer intercambio de genes entre poblaciones. Un nivel de dispersión alto asociado a un flujo genético eventual pueden reflejarse en un aumento de la diversidad genética y una disminución de las diferencias genéticas entre las poblaciones. En este trabajo se evaluó la diversidad y estructura genética de *S. lapazeanum* a través de los polimorfismos de ADN amplificado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos aleatorios (PCR-RAPDs), con el fin de inferir sus posibles patrones de dispersión. Se realizaron colectas en tres sitios: Santa Rosalía (SR), Saladito (SAL) y rancho Piedras Coloradas (RPC) B.C.S. La estructura genética se estudió en tres escalas: regional, entre SR y los dos sitios dentro de la bahía de La Paz (SAL y RPC); local, entre SR, SAL y RPC; e intrapoblacional, entre los dos transectos de 40 m, separados por 20 m, a lo largo de los cuales se realizaron las colectas en cada sitio. Debido a que las macroalgas contienen grandes cantidades de polisacáridos y polifenoles, que dificultan la obtención de ADN, y a que este es el primer trabajo que analiza ADN en una especie mexicana de *Sargassum*, se llevó a cabo la implementación de un método específico para la extracción de ADN total de *S. lapazeanum*. Este método resultó sencillo, rápido y permitió obtener (mediante CTAB) ADN de buena calidad para RAPD, sin tratamientos de purificación como ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Además, se analizaron tres métodos de preservación de frondas: en etanol, secadas en silica gel y congeladas, estas últimas resultaron más eficientes para la obtención de ADN y su amplificación por RAPD. También se optimizó la concentración de ADN (25 ng) y de dNTPs (0.6 mM) para la amplificación por PCR. Se probaron 25 oligonucleótidos de 10 pb, de los cuales dos fueron seleccionados para el análisis genético (OPAR06 y OPAR18). Se realizaron cálculos de la diversidad y la estructura genética con el “Tools for Population Genetics Analyses” (TFPGA), paquete que utiliza modelos especiales para la estimación de heterocigosidad con marcadores que solo revelan alelos dominantes como los RAPD. También se aplicaron el índice de diversidad de Shannon y un análisis de varianza molecular (AMOVA). A partir del registro de la presencia o la ausencia de bandas, se encontraron 105 *loci* (bandas polimórficas). La mayor diversidad genética se presentó dentro de la bahía de La Paz en RPC. Los resultados del índice de diversidad de Shannon y el AMOVA

mostraron que la variabilidad genética dentro de transectos, localidades y regiones es mayor que entre los diferentes niveles (>90% y <10% respectivamente). El valor G_{ST} (análogo de F_{ST} , < 0.066) más alto correspondió al interior de los transectos. Esto concuerda con el valor theta ($\theta_{SS} = 0.041$), que indica una diferenciación genética significativa en la escala intrapoblacional. Sin embargo, los valores Φ_{ST} ($\Phi_{ST} < 0.048$; $P < 0.02$) señalan una estructura genética baja en todas las escalas consideradas, y por ende flujo genético limitado. La mayor distancia genética se encontró entre los transectos 1 de SR y SAL, mientras que la menor entre los dos transectos de SR. El análisis UPGMA colocó a SR como un grupo separado, pero relacionado con uno de los transectos tanto de SAL como de RPC, los cuales se combinaron entre sí. Estos resultados reafirman la ocurrencia de cierto flujo genético y por consiguiente la posible dispersión de *S. lapazeanum* en las escalas local y regional. Resultados similares se han reportado en otras macroalgas pardas, que como *S. lapazeanum* presentan aerocistos y se reproducen sexualmente.

Palabras clave: *Sargassum lapazeanum*, extracción ADN, RAPD, estructura genética, dispersión.

Vo. Bo.

Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra
Co-directora de tesis

ABSTRACT

Genetic structure of *Sargassum lapazeanum* (Sargassaceae: Phaeophyceae) in regional, local and intrapopulation scales; dispersal patterns estimate.

Sargassum lapazeanum is a brown seaweed endemic to the Gulf of California. It dominates the east coast of Baja California Sur, together with other species of the *Sargassum* genus. They play a major ecological role providing food, substrate, and refuge for a great variety of invertebrates and fish. The amount of biomass is sufficient to offer *Sargassum* species for some biotechnological uses, principally as alginate gel, fertilizer, forage, and food supplementation for people and animals. *S. lapazeanum* has an oogamic, monophasic mating system with gametic meiosis and floating vesicles or aerocysts. Thus there is potential for widespread dispersal through thalli (zygote-bearing) drift. Gene flow is the main gene interchange mechanism among populations, so greater genetic diversity and less population differentiation result from enhanced dispersal and eventual gene flow. In this work, the genetic diversity and structure of *S. lapazeanum* were evaluated through randomly-amplified polymorphic DNA (RAPD). To determine genetic structure on three scales, samples were collected at three sites in Baja California Sur (Santa Rosalía/SR, Saladito/SAL, and Rancho Piedras Coloradas/RPC). The regional scale was analyzed by comparing SR and bahía de La Paz/LP (SAL-RPC), the local scale was determined by comparing SR, SAL, and RPC, and the intra-population scale was established by analyzing two 40 m transects separated by 20 m at each collection site. Due to high polysaccharides and polyphenols in brown seaweed and the lack of previous reports on *S. lapazeanum* DNA, a simple and rapid total DNA extraction procedure that yields good-quality DNA without purification step was developed in this work. Additionally, ethanol fixation, silica-drying, and -20°C freezing were evaluated as methods for seaweed frond preservation. We recommend -20°C freezing. The optimal DNA concentration for PCR was 25 ng, while the optimal amount of dNTPs was 0.6 mM. Genetic diversity and structure were calculated with the "Tools for Population Genetics Analyses" (TFPGA) software. The Shannon diversity index and molecular variance (AMOVA) were also calculated. From RAPD electrophoretic patterns, 105 *loci* or polymorphic bands were found. Shannon's diversity index and AMOVA analyses showed that genetic variability of transects, localities, and regions were higher than that of the three scales combined (>90% and <10%, respectively). The highest G_{ST} value (analogous to F_{ST} , < 0.066) was found for transects. These results are consistent with theta value ($\theta_{SS} = 0.041$), which shows significant genetic differentiation at the intra-population level. The ϕ_{ST} value ($\Phi_{ST} < 0.048$; $P < 0.02$) indicates low genetic structure at all scales considered, and thus limited genetic flow. The greatest genetic distance was found between transect 1 of SR and that of SAL, while the least genetic distance was found between transects 1 and 2 of SR. UPGMA analysis revealed the SR site as a separate group, but related to transects of SAL and RPC, which were found to be combined. These results confirm the existence of genetic flow and, consequently, the possible dispersion of *S.*

lapazeanum at local and regional scales. Similar results were reported for other seaweed that have aerocysts and sexual reproduction.

Key words: *Sargassum lapazeanum*, DNA extraction, RAPD, genetic structure.

Vo. Bo.

Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra
Co-directora de tesis

DEDICATORIA

Con amor a Feli, Alfredo, Roberto, Roberto Alfredo y Fabiola Carolina.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca crédito con el número de registro 144352, recibida durante el segundo año de mis estudios.

Al CIBNOR y a su programa de estudios de Posgrado por la beca durante el primer año de la maestría y la extensión de seis meses, por todas las facilidades en mis estudios y por el tiempo extra.

A la Dra. Hernández-Saavedra N.Y. por enseñarme las técnicas, por su paciencia ante mis descuidos en el laboratorio, por apoyarme en la culminación de esta tesis y dar la cara por mi.

A la M. en C. Romero-Geraldo R., la cM. en C. Rojas-Posadas D.I., el Dr. Murugan, G., el M. en C. Ramírez-Serrano R. y Sierra-Beltrán A. por su ayuda y grata compañía en el laboratorio de Genética Molecular.

Al Dr. Scrosati, R.A. por llevarme a los sitios de colecta, por ayudarme a delimitar los transectos, por conseguirme artículos relacionados con la tesis, por estar al tanto desde lejos, por revisarme rapidísimo y por dejarme aprender por mí misma.

A la cM. en C. Rivera M.G. y a la Biol. Camacho O.M. por su ayuda en la medición de los transectos y el lavado de las algas de Santa Rosalía. A ambas por compartir conmigo la información de sus trabajos sobre *Sargassum lapazeanum*.

A la Dra. Servière-Zaragoza E. y el Dr. Pérez-Enríquez R. por sus valiosas recomendaciones para mejorar esta tesis y por su disponibilidad para revisarme rápido.

A la Dra. Phillips, N. de la Universidad de Hawaii E.U.A., por dejarnos probar su protocolo de extracción de ADN antes de publicarlo y atender mis dudas por correo electrónico.

Al Dr. Engelen, A.H. de la Universidad de Groningen Holanda, por sus valiosos consejos vía correo electrónico, que me ayudaron a obtener ADN de la latosa *S. lapazeanum*.

A la cDra. Arcos-Ortega G.F. por su valiosa orientación, por explicarme y por darme una empujadota para terminar esta tesis.

A la cDra. Ferrer-Ortega M.M. por dirigirme en el análisis e interpretación de los datos con el TFPGA.

A la familia Mendoza-Carrión por su valioso apoyo económico y moral en todo momento.

Agradezco especialmente al M. en C. Hernández-Herrera, R. por haber hecho posible la realización de este trabajo, por su valiosa ayuda académica y familiar (en el cuidado de 2 niños pequeños), así como por su enorme apoyo moral y económico. Roberto millones de gracias.

CONTENIDO

Resumen.	i
Abstract.	iii
Dedicatoria.	v
Agradecimientos.	vi
Contenido.	vii
Lista de tablas.	ix
Lista de figuras.	xi
I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. <i>Sargassum lapazeanum</i> .	3
1.1.1. Ciclo de vida.	6
1.1.2. Distribución.	8
1.1.3. Dispersión de <i>Sargassum</i> .	9
1.2. Diversidad y estructura genética.	10
1.3. Análisis de ADN por RAPD-PCR.	13
1.4. Estudios sobre genética de poblaciones de macroalgas.	18
1.5. OBJETIVOS.	20
1.5.1. Objetivo General.	20
1.5.2. Objetivos particulares.	20
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
2.1. Área de estudio.	21
2.1.1. Santa Rosalía (SR).	21
2.1.2. Saladito (SAL).	22
2.1.3. Rancho Piedras Coloradas (RPC).	22
2.2. Colecta.	23
2.3. Procesamiento de las muestras.	25
2.4. Preservación de las muestras.	25
2.4.1. Fijación en etanol.	25
2.4.2. Secado con silica gel.	26
2.4.3. Congelación.	26
2.4.4. Pruebas de calidad del ADN obtenido a partir de muestras preservadas por diferentes métodos.	26
2.4.4.1. Ápice y base de las frondas.	26
2.4.4.2. Métodos de preservación y PCR.	26
2.5. Homogeneización del tejido.	27
2.6. Obtención de ADN total de <i>S. lapazeanum</i> .	27
2.6.1. Protocolos evaluados.	27
2.6.2. Protocolo de extracción de ADN total de <i>S. lapazeanum</i> .	28
2.6.3. Ensayos de purificación.	30
2.6.3.1. Purificación de ADN con ARNasa y segunda extracción con fenol-cloroformo.	30
2.6.3.2. Purificación del ADN con la resina Chelex 100.	30
2.6.3.3. Purificación con Gene Clean.	31

2.7. Amplificación de ADN de <i>S. lapazeanum</i> por RAPD.	32
2.7.1. Estandarización de las concentraciones óptimas de ADN y de dNTPs.	32
2.7.2. Reproducibilidad de RAPD en <i>S. lapazeanum</i> .	32
2.7.3. Elección de oligonucleótidos RAPD.	33
2.7.4. Análisis de productos RAPD.	35
2.8. Análisis de datos.	36
2.8.1. Análisis de diversidad, estructura y distancia genética con el programa TFPGA.	36
2.8.2. Análisis de diversidad de Shannon.	38
2.8.3. Análisis de varianza molecular (AMOVA).	39
III. RESULTADOS.	41
3.1. Preservación de las muestras.	41
3.1.1. Ápice y base de las frondas.	41
3.1.2. Métodos de preservación y PCR.	42
3.2. Obtención de ADN.	43
3.2.1. Estandarización del protocolo de extracción de ADN para <i>S. lapazeanum</i> .	43
3.3. Amplificación de ADN de <i>S. lapazeanum</i> por RAPD.	45
3.3.1. Estandarización de las concentraciones óptimas de ADN y dNTPs.	45
3.3.2. Reproducibilidad de RAPD en <i>S. lapazeanum</i> .	46
3.3.3. Elección de oligonucleótidos RAPD.	46
3.4. Diversidad genética.	47
3.4.1. Estimaciones realizadas con el TFPGA.	47
3.4.2. Índice de diversidad de Shannon.	48
3.5. Estructura genética.	50
3.5.1. Estimaciones de θ realizadas con el TFPGA	50
3.5.2. Índice de diversidad de Shannon.	51
3.5.3. Análisis de varianza molecular (AMOVA).	51
3.6. Distancia genética.	53
IV. DISCUSIÓN.	55
4.1. Obtención de ADN y amplificación por RAPD.	55
4.2. Diversidad genética.	59
4.3. Estructura genética.	61
4.4. Dispersión.	62
V. CONCLUSIONES.	66
VI. LITERATURA CITADA.	68
VII. ANEXOS.	76
7.1. Anexo 1.	76
7.2. Anexo 2.	78

LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores RAPD probados en este trabajo.
- Tabla II. Mezcla de reacción.
- Tabla III. Contenido de los tubos sometidos a PCR.
- Tabla IV. Programa de amplificación.
- Tabla V. Comparación de la calidad del ADN obtenido de frondas preservadas con tres métodos diferentes (valores promedio de $A_{260/280}$ y desviación estándar).
- Tabla VI. Eficiencia de los métodos de preservación en la amplificación de ADN de *S. lapazeanum* por RAPD con los oligonucleótidos OPA04, OPA13, OPM10.
- Tabla VII. Comparación de los protocolos de extracción de ADN probados con *S. lapazeanum*
- Tabla VIII. Estandarización de la concentración de ADN blanco y dNTPs para PCR con cinco oligonucleótidos.
- Tabla IX. Estadísticos de genética descriptiva efectuados en el TFGA con base en la información de los oligos OPA06 y OPA18.
- Tabla X. Estimación de la diversidad genética en escala regional con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.
- Tabla XI. Estimación de la diversidad genética en escala local con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.
- TABLA XII. Estimación de la diversidad genética en escala intrapoblacional con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.
- TABLA XIII. Diversidad genética dentro y entre los transectos de *S. lapazeanum* en escalas regional, local e intrapoblacional, mediante el índice de Shannon.
- TABLA XIV. Estimación de θ (F_{ST}), con un 95% de confianza.
- Tabla XV. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las tres escalas probadas.

Tabla XVI. *S. lapazeanum*. Abajo izquierda = Diferenciación por pares de los valores Φ_{ST} calculados en Arlequín. Arriba derecha = Matriz de significancia (0.05) de los valores de P para Φ_{ST} (110 permutaciones).

Tabla XVII. Distancias genéticas de Nei (1978) sin sesgo.

Tabla XIII. Comparación de los protocolos de extracción de ADN probados con *S. lapazeanum*.

TABLA XIX. Concentración de los elementos de la reacción para RAPD utilizadas con macroalgas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Foto de *S. lapazeanum* del rancho Piedras Coloradas (tomada por G. Mendoza-Carrión, 2003).
- Figura 2. Ciclo de vida de *Sargassum*, modificado de Critchley y Fletcher, 1997.
- Figura 3. Área de estudio.
- Figura 4. Orientación y distancia entre los transectos para la colecta de *S. lapazeanum* (vista superior).
- Figura 5. Foto de geles con ADN obtenido a partir de muestras preservadas en: (a) Etanol, (b) Silica Gel y (c) Congeladas.
- Figura 6. Porcentaje de amplificación con RAPD para diferentes métodos de preservación. E = Etanol, SiG = Silica gel y F = Congeladas.
- Figura 7. Productos RAPD obtenidos con el oligonucleótido OPA13, ADN de ocho muestras de SR por triplicado. Panel A: Individuos 1 al 4. Panel B: Individuos 5 al 8. C+: Control positivo. M: Marcador VII (Boehringer). pb: pares de bases.
- Figura 8. Bandas polimórficas de ADN amplificado con el oligonucleótido aleatorio OPA06. Línea 1: Marcador VII (Boehringer). Líneas 2 a 15: Diferentes organismos de RPC.
- Figura 9. Dendrograma de las distancias genéticas entre todos los transectos de Santa Rosalía (SR), Saladito (SAL) y Piedras Coloradas (RPC). Los porcentajes corresponden a las réplicas similares que sustentaron las uniones y los números deciales indican la distancia genética original.

“Estructura genética de *Sargassum lapazeanum* (Sargassaceae: Phaeophyceae) en escalas intrapoblacional, local y regional: estimación de sus posibles patrones de dispersión”

I. INTRODUCCIÓN.

Dentro y entre las poblaciones de una especie se presentan variaciones genéticas que dan lugar a una estructura en niveles de diferenciación genética. La estructura genética refleja el movimiento efectivo de individuos (dispersión) y la transferencia de material genético (flujo genético) entre poblaciones (Avice, 1994). La dispersión y el flujo genético están claramente relacionados. Sin embargo, dispersión es un concepto ecológico relacionado con la dinámica de una población y flujo genético se refiere a un mecanismo de la genética de poblaciones.

La dispersión de las macroalgas marinas se debe a la capacidad que tiene una especie de lanzar sus propágulos lejos de los organismos que le dieron origen (Santelices, 1990). La mayoría de los propágulos de las macroalgas son esporas, cigotos o gametos con capacidad de partenogénesis (Clayton, 1992), es decir, pueden formar un esporofito sin fecundación, por lo que son capaces de establecerse por sí mismos. La dispersión es importante porque determina la expansión o el crecimiento de las poblaciones, la colonización de nuevos ambientes o la invasión de poblaciones ya existentes (Levinton, 1995).

El flujo genético, por su parte, es el movimiento de genes que involucra tanto a los propágulos como a los gametos que no pueden establecerse por sí mismos, tal es el caso del polen de plantas terrestres (Ouborg *et al.*, 1999). Para considerar la existencia de flujo genético es indispensable que exista un

intercambio genético efectivo, esto es, que se formen nuevos individuos a partir del apareamiento de individuos locales con los que llegan de otros sitios. El flujo genético es un mecanismo importante de variabilidad genética, que promueve la evolución de una especie. En este trabajo se considera que la dispersión está asociada a una alta probabilidad de que exista flujo genético.

La dispersión junto con el flujo genético son difíciles de estudiar directamente, sobre todo a grandes distancias, debido a la dificultad de seguir a los propágulos de manera individual, por lo que su estimación se facilita con una aproximación indirecta (Ouborg *et al.*, 1999; Avise, 1994; Neigel, 1997). Una opción para estimar la dispersión de una especie es examinar sus consecuencias en la genética de sus poblaciones a través de marcadores moleculares (Ouborg *et al.*, 1999).

Con el uso de marcadores moleculares es posible evaluar la distribución de la variación genética entre poblaciones (estructura genética) y con esto inferir el flujo genético (Ouborg *et al.*, 1999). Cuando la diferenciación genética entre poblaciones es alta, las poblaciones reflejan un nivel de estructuración alto que puede deberse al escaso traslado e intercambio genético de una población a otra. En cambio, si no se detectan diferencias genéticas, ni se distingue una estructura genética entre poblaciones alejadas, es posible que exista un movimiento continuo de material genético debido a los organismos que se dispersan. Por lo tanto, al detectar la magnitud de las diferencias genéticas entre poblaciones se puede estimar el flujo genético e inferir aproximadamente el grado de dispersión (Ouborg *et al.*, 1999).

En este trabajo se analizan los polimorfismos de ADN amplificado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos aleatorios, para estimar la estructura genética de *Sargassum lapazeanum* Setchell y Gardner en tres escalas, con el fin de inferir sus posibles patrones de dispersión.

1.1. *Sargassum lapazeanum*.

Sargassum es un género de macroalgas pardas de la familia Sargassaceae, orden Fucales, clase Phaeophyceae, división Heterokontophyta (Lee, 1999; van den Hoek *et al.*, 1995). *Sargassum* cuenta con más de 400 especies (Phillips, 1992) ampliamente distribuidas en aguas tropicales y templadas. Sus especies forman grandes mantos submareales y flotantes (Bold y Wynne, 1985).

En el golfo de California, las macroalgas del género *Sargassum* son las más abundantes. Se ha estimado una biomasa total de alrededor de 170,000 toneladas de peso húmedo en mantos de la costa noroeste del golfo de California hasta Mulegé, que cubren un área total de 1,113 hectáreas (Pacheco-Ruiz *et al.*, 1998). Otras evaluaciones de biomasa han estimado una cosecha de 18,901 toneladas durante la primavera en 33 mantos a lo largo de la bahía de La Paz (Hernández-Carmona *et al.*, 1990) y de 7,250 toneladas en bahía Concepción (Casas-Valdéz *et al.*, 1993). La biomasa está compuesta principalmente de *S. johnstonii* Setchell y Gardner y *S. sinicola* Setchell y Gardner en el norte y *S. sinicola*, *S. heporhizum* Setchell y Gardner y *S. lapazeanum* en el sur (Pacheco-

Ruíz *et al.*, 1998; Casas-Valdéz *et al.*, 1993; Hernández-Carmona *et al.*, 1990). En bahía Concepción dichas especies están representadas en una proporción aproximada de 60%, 30% y 10% respectivamente (Núñez-López y Casas-Valdéz, 1997) Estos datos son reflejo de la dominancia de *Sargassum* a lo largo de la costa de la península de Baja California y resaltan su importancia ecológica, así como su potencial para explotación y uso comercial.

Los mantos de *Sargassum* son usados como sitios de desove, nodrizaje, refugio y proporcionan sustrato y alimento a una gran diversidad de invertebrados y peces (Umezaki, 1984). Además, son una fuente importante de nutrientes vía detritus. *Sargassum* es uno de los cuatro géneros de macroalgas económicamente importantes que tienen representantes en aguas cálidas. En Oriente *Sargassum* es cultivado para consumo humano, mientras que en Occidente se comercializa como alimento procesado y productos biomédicos (Abbott, 1988). Debido a las grandes cantidades de biomasa que se han estimado, las especies de *Sargassum* de la costa noreste del golfo de California pueden ser utilizadas para la obtención de alginatos, como fertilizantes, forraje, medicamentos o como complemento alimenticio en aves y humanos (Hernández-Carmona *et al.*, 1990; Pacheco-Ruíz *et al.*, 1998). El género *Sargassum* también llama la atención por su capacidad para acumular metales pesados (Zhou *et al.*, 1998).

Según Rocha-Ramírez y Siqueiros-Beltrones (1990), en la bahía de La Paz se han registrado siete especies de *Sargassum*: *S. lapazeanum*, *S. herporhizum*, *S. howellii* Setchell, *S. johnstonii*, *S. sinicola*, *S. horridum* Setchell y Gardner, y *S. cylindrocarpum* Setchell y Gardner.

Aunque *Sargassum* es uno de los géneros de macroalgas taxonómicamente problemáticos, ya que sus especies presentan una gran variabilidad morfológica que hace difícil su identificación, *S. lapazeanum* se reconoce como la única especie en la bahía de La Paz que no presenta problemas taxonómicos (Rocha-Ramírez y Siqueiros-Beltrones, 1990).

S. lapazeanum (fig. 1) fue descrita por primera vez en 1924 por Setchell y Gardner, quienes utilizaron ejemplares de La Paz, B.C.S. como localidad tipo. Posteriormente, en una revisión cuidadosa de las especies del golfo de California, Dawson (1944) define al grupo *Lapazeanum* como uno de cuatro tipos diferentes de sargazos, caracterizado principalmente por sus filoides asimétricos que no presentan vena media. También menciona que los miembros de este grupo son fácilmente distinguibles de otras especies del golfo.



Figura 1. Foto de *S. lapazeanum* del rancho Piedras Coloradas (tomada por G. Mendoza-Carrión, 2003).

Las características principales de *S. lapazeanum* que permiten distinguirla de otras especies son:

- a) filoides (estructuras laminares mayoritariamente responsables de la fotosíntesis, análogas en esta función a las hojas de plantas terrestres) asimétricos, ensanchados cerca de la mitad, con el margen dentado,
- b) aerocistos (vesículas gaseosas, estructuras para flotación) de forma elipsoidal, coronadas por el remanente del filoide que forma una cresta y
- c) sujetador discoide (estructura de fijación) liso.

En los sitios estudiados *S. lapazeanum* se identificó fácilmente a simple vista por las características mencionadas y por encontrarse en una franja más cercana a la costa y separada de las otras especies.

1.1.1. Ciclo de vida.

En el ciclo de vida de *Sargassum*, como el de las macroalgas pertenecientes al orden Fucales, sólo la fase diploide es vegetativa y evidente, mientras que la generación haploide está reducida a los gametos microscópicos (fig.2). La oófera y los anterozoides se producen en los conceptáculos que son cavidades especiales agrupadas en receptáculos, puntas hinchadas de algunas frondas. La unión gamética es siempre oogámica.

Las plantas son monoicas o dioicas, en estas últimas la oogonia y los anteridios se encuentran en plantas separadas y en las monoicas pueden formarse en el mismo o en diferente conceptáculo dentro del mismo receptáculo (Lee, 1999; van den Hoek *et al.*, 1995). Los receptáculos de *S. lapazeanum* son bastante característicos, diferentes y visiblemente dentados en ambos sexos. Por

lo común, los receptáculos anteridiales (masculinos) son más pequeños en diámetro y más abiertamente ramificados (Dawson, 1944). Estas observaciones concuerdan con lo observado en cortes de algunos receptáculos de *S. lapazeanum* del rancho Piedras Coloradas, San Juan de la Costa B.C.S. (sitio contemplado en este trabajo), que indican que esta especie es dioica (O.M. Camacho y M.G. Rivera, com. pers.). Sin embargo, para asegurar lo anterior hace falta realizar más observaciones durante todas las temporadas del año en varios sitios a lo largo de la distribución de esta especie.

La fertilización en *Sargassum* es externa, aunque usualmente los cigotos son retenidos en los receptáculos femeninos (Critchley y Fletcher, 1997). Otra característica del género es que la meiosis se lleva a cabo durante la formación de los gametos (Lee, 1999; van den Hoek *et al.*, 1995).

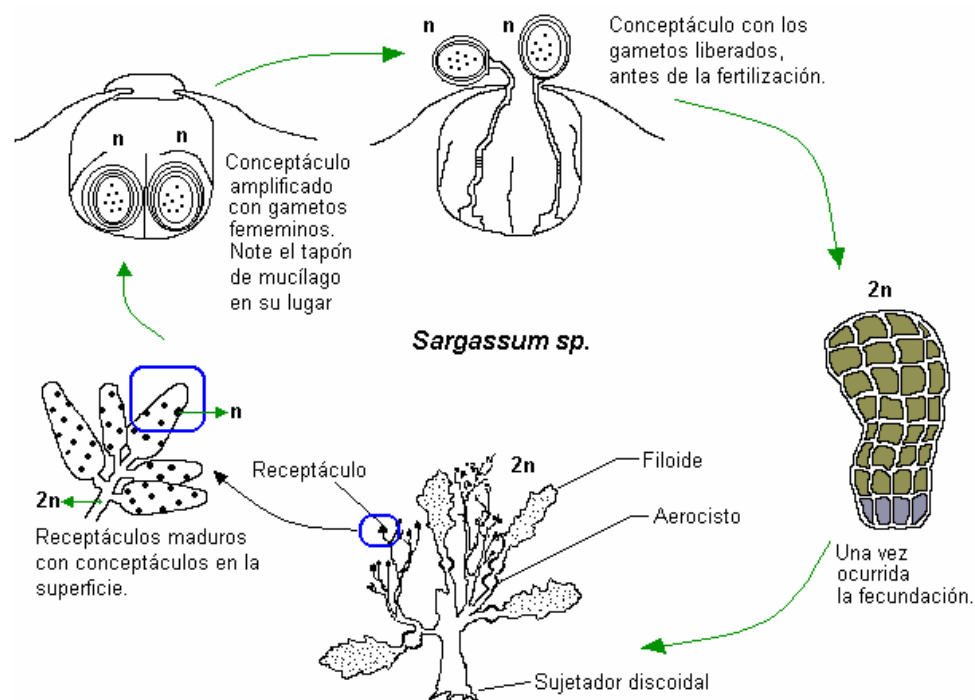


Figura 2. Ciclo de vida de *Sargassum*, modificado de Critchley y Fletcher, 1997.

Algunas especies del género *Sargassum* que no se mantienen sujetas a un sustrato y forman extensos mantos flotantes pelágicos en el océano Atlántico, “Mar de los Sargazos”, se reproducen exclusivamente de manera vegetativa continua por fragmentación (Bold y Wynne, 1985; Lee, 1999).

1.1.2. Distribución.

S. lapazeanum se distribuye en franjas interrumpidas a lo largo de la costa oriental de la península de Baja California Sur y en las costas de Sonora. Existen registros de *S. lapazeanum* para Sonora en Guaymas, isla San Marcos, isla Tortuga, e isla de Turner (Dawson, 1944). Para B.C.S. se ha registrado en Santa Rosalía, Mulegé (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1998), bahía Concepción (Núñez- López y Casas-Valdéz, 1996) y en la bahía de La Paz (Rocha-Ramírez y Siqueiros-Beltrones, 1990; Hernández-Carmona *et al.*, 1990; Paul-Chávez y Riosmena-Rodríguez, 1997; Cruz-Ayala *et al.*, 1998; Riosmena-Rodríguez *et al.*, 1991). También se le puede encontrar más allá del límite sur de la bahía de La Paz en El Sargento (bahía de La Ventana). Como no existen registros para otras regiones, *S. lapazeanum* es una especie que se considera endémica del golfo de California.

Sobre *S. lapazeanum* se ha estudiado su fenología (cronología de las diversas fases de su vida en relación con las variaciones estacionales del clima), su biomasa y su talla en bahía Concepción (Núñez-López y Casas-Valdéz, 1996 y Núñez-López y Casas-Valdéz, 1997). Estos autores reportaron que *S. lapazeanum* es anual, se encuentra de diciembre a junio, llega a ser reproductiva en mayo-junio y, posteriormente, desaparece. La biomasa y la talla presentan una variación estacional en bahía Concepción, con valores máximos a finales de la primavera,

disminución considerable en verano, desaparición casi total en otoño e incremento gradual en invierno (Núñez-López y Casas-Valdéz, 1997).

A la par de este trabajo se estudió la dinámica poblacional de *S. lapazeanum* en el rancho Piedras Coloradas. Los resultados de esa investigación indicaron que *S. lapazeanum* es perenne, pues no desaparece. La abundancia varía de máximos valores en primavera a mínimos de agosto a febrero (M.G. Rivera y R.A. Scrosati, com. pers.).

S. lapazeanum resulta un buen modelo para estudiar la estructura genética, debido a que es un alga dominante y a sus aerocistos que le confieren la capacidad de dispersar frondas reproductivas al llevar propágulos a otros sitios cuando son arrastradas por las corrientes marinas.

1.1.3. Dispersión de *Sargassum*.

Los propágulos de las algas son generalmente esparcidos en la columna de agua, por lo que flotan transportados por las masas de agua o se mueven a través de sustratos flotantes o animales (Santelices, 1990). Kendrick y Walker (1991, 1995) diseñaron un método de succión del sustrato que les permitió cuantificar propágulos teñidos para estudiar directamente la escala de dispersión de *S. spinuligerum* y otras especies de *Sargassum* originarias de Australia. Dichos autores señalan que los propágulos de *Sargassum* se dispersan principalmente en escala de un metro. Los talos de *Sargassum* se desprenden anualmente después de haber desarrollado estructuras reproductivas y en su mayoría son arrastrados por las corrientes a las playas donde se acumulan (Kendrick y Walker, 1994). Sin embargo, gracias a los aerocistos, algunos talos de *Sargassum* tienen la

posibilidad de flotar y ser arrastrados por las corrientes a distancias que van desde 600 hasta 900 km (Norton, 1992). Por tanto, la única posibilidad eficiente para que *Sargassum* se disperse en escalas grandes, ocurre vía transporte de propágulos (Kendrick y Walker, 1994). La posibilidad de dispersión de *Sargassum* se incrementa debido a que los propágulos tienen la capacidad de sobrevivir en la columna de agua por largos períodos. Se han encontrado propágulos viables de hasta 40 días en cultivo, aunque sin la capacidad de sujetarse en un sustrato (Deysher y Norton, 1982).

1.2. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA.

Las variantes de un gen (determinante hereditario del fenotipo) que existen en una población son llamadas alelos (Tamarin, 1996). La variación alélica ocurre en varios *loci* (pl. de *locus*) o posiciones del gen en un cromosoma. Los *loci* que son genéticamente variables son llamados polimórficos o se dice que muestran polimorfismo (Thorpe *et al.*, 1995). Por lo anterior, podemos definir a la diversidad genética como una medida del número y la frecuencia de alelos con formas alternas presentes en una población, estimada en función del número y tipo de alelos y genotipos.

Las medidas de la diversidad genética, según Lu y Williams (1994) son:

- Porcentaje de *loci* polimórficos (% P), se refiere al número de *loci* polimórficos encontrados en la población entre el número total de *loci* analizados.
- Promedio de alelos por *locus* (A/L), esto es el número de alelos presentes en la población entre el número total de *loci* estudiados.

- Heterocigosidad promedio (H) es el número de individuos heterocigotos entre número total de individuos.

Los procesos que causan diferenciación genética son cinco: mutación, recombinación, selección natural, deriva génica y flujo genético. La **recombinación** reacomoda los alelos entre los cromosomas durante la formación de gametos por medio de la meiosis. La recombinación por sí misma no genera diversidad genética en cada locus, sólo puede crear nuevas combinaciones de alelos en diferentes *loci* al mezclar alelos de diferentes individuos (Schaal y Leverich, 1995).

La **mutación** es el mecanismo que origina la diversidad genética, pues actúa tanto en la formación de nuevos alelos, como en su cambio o pérdida. Sin embargo, el cambio que provoca en las frecuencias alélicas es poco relevante, debido a que las tasas de mutación son muy bajas (del orden de 10^{-5}), un cambio por *locus* por generación por cada 10^5 gametos (Tamarin, 1996 y Eguiarte Fruns, 1987). Por ello, la selección natural, la deriva génica y el flujo genético son los procesos que determinan el mantenimiento de la diversidad genética en las poblaciones (Thorpe *et al.*, 1995).

La **selección natural** ocurre por las diferencias en la sobrevivencia y el éxito reproductivo de los organismos. La selección natural produce cambios en las frecuencias genotípicas de acuerdo a los individuos con los fenotipos mejor adaptados a los ambientes cambiantes, quienes pasarán una mayor proporción de sus genes a la siguiente generación (Eguiarte Fruns, 1987; Thorpe *et al.*, 1995).

Se conoce como **deriva génica** a las fluctuaciones azarosas en las frecuencias alélicas, es decir algunos genes pueden aumentar, otros disminuir y otros pueden perderse de generación en generación. La deriva génica está inversamente relacionada con el tamaño de la población, esto es, las frecuencias alélicas cambian más rápidamente cuanto más pequeña es la población (Thorpe *et al.*, 1995; Tamarin, 1996).

El **flujo genético** permite la entrada (debido a la proporción de individuos nuevos) y la salida (a través de la frecuencia génica de los individuos migrantes) de alelos en una población, siempre y cuando los migrantes que entran a la población tengan diferentes genotipos y se crucen con éxito con los residentes. La importancia del flujo genético en el cambio de la diversidad genética aumenta si el número de migrantes efectivos es grande y si sus frecuencias génicas difieren sustancialmente entre los migrantes y los residentes (Eguiarte Fruns, 1987; Tamarin, 1996; Thorpe *et al.*, 1995). Es muy difícil evaluar la magnitud del flujo genético entre distintas poblaciones. Sin embargo, se reconoce que el flujo genético, en ausencia de un factor selectivo fuerte, es el principal determinante de las diferencias genéticas dentro y entre poblaciones de especies marinas (Thorpe *et al.*, 1995; Williams y Di Fiori, 1996; Hilbish, 1996), por lo tanto puede estimarse a través de la cuantificación de tales diferencias. El flujo genético está influenciado por los sistemas de apareamiento y la capacidad de dispersión de una especie, por lo que estos se consideran excelentes mecanismos de predicción de la diversidad y estructura genética en plantas terrestres (Loveless y Hamrick, 1984) y en algunas algas (Lu y Williams, 1994; Williams y Di Fiori, 1996).

La **estructura genética** es la distribución espacial de la diversidad genética dentro y entre poblaciones (Massey y Hamrick, 1998; Williams y Di Fiori, 1996). Se produce por la divergencia genética de las poblaciones de una especie. Los coeficientes F de Wright describen la estructura genética de poblaciones (Avice, 1994), pues separan la variabilidad genética en tres niveles: toda la población (F_T), subpoblaciones (F_S) e individuos (F_I). Estos valores están interrelacionados como sigue:

$$F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS}) \quad (1)$$

F_{ST} es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones y siempre es positivo (Hedrick, 1982). También, F_{ST} puede ser definida como un parámetro que describe la distribución de las frecuencias de alelos entre poblaciones (Ouborg *et al.*, 1999). F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg (relación matemática de las frecuencias alélicas y genotípicas en una población de tamaño grande, con individuos diploides que se reproducen sexualmente y se aparean al azar, que no está expuesta a selección, ni existe mutación, ni flujo genético) dentro de subpoblaciones y en la población total respectivamente. Sus valores positivos indican una deficiencia de heterocigotos (Hedrick, 1982). El cálculo de las distancias genéticas es otra forma de cuantificar la divergencia o similitud genética entre dos poblaciones (Avice, 1994).

1.3. ANÁLISIS DE ADN POR RAPD-PCR.

La obtención de ADN es un paso básico para la aplicación de técnicas

moleculares en estudios ecológicos, genéticos y de sistemática de las algas. El objetivo de un protocolo de extracción es obtener ADN de alto peso molecular, es decir, que las hebras de ADN no se encuentren fragmentadas. En las algas se tienen dificultades en el aislamiento de ADN debido a que presentan altas cantidades de polisacáridos y metabolitos secundarios, como polifenoles, los cuales afectan la calidad del ADN extraído (Oliveira, 1995; Phillips, 1998).

Se ha analizado ADN de especies del género *Sargassum* en los siguientes trabajos:

- En la diferenciación de *S. polycystum* C. Agardh y *S. siliquosum* J. Agardh, de Malasia y Singapur, se probaron cuatro métodos de aislamiento de ADN, de los cuales sólo uno resultó útil (Ho *et al.*, 1995a).
- Phillips *et al.* (2001) propusieron un método de extracción de ADN muy eficiente para algas pardas en general, se basa en el uso de bromuro de metil – trimetil-amonio (CTAB) y requiere ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.
- Engelen *et al.* (2001) estudiaron la diferenciación genética de *S. polyceatium* Montagne alrededor de la isla Curaçao en las Antillas Holandesas. En dicho trabajo utilizaron un método de extracción de ADN con CTAB, desarrollado por Doyle y Doyle (1987), después del cual es indispensable la purificación por ultracentrifugación en gradiente de CsCl para que el ADN amplifique y presente consistencia en la amplificación.

Este es el primer trabajo donde se analiza ADN para una especie mexicana

de *Sargassum*, por lo que fue necesaria la implementación de un método específico (sencillo y rápido) de extracción de ADN total de *S. lapazeanum*.

RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar, en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA. RAPDs si se refiere a los polimorfismos de ADN amplificado aleatoriamente) es una técnica basada en la reacción de la cadena de la polimerasa (en inglés: Polymerase Chain Reaction, PCR). La técnica de PCR amplifica ADN por replicación *in vitro*, con una ADN polimerasa termoestable, oligonucleótidos (conocidos como iniciadores o cebadores, primers en inglés) de secuencia complementaria a los lados que flanquean la secuencia de ADN objetivo y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en solución. El proceso involucra tres pasos que se repiten un cierto número de ciclos determinados y se llevan a cabo de forma automática en termocicladores. Los pasos de PCR son:

1.- *Desnaturalización* de la doble cadena de ADN por calentamiento.

2.- *Hibridación o alineación* de los oligonucleótidos iniciadores con los sitios que flanquean la región que se quiere amplificar.

3.- *Extensión*, cuando las hebras complementarias a la región entre los oligonucleótidos iniciadores son sintetizadas por la ADN polimerasa termoestable (Avisé, 1994; Barrera Saldaña *et al.*, 1993).

La técnica de RAPD fue desarrollada por Welsh y MacClelland (1990) y Williams *et al.* (1990). Se utiliza un solo oligonucleótido iniciador, sin necesidad de combinarlo con un segundo oligonucleótido iniciador como en el proceso rutinario de PCR, su tamaño es pequeño (comúnmente de 10 pb -pares de bases-), su secuencia es elegida aleatoriamente y para escogerlo o producirlo no se requiere

conocimiento específico de una secuencia de ADN particular. Debido a esto, los fragmentos amplificados son aquellas regiones del genoma que están flanqueadas por la secuencia complementaria al oligonucleótido iniciador orientadas al interior. La variación alélica consiste en la presencia o ausencia de productos de amplificación particulares, que pueden ser separados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Con RAPD se revelan varios segmentos polimórficos por oligonucleótido iniciador dentro de una población, otros segmentos pueden aparecer como bandas monomórficas. El grado de variabilidad observada por muchos oligonucleótidos iniciadores sugiere que la técnica puede ser usada para responder a una variedad de preguntas, entre ellas identificación individual, análisis de paternidad, identificación de linaje y análisis filogenético (Parker *et al.*, 1998).

El método de RAPD produce polimorfismos con características dominantes, ya que sólo pueden ser distinguidos los homocigotos dominantes (Ouborg *et al.*, 1999). La pérdida de un sitio de reconocimiento resulta en la ausencia completa del segmento amplificado adjunto y no simplemente en un cambio de movilidad en el gel, por lo que los heterocigotos pueden aparecer únicamente como diferencias en la intensidad de la banda, lo cual no es un fenotipo fidedigno (Parker *et al.*, 1998). Por tanto, únicamente es posible la estimación del genotipo, pero no de las frecuencias alélicas. Para el cálculo de los valores de F_{ST} , en lugar de métodos basados en la frecuencia alélica, se deben utilizar procedimientos de estimación alternativa como, por ejemplo, métodos basados en la similitud de los perfiles de muchos *loci* entre individuos (Ouborg *et al.*, 1999).

La técnica de RAPD tiene las siguientes ventajas: es simple, se elabora de manera rápida, puede usarse en especies con crecimiento lento y distribución en grupos distantes, evita problemas que pueden surgir por la amplificación de genes codificantes, requiere poca cantidad de ADN, no involucra pruebas con marcadores radioactivos y, algo importante, no requiere información genética de la especie estudiada, ni diseño de oligonucleótidos específicos (Ho *et al.*, 1995b; Skotnicki *et al.*, 1999). RAPD se reconoce como una técnica que puede ser excelente para estudiar la estructura genética de poblaciones por su carácter dominante y por el tipo de matrices de datos que genera (Parker *et al.*, 1998).

Su principal desventaja es que, debido a su tamaño corto, los marcadores RAPD pueden generar algunos productos de amplificación inespecíficos, por lo que se necesita un control cuidadoso de la calidad del ADN y de las condiciones de amplificación para asegurar patrones de bandeo reproducibles (Parker *et al.*, 1998).

Algunos ejemplos de la aplicación de RAPD en macroalgas son: la identificación de híbridos en *Gelidium vagum* Okamura (Patwary y van der Meer, 1994), el análisis de morfotipos de *Gracilaria* (González *et al.*, 1996), la evaluación de la identidad de *Gracilaria chilensis* Bird. MacLachlan y Oliveira en poblaciones naturales y artificiales (Meneses, 1996), el estudio de relaciones filogenéticas de *Acrosiphonia arcta* (Dillwyn) J. G. Agardh (van Oppen *et al.*, 1994), y el análisis de linajes en *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour (Billot *et al.*, 1999). En especies del género *Sargassum* se ha utilizado la técnica RAPD con buenos resultados para la caracterización de la variación genética interespecífica y la identificación de S.

polycystum C. Agardh, *S. siliquosum* J. Agardh, *S. bacularia* Mertens, *S. glaucescens* J. Agardh y *S. oligocystum* Montagne de Malasia y Singapur (Ho *et al.*, 1995b). También el análisis de RAPDs ha servido para evaluar los niveles de diversidad y estructura genética de *S. polyceratium* (Engelen *et al.*, 2001).

Este trabajo utiliza los RAPDs para analizar los niveles de las diferencias genéticas del alga parda *S. lapazeanum* en tres sitios, e inferir cuáles son los alcances de la dispersión de esta especie.

1.4. ESTUDIOS SOBRE GENÉTICA DE POBLACIONES EN MACROALGAS.

Existen varios trabajos sobre diversidad y estructura genética mediante análisis de isoenzimas en poblaciones de algas verdes como *Enteromorpha linza* (L) J. Ag. (Innes, 1987). Algunos géneros de algas rojas estudiadas son *Eucheuma* (Cheney and Babbel, 1978), *Porphyra* (Lindstrom, 1993) y *Gelidium* (Sosa *et al.*, 1998).

Sobre algas pardas, los primeros que estudiaron la estructura genética fueron Bhattacharya *et al.* (1990), Lu y Williams (1994) y Williams y Di Fiori (1996). Bhattacharya *et al.* (1990) encontraron evidencia de subestructura genética entre sitios distanciados por dos kilómetros, a partir de variaciones del ADN ribosomal de *Costaria costata* C. A. Agardh analizadas con RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción, en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism). *Halidrys dioica* Gardner, perenne y con flotadores que le confieren el potencial para dispersarse a grandes distancias, mediante el análisis de isoenzimas mostró niveles altos de diversidad y baja estructura genética (Lu y

Williams, 1994). Mientras que, el alga dioica con capacidad de dispersión limitada a distancias cortas *Pelvetia fastigiata* J. Ag., presentó, también con isoenzimas, niveles bajos de diversidad genética y una alta estructuración espacial (Williams y Di Fiori, 1996).

A la fecha se han realizado varias investigaciones sobre la diferenciación genética de macroalgas rojas mediante el uso de RAPDs, entre ellos con *Phycodrys rubens* (L.) Batters (van Oppen *et al.*, 1995), *Furcellaria lumbricalis* Hudson (Valatka *et al.*, 2000), *Delisea pulchra* Greville (Wright *et al.*, 2000) y *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq (Faugeron *et al.*, 2001). El análisis de RAPDs ha sido utilizado específicamente para estimar patrones de dispersión en el alga roja *Gelidium sesquipedale* Clem. (Alberto *et al.*, 1999). Entre las algas pardas que han sido evaluadas con RAPDs están *Postelsia palmaeformis* Ruprecht (Coyer *et al.*, 1997) y *Pelagophycus porra* Leman (Miller *et al.*, 2000).

1.5. OBJETIVOS.

1.5.1. Objetivo general.

Analizar la estructura genética de *Sargassum lapazeanum* en escalas intrapoblacional, local y regional, con el fin de inferir sus posibles patrones de dispersión a lo largo de la costa del suroeste del golfo de California.

1.5.2. Objetivos particulares.

-Estandarizar un método accesible y rápido para extraer ADN de *S. lapazeanum*.

-Calcular la diversidad genética de *S. lapazeanum*, a partir de tres sitios en la costa oriental de B.C.S.

-Determinar la estructura genética de *S. lapazeanum*, a lo largo de escalas intrapoblacional, local y regional.

-Estimar las distancias genéticas de las poblaciones de *S. lapazeanum* para inferir sus posibles patrones de dispersión en el suroeste del golfo de California.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. ÁREA DE ESTUDIO.

Sargassum lapazeanum se estudió en tres sitios a lo largo de su distribución en la costa occidental del golfo de California. Los sitios estudiados fueron: Santa Rosalía, Saladito y rancho Piedras Coloradas (fig. 3).

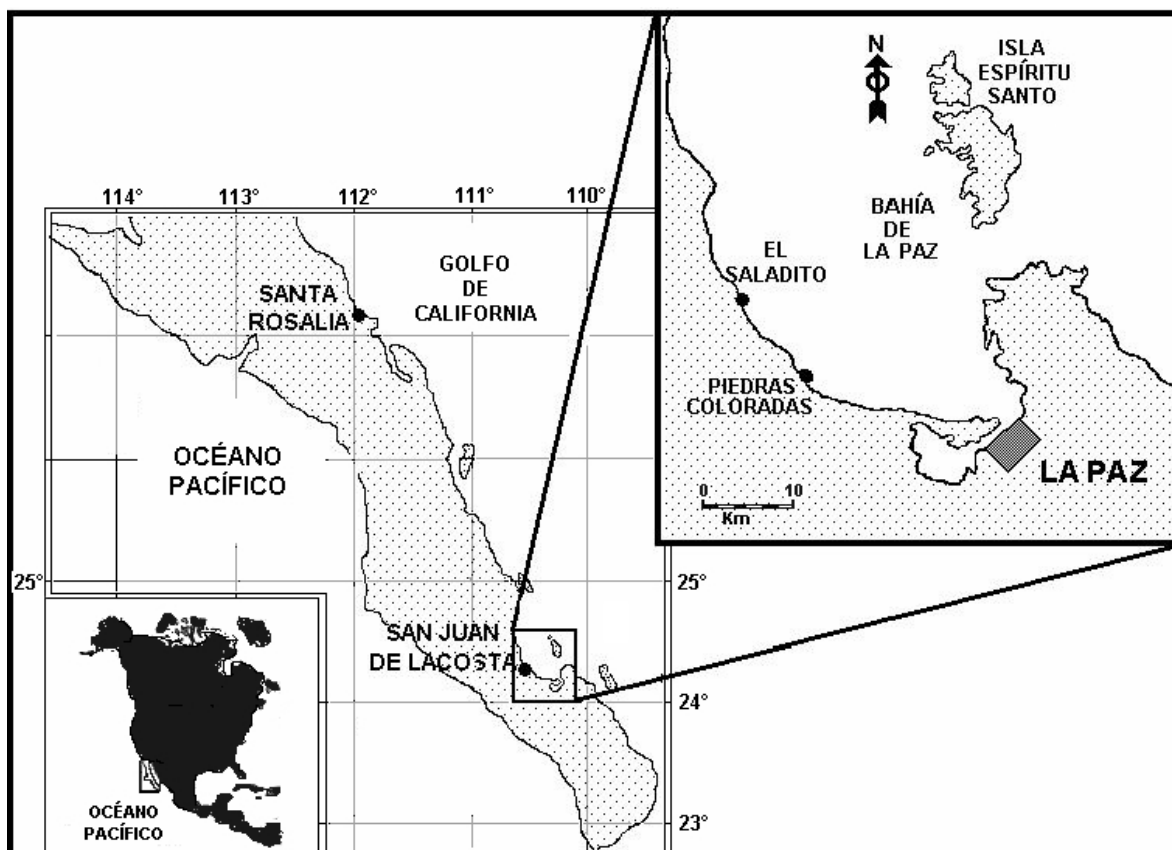


Figura 3. Área de estudio.

2.1.1. Santa Rosalía (SR).

Sitio rocoso, expuesto al oleaje, localizado en el extremo sur del malecón del poblado de Santa Rosalía ($27^{\circ}19'52''N$, $112^{\circ}15'34''O$). Los talos de *S. lapazeanum* se encontraron distribuidos en parches, a una profundidad (tres

metros aproximadamente) mayor a la de los otros lugares estudiados. Al momento de la colecta, *S. lapazeanum* presentó tallas grandes (más de dos metros), mayores a las encontradas en los otros sitios.

2.1.2. Saladito (SAL).

Pequeña bahía rocosa entre Saladito y el predio Junco aproximadamente a 5 km al norte de San Juan de la Costa (24°25'48"N, 110°41'33'O). En SAL los talos de *S. lapazeanum* se encontraron distribuidos en parches, en una zona más somera que en los otros lugares (menos de un metro de profundidad). Cuando se realizó la colecta, los sargazos presentaban tallas pequeñas (alrededor de 30 a 60 cm), menores en comparación con los otros sitios, y no se observaron otras especies de *Sargassum*.

2.1.3. Rancho Piedras Coloradas (RPC).

Alrededor de 5 km al sur de San Juan de la Costa (24°20'16"N, 110°18'23"O). Se colectó a lo largo de una punta rocosa expuesta al oleaje, en la que *S. lapazeanum* es abundante y forma una franja continua, que se encuentra paralela a la costa y separada de otras especies del mismo género. Durante la colecta se observaron tallas de hasta un metro y medio.

En este trabajo se analizan las siguientes escalas:

a) **Regional**, separación por cientos de kilómetros, entre SR y los dos sitios dentro de la bahía de La Paz. SR se encuentra a una distancia del contorno de la costa de aproximadamente 481.6 km de SAL (fig. 3).

b) **Local**, distancia en decenas de kilómetros, entre SAL y RPC. SAL y RPC se encuentran dentro de la bahía de La Paz (LP) y están separados por alrededor de 10.8 km (fig. 3).

c) **Intrapoblacional**, del orden de 1m hasta decenas de metros, tomando en cuenta los dos transectos de 40 m, separados por 20 m, a lo largo de los cuales se realizaron las colectas en cada sitio (fig. 4).

2.2. COLECTA.

La colecta en SR, SAL y RPC se realizó en junio del 2000, antes de la época en que la abundancia de *S. lapazeanum* disminuye al mínimo nivel, según lo registrado en RPC (M.G Rivera, com. pers.). Las muestras se colectaron en dos transectos de 40 m cada uno, ambos paralelos a la línea de costa, con una separación de 20 m entre sí (fig. 4).

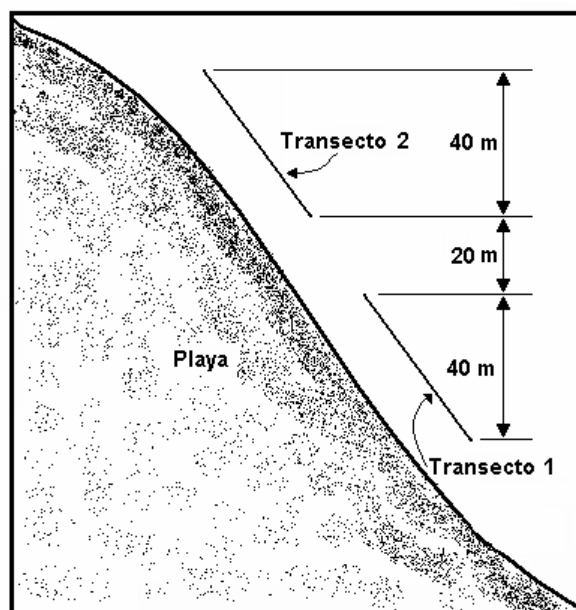


Figura 4. Orientación y distancia entre los transectos para la colecta de *S. lapazeanum* (vista superior).

En cada transecto se colectaron al azar 30 fragmentos de aproximadamente 5 cm de la parte apical de una sola fronda por talo, es decir, se cuidó que cada muestra correspondiera a un individuo diferente. Los fragmentos se cortaron en talos de diferentes tallas. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico, que se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento y preservación en el laboratorio. Las muestras de SR se lavaron después de la colecta y se colocaron en nitrógeno líquido hasta llegar al laboratorio de Genética Molecular en el CIBNOR (La Paz, B.C.S.), donde se efectuaron los análisis.

Se realizaron colectas preliminares en varios sitios de la bahía de La Paz, durante el verano de 1999, con la finalidad de estandarizar los métodos de preservación de muestras y extracción de ADN. Todas las colectas se hicieron a lo largo de transectos paralelos a la costa. Se colectaron fragmentos de la punta de las frondas de aproximadamente 5 cm, excepto cuando se probó la diferencia del ADN obtenido a partir del ápice con el de base de las frondas, para lo cual se colectaron frondas completas de entre 10 y 15 cm. En todas las colectas se tomó muestra de una sola fronda por talo para asegurar que cada muestra correspondiera a un individuo diferente. Las muestras que sirvieron para probar la fijación en etanol fueron colocadas en etanol 96% en el sitio de colecta. En otras colectas las muestras fueron guardadas en bolsas de plástico y mantenidas en hielo hasta su procesamiento.

2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Una vez en el laboratorio los fragmentos colectados se limpiaron cuidadosamente según lo que recomiendan Ho *et al.* (1995a). Primero se eliminaron los epifitos más notorios mediante cepilladas suaves con un cepillo de dientes de plástico y pinzas. Después todas las muestras se lavaron dos veces con agua purificada, se enjuagaron perfectamente con agua destilada y se eliminó el exceso de agua. Durante este proceso se verificó que no quedaran epifitos.

2.4. PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

El ADN puede obtenerse a partir de muestras frescas o preservadas con diferentes métodos como: fijación en etanol, secado al aire o con silica gel y congelación (Oliveira, 1995). Con *S. lapazeanum* se probaron tres métodos de preservación para conocer el más práctico y eficiente para la obtención de ADN puro. Los métodos probados fueron: fijación en etanol, secado con silica gel y congelación.

2.4.1. Fijación en etanol.

Las muestras se colocaron en etanol 96% inmediatamente después de la colecta. Este material se lavó hasta el momento que se efectuaba la extracción de ADN. Con este método se probaron tres variantes: a) secadas al aire libre en el laboratorio, b) rehidratadas durante una hora con agua destilada estéril y c) procesadas recién sacadas del etanol. Esta última variante fue usada para las pruebas de calidad de ADN, debido a que con estas muestras se obtuvo ADN menos degradado.

2.4.2. Secado con silica gel.

Una vez lavadas, cada una de las muestras se colocó en una bolsa de plástico y se cubrió totalmente con silica gel.

2.4.3. Congelación.

Cada una de las muestras lavadas se guardó en una bolsa de plástico, las cuales se mantuvieron congeladas a -20°C .

2.4.4. Pruebas de la calidad del ADN obtenido a partir de muestras preservadas por diferentes métodos.

2.4.4.1. Ápice y base de las frondas.

Se probaron las diferencias en la calidad del ADN obtenido a partir de la mitad de las frondas hasta la punta (ápice) y de la mitad hacia el sitio de corte (base) en cuatro frondas fijadas en etanol 96%, cinco frondas secadas con silica gel y cinco frondas congeladas. Se usaron frondas con una longitud entre 10 y 15 cm. El ADN de ápices y bases se obtuvo por triplicado, es decir, el tejido molido se repartió en tres microtubos (Eppendorf) de 1.5 mL que fueron procesados al mismo tiempo.

2.4.4.2. Métodos de preservación y PCR.

Una vez obtenido el ADN de frondas preservadas con diferentes métodos, se evaluó su eficiencia en la amplificación por RAPD. Se procesaron dos muestras fijadas en etanol, dos secadas con silica gel y dos congeladas, para cada muestra se realizaron seis repeticiones, esto es, el tejido molido se repartió en seis tubos diferentes que se analizaron juntos. En este ensayo, la amplificación se probó con tres oligonucleótidos: OPA04, OPA13 y OPM10 (ver sección 2.7.3).

2.5. HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO.

Fragmentos de muestra de entre 0.01 g a 0.03 g (peso húmedo) fueron molidos en un mortero de porcelana. Al momento de moler se agregó nitrógeno líquido para que el tejido quedara finamente molido. El tejido molido se transfirió a microtubos de 1.5 mL que se conservaron en hielo hasta iniciar el proceso para la obtención del ADN.

2.6. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE *S. lapazeanum*.

2.6.1. Protocolos evaluados.

La extracción de ADN total de *S. lapazeanum*, con buena calidad para ser analizado por RAPD, se logró después de probar los siguientes procedimientos utilizados con otras especies del género *Sargassum*.

1. CTAB modificado por Ho *et al.* (1995a).
2. Sarcosil modificado por Ho *et al.* (1995a).
3. CTAB modificado por Phillips (1998).

En el Anexo 1 se presentan los pasos de dichos protocolos y del modificado para la extracción de ADN de *S. lapazeanum*.

Los protocolos 1 y 2 se probaron únicamente con tejido fijado en etanol 96%. Con el protocolo 3 se procesaron muestras fijadas en etanol 96% y congeladas. El protocolo implementado para *S. lapazeanum* se probó con muestras congeladas y secadas con silica gel. Con cada uno de los protocolos se evaluó el color y la consistencia del precipitado de ADN después de la extracción,

la concentración de ADN obtenido, su relación $A_{260/280}$, y su éxito como templado para RAPD.

2.6.2. Protocolo de extracción de ADN total de *S. lapazeanum*.

Se realizaron extracciones por triplicado, esto es, el tejido molido de una sola muestra se repartió en tres microtubos de 1.5 mL que se analizaron al mismo tiempo. Se realizaron extracciones de 60 individuos de cada población (30 por transecto), esto hace un total de 540 extracciones si se toma en cuenta que cada muestra se procesó por triplicado. La extracción de ADN total de *S. lapazeanum* resultó de la modificación del método de CTAB descrito por Phillips (1998). A cada tubo con tejido molido se agregaron 700 μ L de buffer de lisis (2% p/v CTAB, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.2 M EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.1% p/v SDS, 3.5 mM ácido dietilditiocarbámico –DIECA-, 1% v/v β -mercaptoetanol –ME-, 3% p/v polivinilpolipirrolidone –PVPP, se incorporó al momento de usar-). Después, se incubó durante 60 min a 50°C en un baño María (Precision, modelo 182). Durante este tiempo los tubos se agitaron en un vortex (VWR Scientific Products, modelo 945097) cada 20 min. Posteriormente, se realizó una extracción con 700 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (sevac; 24:1 v/v), para ello se agitó en vortex durante dos minutos. Para separar el ADN se centrifugó a 17530 x g por 10 min a 25°C. Se recuperó la fase superior cristalina en un tubo nuevo y se agregaron 400 μ L del buffer de lisis. Por segunda ocasión, se incubó en baño María a 50°C durante 15 min. Se hizo una segunda extracción con 350 μ L de sevac, para lo cual se agitó en vortex por un minuto. Se centrifugó a 17530 x g, por 10 min a 25°C. Se

recuperó la fase superior en un tubo estéril y se adicionó 1 mL de etanol absoluto preenfriado a -20°C . El tubo se guardó a -20°C durante toda una noche para precipitar todo el ADN. Posteriormente, se centrifugó a $17530 \times g$ durante 10 min a 4°C para recuperar el ADN en el fondo del tubo. El ADN obtenido se lavó dos veces con $500 \mu\text{L}$ de etanol 70% frío. El ADN se secó al aire y finalmente se disolvió en $50 \mu\text{L}$ de TE (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001M EDTA pH 8.0).

Se cuantificó y verificó la pureza del ADN obtenido en un espectrofotómetro (Beckman DU-600) con el modelo de Warburg y Christian (1942). Este modelo registra las absorbancias a 260 nm (absorbe ácidos nucleicos), 280 nm (detecta proteínas por los residuos de grupos fenólicos) y 320nm (corrección de fondo del solvente). También calcula los cocientes $A_{260/280}$ y $A_{280/260}$. $A_{260/280}$ indica el grado de pureza del ADN en relación a las proteínas y el ARN. Una relación $A_{260/280}$ entre 1.7 y 1.9 indica que el ADN está puro. Una $A_{260/280}$ menor a 1.7 es reflejo de que la cantidad de proteínas es más elevada que la de ácidos nucleicos y una $A_{260/280}$ superior a 1.9 indica que existe mayor cantidad de ARN que de ADN. El cociente $A_{280/260}$ puede ser usado como un indicador de la pureza de proteínas con respecto a los ácidos nucleicos (Werman *et al.*, 1990).

Para la visualización del ADN obtenido se corrieron electroforesis a 70V durante 30 min en geles de agarosa 0.8%, preteñidos con bromuro de etidio, a través de un sistema amortiguador TBE 1X (TBE 10X: 890mM Tris base, 890mM ácido bórico y 20mM de EDTA 0.5 M pH 8.0). Las muestras que contenían grandes cantidades de ARN se incubaron con $2 \mu\text{L}$ de ARNasa ($1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$) a 37°C por 30 min en baño María. Posteriormente, el ADN se cuantificó

espectrofotométricamente y se realizaron diluciones en H₂O destilada estéril para ajustar la concentración de ADN a lo requerido en el proceso de amplificación.

2.6.3. Ensayos de purificación.

Durante la estandarización del protocolo de extracción de ADN de *S. lapazeanum* se probaron tres procedimientos para purificar el ADN. Esto con la finalidad de obtener ADN suficientemente limpio, que pudiera amplificarse sin problemas mediante RAPD.

2.6.3.1. Purificación de ADN con ARNasa y segunda extracción con fenol-cloroformo.

El ADN se incubó con 2 μL de ARNasa ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) por 30 min a 37°C en baño María. Posteriormente, se resuspendió en 200 μL de TE para aumentar el volumen y se realizó una extracción con 200 μL de fenol-cloroformo, para lo cual se agitó en vortex durante un minuto. Se centrifugó a $17530 \times g$ por 20 min a 4°C. Se recuperó la fase superior en un tubo estéril y se añadieron 400 μL de etanol absoluto. El tubo se guardó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a $17530 \times g$ por 20 min a 4°C, se realizaron dos lavados con 500 μL de etanol 70% pre-enfriado, entre cada lavado se centrifugó a $17530 \times g$ por 10 min a 4°C. Finalmente, se resuspendió en 50 μL de TE.

2.6.3.2. Purificación de ADN con la resina Chelex 100.

La utilización de la resina Chelex 100 estuvo basada en Walsh *et al.* (1991). A 50 μL de ADN se adicionaron 150 μL de Chelex (5%), 2 μL de proteinasa K

(10mg mL⁻¹) y 7 µL de ditioneitol (DTT 1M). Se incubó a 56°C durante 30 a 60 min. Se agitó en vortex por 10 seg. Finalmente, se centrifugó a 15000 x g por 20 seg.

2.6.3.3. Purificación con Gene Clean.

El kit Gene Clean (Bio 101. La Jolla, Ca.) se usó de la forma siguiente:

A 100 µL del sobrenadante de la última extracción con sevac se agregaron 100 µL de NaI 6M. Esto se calentó a 55°C en baño María durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 10 µL de silica gel, se mezcló en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a 8944 x g por 1 min y se tiró el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 300 µL de solución New Wash 1X fría, para ello se agitó en vortex. Se centrifugó a 8944 x g por 1 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 20 µL de H₂O destilada estéril en vortex y se incubó a 55°C durante 10 min. Se centrifugó a 8944 x g por 1 min. El sobrenadante se colectó en tubo estéril y se colocó en frío. La silica gel que quedó en el fondo se resuspendió con 20 µL de H₂O destilada estéril. Se repitió el proceso a partir de este paso, hasta colocar más sobrenadante con el obtenido inicialmente. Se centrifugó, por última vez, a 8944 x g durante 2 min para asegurar la eliminación de toda la silica y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

Una vez que el protocolo de extracción de ADN de *S. lapazeatum* estuvo estandarizado, el ADN obtenido únicamente se incubó con ARNasa (sin realizar una segunda extracción) antes del proceso de amplificación. Esto debido a que la relación A_{260/280} resultó igual o mayor de 1.9 en la mayoría de las muestras.

2.7. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *S. lapazeanum* POR RAPD.

2.7.1. Estandarización de las concentraciones óptimas de ADN y de dNTPs.

En la reacción en cadena de la polimerasa es importante la estandarización de la concentración de ADN para templado, ya que poca cantidad de ADN provoca amplificaciones ineficientes, mientras que el exceso de ADN ocasiona amplificaciones inespecíficas. Por su parte, concentraciones muy bajas de dNTPs disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, en tanto que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción (Barrera Saldaña *et al.*, 1993). Por tanto, se estandarizaron las concentraciones de ADN blanco y dNTPs. Para ello se probaron las concentraciones de ADN siguientes: 25 ng, 50 ng, 75 ng y 100 ng, así como las siguientes de dNTPs: 0.6 mM, 0.4 mM y 0.2 mM. Dichas concentraciones se analizaron con ADN obtenido a partir de dos fragmentos congelados (F) y de dos secados en silica gel (SiG) y con los oligonucleótidos OPA02, OPA03, OPA04, OPA13 y OPM10 (Tabla I).

2.7.2. Reproducibilidad de RAPD en *S. lapazeanum*.

La reproducibilidad de las amplificaciones del ADN por RAPD es un aspecto que debe cuidarse, debido a que una de las desventajas de esta técnica es su sensibilidad a las variaciones en el proceso. Para comprobar que las amplificaciones obtenidas eran reproducibles, se amplificaron mediante RAPD, al mismo tiempo y con el mismo oligonucleótido, los tres extractos de ADN obtenidos en 79 muestras (estos datos no fueron considerados en el análisis genético). Una vez estandarizado el proceso de amplificación, se decidió usar uno sólo de los tres

extractos de ADN obtenido, el cual se eligió por su concentración y su relación $A_{260/280}$ estimada mediante lecturas espectrofotométricas.

2.7.3. Elección de oligonucleótidos RAPD.

Se probaron los oligonucleótidos OPA02, OPA03, OPA04, OPA13 y OPM10, secuencias que han amplificado con otras especies del género *Sargassum* (Ho *et al.*, 1995a). También se examinaron los veinte oligonucleótidos del kit AR (Operon Technologies), de estos únicamente cinco generaron productos de PCR. En la tabla I se detalla la secuencia de todos los oligonucleótidos probados.

TABLA I. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores RAPD probados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia	Oligonucleótido	Secuencia
OPA02*	TGCGGAGCTG	OPAR09	GGGGTGTCT
OPA03*	AGTCAGCCAC	OPAR10	TGGGGCTGTC
OPA04*	AATCGGGCTG	OPAR11	GGGAAGACGG
OPA13*	CAGCACCCAC	OPAR12	GGATCGTCGG
OPM10*	TCTGGCGCAC	OPAR13	GGGTCGGCTT
OPAR01	CCATTCCGAG	OPAR14	CTCACAGCAC
OPAR02	CACCTGCTGA	OPAR15	ACACTCTGCC
OPAR03	GTGAGGCGCA	OPAR16	CCTTGCGCCT
OPAR04	CCAGGAGAAG	OPAR17	CCACCACGAC
OPAR05	CATACCTGCC	OPAR18	CTACCGGCAC
OPAR06	TGGGGCTCAA	OPAR19	CTGATCGCGG
OPAR07	TCCTTCGGTG	OPAR20	TGCGCCATCC
OPAR08	GTGAATGCGG		

* = oligonucleótidos reportados con otras especies del género *Sargassum*.

Para cada PCR se realizó una mezcla de reacción como se indica en la tabla II.

TABLA II. Mezcla de reacción.

Componentes	Cantidad por individuo (μL)
DNTPs (10 mM)	1.5
Solución amortiguadora 10x para PCR	2.5
H ₂ O miliQ	17.8
Taq ADN polimerasa (5 U μL^{-1})	0.2

De esta mezcla se adicionaron 22 μL a cada tubo, en el que previamente se colocaron el ADN extraído y el oligonucleótido. Por lo tanto, se manejó un volumen final de 25 μL (Tabla III).

TABLA III. Contenido de los tubos sometidos a PCR.

Componentes	Cantidad por individuo
ADN (12.5 ng μL^{-1})	2 μL
Oligonucleótido (49 a 90 pmol)	1 μL
Mezcla de reacción	22 μL
Aceite mineral	1 gota

La amplificación consistió de 45 ciclos y se realizó en un termociclador (Techne, Cyclogene, E.U.A.), de acuerdo al programa descrito en la tabla IV. En cada PCR fue incluida una muestra que hubiera amplificado anteriormente para que sirviera como control positivo del proceso.

TABLA IV. Programa de amplificación.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	1 min.	45
Hibridación	37°C	1 min.	
Extensión	72°C	2 min.	
Extensión final	72°C	3 min.	

La selección de los oligonucleótidos se realizó a una temperatura de hibridación laxa de 30°C y todas las muestras fueron analizadas con una temperatura más selectiva de 37°C.

2.7.4. Análisis de productos RAPD.

Un volumen de 12 µL del producto de PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1.5% preteñidos con bromuro de etidio. Como referencia del tamaño de las bandas observadas en los geles se utilizó el marcador VII (Boehringer) que contiene fragmentos de 8,576 pb a 359 pb.

Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas mediante un sistema UVI Tech (St John's Innovation Center) y se analizaron con el programa UVIDOC (versión 97.02, UVI Tech), con el cual se ajustó el brillo y contraste luminoso para optimizar la identificación de las bandas. Se marcaron todas las bandas claramente definidas y se calculó su tamaño en pares de bases. Los tamaños de los fragmentos también se calcularon por medio de regresiones lineales de los logaritmos de las distancias de las bandas (medidas directamente en las imágenes impresas), debido a que varias bandas quedaban fuera del rango del marcador de peso molecular utilizado. Las regresiones lineales se realizaron en la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office 98). Se contrastaron los tamaños calculados con los estimados por el UVIDOC para acomodar a las bandas que se observaron en las muestras de cada sitio por tamaños, y así formar las matrices de presencia-ausencia.

2.8. ANÁLISIS DE DATOS

En los patrones RAPD cada banda representa un *locus* con dos estados (presencia-ausencia). Debido a su característica dominante, la heterocigosidad no puede ser determinada. Sin embargo, existen estimadores para modificar los modelos originales (Lynch y Milligan, 1994). Los patrones de bandeo fueron tratados como fenotipos, los cuales se usaron para obtener información genotípica.

Con los datos obtenidos se realizaron:

1. Análisis de diversidad, estructura y distancia genética con el programa TFPGA.
2. Análisis de diversidad de Shannon.
3. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

2.8.1. Análisis de diversidad, estructura y distancia genética con el programa TFPGA.

El programa TFPGA (en inglés Tools For Population Genetic Analyses; Miller, 1997), al analizar RAPDs, asume dos alelos por *locus*, esto es, cada banda presente se considera como el genotipo dominante y la ausencia de esa misma banda en otro organismo representa el genotipo de homocigoto recesivo. Para realizar los cálculos de diversidad, estructura y distancia genética con los modelos que consideran valores de heterocigosidad, se escogió en el TFPGA la opción de utilizar el estimador basado en las expansiones de segundo orden de Taylor, desarrollado por Lynch y Milligan (1994). También, se eligió que las frecuencias alélicas generadas por el TFPGA se redondearan al valor más cercano posible de

la muestra observada.

Se estimaron las frecuencias alélicas y de heterocigotos, la heterocigosidad y el porcentaje de *loci* polimórficos para las diferentes escalas consideradas en este trabajo. Como los RAPDs son un marcador dominante, el TFPGA realiza las estimaciones bajo el supuesto de que se cumplen las proporciones Hardy-Weinberg para poblaciones en equilibrio. Por lo tanto, se seleccionaron las heterocigosidades esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg entre las tres opciones que da el TFPGA. Además, se eligió un criterio del 95% para la estimación del porcentaje de *loci* polimórficos.

Se calcularon los coeficientes F de Wright por el método de Weir y Cockerham (1984). El valor de theta (θ) corresponde a F_{ST} (Weir, 1996). Las estimaciones de θ calculadas por el TFPGA están realizadas bajo el supuesto de que se cumplen las proporciones Hardy-Weinberg para datos RAPD, esto significa que los coeficientes F_{IS} y F_{IT} son iguales a cero y θ respectivamente. θ_S indica la diferenciación de las poblaciones dentro de las regiones (escala regional), θ_P indica la diferenciación de las poblaciones (escala local) y θ_{SS} indica la diferenciación de los transectos en las localidades dentro de las regiones (escala intrapoblacional). Se obtuvieron los resultados para cada *locus* y se realizó la estimación de las varianzas con el método jackknife. También se realizó un bootstrap para generar intervalos de 95% confianza con 10,000 iteraciones.

Las distancias genéticas se obtuvieron sin sesgo de acuerdo a Nei (1978).

Con una prueba de Mantel (Mantel, 1967) se evaluó la correlación de las distancias genéticas con las distancias geográficas, para ello se corrieron 1,000 permutaciones.

A partir del cálculo de las distancias genéticas se agrupó a las poblaciones por el método de UPGMA (agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada, en inglés; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). En este agrupamiento se realizó un procedimiento de bootstrap con 10,000 iteraciones y se calculó el porcentaje de loci que sustentan los nodos.

2.8.2. Análisis de diversidad de Shannon.

El índice de diversidad de Shannon fue calculado de acuerdo a Bussell (1999) con la siguiente fórmula:

$$H'_j = -\sum(p_i \cdot \log_2 p_i), \quad (2)$$

donde

H'_j = índice de diversidad de Shannon

p_i = frecuencia de la presencia de una banda RAPD (*locus*) en el total de observaciones del transecto, la localidad o la región, según la escala analizada.

Para posibilitar la comparación de los niveles de diversidad detectados con diferente oligonucleótido dentro de la escala analizada, los valores H'_j se promediaron por oligonucleótido en todos los transectos, las localidades o las regiones por medio de la fórmula siguiente:

$$H'_{pop} = (1/n) * (\sum H'_j), \quad (3)$$

donde: H'_{pop} = índice de diversidad de transectos, localidades o regiones.

H'_j = índice de diversidad de Shannon

n = número de transectos, localidades o regiones.

La diversidad total de *S. lapazeanum* (H'_{sp}) fue calculada como H'_j (fórmula 2), donde los valores p_i son las frecuencias de la presencia o ausencia de una banda RAPD (*locus*) en el total de muestras (112 individuos para el oligo OPAR18 y 76 para el oligo OPAR06).

La diversidad dentro de las diferentes escalas analizadas se calculó para cada oligonucleótido como:

$$H'_{pop} / H'_{sp} \quad (4)$$

El componente de diversidad entre los diferentes niveles evaluados se estimó para cada oligonucleótido con la fórmula:

$$1 - (H'_{pop} / H'_{sp}) \quad (5)$$

Este valor equivale a G'_{ST} , medida de la heterogeneidad entre poblaciones de Nei (1973).

El índice de Shannon resulta un análisis complementario, que no requiere tomar en cuenta los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg, como lo hacen los modelos convencionales para el análisis genético. Sus desventajas son una menor flexibilidad en la división de la diversidad y la imposibilidad de desarrollar pruebas de significancia.

2.8.3. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) fue usado para estimar los componentes de varianza para los fenotipos RAPD bajo el

supuesto de estructura poblacional en las escalas regional, local e intrapoblacional. En Arlequín ver 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) se calcularon los valores ϕ_{ST} (Φ_{ST} , análogos a F_{ST} de Wright) y se realizó un procedimiento de permutaciones (10,000 réplicas) para probar su significancia. El AMOVA fue desarrollado originalmente para haplotipos de RFLP, pero ha sido modificado para usarse con datos genéticos dominantes como los RAPDs. La principal ventaja del AMOVA se debe a que los métodos de permutación para probar la significancia hacen que no sea necesario cumplir el supuesto de normalidad, requerido en un ANOVA clásico. La principal desventaja de un AMOVA es que debe suponerse equilibrio de Hardy-Weinberg y este no puede ser determinado a partir de datos RAPD. Los resultados del AMOVA se contrastaron con los del índice de Shannon, ya que en un par de trabajos se han encontrado resultados equivalentes sobre la diversidad y estructuración de poblaciones con ambos análisis (Bussell, 1999; Engelen *et al.*, 2001).

III. RESULTADOS.

3.1. PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

3.1.1. Ápice y base de las frondas.

No se observaron diferencias significativas entre la calidad del ADN de la base o del ápice, probablemente, debido a que las frondas procesadas eran pequeñas (entre 10 y 15 cm). Sin embargo, se notó que las muestras congeladas resultaron las más eficientes, ya que en general se obtuvo ADN más puro, con los promedios de $A_{260/280}$ más altos y las menores desviaciones estándar (Tabla V). Además, las bandas de ADN obtenido a partir de material congelado se notaron más definidas y claras en los geles (fig. 5).

TABLA V. Comparación de la calidad del ADN obtenido de frondas preservadas con tres métodos diferentes (valores promedio de $A_{260/280}$ y desviación estándar).

ETANOL		SILICA GEL		CONGELADO	
Ápice	Base	Ápice	Base	Ápice	Base
1.06 ± 0.20	0.84 ± 0.41*	1.29 ± 0.17	1.37 ± 0.3	1.82 ± 0.05	1.67 ± 0.10
1.16 ± 0.14	0.72 ± 0.54*	0.99 ± 0.53	1.88 ± 0.86*	1.77 ± 0.07	1.87 ± 0.53
1.16 ± 0.11	1.39 ± 0.16	0.97 ± 0.65	0.92 ± 0.84	1.39 ± 0.08	1.27 ± 0.18
1.47 ± 0.15	1.55 ± 0.03	1.35 ± 0.22	1.11 ± 0.55	1.92 ± 0.03	1.91 ± 0.06
		1.52 ± 0.08	1.76 ± 0.05	1.62 ± 0.14	1.78 ± 0.09

* sólo incluyen 2 repeticiones.

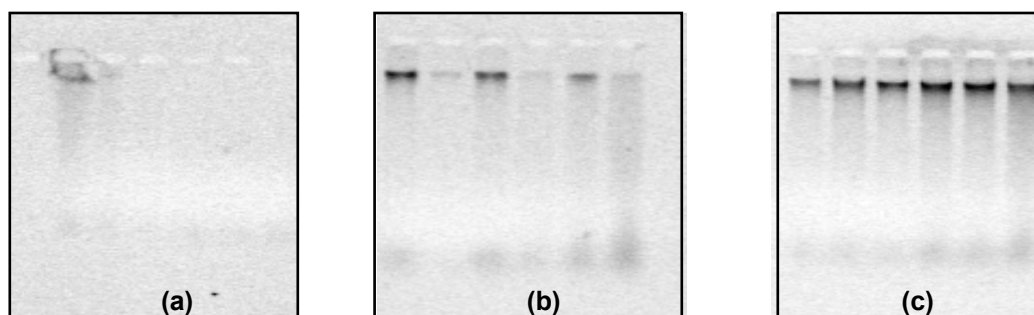


Figura 5. Foto de geles con ADN obtenido a partir de muestras preservadas en: (a) Etanol, (b) Silica Gel y (c) Congeladas

Para el análisis genético se utilizó únicamente la parte apical de las frondas, puesto que este es el tejido más joven y con menos epifitos.

3.1.2. Métodos de preservación y PCR.

Con este ensayo se observó el ADN más puro (promedio de $A_{260/280} = 1.81$; Tabla VI) y los mayores porcentajes de amplificación a partir de muestras congeladas (fig. 6). Aunque la presencia de productos de PCR fue variable, se notó mayor consistencia en los resultados con muestras congeladas. Por tanto, todas las muestras usadas en el análisis genético se conservaron congeladas.

TABLA VI. Eficiencia de los métodos de preservación en la amplificación de ADN de *S. lapazeanum* por RAPD con los oligonucleótidos OPA04, OPA13, OPM10.

Muestra	$A_{260/280}$	OPA04	OPA13	OPM10	Muestra	$A_{260/280}$	OPA04	OPA13	OPM10
Etanol 1	1.1	A	-	-	Etanol 2	1.3	-	-	-
	1.3	-	A	-		1.6	A	-	-
	1.1	-	-	-		1.5	A(bt)	-	-
	1.6	A	A	-		1.6	A	-	-
	1.4	A	-	-		1.5	A	-	-
	1.3	-	-	-					
Silica gel 1	1.4	A(bt)	-	A(bt)	Silica gel 2	1.5	A	-	A
	1.5	A	-	A		1.5	-	-	-
	1.1	-	-	A(bt)		1.6	-	A	A
	1.4	A(bt)	-	-		1.7	A	A	-
	1.4	-	-	-		1.8	A	-	-
	0.5	A(bt)	-	A		1.8	A	A	-
Congelada 1	1.9	A(bt)	-	-	Congelada 2	1.7	-	A	A
	1.9	-	-	A		1.7	-	-	A
	1.9	-	A	-		1.5	-	-	A
	1.9	-	-	-		1.8	A	A	A
	2.0	-	-	A		1.9	A	A	A
	1.9	A	-	-		1.7	A	A	A

“-“ = no amplificó, A = amplificó, bt = bandas tenues.

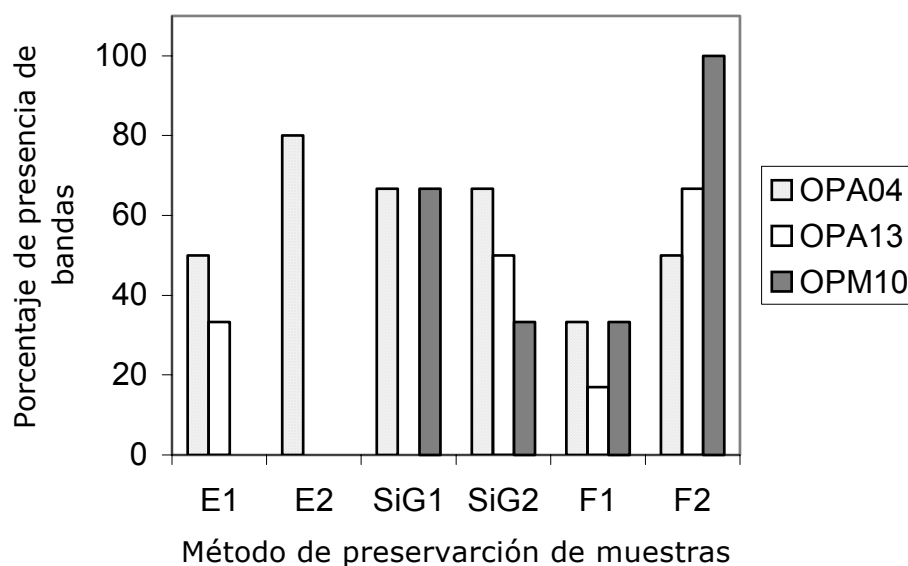


Figura 6. Porcentaje de amplificación con RAPD para diferentes métodos de preservación. E = etanol, SiG = silica gel y F = congeladas.

3.2. OBTENCIÓN DE ADN.

3.2.1. Estandarización del protocolo de extracción de ADN para *S. lapazeanum*.

La utilización de nitrógeno líquido y de una pequeña cantidad de tejido durante la homogeneización resultaron importantes para lograr la extracción de ADN de *S. lapazeanum*.

La tabla VII presenta las diferencias entre los métodos probados en cuanto al color y la consistencia del precipitado, la concentración de ADN obtenido, su relación $A_{260/280}$, y su éxito como templado para PCR.

TABLA VII. Comparación de los protocolos de extracción de ADN probados con *S. lapazeanum*.

Protocolo de extracción	Número de muestras	Características del precipitado	µg ADN g ⁻¹ (peso húmedo)	A260/280	Éxito de amplificación por RAPD
1. CTAB (Ho et al., 1995)	17	Pardo o transparente, gelatinoso	No se cuantificó	No se cuantificó	No fue probado
2. Sarcosil (Ho et al., 1995)	9	Pardo, gelatinoso	No se cuantificó	No se cuantificó	No fue probado
3. CTAB (Phillips, 1998)	44	Transparente, pardo, gelatinoso	1.63 a 18.60	0.20 a 1.71	No amplificó (sólo en controles positivos).
4. CTAB para <i>S.lapazeanum</i> modificado de (Phillips, 1998)	43	Blanco, pardo	1.49 a 13.08	1.04 a 2.16	Amplificó el 38.5%

Con el protocolo 1 se obtuvo ADN degradado y tenue, estos resultados no mejoraron después de que se purificó con ARNasa y se realizó una segunda extracción con fenol-cloroformo. Con el protocolo 2 no se logró extraer ADN.

El ADN obtenido de muestras fijadas en etanol, procesadas con el protocolo 3 se observó degradado y tenue, sin mejorar después de que se incubó con ARNasa y se realizó una segunda extracción con fenol-cloroformo. Este protocolo reveló bandas de ADN muy tenues a partir de tejido congelado. A pesar de que el ADN se limpió con Chelex 100, no se obtuvieron productos de PCR.

Las bandas de ADN mejor definidas se observaron con el protocolo 4 (estandarizado para *S. lapazeanum*), a partir de frondas congeladas y secadas con silica gel (fig. 5).

3.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *S. lapazeanum* POR RAPD.

3.3.1. Estandarización de las concentraciones óptimas de ADN y dNTPs.

En cuanto a la optimización del PCR se determinó que, a pesar de que hubo un porcentaje bajo de amplificación y se obtuvieron bandas tenues y borrosas, 25 ng fue la concentración de templado más eficiente (Tabla VIII). En tanto que, la variación de concentraciones de dNTPs no tuvo ningún efecto, por lo que se decidió utilizar 0.6 mM para contar con bases nucleotídicas suficientes.

TABLA VIII. Estandarización de la concentración de ADN blanco y dNTPs para PCR con cinco oligonucleótidos.

OLIGO	DNTPs ADN blanco [ng]	0.6 mM				0.4 mM				0.2 mM			
		25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
OPA02 (TGCGGAGCTG)	F1	+S	+S	-	-	-	-	-	-	+S	-	-	+S
	F2	+S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SiG1	-	-	-	-	+S	+	-	+S	+S	-	-	-
	SiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA03 (GTCAGCCAC)	F1	+S	-	-	-	+S	+	-	-	+SS	+	-	-
	F2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	SiG1	-	-	-	-	+	-	-	-	+S	-	-	-
	SiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA04 (AATCGGGCTG)	F1	+	+SS	+S	+S	+S	-	+S	-	+SS	-	-	-
	F2	-	-	-	-	+S	-	-	-	-	-	-	-
	SiG1	-	+S	-	-	+S	-	-	-	+SS	+S	-	+
	SiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA13 (CAGCACCCAC)	F1	+S	+	-	-	+S	-	-	-	+S	+	+	-
	F2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	SiG1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	SiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPM10 (TCTGGCGCAC)	F1	+S	+S	-	+S	+SS	+	-	+S	-	-	-	-
	F2	+SS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SiG1	+SS	+S	-	-	+S	-	-	-	+SS	+	-	-
	SiG2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

(-) No se presentaron bandas, (+) Amplificación positiva, S = bandas poco definidas.

3.3.2. Reproducibilidad de RAPD en *S. lapazeanum*.

La reproducibilidad de las amplificaciones aumentó con el uso de material preservado en congelación y con la práctica. Los extractos de ADN de la misma muestra, obtenidos en diferente tubo, presentaron patrones similares de bandas en al menos dos de tres repeticiones (fig. 7).

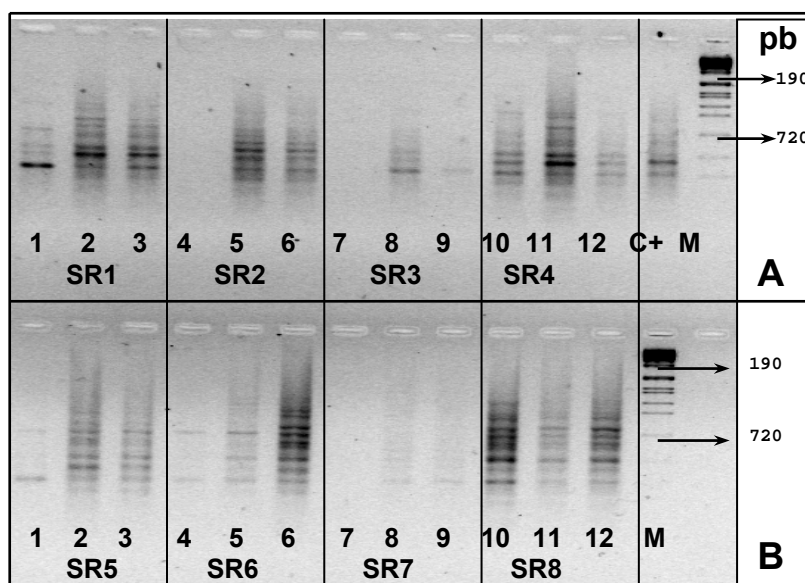


Figura 7. Productos RAPD obtenidos con el oligonucleótido OPA13, ADN de ocho muestras de SR por triplicado. Panel A: Individuos 1 al 4; Panel B: Individuos 5 al 8. C+: Control positivo, M: Marcador VII (Boehringer). pb: pares de bases.

3.3.3. Elección de oligonucleótidos RAPD.

De los 25 oligonucleótidos probados se escogieron los oligonucleótidos OPAR06 y OPAR18, debido a su polimorfismo, buena calidad y aceptable reproducibilidad de las bandas generadas.

3.4. DIVERSIDAD GENÉTICA.

3.4.1. Estimaciones realizadas con el TFPGA.

Con cada individuo se obtuvo un perfil de bandas RAPD único y no se encontraron bandas específicas para las regiones, las localidades, o los transectos. Se hallaron 56 bandas polimórficas para el oligonucleótido OPAR06 y 49 para el oligonucleótido OPAR18, que en total suman 105 bandas polimórficas (*loci*) analizadas. Las frecuencias alélicas de cada sitio se presentan en el anexo 2. Los tamaños de las bandas se calcularon entre 1930 y 180 pb. En la figura 8 se da un ejemplo de los patrones de bandeo encontrados en 14 individuos de RPC.

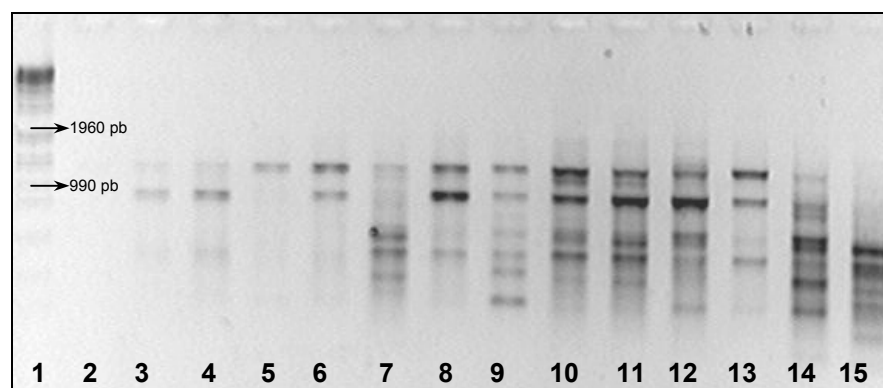


Figura 8. Bandas polimórficas de ADN amplificado con el oligonucleótido aleatorio OPAR06. Línea 1: Marcador VII (Boehringer). Líneas 2 a 15: Diferentes organismos de RPC.

La región de la bahía de La Paz (LP) resultó más diversa que la región de Santa Rosalía (SR). Tanto en Saladito (SAL) como en Rancho Piedras Coloradas (RPC) la variación intrapoblacional fue mayor que en SR (Tabla IX).

TABLA IX. Estadísticos de genética descriptiva efectuados en el TFPGA con base en la información de los oligos OPAR06 y OPAR18.

Escala	Tamaño promedio de la muestra	Heterocigosidad promedio (Hardy-Weinberg)	% <i>loci</i> polimórfico (criterio 95%)
<i>Sargassum lapazeanum</i> (en este trabajo)	92.80	0.1222	52.38
Regional SR	36.73	0.0949	39.05
LP (SAL y RPC)	56.07	0.1364	56.19
Local SR	36.73	0.0973	39.05
SAL	24.80	0.1317	49.52
RPC	31.27	0.1404	52.38
Intrapoblacional SR 1	19.00	0.0950	42.86
SR 2	17.73	0.0865	32.38
SAL1	9.80	0.1053	41.90
SAL2	15.00	0.1432	54.29
RPC 1	16.80	0.1248	50.48
RPC 2	14.47	0.1430	55.24

3.4.2. Índice de diversidad de Shannon.

El índice de Shannon (H'_j) calculado por oligonucleótido dentro de cada región y entre regiones indica que los oligonucleótidos OPAR06 y OPAR18 detectaron valores de diversidad similares dentro de cada región (SR = 0.782 vs 0.903, LP = 1.282 vs 1.101; Tabla X). Mientras que entre las dos regiones se obtuvieron diversidades diferentes (SR = 0.843 vs LP = 1.191, Tabla X). LP mostró mayor diversidad que SR. El promedio de la diversidad de los *loci* por transecto fue 1.017, con valores de 0.843 para SR y 1.191 para LP (Tabla X).

En la tabla XI se observa que los oligonucleótidos detectaron pocas diferencias de la diversidad dentro de cada localidad y entre todas las localidades. La localidad más diversa fue SAL y SR la menos diversa. El promedio de la diversidad de los *loci* por localidades resultó 1.163 (con valores de 0.84 a 1.445, Tabla XI), este valor fue mayor que lo encontrado en la escala regional y la

intrapoblacional, cuyos valores fueron muy parecidos.

A nivel intrapoblacional, los oligonucleótidos variaron en su poder de detección de la diversidad dentro de cada transecto y entre todos los transectos. RPC 2 y SAL 2 resultaron los transectos más diversos. El promedio de la diversidad de los *loci* por transecto fue 1.007, con valores de 0.754 a 1.236 (Tabla XII).

TABLA X. Estimación de la diversidad genética en escala regional con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.

OLIGO	BANDAS	SR	Bahía de La Paz (SAL y RPC)	H'_j promedio Por oligo o H'_{pop}
OPAR18	49	0.782	1.282	1.032
OPAR06	56	0.903	1.101	1.002
Bandas totales	105			
Bandas promedio	52.5			
Sumas H'_j		1.685	2.383	2.034
H' promedio por sitio		0.843	1.191	1.017

TABLA XI. Estimación de la diversidad genética en escala local con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.

OLIGO	BANDAS	SR	SAL	RPC	H'_j promedio Por oligo o H'_{pop}
OPAR18	49	0.782	1.885	1.256	1.308
OPAR06	56	0.903	1.006	1.146	1.018
Bandas totales	105				
Bandas promedio	52.5				
Sumas H'_j		1.685	2.890	2.402	2.326
H' promedio por sitio		0.843	1.445	1.201	1.163

TABLA XII. Estimación de la diversidad genética en escala intrapoblacional con el índice de Shannon (H'_j), modificado por Bussell (1999), para *S. lapazeanum*.

OLIGO	BANDAS	SR1	SR2	SAL1	SAL2	RPC1	RPC2	H'_j promedio Por oligo o H'_{pop}
OPAR18	49	0.626	0.869	1.132	1.338	1.045	1.389	1.066
OPAR06	56	1.035	0.638	0.731	1.078	1.117	1.084	0.947
Bandas totales	105							
Bandas promedio	52.5							
Sumas H'_j		1.661	1.507	1.862	2.416	2.162	2.473	2.014
H'_j promedio por transecto		0.831	0.754	0.931	1.208	1.081	1.236	1.007

El análisis de la diversidad con el índice de Shannon mostró que más del 90% de la variación de los RAPDs se presenta dentro de las escalas analizadas (H'_{pop}/H'_{sp}) y menos del 10% entre ellas [$1-(H'_{pop}/H'_{sp})$] (Tabla XIII). Esto fue detectado con los dos oligonucleótidos estudiados (Tabla XIII).

TABLA XIII. Diversidad genética dentro y entre los transectos de *S. lapazeanum* en escalas regional, local e intrapoblacional mediante el índice de Shannon.

ESCALA	OLIGO	H'_{pop}	H'_{sp}	H'_{pop}/H'_{sp} (dentro)	(H'_{pop}/H'_{sp}) (entre)
REGIONAL	OPAR18	1.032	1.122	0.919	0.081
	OPAR06	1.002	1.031	0.972	0.028
	Totales	2.034	2.153	1.892	0.108
	Promedios	1.017	1.077	0.946	0.054
LOCAL	OPAR18	1.308	1.122	0.988	0.012
	OPAR06	1.018	1.031	0.988	0.012
	Totales	2.326	2.153	1.976	0.024
	Promedios	1.163	1.077	0.988	0.012
INTRAPOBLACIONAL	OPAR18	1.066	1.122	0.950	0.050
	OPAR06	0.947	1.031	0.919	0.081
	Totales	2.014	2.153	1.869	0.131
	Promedios	1.007	1.077	0.934	0.066

NOTA: Las negritas resaltan los valores promedio de variación dentro y entre las escalas analizadas.

3.5. ESTRUCTURA GENÉTICA.

3.5.1. Estimaciones de θ realizadas con el TFPGA.

Las θ indican qué tan diferenciadas están las regiones (θ_P), los sitios (θ_S) y los transectos (θ_{SS}). En la tabla XIV se observa que, de acuerdo con los intervalos de confianza, entre regiones y sitios es posible obtener valores θ iguales a cero, lo cual indica que no hay diferencias significativas. Por lo tanto, *S. lapazeanum* no presenta estructura genética en las escalas regional y local según lo calculado por el TFPGA. En cambio, los transectos están significativamente diferenciados y por consiguiente presentan estructura genética.

TABLA XIV. Estimación de θ (F_{ST}), con un 95% de confianza.

	θP (Regiones)	θS (Localidades)	θSS (Transectos)
Todos los loci	0.0117	0.0098	0.0414
Promedio	0.0118	0.0099	0.0416
Desviación estándar	± 0.0072	± 0.0064	± 0.0065
Intervalos de confianza	0.0257 -0.0024	0.0221 -0.0029	0.0538 0.0285

3.5.2. Índice de diversidad de Shannon.

Los valores similares a G'_{ST} , obtenidos con el índice de Shannon, indican una diferenciación baja entre regiones (0.054), localidades (0.012) y transectos (0.066; Tabla XIII). Estos valores se consideran bajos en comparación con lo obtenido con *S. polyceratum* ($G'_{ST} = 0.364$; Engelen *et al.*, 2001).

3.5.3. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

El AMOVA, al igual que el índice de diversidad de Shannon (Tabla XIII), detectó mayor variación dentro de las escalas analizadas (>90%), que entre las escalas (<10%). Los valores de Φ_{ST} calculados por el AMOVA revelaron diferencias significativas a escalas intrapoblacional, local y regional, que evidencian una estructuración genética en las escalas analizadas (Tabla XV). Sin embargo, las Φ_{ST} presentaron valores bajos, según lo reportado con *S. polyceratum* ($\Phi_{ST} = 0.283$; Engelen *et al.*, 2001). Se calcularon las estimaciones pareadas de la diferenciación entre todos los transectos, con base en los valores Φ_{ST} , y su significancia se probó con permutaciones (Tabla XVI).

TABLA XV. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las tres escalas probadas.

Escala	Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componente de Varianza	% de variación	Valor de <i>P</i>	Índice de fijación	Interpretación
INTRAPOBLACIONAL	Entre transectos	5	40.066	0.13904	2.88	0.00238	FST = 0.02882	Variación significativa entre transectos. Resultados con la misma tendencia que los calculados con el índice de diversidad de Shannon (Tabla XIII).
	Dentro de transectos	138	646.573	4.68531	97.12			
LOCAL	Entre localidades	2	26.494	0.18269	3.76	0.01931	FCT = 0.03758	Diferenciación significativa entre localidades.
	Entre transectos y dentro de localidades	3	13.572	0.00675	0.14	0.60911 n.s.	FSC = -0.00144	Sin diferenciación entre transectos y dentro de localidades.
	Dentro de transectos	138	646.573	4.68531	96.38	0.00228	FST = 0.03619	Diferenciación significativa dentro de transectos.
REGIONAL	Entre regiones	1	20.106	0.22358	4.54	<0.0001	FCT = 0.04543	Diferenciación significativa entre regiones.
	Entre localidades y dentro de regiones	4	19.960	0.01293	0.26	0.52267 n.s.	FSC = 0.00275.	Sin diferenciación entre localidades y dentro de regiones.
	Dentro de localidades	138	646.573	4.68531	95.19	<0.0001	FST = 0.04805	Diferenciación significativa dentro de localidades

TABLA XVI. *S. lapazeanum*. Abajo izquierda = Diferenciación por pares de los valores Φ_{ST} calculados en Arlequín. Arriba derecha = Matriz de significancia (0.05) de los valores de *P* para Φ_{ST} (110 permutaciones).

	SR1	SR2	SAL1	SAL2	RPC1	RPC2
SR1		-	+	+	+	-
SR2	-0.00474		+	+	+	-
SAL1	0.05691	0.10434		-	+	-
SAL2	0.10480	0.08226	0.02894		+	-
RPC1	0.06541	0.06847	0.06732	0.06411		-
RPC2	-0.06703	0.01782	-0.02302	-0.07726	-0.01834	

3.6. DISTANCIA GENÉTICA.

En la tabla XVII se observa que los transectos genéticamente menos distantes fueron SR1 y SR2 (0.0033). En tanto que, las mayores distancias genéticas se presentaron entre SR1 y SAL1 (0.0107), así como entre SR1 y RPC2 (0.0090). Otros transectos distantes resultaron SAL1 y SAL2 (0.0069).

La correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, calculada con la prueba de Mantel, resultó no significativa $r=0.349$ ($P = 0.1030$ a 0.9060 , n.s.). La falta de significancia en Mantel es indicio de que no hay aislamiento de *S. lapazeanum* debida a la distancia entre los sitios.

En la figura 9 se presenta la agrupación de los transectos por su distancia genética. Los dos transectos de Santa Rosalía integran un grupo, el cual está relacionado con otro grupo formado por SAL2 y RPC1, lo que sugiere que existe una relación entre la región de SR y la región de LP. Por su parte los transectos SAL1 y RPC2 forman otro grupo el cual tiene menor aproximación con los grupos anteriores.

TABLA XVII. Distancias genéticas de Nei (1978) sin sesgo.

	SR1	SR2	SAL1	SAL2	RPC1	RPC2
SR1	*****					
SR2	0.0033	*****				
SAL1	0.0107	0.0050	*****			
SAL2	0.0058	0.0052	0.0069	*****		
RPC1	0.0056	0.0047	0.0085	0.0038	*****	
RPC2	0.0090	0.0059	0.0034	0.0052	0.0042	*****

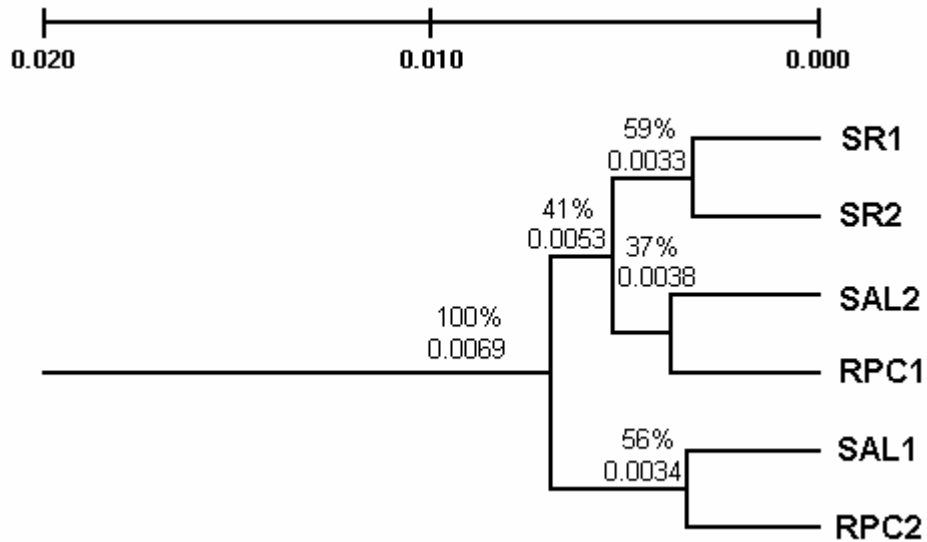


Figura 9. Dendrograma de las distancias genéticas entre todos los transectos de Santa Rosalía (SR), Saladito (SAL) y Piedras Coloradas (RPC). Los porcentajes corresponden a las réplicas similares que sustentaron las uniones y los números decimales indican la distancia genética original.

IV. DISCUSIÓN.

4.1. OBTENCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR RAPD.

Los obstáculos para la extracción de ADN de las macroalgas se deben a que sus células están: a) formadas por paredes celulares duras, que requieren homogeneización con nitrógeno líquido, b) cargadas de polisacáridos que comigran con los ácidos nucleicos a lo largo de los procesos de extracción y purificación (por ejemplo, en las macroalgas pardas del orden *Laminariales* un tercio del peso seco total de los esporofitos corresponde a polisacáridos), c) rellenas de nucleasas poco comunes y compuestos oxidativos como fenólicos (presentes en cantidades significativas en algas pardas), y sus talos: a) están altamente epifitizados por cianobacterias, diatomeas o algas rojas difíciles de limpiar en su totalidad, b) son grandes y contienen poca cantidad de ADN en comparación con la biomasa, o c) son muy pequeños, en los que la cantidad de biomasa es insuficiente (Olsen, 1990).

Las dificultades en la obtención de ADN de macroalgas ha llevado a implementar ajustes “organismo-específicos” a los protocolos “alga-específicos” publicados al respecto (Olsen, 1990). A veces esos ajustes son tan complejos que resultan costosos en dinero y tiempo, aunque se obtenga ADN de excelente calidad (Oliveira, 1995). La elección del método depende, entre otras cosas, de la disponibilidad de material para la extracción y el objetivo de obtener ADN.

Se han publicado varias técnicas de extracción para macroalgas pardas del orden *Laminariales* que necesariamente requieren una gran cantidad de tejido de hasta 100 g o etapas de lavados, previos a la extracción, en sistemas

amortiguadores para remover polisacáridos y otros contaminantes (Fain *et al.*, 1988), así como purificación en columnas de Sepharose para remover polisacáridos y ARN (Mayes *et al.*, 1992). Con otras técnicas aplicadas a macroalgas pardas es indispensable realizar varias manipulaciones con una duración de hasta tres días e incluyen ultracentrifugación en gradientes de CsCl (Fain *et al.*, 1988; Coyer *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 2001; Engelen, *et al.*, 2001).

En la tabla XVIII se compara el método de extracción de ADN usado para *S. lapazeanum* con el método CTAB probado en especies de *Sargassum* de Malasia (Ho *et al.*, 1995a). Dicho método reporta la obtención de ADN de menor calidad ($A_{260/280} = 0.83$ a 1.25) que el obtenido por el método practicado en este trabajo ($A_{260/280} = 1.4$ a 2.1). La concentración de ADN extraído no se consideró importante para los fines de esta investigación. Sin embargo, se obtuvieron cantidades de ADN por muestra (2.37 a $7.13 \mu\text{g}$ de ADN g^{-1} , peso húmedo de tejido) suficientes para realizar varios PCR. En la tabla XVIII también se compara con el protocolo de Phillips (2001), quien reporta haber obtenido $73 \mu\text{g}$ de ADN g^{-1} de *S. lapazeanum*, Es importante resaltar que dicho método utiliza ultracentrifugación en gradiente de CsCl como paso indispensable.

El éxito del método de extracción de ADN desarrollado por Phillips (2001) para varias especies de *Sargassum* se atribuyó al uso de un buffer de lisis altamente reductivo, preparado con mayores cantidades, que las acostumbradas en otros protocolos, de β -ME (agente reductor), PVPP (captura compuestos fenólicos) y EDTA (agente quelante), así como a la adición de DIECA, que es un

componente poco común para la extracción de ADN, sin embargo, forma parte del método de extracción de enzimas usado por Lu y Williams (1994).

TABLA XVIII. Comparación de protocolos de extracción de ADN probados con *Sargassum lapazeanum*.

	<i>Sargassum polycystum</i> y <i>S. siliquosum</i> (Ho et al., 1995a)	21 especies de <i>Sargassum</i> y otras algas pardas (Phillips, 2001)	<i>Sargassum lapazeanum</i> (Este trabajo)
Número de muestras	17	No reportado	25
Color del precipitado	24% pigmentado 76% claro	No reportado	100% transparente
µg ADN g-1 (peso húmedo)	0.90 a 3.01(peso seco)	10 a 465	2.37 a 7.13
A260/280	0.83 a 1.25	1.2 a 2.0	1.4 a 2.1
Éxito de amplificación por PCR	100%	Exitoso	100% de frondas 70% en repeticiones
Purificación mediante gradiente en CsCl	No utiliza	Indispensable	No requiere

Las diferencias entre el protocolo de Phillips (2001) y el desarrollado en este trabajo consisten en el tiempo y la temperatura de incubación con el buffer de lisis, así como el uso indispensable de un método de purificación (ultracentrifugación en gradiente de CsCl o purificación en columna) en el caso de Phillips (2001). El ADN de buena calidad obtenido en este trabajo es reflejo de la importancia del paso de incubación en el buffer de lisis y de la homogeneización adecuada del tejido, ya que una vez que las células se rompen es cuando los polisacáridos y polifenoles forman complejos con las hélices de ADN. Otro factor importante es la utilización de pequeñas cantidades de muestra, que permite reducir el nivel de polisacáridos incluidos.

El método de extracción de ADN total implementado en este trabajo para *S. lapazeanum* resulta simple, rápido y barato, pues ahorra el tiempo y material que

se requiere en la ultracentrifugación en gradiente de CsCl u otro método de purificación. Además, puede obtenerse, de una manera más rápida y fácil, ADN de suficiente calidad y pureza para su análisis con RAPD, tanto en frondas congeladas como secadas con silica gel, e incluso es posible obtener ADN de muestras fijadas en etanol, aunque de menor calidad (Tablas V y VI). Después de todos los ensayos realizados, se decidió coleccionar únicamente la parte apical de las frondas, por presentar el tejido más joven y se optó por conservar las muestras congeladas, ya que así se registró mayor probabilidad de éxito en la amplificación por RAPD.

En este estudio se amplificó el ADN mediante RAPD. Este método utiliza poca cantidad de ADN (25 ng en este trabajo). Aunque la obtención de productos de PCR depende más de la pureza y calidad del ADN extraído que de su cantidad. El PCR es sensible a fuentes de contaminación diminutas en el ADN de las muestras que pueden detectarse como polimorfismos. Los sargazos presentan muchos epifitos, por lo que para evitar la incertidumbre en el proceso de amplificación, las muestras se lavaron cuidadosamente. Al respecto, Ho *et al.* (1995b) señalan al uso de oligonucleótidos aleatorios como una ventaja, porque como son pequeños e inespecíficos reducen la probabilidad de amplificación del ADN de los epifitos.

Las concentraciones de los componentes para el proceso de PCR se compararon con otros estudios que analizaron RAPD en otras especies de macroalgas. Se observó que las concentraciones utilizadas son muy variables, por

ejemplo, se manejan 2 ng a 200 ng de ADN. Las concentraciones utilizadas en este trabajo están dentro de los rangos más usados (Tabla XIX).

4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA.

Las estimaciones realizadas con el índice de diversidad de Shannon coinciden con el AMOVA en que la variabilidad de *S. lapazeanum* es mayor dentro (>90%) que entre regiones, localidades y transectos (<10%). Estos datos, aunque corresponden a valores extremos, tienen una tendencia consistente con poblaciones grandes, con reproducción sexual y flujo genético que han sido documentadas tanto en plantas terrestres perennes (Bussell, 1999) y en especies de angiospermas marinas (Reusch *et al.*, 1999), así como en algunas especies de macroalgas pardas: *S. polyceratium* (Engelen *et al.*, 2001), *Halidrys dioica* (Lu y Williams, 1994) y *Alaria marginata* Postels y Ruprecht (Kusumo y Druehl, 2000), algas dioicas, con fertilización externa y un alto potencial de dispersión.

La alta variabilidad genética dentro de las poblaciones indica que un alto porcentaje de los individuos de *S. lapazeanum* muestreados resultaron genéticamente distintos. La alta variabilidad genética intrapoblacional sugiere que el mecanismo de reproducción de *S. lapazeanum* en estos sitios es principalmente sexual. Algo similar se ha observado en especies de pastos marinos (Bandeira y Nilsson, 2001).

Además, como *S. lapazeanum* es una de las especies que se considera dominante en la costa oriental de B.C.S. su alta variabilidad intrapoblacional se atribuye a una alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes. El alto grado

TABLA XIX. Concentración de los elementos de la reacción para RAPD utilizadas con macroalgas.

REFERENCIA	[ADN]	OLIGO	DNTPs	SISTEMA AMORTIGUADOR	Mg	ENZIMA	GRUPO ESTUDIADO
Patwary <i>et al.</i> , 1993 y Patwary <i>et al.</i> , 1994	25 ng	0.2 µM	100 µM	Buffer de Taq ADN polimerasa		1 U	Rhodophyta
van Oppen <i>et al.</i> , 1994 y van Oppen <i>et al.</i> , 1995	15 ng +2 ng	25 ng	100 µM	2.5 µL de 10X buffer de reacción libre de magnesio	1.5 mM MgCl ₂	0.75 U	Chlorophyta +Rhodophyta
van Oppen <i>et al.</i> , 1996	2.5 ng	0.5 µM	100 µM	2.5 µL 10X SuperTaq buffer de reacción		0.075 U SuperTaq ADN polimerasa	
Ho <i>et al.</i> , 1995a y b	200 ng	5 pmol	100 µM	2.5 µL 5X buffer de Taq ADN polimerasa	2.5 mM MgCl ₂	1 U	<i>Sargassum</i> , Phaeophyta
González <i>et al.</i> , 1996	60 ng	0.2 mM	200 mM	buffer de Taq ADN polimerasa	1.5 mM Mg ⁺²	1 U	Rhodophyta
Meneses, 1996	20 ng	1.0 µM	100 µM	2 µL buffer de Taq ADN polimerasa	3 mM MgCl ₂	0.5 U	Rhodophyta
Santos y Leitão, 1997	50 ng	0.4 µM	150 µM	2.5 µL 10X buffer de Taq ADN polimerasa		1 U	Rhodophyta
Coyer y Stam, 1997	10 ng		1.5 µL 10X mastermix 100 µM	2.5 µL 10X SuperTaq buffer de reacción		0.075 u	<i>Postelsia</i> , Phaeophyta
Billot <i>et al.</i> , 1999	3-6 ng	0.5 µM	200 mM		1.5 mM y 2.5 mM MgCl ₂	0.9 U de Goldstar polimerasa	<i>Laminaria</i> , Phaeophyta
Phillips, 1998	10 – 100 ng	0.25 µM	0.2 µM	1X PCR buffer	1.5 mM MgCl ₂	1U en un volumen de 100 µL	<i>Sargassum</i> , Phaeophyta
Este trabajo.	25 ng	49-90 pmol	0.6 mM	2.5 µL 10X PCR buffer	15 mM incluido en el buffer	1U	<i>Sargassum lapazeanum</i>, Phaeophyta

de variabilidad que se observa en *S. lapazeanum* puede conferirle una amplia capacidad de respuesta a presiones selectivas, como por ejemplo, una posible competencia con otras especies del género *Sargassum* presentes en los mantos del sur de la península.

Por otro lado, también es posible que los métodos de análisis sobrestimen los valores de variabilidad debido a que sólo se analizan dos oligonucleótidos y a RAPD tiene un nivel de error entre 5 y 10%, lo cual no representa problema en escalas grandes, aunque si afecta los resultados en escalas pequeñas (van Oppen *et al.*, 1996).

4.3. ESTRUCTURA GENÉTICA.

La falta de diferencias significativas entre regiones (θ_P) y poblaciones (θ_S), encontradas por el TFPGA (Tabla XIV), indican que *S. lapazeanum* no presenta estructuración genética en estas escalas o el flujo genético es ilimitado. En cambio, los transectos (θ_{SS}) presentan flujo genético restringido, menor que entre regiones y sitios, por estar más diferenciados.

Mediante el AMOVA se observaron diferencias genéticas significativas de *S. lapazeanum* en escalas regional, local e intrapoblacional, que sugieren la existencia de una estructuración genética a estos niveles.

Es notable que el AMOVA, a diferencia del TFPGA, detecta estructura genética en escalas regional y local. Esto puede atribuirse a los diferentes modelos que aplican los programas Arlequín y TFPGA. Según los resultados

obtenidos, el AMOVA realiza un análisis más fino que detecta diferencias significativas, mientras que, los estimadores utilizados por el TFPGA subestiman las diferencias calculadas. Sin embargo, los resultados del TFPGA dan un panorama claro de las principales tendencias.

El valor theta θ_{SS} , las ϕ_{ST} (Φ_{ST}), al igual que el valor análogo a G'_{ST} presentaron valores pequeños que son indicativos de una diferenciación débil y flujo genético alto (Bussell, 1999). *S. lapazeanum* presentó una estructura genética baja que indica la posibilidad de que ocurra flujo genético entre las escalas analizadas y por consiguiente se considera que tiene potencial para dispersarse a lo largo de su distribución en la costa oriental de B.C.S.

4.4. DISPERSIÓN.

Hasta ahora, los métodos directos para medir dispersión en las macroalgas marinas han reportado un potencial reducido a escalas pequeñas. Tal es el caso de la dispersión de esporas del alga parda *Postelsia palmaeformis*, que está limitada a un radio de tres metros del esporofito (Innes, 1987; Lobban y Harrison, 1994, Norton, 1992). Sin embargo, se ha encontrado que condiciones de alta turbulencia facilitan la resuspensión de las esporas de Laminariales, lo que posibilita la dispersión de las esporas en escalas grandes, así como por talos fértiles flotantes (Reed *et al.*, 1988, 1992). La medición de la dispersión por métodos directos es un tanto imprecisa, ya que es alterada por las características del ambiente marino y por la imposibilidad de reconocer la fuente de los

propágulos liberados (Kendrick y Walker, 1991, Norton, 1992). El uso de marcadores moleculares para el estudio de la estructura genética de una población resulta un mejor estimador indirecto del potencial de dispersión.

La dispersión en el medio ambiente marino puede darse gracias al sistema de circulación de las corrientes marinas. La circulación superficial del golfo de California tiene un fuerte ciclo estacional, con flujo entrante en verano y saliente en invierno (De la Lanza, 1991; Lavín *et al.*, 1997). Tanto la acción del océano Pacífico, que entra por la boca del golfo, como el viento generan una onda que se propaga por la costa continental hasta la cabeza del golfo, retorna atrapada a la costa de la península y sale del golfo. La dinámica puede verse como dos ondas que viajan en sentido opuesto, atrapadas en costas opuestas, y que prácticamente no interactúan entre sí, ya que decaen muy rápidamente hacia el centro del golfo.

La circulación superficial en invierno tiene como componente principal la corriente de California, que entra al golfo de California de lado de la península y presenta un giro anticiclónico, de la península al continente, mientras que en verano, predomina la corriente nor-ecuatorial, cuyo flujo entra de lado del continente y da un giro ciclónico, del continente a la península (De la Lanza, 1991; Lavín *et al.*, 1997).

Dicho patrón de circulación del golfo, sugiere que *S. lapazeanum* no puede dispersarse de Santa Rosalía a la bahía de La Paz, ya que en invierno, cuando la circulación en el golfo va de norte a sur, *S. lapazeanum* es escasa, prácticamente no se le encuentra además de que sólo hay talos reproductivos en primavera tardía y verano temprano (M.G. Rivera y R.A. Scrosati com. pers.). Por lo tanto, se

propone que el patrón de dispersión de *S. lapazeanum* va de la región de la bahía de La Paz hacia Santa Rosalía, dado el sistema de circulación de corrientes del golfo de California. Sin embargo es necesario tratar de confirmar la posibilidad de dispersión entre estas zonas, puesto que la costa presenta numerosas bahías e islas y *S. lapazeanum* se encuentra también en sitios intermedios entre la bahía de La Paz y Santa Rosalía.

La región de Santa Rosalía forma un grupo diferente, aunque hay un segundo grupo en el que se junta con la región de la bahía de La Paz. Esto sugiere que para Santa Rosalía hubo eventos de colonización o hay flujo genético que probablemente proviene de la bahía de La Paz. SAL1 y RPC2 componen un tercer grupo distinto, por lo que existe la posibilidad de que en dichos transectos se encuentren individuos autóctonos o que no han recibido flujo genético de la otra región. Por otro lado, la combinación entre los transectos de RPC y SAL puede explicarse porque ambos se encuentran dentro de una bahía y por su cercanía tienen un alto grado de intercambio genético (flujo genético ilimitado).

Este trabajo es el primer estudio sobre la diversidad y estructura genética de poblaciones de una especie de *Sargassum* en México. Las especies de este género son importantes y tienen un alto potencial de utilización comercial por su gran biomasa estimada, pero como varios autores reconocen hace falta realizar estudios poblacionales y sobre la reproducción de las especies. Los RAPDs resultaron un marcador útil para estudiar la estructura genética de *S. lapazeanum* y dan pauta a otros estudios que incluyan más sitios de muestreo, investigaciones de tipo local para explicar aspectos poblacionales de *Sargassum* en Baja

California Sur, así como estudios ecológicos para complementar el conocimiento de la dispersión de esta alga.

V. CONCLUSIONES.

- Se implementó un método de extracción de ADN total para *S. lapazeanum*. A diferencia de otros métodos usados con especies del mismo género, este es un método sencillo, con el cual se obtiene ADN de buena calidad para su análisis por PCR sin realizar ultracentrifugación en gradiente de CsCl, por lo que disminuye el tiempo y los costos de procesamiento. El método permite obtener ADN a partir de muestras congeladas o secadas en sílica.
- La congelación de muestras de *S. lapazeanum* resultó el método de preservación más eficiente en la obtención de ADN de buena calidad para realizar un análisis genético.
- La variabilidad genética de *S. lapazeanum* fue mayor dentro de transectos, localidades y regiones (>90%), que entre las diferentes escalas (>10%).
- *S. lapazeanum* presentó diferencias significativas en escalas regional, local e intrapoblacional, que indicaron la existencia de una estructura genética baja, lo cual es señal de un flujo genético limitado entre los diferentes niveles.
- Las distancias genéticas colocan a SR como un grupo alejado y diferente a los otros sitios. Sin embargo, está relacionado con transectos de las localidades de la bahía de La Paz, por lo que se confirma la probabilidad de que exista flujo genético en la escala regional.
- Los transectos de SAL y RPC forman grupos combinados, esto indica flujo genético a través de la escala local.

- *S. lapazeanum* tiene potencial de dispersión tanto en escalas intrapoblacional y local, como en escala regional. Esto resulta similar a lo encontrado en otras macroalgas pardas con aerocistos y reproducción sexual.
- El patrón general de circulación de las corrientes marinas en el golfo de California además de lo reportado sobre la dinámica poblacional de *S. Lapazeanum* y los resultados obtenidos en este trabajo indican que existe la posibilidad de que esta especie se disperse de la bahía de La Paz hacia Santa Rosalía.

VI. LITERATURA CITADA.

- Abbott, I.A.** (ed). 1988. Taxonomy of Economic Seaweeds to some Pacific and Caribbean Species. California Sea Grant College Program. Vol. II págs 5-21.
- Alberto, F., R. Santos y J.M. Leitão.**1999. Assessing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. Mar. Ecol. Prog. Ser. 191:101-108.
- Avise, J.C.** 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York. 511 pp.
- Bandeira, S.O. y P.G. Nilsson.** 2001. Genetic population structure of the seagrass *Thalassodendron ciliatum* in sandy and rocky habitats in southern Mozambique. Mar. Biol. 139:1007-1012.
- Barrera Saldaña, H. A., R. Ortiz López, A. Rojas Martínez y D. Reséndez Pérez.** 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una época dorada de la biología molecular. Ciencia y Desarrollo. XVIII(108):50-60.
- Bhattacharya, D., D.L. Baillie y L.D. Druehl.** 1990. Population analysis of the kelp *Costaria costata* (Phaeophyta) using a polymorphic ribosomal DNA probe. Pl. Syst. Evol. 170:177-191.
- Billot, C., S. Boury, H. Benet y B. Kloareg.** 1999. Development of RAPD Markers for Parentage Analysis in *Laminaria digitata*. Bot. Mar. 42:307-314.
- Bold, H:C. y M.J. Wynne.** 1985. Introduction to algae. Structure and reproduction. 2a. ed. Prentice Hall, Inc. Nuevo Jersey, E.U.A. 720pp.
- Bussell, J.D.** 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). Mol. Ecol. 8:775-789.
- Casas Valdéz, M.M., I. Sánchez Rodríguez y G. Hernández Carmona.** 1993. Evaluación de *Sargassum* spp. En la costa oeste de bahía Concepción, B.C.S., México. Inv. Mar. CICIMAR. 8(2):61-69.
- Cheney D.P. y G.R. Babbel.** 1978. Biosystematic studies of the red algal genus *Euclidean*. I. Electrophoretic variation among Florida populations. Mar. Biol. 47:251-264.
- Clayton, M.N.** 1992. Propagules of marine macroalgae: structure and development. Br. phycol. J. 27:219-232.

- Coyer, J.A., J.L. Olsen y W.T. Stam.** 1997. Genetic variability and spatial separation in the sea palm kelp *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprints and RAPDs. *J. Phycol.* 33: 561-568.
- Critchley A. y J. Fletcher.** 1997. (Página consultada el 18 de diciembre del 2002) Life cycle of the brown seaweed *Sargassum sp.* [On line] Department of Botany, University of the Witwatersrand ,Johannesburg, Sudáfrica. URL:<http://www.unam.na/research/henties/sargassum/lcydat1.htm>
- Cruz-Ayala M. B., M. M. Casas Valdéz y S. Ortega-García.** 1998. Temporal and spatial variation of frondose benthic seaweeds in La Paz, Bay, B.C.S., México. *Bot. Mar.* 41: 191-198.
- Dawson, E.Y.** 1944. The marine algae of the Gulf of California. Allan Hancock. Pacific Expeditions. 3(10):189-454.
- Deysher, L. y T.A. Norton.** 1982. Dispersal and colonization in *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56:179-195.
- De la Lanza Espino, G.** (compiladora). 1991. Oceanografía de Mares Mexicanos. AGT editor. México, D.F. 569 pp.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Engelen, A.H., J.L. Olsen, A.M. Breeman y W.T. Stam.** 2001. Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curaçao (Netherlands Antilles). *Mar. Biol.* 139:267-277.
- Eguiarte Fruns, L.E.** 1987. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. *Ciencias. Núm. especial 1:* 30-38.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fain, S.R., L.D. Druehl y D.L. Baillie.** 1988. Repeat and single copy sequences are differentially conserved in the evolution of kelp chloroplast DNA. *J. Phycol.* 24:292-302.
- Faugeron, S., M. Valero, C. Destombe, E.A. Martínez y J.A. Correa.** 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rodophyta). *J. Phycol.* 37:705-716.
- Goff, L.J. y A.W. Coleman.** 1988. The use of plastid DNA restriction endonuclease

patterns in delineating red algal species and populations. *J. Phycol.* 24:357-368.

González, M., R. Montoya, A. Candia, P. Gómez y M. Cisternas. 1996. Organellar DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of morphotypes of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Chile. *Hydrobiol.* 326/327: 229-234.

Hedrick, P.W. 1982. *Genetics of Population*. Science book international. Boston. 628 pp.

Hernández-Carmona, G., M. M. Casas Valdéz, C. Fajardo-León, I. Sánchez Rodríguez y E. Rodríguez-Montesinos, 1990. Evaluación de *Sargassum* spp. en la bahía de La Paz, B.C.S., México. *Inv. Mar. CICIMAR* 5(1):11-18.

Hilbish, T.J. 1996. Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192:67-83.

Ho, C.L., S.M. Phang y T. Pang. 1995a. Molecular characterisation of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *J. Applied Phycol.* 7:33-41.

Ho, C.L., S.M. Phang y T. Pang. 1995b. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). *Eur. J. Phycol.* 30:273-280.

Innes, D.J. 1987. Genetic structure of asexually reproducing *Enteromorpha linza* (Ulvales:Chlorophyta). *Mar. Biol.* 94:459-467.

Kendrick, G.A. y D. I. Walker. 1991. Dispersal distances of propagules of *Sargassum spinuligerum* (Sargassaceae: Phaeophyta) measured directly by vital staining and venturi suction sampling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79:133-138.

Kendrick, G.A. y D. I. Walker. 1994. Role of recruitment in structuring beds of *Sargassum* (Phaeophyta) at Rottneest island, Western Australia. *J. Phycol.* 30:200-208.

Kendrick, G.A. y D. I. Walker. 1995. Dispersal of propagules of *Sargassum* spp. (Sargassaceae: Phaeophyta): Observations of local patterns of dispersal and consequences for recruitment and population structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192:273-288.

Kusumo, H.T. y L.D. Druehl. 2000. Variability over space and time in the genetic

structure of the winged kelp *Alaria marginata*. Mar. Biol. 136:397-409.

- Lavín, M.F., E. Beier y A. Badan.** Estructura hidrográfica y circulación del golfo de California: Escalas estacional e interanual. En: Lavín, M.F. (editor). Contribuciones a la Oceanografía Física en México. Monografía núm. 3. Unión Geofísica Mexicana. págs. 141-171.
- Lee, R.E.** 1999. Phycology. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Reino Unido. 3a. edición. 614pp.
- Levinton, J.S.** 1995. Marine Biology. Function, Biodiversity, Ecology. Oxford University Press. págs. 87-113.
- Lynch, M. y B.G. Milligan.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3:91-99.
- Lindstrom, S.C.** 1993. Inter- and intrapopulation genetic variation in species of *Porphyra* (Rhodophyta: Bangiales) from British Columbia and adjacent waters. J. Applied Phycol. 5:53-62.
- Lobban C.S., y P.J. Harrison.** 1994. Seaweeds Ecology and Physiology. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. 366 pp.
- Loveless M.D. y J.L. Hamrick,** 1984. Ecological determinants of genetic structure en plant populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. 15:65-95.
- Lu, T.T., S.L. Williams.** 1994. Genetic diversity and genetic structure in the brown alga *Halidrys dioica* (Fucales:Cystoserraceae) in Southern California. Mar. Biol. 121:363-371.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27:209-220.
- Massey, L.K. y J.L. Hamrick.** 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). Am. J. Bot. 85(3):340-345.
- Meneses, I.** 1996. Assessment of populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) utilizing RAPDs. J. of Appl. Phycol. 8:185-192.
- Miller, K.A., J.L. Olsen y W.T. Stam.** 2000. Genetic divergence correlates with morphological and ecological subdivision in the deep-water kelp, *Pelagophycus porra* (Phaeophyceae). J. Phycol. 36:862-870.
- Miller, M.P.** 1997. Tools for Population Genetics Analyses (TFPGA) 1.3. A Windows

program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.

- Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70:3321-3323.
- Neigel, J.E.** 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:105-128.
- Norton, T.A.** 1992. Dispersal by macroalgae. *Br. phycol. J.* 27:293-301.
- Núñez-López, R. A. y M.M. Casas-Valdéz,** 1996. Fenología de las especies de *Sargassum* (Fucales:Sargassaceae) en tres zonas de Bahía Concepción, B.C.S., México. *Rev. Biol. Trop.* 44 (2):455-464.
- Núñez-López, R. A. y M. M. Casas-Valdéz,** 1997. Variación estacional de la biomasa y talla de *Sargassum spp.* (Sargassaceae, Phaeophyta) en Bahía Concepción, B.C.S., México. *Hidrobiol.* 7:19-25.
- Oliveira, M.C.** 1995. Técnicas de extracción de ADN de algas marinas. En: Alveal, K., M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. págs. 489-504.
- Olsen, J.L.** 1990. Nucleic acids in algal systematics. *J. Phycol.* 26:209-214.
- Ouborg, N.J., Y. Piquot y J.M. van Groenendael.** 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *J. Ecol.* 87:551-568.
- Pacheco-Ruíz, I., J.A. Zertuche-González, A. Chee-Barragán y R. Blanco-Betancourt.** 1998. Distribution and quantification of *Sargassum* beds along the west coast of the gulf of California, México. *Bot. Mar.* 41:203-208.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst.** 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecol.* 79(2): 361-382.
- Patwary, M.U., R.M. MacKay y J.P. van der Meer.** 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. of Phycol.* 29: 216-222.
- Patwary, M.U. y J.P. van der Meer.** 1994. Application of RAPD markers in an

examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). *J. of Phycol.* 30: 91-97.

Paul-Chávez, L. y R. Riosmena-Rodríguez. 1997. Sistemática y biogeografía de macroalgas de la bahía de La Paz, B.C.S. En: Urbán, J. y M. Ramírez (eds.) La Bahía de La Paz, Investigación y Conservación. UABCS, CICIMAR y SCRIPPS. págs. 59-82.

Phillips, N. 1992. Biogeography of *Sargassum* (Phaeophyta) in the Pacific Basin. En: Abott, I.A. (ed.). Taxonomy and Economic Seaweeds. California sea Grant. Vol. III,. 95-116.

Phillips, N. 1998. Development of a DNA extraction protocol for *Sargassum* species. pp. En: Molecular Phylogenetic Analysis of the Pan-Pacific Genus *Sargassum*. Tesis doctoral. Universidad de Hawaii. Honolulu, HI, E.U. A. págs. 107-144.

Phillips, N., C. Smith y C. Morden. 2001. An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycol. Research* (49): 97-102.

Reed, D.C., D.R. Laur y A.W. Ebeling. 1988. Variation in algal dispersal and recruitment: the importance of episodic events. *Ecol. Monogr.* 58:321-335.

Reed, D.C., C.D. Amsler y A.W. Ebeling. 1992. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency. *Ecology.* 73:1577-1585.

Reusch, T.B.H., W.T. Stam y J.L. Olsen. 1999. Microsatellite *loci* in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Mol. Ecol.* 8:317-321.

Riosmena-Rodríguez, R. 1991. The extension geographic range of selected seaweeds on the Baja California peninsula. *Rev. Inv. Cient.* 2(2):13-20.

Rocha-Ramírez V. y D. A. Siqueiros-Beltrones. 1990. Revisión de las especies del género *Sargassum* C. Agardh registradas para la bahía de La Paz, B.C.S., México. *Ciencias Marinas.* 16(3):15-26.

Santos R., F. Alberto y J.M. Leitão. 1997. DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rodophyta) populations. *Note. J. Phycol.* 33: 706-710.

Santelices, B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28: 177-276.

Schaal, B. y W.J. Leverich. 1995. Processes of genetic diversification. En: Heywood, V.H. y R.T. Watson (eds.). *Global Biodiversity Assessment.* UNEP.

- Schaal, B. y W.J. Leverich.** 1995. Processes of genetic diversification. En: Heywood, V.H. y R.T. Watson (eds.). Global Biodiversity Assessment. UNEP. Cambridge University Press. E.U.A. págs. 216-225.
- Schenider, S., D. Roessli y L. Excoffier.** 2000. Arlequin ver. 2000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Setchell, W.A. y N.L. Gardner.** 1924. Expedition of the California Academy of Sciences of the Gulf of California in 1921. The marine algae. Proc. Calif. Acad. Sci. (Ser. IV) 12-29:695-949.
- Skotnicki, M.L., J.A. Ninham y P.M. Selkirk.** 1999. Genetic diversity and dispersal of the moss *Sarconeurum glaciale* on Ross Island, East Antarctica. Mol. Ecol. 8:753-762.
- Sosa, P.A. y G. Garcia-Reina.** 1992. Genetic variability and differentiation of sporophytes and gametophytes in populations of *Gelidium arbuscula* (Gelidaceae:Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis. Mar. Biol. 113:679-688.
- Sosa, P.A., M. Valero, F. Batista y M.A. González-Pérez.** 1998. Genetic structure of natural populations of *Gelidium* species: A re-evaluation of results. J. of Applied Phycol. 10:279-284.
- Sosa, P.A. y S.A. Lindstrom.** 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and application in systematics. Eur. J. Phycol. 34:427-442.
- Tamarin, R.H.** 1996. Principios de Genética. Editorial Reverté. Barcelona. 607 pp.
- Thorpe, J.P., J. Smartt, A.L. Allcock, M. Chauvet, K.A. Crandall, D.R. Given y S.J.G. Hall.** 1995. Genetic diversity as a component of biodiversity. En: Heywood, V.H. y R.T. Watson (eds.). Global Biodiversity Assessment. UNEP. Cambridge University Press. E.U.A. págs.57-85.
- Umezaki, I.** 1984. Ecological studies of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh in Obama Bay, Japan Sea. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 50(7):1193-1200.
- Valatka, S., A. Mäkinen y T. Yli-Mattila.** 2000. Analysis of genetic diversity of *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Baltic Sea by RAPD-PCR technique. Phycologia 39(2):109-117.

- van Oppen, M.J.H., O. E. Diekmann, C. Wiencke, W.T. Stam y J.L. Olsen.** 1994. Tracking routes: phylogeography of the Arctic-Antarctic disjunct seaweed *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30: 67-80.
- van Oppen, M.J.H., J.L. Olsen y W. T. Stam.** 1995. Genetic variation within and among North Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 30:251-260.
- van Oppen, M.J.H., H. Klerk, M. de Graaf, W.T. Stam y J.L. Olsen.** 1996. Assessing the limits of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. *J. Phycol.* 32: 433-444.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger y R. Higuchi.** 1991. Chelex^R 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques.* 10(4):506-513.
- Warburg, O. y W. Christian.** 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham.** 1984. Estimating F–statistic for the analysis of population structure. *Evolution* 28(6): 1358-1370.
- Weir, B.S.** 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic data.* Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 455 pp.
- Welsh, J. y M. MacClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18(24): 7213-7218.
- Werman, S.D., M.S. Springer y R.J. Britten.** 1990. Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. En: Hillis, D. M. y C. Moritz (eds.) *Molecular Systematics.* Sinauer Associates, Inc. E.U.A. pág. 219.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18(22): 6531-6535.
- Williams, S.L. y R.E. Di Fiori.** 1996. Genetic diversity and structure in *Pelvetia fastigiata* (Phaeophyta:Fucales): does a a small effective neighborhood size explain fine-scale genetic structure?. *Mar. Biol.* 126:371-382.
- Wright, J.T., G.C. Zuccarello y P.D., Steinberg.** 2000. Genetic structure of the subtidal red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Biol.* 136:439-448.
- Zhou, J.L., P.L. Huang y R.G. Lin.** 1998. Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and micro algae source. *Environmental Pollution.* 101(1):67-75.

VII. ANEXOS.

7.1. ANEXO 1.

Protocolos de extracción de ADN probados con *S. lapazeanum*.

	1. CTAB (Ho <i>et al.</i>, 1995)	2. Sarcosil (Ho <i>et al.</i>, 1995)	3. CTAB (Phillips, 1998)	4. CTAB para <i>S. lapazeanum</i> modificado de Phillips (1998)
BUFFER de extracción	1% (p/v) CTAB, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 0.7 M NaCl, 1% (p/v) PVP.	2% (p/v) Sarcosil, 20mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 0.1 M NaCl, 2%(p/v) PVP.	2% (p/v) CTAB, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.2 M EDTA pH 8.0), 1.4 M NaCl, 3% (p/v) PVPP, 0.1% (p/v) SDS, 3.5mM DIECA (Diethyldithiocarbamic acid), 1% (v/v) β - ME.	2% (p/v) CTAB, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.2 M EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 3% (p/v) PVPP, 0.1% (p/v) SDS, 3.5mM DIECA, 1% (v/v) β -ME.
1er. Paso	Incubación con el buffer de extracción a 65°C durante 10 a 15 min.	Incubación con el buffer de extracción a temperatura ambiente por 2 h.	Incubación con el buffer de extracción a temperatura ambiente durante 30 a 60 min.	Incubación con el buffer de extracción a 50°C durante 15 a 60 min.
2o. Paso	Extracción con 1 volumen de cloroformo- alcohol isoamílico 1:24 (sevac). Agitar en vortex. Centrifugación a 11000 x g por 5 min. para separar fases.	Centrifugación a 10000 x g a 4°C durante 10 min. para separar fases. Incubación con proteínasa K a 37°C durante 1.5 h. (También se probó incubar con la proteínasa K y después centrifugar [4 muestras])	Extracción con 1 volumen de sevac. Centrifugación a 1096 x g por 10 min. para separar fases.	Extracción con 1 volumen de sevac. Centrifugación a 17530 x g por 10 min. para separar fases.
3er. Paso	Incremento de concentración salina. Agregar un décimo de volumen de CTAB 10% + NaCl 0.7 M a 65°C, calentado previamente. Extracción con 1 volumen de sevac. Agitar en vortex. Centrifugación a 11000 x g por 5 min. para separar fases.	Extracción con 1 volumen de fenol. Centrifugación a 10000 x g a 4°C por 10 min para separar fases.	Precipitación de ADN y bandedo por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl.	Incubación con el buffer de extracción a 50°C por 15 min.

4o. Paso	Adición de 2 volúmenes de buffer de precipitación de CTAB: 1% (p/v) CTAB, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA (pH 8.0). Mantener en hielo por 30 min. Centrifugar a 11000 x g a 4°C por 5 min. y decantar.	Extracción con 1 volumen de 1:1 fenol-sevac. Centrifugación para separar fases. Se repite una vez.		Extracción con 1 volumen de sevac. Centrifugación a 17530 x g por 10 min. para separar fases.
5o. Paso	Rehidratación del pellet en 100 µL de buffer TE salino (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH 8.0, 1 M NaCl). Calentar a 65°C por 5 a 10 min.	Se agrega NaCl para obtener una concentración final de 0.5 M.		Precipitación de ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda una noche.
6o. Paso	Precipitación de ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda una noche.	Precipitación de ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda una noche.		Centrifugar a 17530 x g a 4°C durante 10 min. Lavado con etanol 70% frío, secar parcialmente y disolver en 50 µL de TE.
7o. Paso	Centrifugar a 17530 x g a 4°C durante 10 min. ADN lavado con etanol 70% frío, secado parcial y disuelto en 50 µL de TE.	Centrifugar a 17530 x g a 4°C durante 10 min. Lavar con etanol 70% frío, secar parcialmente y disolver en 50 µL de TE.		

7.2. ANEXO 2.

TABLA DE FRECUENCIAS ALÉLICAS.
ESCALA REGIONAL.

LOCUS	SR		LP	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	0.012	0.988	0.000	1.000
2	0.000	1.000	0.014	0.986
3	0.000	1.000	0.021	0.979
4	0.000	1.000	0.049	0.951
5	0.000	1.000	0.035	0.965
6	0.000	1.000	0.035	0.965
7	0.000	1.000	0.035	0.965
8	0.012	0.988	0.021	0.979
9	0.122	0.878	0.099	0.901
10	0.085	0.915	0.091	0.909
11	0.073	0.927	0.035	0.965
12	0.012	0.988	0.028	0.972
13	0.012	0.988	0.007	0.993
14	0.305	0.695	0.176	0.824
15	0.134	0.866	0.162	0.838
16	0.000	1.000	0.127	0.873
17	0.024	0.976	0.042	0.958
18	0.085	0.915	0.162	0.838
19	0.390	0.610	0.176	0.809
20	0.024	0.976	0.176	0.809
21	0.134	0.866	0.247	0.753
22	0.159	0.842	0.127	0.873
23	0.024	0.976	0.070	0.930
24	0.024	0.976	0.063	0.937
25	0.024	0.976	0.099	0.901
26	0.073	0.927	0.120	0.880
27	0.134	0.866	0.211	0.789
28	0.073	0.927	0.106	0.894
29	0.061	0.939	0.162	0.838
30	0.049	0.951	0.134	0.866
31	0.000	1.000	0.134	0.852
32	0.000	1.000	0.091	0.909
33	0.061	0.939	0.120	0.880
34	0.012	0.988	0.056	0.944
35	0.037	0.963	0.176	0.824
36	0.000	1.000	0.056	0.944
37	0.024	0.976	0.099	0.901
38	0.061	0.939	0.056	0.944
39	0.000	1.000	0.056	0.944
40	0.000	1.000	0.028	0.972
41	0.061	0.939	0.021	0.979
42	0.207	0.793	0.078	0.922
43	0.037	0.963	0.092	0.908
44	0.073	0.927	0.197	0.803
45	0.000	1.000	0.106	0.894
46	0.024	0.976	0.028	0.972
47	0.000	1.000	0.007	0.993
48	0.000	1.000	0.007	0.993
49	0.000	1.000	0.007	0.993
50	0.000	1.000	0.035	0.965
51	0.000	1.000	0.047	0.953
52	0.046	0.955	0.012	0.988
53	0.015	0.985	0.012	0.988

LOCUS	SR		LP	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
54	0.061	0.939	0.058	0.942
55	0.030	0.970	0.174	0.826
56	0.046	0.955	0.209	0.791
57	0.061	0.939	0.070	0.930
58	0.000	1.000	0.035	0.966
59	0.076	0.924	0.116	0.884
60	0.030	0.970	0.035	0.965
61	0.030	0.970	0.058	0.942
62	0.015	0.985	0.023	0.977
63	0.061	0.939	0.023	0.977
64	0.061	0.939	0.023	0.977
65	0.015	0.985	0.047	0.953
66	0.197	0.803	0.093	0.907
67	0.076	0.924	0.128	0.872
68	0.046	0.955	0.035	0.965
69	0.015	0.985	0.116	0.884
70	0.030	0.970	0.023	0.977
71	0.061	0.939	0.047	0.953
72	0.061	0.939	0.070	0.930
73	0.015	0.985	0.070	0.930
74	0.046	0.955	0.116	0.884
75	0.106	0.894	0.116	0.884
76	0.167	0.833	0.070	0.930
77	0.197	0.803	0.256	0.744
78	0.303	0.697	0.116	0.884
79	0.242	0.758	0.081	0.919
80	0.167	0.833	0.209	0.791
81	0.091	0.909	0.174	0.826
82	0.136	0.864	0.047	0.953
83	0.046	0.955	0.163	0.837
84	0.061	0.939	0.047	0.953
85	0.076	0.924	0.081	0.919
86	0.076	0.924	0.081	0.919
87	0.076	0.924	0.081	0.919
88	0.152	0.849	0.081	0.919
89	0.030	0.970	0.081	0.919
90	0.076	0.924	0.047	0.953
91	0.030	0.970	0.058	0.942
92	0.076	0.924	0.093	0.907
93	0.000	1.000	0.035	0.965
94	0.015	0.985	0.070	0.930
95	0.030	0.970	0.023	0.977
96	0.015	0.985	0.023	0.977
97	0.000	1.000	0.047	0.954
98	0.000	1.000	0.012	0.988
99	0.000	1.000	0.012	0.988
100	0.030	0.970	0.035	0.965
101	0.030	0.970	0.023	0.977
102	0.046	0.955	0.000	1.000
103	0.000	1.000	0.035	0.965
104	0.015	0.985	0.012	0.988
105	0.015	0.985	0.000	1.000

ESCALA LOCAL.

LOCUS	SR		SAL		RPC	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	0.012	0.988	0.000	1.000	0.000	1.000
2	0.000	1.000	0.036	0.964	0.000	1.000
3	0.000	1.000	0.036	0.964	0.012	0.988
4	0.000	1.000	0.071	0.929	0.035	0.965
5	0.000	1.000	0.018	0.982	0.047	0.954
6	0.000	1.000	0.018	0.982	0.047	0.954
7	0.000	1.000	0.036	0.964	0.035	0.965
8	0.012	0.988	0.036	0.964	0.012	0.988
9	0.122	0.878	0.071	0.929	0.116	0.884
10	0.085	0.915	0.089	0.911	0.081	0.919
11	0.073	0.927	0.018	0.982	0.047	0.954
12	0.012	0.988	0.036	0.964	0.023	0.977
13	0.012	0.988	0.000	1.000	0.012	0.988
14	0.305	0.695	0.107	0.893	0.221	0.779
15	0.134	0.866	0.179	0.821	0.151	0.849
16	0.000	1.000	0.179	0.821	0.093	0.907
17	0.024	0.976	0.036	0.964	0.047	0.954
18	0.085	0.915	0.071	0.929	0.221	0.779
19	0.390	0.610	0.214	0.786	0.163	0.837
20	0.024	0.976	0.107	0.857	0.221	0.779
21	0.134	0.866	0.286	0.714	0.221	0.779
22	0.159	0.842	0.161	0.839	0.116	0.884
23	0.024	0.976	0.089	0.911	0.058	0.942
24	0.024	0.976	0.071	0.929	0.058	0.942
25	0.024	0.976	0.071	0.929	0.116	0.884
26	0.073	0.927	0.107	0.857	0.116	0.884
27	0.134	0.866	0.286	0.714	0.163	0.837
28	0.073	0.927	0.161	0.839	0.070	0.930
29	0.061	0.939	0.071	0.929	0.221	0.779
30	0.049	0.951	0.071	0.929	0.174	0.826
31	0.000	1.000	0.107	0.893	0.163	0.837
32	0.000	1.000	0.089	0.911	0.081	0.919
33	0.061	0.939	0.089	0.911	0.140	0.860
34	0.012	0.988	0.089	0.911	0.035	0.965
35	0.037	0.963	0.107	0.893	0.221	0.779
36	0.000	1.000	0.036	0.964	0.070	0.930
37	0.024	0.976	0.107	0.857	0.070	0.930
38	0.061	0.939	0.071	0.929	0.047	0.954
39	0.000	1.000	0.089	0.911	0.035	0.965
40	0.000	1.000	0.036	0.964	0.023	0.977
41	0.061	0.939	0.018	0.982	0.023	0.977
42	0.207	0.793	0.018	0.982	0.128	0.872
43	0.037	0.963	0.089	0.911	0.081	0.919
44	0.073	0.927	0.214	0.786	0.174	0.826
45	0.000	1.000	0.250	0.750	0.023	0.977
46	0.024	0.976	0.036	0.964	0.023	0.977
47	0.000	1.000	0.018	0.982	0.000	1.000
48	0.000	1.000	0.000	1.000	0.012	0.988
49	0.000	1.000	0.018	0.982	0.000	1.000
50	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929
51	0.000	1.000	0.000	1.000	0.095	0.905
52	0.046	0.955	0.023	0.977	0.000	1.000
53	0.015	0.985	0.000	1.000	0.024	0.976

LOCUS	SR		SAL		RPC	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
54	0.061	0.939	0.046	0.955	0.071	0.929
55	0.030	0.970	0.182	0.818	0.191	0.809
56	0.046	0.955	0.114	0.886	0.310	0.690
57	0.061	0.939	0.046	0.955	0.095	0.905
58	0.000	1.000	0.023	0.977	0.048	0.952
59	0.076	0.924	0.091	0.909	0.119	0.881
60	0.030	0.970	0.046	0.955	0.024	0.976
61	0.030	0.970	0.000	1.000	0.119	0.881
62	0.015	0.985	0.000	1.000	0.048	0.952
63	0.061	0.939	0.023	0.977	0.024	0.976
64	0.061	0.939	0.046	0.955	0.000	1.000
65	0.015	0.985	0.000	1.000	0.095	0.905
66	0.197	0.803	0.205	0.796	0.000	1.000
67	0.076	0.924	0.114	0.841	0.095	0.905
68	0.046	0.955	0.046	0.955	0.024	0.976
69	0.015	0.985	0.068	0.932	0.119	0.833
70	0.030	0.970	0.023	0.977	0.024	0.976
71	0.061	0.939	0.046	0.955	0.048	0.952
72	0.061	0.939	0.068	0.932	0.071	0.929
73	0.015	0.985	0.068	0.932	0.071	0.929
74	0.046	0.955	0.046	0.955	0.191	0.809
75	0.106	0.894	0.091	0.909	0.119	0.881
76	0.167	0.833	0.068	0.932	0.071	0.929
77	0.197	0.803	0.205	0.796	0.310	0.690
78	0.303	0.697	0.114	0.841	0.071	0.929
79	0.242	0.758	0.046	0.955	0.119	0.881
80	0.167	0.833	0.182	0.818	0.238	0.762
81	0.091	0.909	0.205	0.796	0.119	0.833
82	0.136	0.864	0.000	1.000	0.095	0.905
83	0.046	0.955	0.205	0.796	0.119	0.881
84	0.061	0.939	0.046	0.955	0.048	0.952
85	0.076	0.924	0.114	0.886	0.048	0.952
86	0.076	0.924	0.114	0.841	0.024	0.976
87	0.076	0.924	0.068	0.932	0.095	0.905
88	0.152	0.849	0.068	0.932	0.095	0.905
89	0.030	0.970	0.182	0.818	0.000	1.000
90	0.076	0.924	0.046	0.955	0.048	0.952
91	0.030	0.970	0.023	0.977	0.095	0.905
92	0.076	0.924	0.091	0.909	0.095	0.905
93	0.000	1.000	0.046	0.955	0.024	0.976
94	0.015	0.985	0.046	0.955	0.095	0.905
95	0.030	0.970	0.023	0.977	0.024	0.976
96	0.015	0.985	0.023	0.977	0.024	0.976
97	0.000	1.000	0.091	0.909	0.000	1.000
98	0.000	1.000	0.023	0.977	0.000	1.000
99	0.000	1.000	0.000	1.000	0.024	0.976
100	0.030	0.970	0.046	0.955	0.024	0.976
101	0.030	0.970	0.023	0.977	0.024	0.976
102	0.046	0.955	0.000	1.000	0.000	1.000
103	0.000	1.000	0.023	0.977	0.048	0.952
104	0.015	0.985	0.000	1.000	0.024	0.976
105	0.015	0.985	0.000	1.000	0.000	1.000

ESCALA INTRAPOBLACIONAL

LOCUS	SR1		SR2		SAL1		SAL2		RPC1		RPC2	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
2	0.000	1.000	0.000	1.000	0.039	0.961	0.033	0.967	0.000	1.000	0.000	1.000
3	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.000	1.000	0.022	0.978
4	0.000	1.000	0.000	1.000	0.115	0.885	0.033	0.967	0.050	0.950	0.022	0.978
5	0.000	1.000	0.000	1.000	0.039	0.961	0.000	1.000	0.025	0.975	0.065	0.935
6	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.000	1.000	0.087	0.913
7	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.000	1.000	0.065	0.935
8	0.000	1.000	0.023	0.977	0.039	0.961	0.033	0.967	0.000	1.000	0.022	0.978
9	0.210	0.790	0.046	0.954	0.039	0.961	0.100	0.900	0.200	0.800	0.044	0.957
10	0.132	0.868	0.046	0.954	0.154	0.846	0.033	0.967	0.125	0.875	0.044	0.957
11	0.026	0.974	0.114	0.886	0.039	0.961	0.000	1.000	0.050	0.950	0.044	0.957
12	0.000	1.000	0.023	0.977	0.000	1.000	0.067	0.933	0.025	0.975	0.022	0.978
13	0.000	1.000	0.023	0.977	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.022	0.978
14	0.342	0.658	0.227	0.727	0.115	0.885	0.100	0.900	0.200	0.800	0.239	0.761
15	0.053	0.947	0.204	0.796	0.154	0.846	0.133	0.800	0.200	0.800	0.109	0.891
16	0.000	1.000	0.000	1.000	0.231	0.769	0.133	0.867	0.075	0.925	0.109	0.891
17	0.000	1.000	0.046	0.954	0.039	0.961	0.033	0.967	0.000	1.000	0.087	0.913
18	0.000	1.000	0.182	0.818	0.039	0.961	0.100	0.900	0.250	0.750	0.196	0.804
19	0.500	0.447	0.296	0.704	0.077	0.923	0.367	0.786	0.225	0.775	0.109	0.891
20	0.026	0.974	0.023	0.977	0.231	0.769	0.067	0.933	0.175	0.825	0.283	0.717
21	0.105	0.895	0.114	0.841	0.077	0.923	0.500	0.433	0.300	0.700	0.174	0.826
22	0.105	0.895	0.204	0.796	0.385	0.615	0.000	1.000	0.075	0.925	0.109	0.848
23	0.000	1.000	0.046	0.954	0.039	0.961	0.133	0.867	0.050	0.950	0.065	0.935
24	0.000	1.000	0.046	0.954	0.000	1.000	0.133	0.867	0.025	0.975	0.087	0.913
25	0.026	0.974	0.023	0.977	0.115	0.885	0.033	0.967	0.125	0.875	0.087	0.913
26	0.184	0.816	0.000	1.000	0.039	0.961	0.233	0.767	0.050	0.950	0.174	0.826
27	0.026	0.974	0.227	0.773	0.385	0.615	0.133	0.800	0.025	0.975	0.304	0.696
28	0.079	0.921	0.068	0.932	0.115	0.885	0.133	0.800	0.050	0.950	0.087	0.913
29	0.026	0.974	0.091	0.909	0.077	0.923	0.067	0.933	0.175	0.825	0.283	0.717
30	0.000	1.000	0.091	0.909	0.115	0.885	0.033	0.967	0.225	0.775	0.109	0.848
31	0.000	1.000	0.000	1.000	0.039	0.961	0.133	0.800	0.100	0.900	0.217	0.783
32	0.000	1.000	0.000	1.000	0.077	0.923	0.033	0.967	0.025	0.975	0.109	0.848
33	0.000	1.000	0.114	0.886	0.154	0.846	0.100	0.900	0.225	0.775	0.065	0.935
34	0.000	1.000	0.023	0.977	0.077	0.923	0.233	0.767	0.025	0.975	0.044	0.957
35	0.026	0.974	0.046	0.954	0.000	1.000	0.033	0.967	0.175	0.825	0.283	0.717
36	0.000	1.000	0.000	1.000	0.039	0.961	0.133	0.867	0.025	0.975	0.109	0.891
37	0.026	0.974	0.023	0.977	0.115	0.885	0.100	0.900	0.000	1.000	0.109	0.848
38	0.053	0.947	0.068	0.932	0.039	0.961	0.033	0.967	0.050	0.950	0.044	0.957
39	0.000	1.000	0.000	1.000	0.154	0.846	0.033	0.967	0.025	0.975	0.044	0.957
40	0.000	1.000	0.000	1.000	0.039	0.961	0.033	0.967	0.000	1.000	0.044	0.957
41	0.079	0.921	0.046	0.954	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.044	0.957
42	0.132	0.868	0.227	0.727	0.039	0.961	0.133	0.800	0.050	0.950	0.196	0.804
43	0.053	0.947	0.023	0.977	0.000	1.000	0.233	0.767	0.075	0.925	0.087	0.913
44	0.026	0.974	0.114	0.886	0.231	0.769	0.233	0.767	0.250	0.750	0.109	0.891
45	0.000	1.000	0.000	1.000	0.269	0.731	0.067	0.933	0.000	1.000	0.044	0.957
46	0.000	1.000	0.046	0.954	0.000	1.000	0.033	0.967	0.000	1.000	0.044	0.957
47	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
48	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.000	1.000	0.022	0.978
49	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
50	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.214	0.786
51	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.143	0.857	0.000	1.000
52	0.026	0.974	0.071	0.929	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
53	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000

LOCUS	SR1		SR2		SAL1		SAL2		RPC1		RPC2	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
54	0.105	0.895	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.071	0.929	0.071	0.929
55	0.053	0.947	0.000	1.000	0.357	0.643	0.100	0.900	0.071	0.929	0.357	0.500
56	0.079	0.921	0.000	1.000	0.000	1.000	0.133	0.800	0.393	0.607	0.143	0.857
57	0.053	0.947	0.071	0.929	0.071	0.929	0.033	0.967	0.143	0.857	0.000	1.000
58	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.071	0.929	0.000	1.000
59	0.132	0.868	0.000	1.000	0.071	0.929	0.100	0.900	0.107	0.893	0.143	0.857
60	0.053	0.947	0.000	1.000	0.071	0.929	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000
61	0.053	0.947	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929	0.214	0.786
62	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.036	0.964	0.071	0.929
63	0.026	0.974	0.107	0.893	0.000	1.000	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000
64	0.026	0.974	0.107	0.893	0.000	1.000	0.067	0.933	0.000	1.000	0.000	1.000
65	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.107	0.893	0.071	0.929
66	0.132	0.868	0.286	0.714	0.214	0.786	0.133	0.800	0.000	1.000	0.000	1.000
67	0.105	0.895	0.036	0.964	0.071	0.929	0.133	0.800	0.107	0.893	0.071	0.929
68	0.079	0.921	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.036	0.964	0.000	1.000
69	0.026	0.974	0.000	1.000	0.214	0.786	0.000	1.000	0.143	0.857	0.143	0.857
70	0.053	0.947	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000
71	0.105	0.895	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.036	0.964	0.071	0.929
72	0.079	0.921	0.036	0.964	0.000	1.000	0.100	0.900	0.036	0.964	0.143	0.857
73	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.100	0.900	0.107	0.893	0.000	1.000
74	0.053	0.947	0.036	0.964	0.000	1.000	0.067	0.933	0.214	0.786	0.143	0.857
75	0.105	0.895	0.107	0.893	0.071	0.929	0.100	0.900	0.071	0.929	0.214	0.786
76	0.210	0.790	0.107	0.893	0.071	0.929	0.067	0.933	0.107	0.893	0.000	1.000
77	0.210	0.790	0.214	0.786	0.071	0.929	0.267	0.733	0.357	0.643	0.214	0.786
78	0.000	1.000	0.071	0.929	0.143	0.857	0.133	0.867	0.071	0.929	0.071	0.929
79	0.316	0.684	0.143	0.857	0.000	1.000	0.067	0.933	0.107	0.893	0.143	0.857
80	0.184	0.816	0.143	0.857	0.143	0.857	0.133	0.800	0.214	0.786	0.357	0.643
81	0.053	0.947	0.143	0.857	0.143	0.857	0.233	0.767	0.107	0.893	0.214	0.786
82	0.132	0.868	0.107	0.893	0.000	1.000	0.000	1.000	0.143	0.857	0.000	1.000
83	0.079	0.921	0.000	1.000	0.214	0.786	0.133	0.800	0.071	0.929	0.214	0.786
84	0.026	0.973	0.107	0.893	0.000	1.000	0.067	0.933	0.000	1.000	0.143	0.857
85	0.132	0.868	0.000	1.000	0.071	0.929	0.133	0.867	0.071	0.929	0.000	1.000
86	0.132	0.868	0.000	1.000	0.071	0.929	0.133	0.800	0.036	0.964	0.000	1.000
87	0.079	0.921	0.071	0.929	0.000	1.000	0.100	0.900	0.143	0.857	0.000	1.000
88	0.184	0.816	0.107	0.893	0.000	1.000	0.100	0.900	0.143	0.857	0.000	1.000
89	0.000	1.000	0.071	0.929	0.143	0.857	0.133	0.800	0.000	1.000	0.000	1.000
90	0.132	0.868	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.036	0.964	0.071	0.929
91	0.000	1.000	0.071	0.929	0.071	0.929	0.000	1.000	0.071	0.929	0.143	0.857
92	0.053	0.947	0.107	0.893	0.000	1.000	0.133	0.867	0.071	0.929	0.143	0.857
93	0.000	1.000	0.000	1.000	0.143	0.857	0.000	1.000	0.036	0.964	0.000	1.000
94	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.067	0.933	0.107	0.893	0.071	0.929
95	0.053	0.947	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000
96	0.026	0.974	0.000	1.000	0.071	0.929	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929
97	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.133	0.867	0.000	1.000	0.000	1.000
98	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
99	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929
100	0.052	0.947	0.000	1.000	0.071	0.929	0.033	0.967	0.000	1.000	0.071	0.929
101	0.052	0.947	0.000	1.000	0.000	1.000	0.033	0.967	0.036	0.964	0.000	1.000
102	0.079	0.921	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
103	0.000	1.000	0.000	1.000	0.071	0.929	0.000	1.000	0.036	0.964	0.071	0.929
104	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.036	0.964	0.000	1.000
105	0.026	0.974	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000