

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ALGA
KAPPAPHYCUS ALVAREZII CULTIVADA EN LAS COSTAS
DE LA PROVINCIA DE COLÓN**

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF ALGAE
KAPPAPHYCUS ALVAREZII CULTIVATED IN THE COLON
PROVINCE COAST**

Recepción
30-marzo-2021

Aprobación
29-junio-2021

Nicolás Torrales¹, Claudia Massiel Pérez González^{*2}

¹ No afiliado, Panamá

<https://orcid.org/0000-0001-6996-7461> Correo: torralesng@gmail.com

² Universidad de Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0003-3209-5940> Correo: claudia.perezg@up.ac.pa

* autor de correspondencia: Claudia Massiel Pérez González

Editor Temático: Sandra Pérez Álvarez

Resumen

En Panamá, el cultivo de *Kappaphycus* se inició hace más de 20 años en la Provincia de Colón, generando ingresos económicos en las comunidades costeras de forma eco-sostenible. Estos cultivos a lo largo del tiempo experimentan diversos cambios generados por la interacción con el ambiente (contaminación, herbivoría, condiciones climáticas, etc.), influyendo en el fenotipo y genotipo de los cultivos de macroalgas, lo que muchas veces dificulta su correcta identificación taxonómica, caracterización y mantenimiento de las cepas que se cultivan, además que estas algas poseen una alta plasticidad fenotípica. Por tal razón, es necesario recurrir a las técnicas de identificación molecular de los cultivos para identificar y caracterizar molecularmente estas especies introducidas que tienen importancia comercial. En este estudio, el objetivo es identificar el cultivo de *Kappaphycus* en las Costas de la Provincia de Colón a través de marcadores moleculares. Para ello, se utilizaron marcadores moleculares cloroplásticos como el *rbcl* y mitocondriales como el gen *cox2-3*. Como resultado se obtuvieron secuencias del gen mitocondrial *cox 2-3*, las cuales fueron sometidas a análisis filogenéticos junto a las secuencias depositadas en las bases de datos, dando como resultado que la especie cultivada corresponde a la especie *Kappaphycus alvarezii* y muestra cercanía con las especies de *Kappaphycus* y *Eucheuma* de Malasia.

Palabras Clave: *Kappaphycus*, *Eucheuma*, *cox 2-3*, *rbcl*, identificación molecular, plasticidad fenotípica.

Abstract

In Panama, the cultivation of *Kappaphycus* began more than 20 years ago, in the Province of Colón, generating economic income in coastal communities in an eco-sustainable way. Over time, these

crops undergo various changes generated by interaction with the environment (pollution, herbivores, climatic conditions, others). These factors influence the phenotype and genotype of macroalgae cultures, which often makes their correct taxonomic identification, characterization, and maintenance of the cultivated strains complex and the fact that they have high phenotypic plasticity. For this reason, it is necessary to resort to molecular identification techniques to identify and molecularly characterize these introduced species of commercial importance. This study aims to identify the *Kappaphycus* cultivated in the Coasts of the Province of Colón using molecular markers. For this, chloroplastic molecular markers such as *rbcL* and mitochondrial markers such as the *cox2-3* gene were used. As a result, were obtained sequences of the mitochondrial *cox 2-3* gene, which were subjected to phylogenetic analysis and the sequences deposited in the databases, resulting in the cultivated species corresponding to the *Kappaphycus alvarezii* species and shows closeness to the *Kappaphycus* and *Eucheuma* species from Malaysia.

Keywords: *Kappaphycus*, *Eucheuma*, COX 2-3, *rbcL*, molecular identification, phenotypic plasticity.

Introducción

El cultivo de macroalgas en Panamá se implementó hace más de 20 años en la Provincia de Colón, y posteriormente en la Provincia de Bocas de Toro. La principal especie cultivada es del género *Kappaphycus*, su importancia comercial radica en su materia prima, la carragenina o carragenanos, un ficocoloide de gran interés industrial (Batista, 2009).

El género *Kappaphycus* pertenece al grupo de las algas rojas y debido a su alta plasticidad fenotípica, se hace difícil su identificación basándose solo en sus caracteres morfológicos (Phaik et al., 2007). Esta plasticidad morfológica genera confusión entre los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*. Esta característica, puede generar grandes gastos financieros cuando las algas cultivadas no son las correctas y por lo tanto estas son no productoras de kappa-carragenano o lo producen, pero de baja calidad y cantidad (Ji et al., 2013).

El uso de marcadores genéticos no solo elucida el problema de las confusiones entre los distintos tipos de algas rojas, sino que también puede llevar al descubrimiento de nuevas variedades de la misma especie. Entre los marcadores más comunes para la identificación de *Kappaphycus* y *Eucheuma* son los

intraespecíficos para el espaciador RuBisCO codificado en los plástidos y para el espaciador cox2-3 codificados en las mitocondrias.

Los estudios sobre los cultivos de algas del género *Kappaphycus* en Panamá se han enfocado en medir su capacidad de propagación y sus índices de cobertura (Sellers et al., 2015). También se han hecho estudios sobre la mejor manera de realizar cultivos sostenibles mediante la comparación de métodos de cultivo *in-situ* e *in-vitro* (Batista, 2009). Sin embargo, son pocos los estudios moleculares que ayudan a caracterizar estos cultivos de gran interés comercial (Pérez-González, 2013). Por tal razón, el objetivo de nuestro estudio es identificar a través de las técnicas moleculares los cultivos de algas del género *Kappaphycus* de la Provincia de Colón utilizando marcadores cloroplásticos y mitocondriales.

Materiales y métodos

Muestreo

Las muestras de algas fueron colectadas de los cultivos localizados en Cativá, Bahía Las Minas de la Provincia de Colón, realizados por la empresa Panama Sea Farms S.A. De acuerdo a las características morfológicas de estas, la empresa aseguró que eran parte del género *Kappaphycus* Doty. Se tomaron 4 muestras y de cada muestra 3 réplicas. Luego, fueron guardadas en bolsas plásticas con cerradura hermética y transportadas en frío para asegurar su integridad, hasta llegar al laboratorio, en donde fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de las muestras

Se seleccionaron los ápices libres de epifitos de las muestras adquiridas para ser triturados en nitrógeno líquido, después se conservaron en tubos Eppendorf a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la extracción de su material genético.

Extracción del ADN

Para cada extracción se utilizaron 0,5 g de alga triturada y se les añadió 1 ml buffer CTAB (Murray & Thompson, 1980) compuesto por SDS 0.1%, Tris-HCL 0.1M, PVPP 0.1%, NaCl 2M, EDTA 20mM, CTAB 2% (pH 8) y β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las muestras se colocaron en un baño María por una hora a 65 °C, en agitación a intervalos de 5 minutos. Después se le añadió a la muestra 1mL de solución de cloroformo/alcohol isoamílico (CIA) en proporción 24:1, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm, luego se retiró el sobrenadante y se añadió en proporción 1:1 la solución CIA, este procedimiento se repitió dos veces. Inmediatamente después, se añadió alcohol isopropílico en proporción 2:3. La última centrifugación se realizó por 25 minutos, para al final retirar toda la solución, dejando que las muestras de ADN adheridas al tubo se sequen para después lavarlas con etanol al 80% y re-suspenderlas en 50 μ l de agua pura. Las muestras de ADN extraídas se conservaron a 4 °C.

Para comprobar la extracción exitosa del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En este procedimiento se prepararon 35 mL (concentración de agarosa 1% en 35 mL de TAE) con SYBR (3.5 μ L). Las muestras utilizadas (5uL) se mezclaron con un tampón de carga (1 μ L) antes de depositarse en los pocillos del agar y se corrieron a una carga de 80-100V. Las muestras que indicaron la presencia de ADN fueron guardadas a 4 °C para los siguientes procedimientos.

Purificación del ADN

Para la purificación de las muestras con ADN se le añadieron agua pura para obtener un volumen de 100uL, a la solución anterior se le añadieron 33,3 μ L de acetato de amonio (7,5M) y 333,3 μ L de etanol absoluto. Luego se centrifugó por 25 minutos a 13000 rpm, las muestras se lavaron con etanol puro y una vez secas, el ADN se re-suspendió en 25 μ l de agua pura y fue almacenado a 4 °C para los

siguientes procedimientos. El ADN comprobado por medio de la electroforesis, se indicó como puro y se utilizó en el siguiente procedimiento.

Amplificación por PCR

La amplificación se realizó por PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) usando el método de Phaik et al. (2007), el cual fue modificado en los tiempos y temperaturas, ajustados a las condiciones del laboratorio descritas a detalle en cada procedimiento. El volumen total de PCR es de 25 μL , el cual es el agregado de 1,5 μL del primer forward y reverse (0.4×10^{-5} $\mu\text{moles}/\mu\text{L}$ de cada uno), 9 μL del Taq PCR Master Mix Kit de QIAGEN, el cual contenía el Buffer, los dNTP's y la Taq polimerasa, antes de iniciar la PCR se agregaron 8,3 μL de ADN (0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La secuencia de los primers utilizados en el experimento fueron COX-2 (5'-GTACCWTCTTTDRGRRKDAAATGTGAGC-3') y COX-3 (5'-GGATCTACWAGATGRAAAWGGATGRC-3'), junto con los primers R753 (5'-GCTCTTTCATACATATCTTTCC-3') y F2 (5'-CAACAACCAGGTGATCC-3') de RuBisCO.

Los parámetros de la PCR fueron 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclo de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, a 55°C por 5 segundos, elongación a 72°C por 30 segundos y una elongación final a 72°C por 10 minutos. La amplificación fue realizada con el PCR System 9700 de GeneAmp.

Secuenciación y Análisis del Producto de PCR

El producto amplificado se etiquetó y envió a los laboratorios de Maryland de Psomagen USA para la secuenciación de las muestras. Los productos secuenciados fueron analizados con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1 (Hall, 1999) para observar las secuencias obtenidas.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas del BioEdit fueron alineados usando el programa MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar, et al., 2018) con secuencias de bases de datos de *Kappaphycus*, *Eucheuma* y otros (Tabla 1). Una vez obtenido el alineamiento, las secuencias fueron analizadas utilizando el mismo programa MEGA X para determinar el mejor modelo de ADN/Proteínas para el análisis filogenético. Luego se utilizó el método Máxima Verosimilitud (este utiliza el neighbor-joining por lo que se tomó en cuenta las secuencias que pudieron evolucionar a distintas velocidades).

Tabla 1. Secuencias del GenBank de NCBI que se utilizaron para la elaboración del árbol filogenético con las muestras obtenidas.

Nombre del Taxón	Lugar de origen	Código de acceso
<i>Kappaphycus striatum</i>	Malasia	JX624075.1
<i>Kappaphycus striatus</i>	Filipinas	KX388179.1
<i>Kappaphycus striatum</i>	Vietnam	JX624078.1
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Vietnam	JX624074.1
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Filipinas	JX624073.1
<i>Kappaphycus malesianus</i>	Malasia	KM218334.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Indonesia	JX624081.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Filipinas	JX624082.1
<i>Gracilaria changii</i>	Malasia	JX228064.1
<i>Gracilaria caudata</i>	Brasil	MG452534.1
<i>Gracilaria changii</i>	Malasia 2	GU645702.1
<i>Kappaphycus inermis</i>	Filipinas	KT316629.1
<i>Eucheuma arnoldii</i>	Filipinas	KX196454.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Malasia 2	MN331544.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Tanzania 2	KT390685.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Tanzania	AY687429.1
<i>Eucheuma isiforme</i>	México	MH255770.1
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Malasia	JN234759.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Malasia 3	MN331557.1
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Malasia	JN980403.1
<i>Kappaphycus striatus</i>	Malasia 3	MN331556.1
<i>Kappaphycus striatum</i>	Malasia 2	JN234763.1
<i>Betaphycus speciosus</i>	Australia	MH104913.1
<i>Betaphycus speciosus</i>	Australia 2	MH104915.1
<i>Gracilaria cornea</i>	México	KT005902.1
<i>Gracilaria usneoides</i>	México	KT005906.1

Resultados

Extracción de ADN y amplificación de los primers

Se obtuvo un total de 20 muestras de ADN de calidad las cuales fueron utilizadas para la amplificación con los marcadores cloroplásticos y mitocondriales. Como resultado de la amplificación se obtuvieron 10 fragmentos del gen mitocondrial que fueron enviados a secuenciar. En la Figura 1 se muestran los resultados de los geles de electroforesis donde se obtuvo fragmentos entre 274 a 370 pb aproximadamente para el gen mitocondrial *cox2-3*. En cuanto al marcador del gen *rbcL* no se amplificó, por ende, no se obtuvieron fragmentos visibles en el gel de electroforesis.

Secuenciación y análisis filogenético

De las amplificaciones obtenidas, y enviadas a secuenciar al laboratorio Macrogen USA, solo se obtuvieron secuencias de fragmentos con las muestras que utilizaron el marcador mitocondrial COX 2-3 (Tabla 2). Además de presentar similitud con las secuencias de las bases de datos de NCBI correspondientes a la especie *Kappaphycus alvarezii*.

En el árbol filogenético obtenido se puede destacar que todas las muestras de Panamá terminaron en el mismo clado lo cual indica una cercanía evolutiva entre estos, siendo todas de la misma especie. Se puede observar también que el clado más cercano al cual se encuentra las especies en estudio (*Kappaphycus* Panamá), es el que contiene a las especies *Kappaphycus striatum*, *Kappaphycus striatus*, *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma denticulatum*, todas del mismo país de origen Malasia, el cual es el mismo lugar de origen de la variedad de *Kappaphycus* sp. que es cultivada por la empresa Panama Sea Farms S.A.

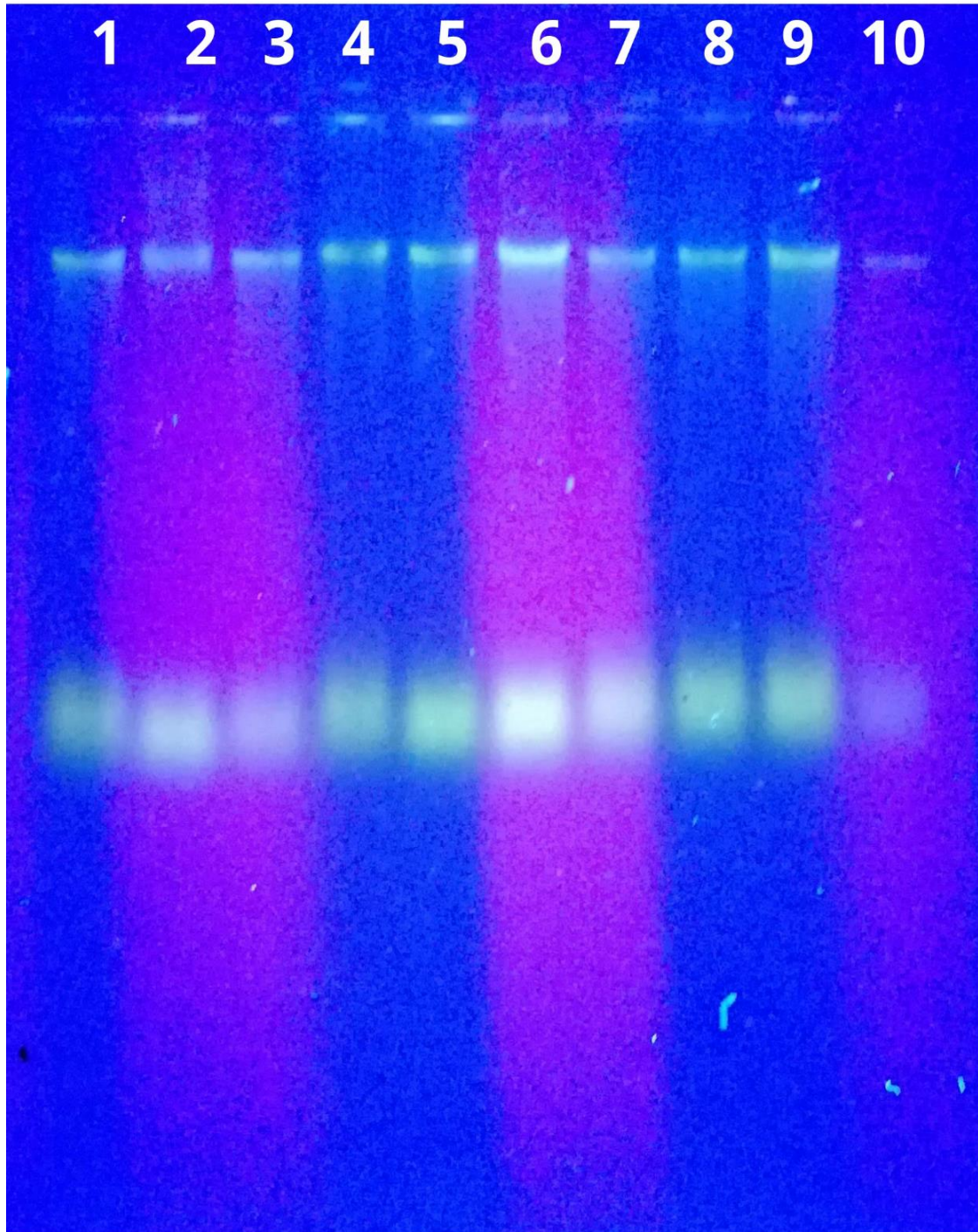


Figura 1. En esta imagen se muestra el resultado de la electroforesis de los 10 fragmentos amplificados para el gen *cox 2-3*.

Tabla 2. Secuencias obtenidas con el marcador mitocondrial cox 2-3 de *Kappaphycus alvarezii* cultivada en la Provincia de Colón.

Nombre de la Muestra	Tamaño de pb
<i>Kappaphycus</i> Panama 2.2	331
<i>Kappaphycus</i> Panama 2.1	274
<i>Kappaphycus</i> Panama 1.2	370
<i>Kappaphycus</i> Panama 1.1	336

También se puede señalar que este marcador mitocondrial muestra dos subgrupos dentro del grupo de *Kappaphycus* de Panamá, es probable que se traten de dos variedades de *Kappaphycus alvarezii* dentro del cultivo, lo que requiere hacer más estudios para comprobarlo.

Discusión

Los marcadores moleculares han ayudado a identificar correctamente las especies de macroalgas, pero se debe encontrar un gen polimórfico capaz de diferenciar una especie de otra, ya que no todos los genes son válidos para identificar las especies de algas marinas. Los resultados de este estudio refuerzan la importancia del uso de los marcadores moleculares para la correcta identificación, en este caso del género *Kappaphycus* perteneciente al grupo *Eucheumatoides*.

Los géneros *Eucheuma* y *Kappaphycus* con frecuencia son identificados de forma errónea (Phaik et al., 2017), debido a su alta plasticidad morfológica la cual puede confundir las descripciones taxonómicas tradicionales (Thien et al., 2020). Además de otros factores tales como, la falta de caracteres adecuados para identificar estas especies y el uso a conveniencia de los nombres comerciales (Zucarrello et al., 2006), lo cual hace necesario recurrir a las herramientas moleculares.

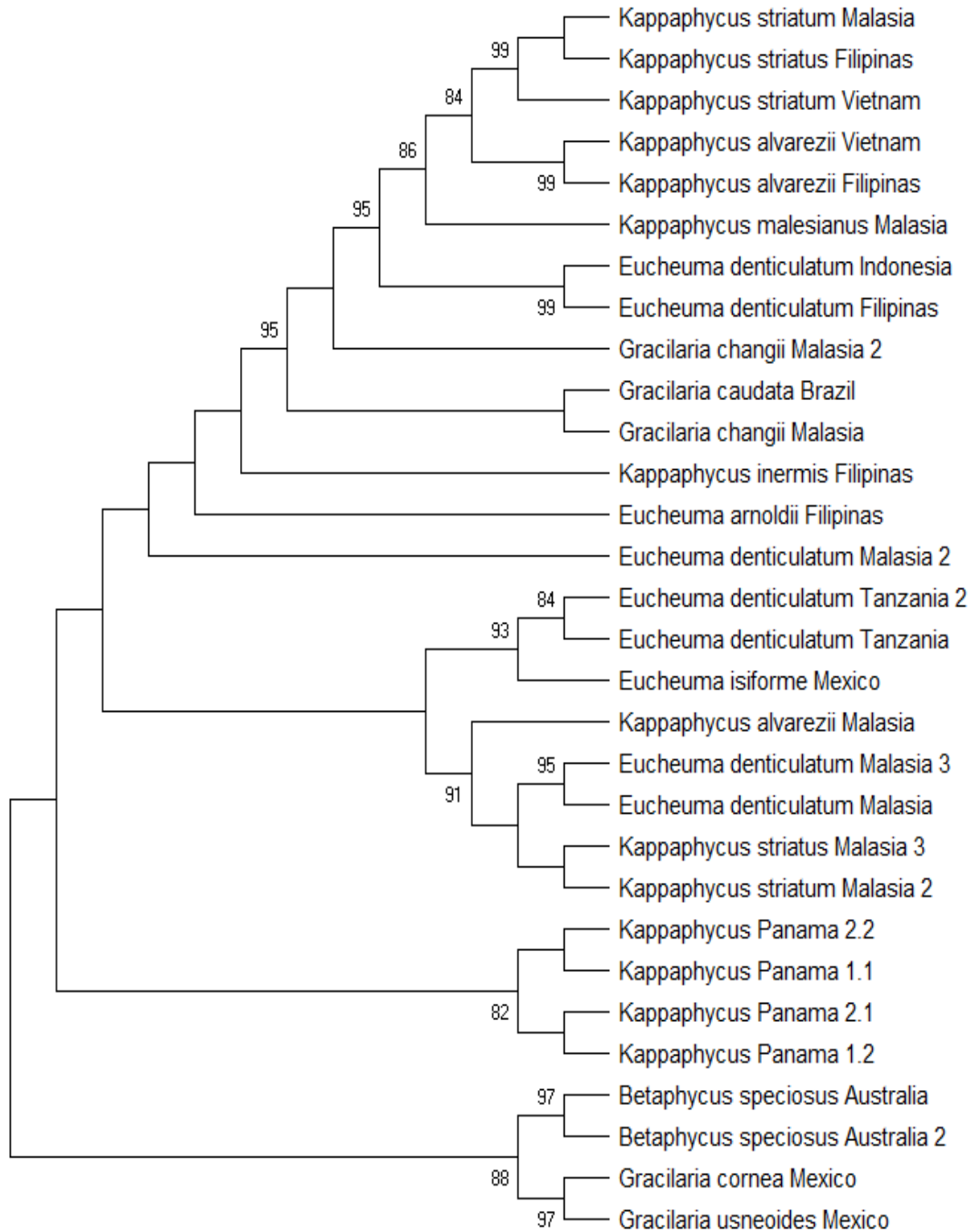


Figura 3. Árbol filogenético obtenido con las secuencias de *Kappaphycus* Panamá y las *Kappaphycus* presentes en las bases de datos del GenBank.

El marcador cloroplástico *rbcL* ha sido muy utilizado tanto en plantas superiores y algas para diferenciar especies y sus variedades. En el caso particular de las algas rojas los estudios realizados por Freshwater et al. (1994) y Fredericq et al. (1996), consideraron este marcador con excelentes valores de divergencia tanto intraespecífica e interespecífica. Sin embargo, Tan *et al.* (2012) consideran que el marcador *rbcL* es válido como marcador de código de barras de ADN para el grupo de las algas rojas en general, pero para diferenciar *Eucheuma* de *Kappaphycus* no es recomendable utilizarlo.

En este estudio no se logró amplificar la región correspondiente al gen *rbcL*, a pesar de hacer los ajustes de la PCR. Por lo tanto, no se obtuvieron datos para comparar la efectividad de dicho marcador, en la identificación de los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*. Pero en el caso del marcador mitocondrial *cox2-3*, se amplificaron con éxito los fragmentos en las muestras de estudio. Este marcador mitocondrial ha sido uno de los más utilizados en la literatura para lograr diferenciar a nivel molecular los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*.

Uno de los primeros estudios que ayudó a esclarecer la identificación de los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*, fue el trabajo de Zuccarello et al. (2006), con muestras pertenecientes a las principales localidades de cultivo a nivel mundial. En dicho estudio, a través del uso de marcadores moleculares mitocondriales como el *cox 2-3* y el marcador cloroplástico espaciador de la RuBisCo, determinaron que el marcador cloroplástico era mucho más conservado que el marcador mitocondrial, siendo necesario la obtención de marcadores más variables que permitan un mejor análisis filogenético para diferenciar estas especies de importancia comercial.

En este sentido, son muchos los estudios moleculares donde se intenta comparar la efectividad de los marcadores moleculares para diferenciar de manera inter e intraespecífica los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*. Este es el

caso del trabajo realizado por Tan *et al.* (2012), quienes compararon cuatro marcadores moleculares para utilizar como código de barras de ADN para la correcta identificación de las especies de los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*, como resultado consideraron que el marcador *cox 2-3* era el más apropiado para utilizar como código de barras de ADN para estos dos géneros.

Además, otro estudio realizado en Filipinas por Dumilac *et al.*, (2016), quienes utilizaron dos tipos de marcadores mitocondriales COI-5P y el espaciador intergénico *cox 2-3* para evaluar la diversidad genética de las variedades cultivadas, en dicho estudio ambos marcadores fueron útiles para diferenciar las especies dentro del género *Kappaphycus*. Por lo tanto, según los estudios descritos y los resultados obtenidos se puede considerar que el marcador mitocondrial *cox 2-3* ha sido un marcador que ha dado excelentes resultados para identificar y diferenciar el género *Kappaphycus* cultivado en Panamá. Además, dichos fragmentos obtenidos para la región *cox 2-3* han sido lo suficientemente polimórficos para asignar a las muestras de *Kappaphycus* de Panamá como posible *Kappaphycus alvarezii*.

Conclusión

Las macroalgas y específicamente las algas rojas son un grupo muy diverso y posee propiedades de gran importancia comercial. Otra de las propiedades que las caracterizan es su alta plasticidad morfológica, la cual solo se puede resolver a través del uso de marcadores moleculares.

Dentro de la gran variedad de marcadores moleculares que se utilizan para identificar y diferenciar al grupo *Eucheumatoides* (*Kappaphycus* y *Eucheuma*), el gen *cox 2-3* es uno de los más efectivos y utilizados en la bibliografía. Además, permite mostrar diferencias a nivel de nuevas variedades dentro del cultivo lo que es muy útil al momento de la selección y conservación de las variedades del cultivo.

Agradecimiento

Queremos agradecer a la empresa Panama Sea Farms S.A. por permitirnos el acceso a las muestras. También agradecer a Nelva Alvarado del Instituto Especializado de Análisis por facilitarnos el espacio para realizar la investigación, Por último, agradecer a Eyda Gómez del Molecular Lab (Naos Marine Laboratory-STRI) por su ayuda en el laboratorio.

Referencias

- Batista, G. V. (2009) Cultivo Ecosostenible de *Kappaphycus alvarezii* en Panamá. Tesis de Doctorado, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Dumilag, R., Orozco, F. y Lluisma, A. (2016). Genetic diversity of *Kappaphycus* species (Gigartinales, Rhodophyta) in the Philippines, Systematics and Biodiversity, 14 (5): 441-451.
<https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1157643>
- Fredericq, S., Hommersand, M.H. y Freshwater, D.W. (1996). The molecular systematics of some agar –and carrageenan- containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. Proceedings XVth int Seaweed Symp. Hydrobiologia 326-327 (1): 125-135.
- Freshwater, D.W. y Rueness, J. (1994). Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. Phycologia 33(3): 187-194
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

- Ji, T., Phaik, L., y Siew-Moi, P. (2013). Phylogenetic relationship of *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) in Malaysia. *Journal of Applied Phycology*, 25: 13–29.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-012-9833-1>.
- Murray, M. G. y Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321–4326.
<https://academic.oup.com/nar/article/8/19/4321/2381063>
- Perez-Gonzalez, C.M. (2013). Caracterización biológica y química de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá. Tesis de Doctorado, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Phaik, E. L., Takeaki, H., Motohiro, S. y Kazuhiro, K. (2007). Molecular Phylogeny of Crustose Brown Algae (Ralfsiales, Phaeophyceae) Inferred from *rbc L* Sequences Resulting in the Proposal for Neoralfsiaceae Fam. Nov. *Phycologia*, 46(4):456-466.
<https://www.tandfonline.com/action/showAxaArticles?journalCode=uphy20>
- Phaik, E. L., Li-En, Y., Ji, T., Maggs, C. y Brodie J (2017). Advancing the taxonomy of economically important red seaweeds (Rhodophyta), *European Journal of Phycology*, 52 (4): 438-451. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365174>
- Sellers, A., Saltonstall, K. y Davidson, T. (2015). The introduced alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty ex PC Silva, 1996) in abandoned cultivation sites in Bocas del Toro, Panama. *BioInvasions Records* 4 (1): 1-7.
<https://doi.org/10.3391/bir.2015.4.1.01>
- Sudhir K., Glen S., Li, M., Knyaz, C. y Koichiro T. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Tan, J., Lim, P.E., Phang S.M., Hong, D.D., Sunarpi, H., y Hurtado, A.Q. (2012). Assessment of four molecular markers as potencial DNA barcodes for red algae *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae,

Rhodophyta) PLoS ONE 7(12) e52905.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052905>

Thien, V.Y., Yong, W.T.L., Anton, A., Chin, G.J.W.L. (2020). A multiplex PCR method for rapid identification of commercially important seaweeds *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus* and *Euचेuma denticulatum* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Regional Studies in Marine Science*, 40,101499. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101499>.

Zuccarello G., Alan, T. C., Jennifer, S., Volker, S., Genevieve, B. L., John, A. W. (2006). Systematics and genetic variation in commercial shape *Kappaphycus* and shape *Euचेuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 18: 643–651.

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-006-9066-2>