



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN MACROALGAS RHODOPHYTA CRECIDAS A LO LARGO DE LA
ZONA INTERMAREAL ROCOSA DE BALLENTA-PENÍNSULA DE SANTA
ELENA”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

AUTOR:

CONFORME PINCAY ÁNGELA MELINA

TUTOR:

BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN PH.D.

LA LIBERTAD- ECUADOR

2024

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN
MACROALGAS RHODOPHYTA CRECIDAS A LO LARGO DE LA ZONA
INTERMAREAL ROCOSA DE BALLENITA-PENÍNSULA DE SANTA ELENA”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

AUTOR:

CONFORME PINCAY ÁNGELA MELINA

TUTOR:

BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN PH.D.

LA LIBERTAD- ECUADOR


2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, **“Comparación de tres protocolos de extracción de ADN en macroalgas Rhodophyta crecidas a lo largo de la zona intermareal rocosa de Ballenita-Península de Santa Elena.”**, elaborado por **Angela Melina Conforme Pincay**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Bióloga. Me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos. Razón por la cual, apruebo en todas sus partes encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

La Libertad, 8 de julio de 2024

Atentamente



Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.

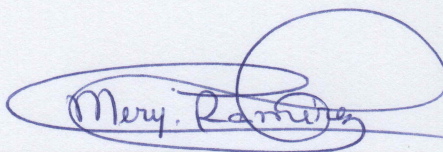
DOCENTE TUTOR

C.I.0201234044

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**Comparación de tres protocolos de extracción de ADN en macroalgas Rhodophyta crecidas a lo largo de la zona intermareal rocosa de Ballenita-Península de Santa Elena.**” elaborado por **Conforme Pincay Angela Melina**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



Q.F. Mery Ramírez Muñoz Ph.D

DOCENTE DE AREA

C.I.: 0907694186

DEDICATORIA

Dedicado a Dios por permitirme estar aquí, darme una hermosa familia que me ama, y la resiliencia para cumplir con mis propósitos. Por poner en mi camino situaciones, lugares y personas correctas para aprender y cumplir mis objetivos, eternamente agradecida. ♥

Con mucho cariño a mi madre Shirley Pincay Gutiérrez y a mi padre Edwin Conforme Franco, por su lucha y esfuerzo de querer siempre lo mejor para mí, por llevarme en el camino del bien, aconsejándome y enseñándome a perseverar siempre.

A mi hermanita Mia Belén, si bien comienza a explorar las sendas de la vida, me motiva cada día a ser un referente para ella.

AGRADECIMIENTO

Mis sinceros agradecimientos a la universidad Estatal Península de Santa Elena, a las autoridades y docentes de la Facultad Ciencias del Mar quienes han contribuido significativamente en mi formación profesional.

A mi tutora Blga. Janeth Galarza Ph.D., por guiarme en la elaboración de este trabajo, por tener la disponibilidad, paciencia y confianza en todo momento, profundamente agradecida.

A Guillermo Reyes por su motivación y orientación durante el desarrollo de esta investigación, de todo corazón gracias.

A mis amigos y compañeros que me apoyaron durante la experimentación y toma de muestras.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Conforme Pincay Angela Melina** como requisito parcial para la obtención del grado de Bióloga de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.


Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 15 de Julio del 2024



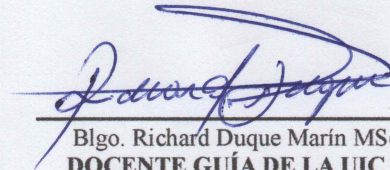
Ing. Jimmy Villon Moreno MSc.
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Q.F. Mery Ramirez Muñoz Ph.D.
DOCENTE DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blga. Janneth Galarza Tipán Ph.D.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



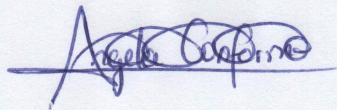
Blgo. Richard Duque Marín MSc.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Pascual Roca Silvestre Mgt.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, Angela Melina Conforme Pincay, declaro que la responsabilidad de las ideas, contenido y análisis de los resultados expuestos en este trabajo de integración curricular, me pertenecen en exclusividad y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).



Conforme Pincay Angela Melina

C.I.: 2400442436

ÍNDICE

RESUMEN	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. JUSTIFICACION.....	6
4. OBJETIVO GENERAL	8
5. OBJETIVO ESPECIFICO.....	8
6. HIPOTESIS	9
7. MARCO TEÓRICO	10
7.1. Ácidos nucleicos	10
7.2. Importancia del ADN en estudios moleculares	12
7.3. Métodos de extracción de ADN	13
7.3.1. Método CTAB	14
7.3.2. Método pK-SDS	14
7.3.3. Método Salting-out.....	15
7.3.4. Método Fenol-Cloroformo	15
7.3.5. Kits Comerciales.....	16
7.3.6. Extracción mediante Cloruro de Cesio (CsCl)	16
7.4. Etapas de extracción de ADN.....	17
7.4.1. Lisis celular.....	17
7.4.2. Aislamiento del ADN.....	18
7.4.3. Precipitación	18
7.4.4. Lavado de ADN	18
7.4.5. Purificación.....	19
7.4.6. Resuspensión	19
8.5. Técnicas de cuantificación del ADN	20
7.5.1. Electroforesis	20

7.5.2. Espectrofotometría.....	21
7.5.3. Fluorometría	22
7.5.4. PCR en tiempo real.....	23
7.6. Extracción de ADN en macroalgas	24
8. MARCO METODOLÓGICO	26
8.1. Obtención de la muestra.....	26
8.2. Procesamiento de muestras	27
8.2.1 Identificación taxonómica convencional.....	27
8.2.2. Preservación de muestra	28
8.3 Extracción de ADN	28
8.3.1 Protocolo 1: Método universal NaCl.....	30
8.3.2 Protocolo 2: Método enzimático.....	31
8.3.3 Protocolo 3: Método CTAB.....	32
8.4 Cuantificación del ADN	33
8.5 Estimación de la integridad de ADN.....	34
8.6. ANALISIS ESTADISTICO	35
9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	36
9.1. Identificación taxonómica de las macroalgas en estudio	36
9.2. Análisis de calidad del ADN entre protocolos	37
9.2.1. Genero <i>Corallina</i> , muestras congeladas.....	37
9.2.2. Genero <i>Corallina</i> muestras secas	40
9.2.3. Genero <i>Acanthophora</i> muestras congeladas.....	42
9.2.4. Genero <i>Acanthophora</i> muestras secas.....	44
9.3. Calidad de ADN por método de preservación.....	47
9.3.1. Protocolo CTAB frente al género <i>Corallina</i>	47
9.3.2. Protocolo universal (NaCl) frente al género <i>Corallina</i>	49
9.3.3. Protocolo enzimático frente al Género <i>Corallina</i>	50

9.3.4. Protocolo CTAB frente al género <i>Acanthophora</i>	52
9.3.5. Protocolo universal (NaCl) frente al género <i>Acanthophora</i>	53
9.3.6. Protocolo enzimático frente al Género <i>Acanthophora</i>	55
9.4. Integridad del ADN	57
10. DISCUSIONES.....	59
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
11.1. Conclusiones	65
11.2. Recomendaciones.....	67
12. BIBLIOGRAFÍA	68
13. ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: a) Estructura molecular de ADN (Martínez-Frías, 2010). b) Estructura molecular de ARN (Burriel, 2023).....	11
Figura 2: Puntos de recolección de muestras.....	26
Figura 3: Diseño de distribución de muestras con cada género de Rhodophyta	30
Figura 4: Concentración de ADN (ng/μL) de <i>Corallina</i> congelada por cada protocolo de extracción.....	38
Figura 5: Pureza de ADN (A260/A280) de <i>Corallina</i> congelada por cada protocolo	39
Figura 6: Concentración de ADN (ng/μL) de <i>Corallina</i> seca por cada protocolo de extracción.....	41
Figura 7: Pureza de ADN (A260/A280) de <i>Corallina</i> seca, por cada protocolo.....	41
Figura 8: Concentración de ADN (ng/μL) de <i>Acanthophora</i> congelada, por cada protocolo de extracción.	43
Figura 9: Pureza de ADN (A260/A280) de <i>Acanthophora</i> congelada	43
Figura 10: Concentración de ADN (ng/μL) de <i>Acanthophora</i> seca por cada protocolo de extracción.....	45
Figura 11: Pureza de ADN (A260/A280) de <i>Acanthophora</i> seca, por cada protocolo.....	46
Figura 12: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo CTAB.....	48
Figura 13: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo CTAB.....	48
Figura 14: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo NaCl.	49
Figura 15: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo NaCl.	50
Figura 16: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo enzimático	51
Figura 17: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Corallina</i> mediante el protocolo enzimático	51

Figura 18: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo CTAB.	52
Figura 19: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo CTAB.	53
Figura 20: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo CTAB	54
Figura 21: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo NaCl.	54
Figura 22: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo enzimático	56
Figura 23: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de <i>Acanthophora</i> mediante el protocolo enzimático.	56
Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coordenadas de las respectivas estaciones dentro del área de estudio.	27
Tabla 2: Criterios de validez para estimar la calidad de ADN, mediante espectrofotometría (Banco ADN, 2020).	34
Tabla 3: Criterio de validez para estimar la integridad de ADN mediante electroforesis, de acuerdo con el Programa de Control de Calidad de Muestras de ADN y ARN.....	35
Tabla 4: Características de los géneros de Rhodophytas	36
Tabla 5: Comparación de <i>p values</i> de los tres protocolos frente a <i>Corallina</i> congelada	39
Tabla 6: Comparación de <i>p values</i> de los tres protocolos frente a <i>Corallina</i> seca,	42
Tabla 7: Comparación de <i>p values</i> de los tres protocolos frente a <i>Acanthophora</i> congelada.	44
Tabla 8: Comparación de <i>p values</i> de los tres protocolos frente a <i>Acanthophora</i> seca	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tabla de mediana estadística de concentración y pureza A260/A280 de ADN.....	79
Anexo 2: Limpieza de algas colectadas	79
Anexo 3: Rotulación de tubos Eppendorf, antes de iniciar el proceso de extracción de ADN	79

GLOSARIO Y SIMBOLOGÍA

Tampón/buffer: Mezcla de diluciones amortiguadoras. Solución que resiste a variaciones drásticas de pH cuando se les añade ácidos o base.

Smear: Bandas de ADN difusas y sin definición clara

Incubación: Proceso en el cual, las muestras se encuentran a una determinada temperatura para conseguir una reacción.

Resuspensión: Partícula asentada sobre una superficie y es levantada nuevamente suspendidas en el medio fluido aplicado

µL: Unidad de medida, microlitros.

ng: Unidad de medida, nanogramos.

M: Molaridad.

nm: Unidad de medida, nanómetros.

mL: Unidad de medida, mililitros.

cm: Unidad de medida, centímetros.

°C: Unidad de medida, grados Celsius.

rpm: Unidad de medida, revoluciones por minuto.

β: Simbología beta.

ABREVIATURAS

CTAB: Cetyl Trimethyl Amommonium Bromide (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio).

SDS: Sodium Dodecilsulfate (Dodecilsufanato de Sodio).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción de la Cadena Polimerasa).

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

NaCl: Cloruro de Sodio.

TRIS: Tris(hidroximetil) aminometano.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

PVP: Polivinilpirrolidona.

MAATE: Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica.

T1: Protocolo de extracción CTAB.

T2: Protocolo de extracción por NaCl.

T3: Protocolo de extracción enzimático.

RESUMEN

Con la llegada de las técnicas moleculares surge una evolución trascendental en el estudio de las especies, convirtiéndose en herramientas esenciales para efectuar diversas aplicaciones, la base para la aplicación de estas técnicas inicia con la obtención del ADN; este material genético debe ser de buena calidad para que no interfiera durante el proceso. Extraer el ADN del filo Rhodophyta es todo un reto, debido a que presentan una pared celular muy rígida, compuesta por polifenoles y polisacáridos, que interfieren en la liberación de los ácidos nucleicos; implementar un protocolo específico que nos permita lidiar con los compuestos y garantice una buena calidad, es indispensable. El presente estudio se llevó a cabo en la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), donde, se analizó productos de ADN de dos géneros de macroalga Rhodophyta, mediante la aplicación de tres protocolos de extracción, determinando el de mejor calidad a través de espectrofotometría y electroforesis. Las muestras de Rhodophytas fueron identificadas como macroalgas del género *Corallina* y *Acanthophora*, el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tres protocolos empleados, en ambos géneros de macroalgas, demostrando que el protocolo CTAB otorga mejor calidad; la mediana de concentración y pureza A260/A280 en el género *Acanthophora* fue (38.4 ng/ μ L y 1.97) y género *Corallina* (49 ng/ μ L y 1.93). Del mismo modo se evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los métodos de preservación utilizados, siendo las algas secas con silica gel, las que mostraron mejores resultados. Finalmente, la integridad del ADN mediante electroforesis visualizada en un gel de agarosa al 1% mostró “integridad alta” en el género *Corallina* seca, mientras que en el género *Acanthophora* solo se logró visualizar bandas de ADN en el protocolo CTAB y método enzimático, acompañado de ligeros *smear*.

Palabras claves: Extracción de ADN, Protocolos, Rhodophytas, *Acanthophora*, *Corallina*.

ABSTRACT

With the advent of molecular techniques, a transcendental evolution in the study of species arises, becoming essential tools for various applications, the basis for the application of these techniques begins with obtaining DNA; this genetic material must be of good quality so that it does not interfere during the process. Extracting DNA from the phylum Rhodophyta is a challenge, because they have a very rigid cell wall, composed of polyphenols and polysaccharides, which interfere with the release of nucleic acids; implementing a specific protocol that allows us to deal with the compounds and guarantees good quality is indispensable. The present study was carried out at the Santa Elena Peninsula State University (UPSE), where DNA products from two genera of Rhodophyta macroalgae were analyzed by applying three extraction protocols, determining the best quality through spectrophotometry and electrophoresis. The Rhodophyta samples were identified as macroalgae of the genus *Corallina* and *Acanthophora*, the statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$) between the three protocols used, in both genera of macroalgae, demonstrating that the CTAB protocol gives better quality; the median concentration and purity A260/A280 in the genus *Acanthophora* was (38.4 ng/ μ L and 1.97) and genus *Corallina* (49 ng/ μ L and 1.93). Likewise, significant differences ($p < 0.05$) were evidenced between the preservation methods used, being the dry algae with silica gel, which showed better results. Finally, DNA integrity by electrophoresis visualized in a 1% agarose gel showed “High integrity” in the dried *Corallina* genus, while in the *Acanthophora* genus only DNA bands were visualized in the CTAB protocol and enzymatic method, accompanied by light *smear*.

Key words: DNA extraction, Protocols, Rhodophyta, *Acanthophora*, *Corallina*.

1. INTRODUCCIÓN

Con la llegada de las técnicas moleculares como la Reacción en la Cadena Polimerasa (PCR), Microrrays de ADN, Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), entre otros, surge una evolución trascendental en el estudio de las especies, convirtiéndose en herramientas esenciales para efectuar diversas aplicaciones en distintos campos (Kim et al., 2021); la base para la aplicación de estas técnicas moleculares inicia con la obtención del genoma, este material genético debe ser de buena calidad para que no interfiera en el procedimiento.

Actualmente existen diversos protocolos, unos más complejos que otros, esto va a depender del organismo al que se quiera extraer el ADN, para el caso de las algas Rhodophytas, se menciona que extraer el ADN de este filo, ha sido todo un reto (Fort, Guiry & Sulpice, 2018), y es por eso que los investigadores utilizan buffers de extracción con cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), buffers de dodecilsulfato sódico (SDS), cloruro de litio (LiCl), otros a base de enzimas como proteinasa K, ribonucleasas y celulasas, como los que se han descrito en estudios de (Hong et al., 1995) (Wilson et al., 2016), estos métodos garantizan una alta calidad de ADN de alto peso molecular (Kumari, 2013), óptimos para posteriores procedimientos de análisis molecular, sobre diversas especies taxonómica con estructuras filamentosas y calcáreas, muy comunes en este filo.

La razón por la que las Rhodophytas necesitan protocolos eficaces se debe a que presentan una pared celular muy rígida, haciendo que su ruptura sea complicada, obstaculizando la liberación de productos de interés; la pared celular de las algas rojas está compuesta generalmente por polifenoles y polisacáridos, que, si no se erradican al realizar el proceso de aislamiento genómico, puede inhibir las actividades enzimáticas (Sahu, Thangaraj & Kathiresan, 2012), influyendo en trabajos futuros como amplificación del ADN, clonación, digestión enzimática, entre otros (Maeda et al., 2012) (Wilson et al, 2016).

El conocimiento sobre la maquinaria molecular endógena de las Rhodophytas es limitado en comparación de las plantas superiores (García & Robaina, 2015) por lo que su estudio genético es sumamente importante para entender su estructura a nivel molecular, para llevar a cabo análisis exhaustivos como creación de códigos de barras de ADN, bibliotecas microsatelitales y realización completa de la secuencia del genoma (Ramakrishnan, Anwar & Mohandass, 2017). Las algas Rhodophytas al igual de que los otros grupos de macroalgas son parte esencial del ecosistema; fuente económica en varios sectores, pues desde hace varios años han sido utilizadas en la industria cosmética, alimentaria y acuícola; además de tener aplicaciones relevantes en la medicina y biorremediación.

En el presente estudio se trabajó con dos géneros de macroalgas predominantes en distintas temporadas del sector Ballenita, provincia de Santa Elena en las que también se aplicó

diferentes tipos de preservación, esto nos ayudará a conocer si surgen diferencias del producto final cuando se realice la purificación de ADN; conocer esta información nos abre las puertas para avanzar con los estudios antes mencionados; permitiendo entender mejor la biodiversidad y relaciones ecológicas, ayudando en la conservación y manejo sostenible de estos recursos. El objetivo de esta investigación es analizar los productos de ADN resultante, mediante la aplicación de tres protocolos de extracción, determinando el de mejor de calidad para este tipo de filo Rhodophyta.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Extraer el ADN en macroalgas Rhodophytas ha resultado dificultoso a lo largo de los años, debido a que las algas poseen una pared celular rígida donde presentan polisacáridos como agar, celulosa, xilano y otros mucilagos, que inhibe la liberación primaria de biomoléculas de proteínas y ficoeritrinas, además de generar viscosidad y soluciones acuosas. Por otro lado, estos polisacáridos hacen que intervengan en la calidad al momento de la extracción de ADN, lo que plantea la pregunta central de esta investigación: ¿Cuál es un método óptimo para obtener una buena calidad de ADN en este tipo de organismos Rhodophytas?

En el mercado se encuentran presentes Kits comerciales de extracción de ADN vegetal, pero son costosos y muchas veces brindan baja concentración de ADN, debido a que utilizan columnas de sílice y al momento de eluir la muestra, la mayor concentración de ADN se suele quedar en estas columnas, mencionando también que estos kits comerciales solo son para un número limitado de muestras, lo cual no es favorable; es por eso que muchos investigadores se han visto en la necesidad de implementar y modificar métodos de extracción utilizando varios tipos de reactivos y equipos sofisticados, debido a esta variedad de protocolos se debe examinar los más notables para sugerir a la comunidad científica a la hora de trabajar con este tipo de filo, evitando los inconvenientes antes mencionados.

Por otro lado, el experimentar en muestras de distintos tipos de preservación es útil para determinar si estas técnicas interfieren en la calidad del ADN durante la extracción, optando por métodos de preservación más eficientes, estas técnicas generalmente se aplican cuando no se puede realizar el proceso de extracción de manera inmediata. En Ecuador mediante una revisión en los repositorios de las universidades, el estudio en macroalgas es escasa, las pocas investigaciones realizadas, se basan más, en el ámbito físico-químico y diversidad, pero en el área molecular no existe este tipo de investigación, manifestando poco entusiasmo sobre estos organismos, pudiendo explorar y sacarle el máximo provecho a estas especies marinas.

3. JUSTIFICACION

Actualmente existen diversos protocolos de extracción en especies vegetales que a través de los años se han modificado en base a las necesidades de otros investigadores, pero conocer un protocolo específico que nos ayude a lidiar con los compuestos polisacáridos presentes en la pared celular de las macroalgas Rhodophytas y garantice una buena pureza y concentración, es crucial al momento de realizar una extracción de ADN, para que no interfieran en estudios moleculares que se realizan posteriormente, todo esto con equipos que estén presentes en un laboratorio molecular básico y que cualquier área con interés en el estudio de las macroalgas pueda ejecutarlo.

Esta información es una base para llevar a cabo diversas investigaciones en distintas áreas, por ejemplo, se podrían construir códigos de barras de ADN de macroalgas presentes en el país, que a su vez, se enriquecería o construiría las bibliotecas microsatelitales de especies marinas; por otro lado, conociendo sus secuenciaciones completas, hace factibles los mejoramientos genéticos para adaptar macroalgas de interés comercial a sistemas de producción, también comprender como han venido evolucionando y adaptándose a los diferentes cambios ambientales, además de conocer la diversidad de especies existentes para el mismo género.

Existen diferentes métodos de preservación de muestras para realizar estudios moleculares, implementar estos métodos de preservación en muestras de macroalgas

es muy indispensable, por una parte, porque están estrechamente relacionadas a los factores ambientales, es decir, son susceptibles a los diferentes cambios que pueden ocurrir en su medio y por esta razón estar ausentes, también, el que la especie de interés este presente, dependerá de la etapa de desarrollo en la que se encuentre. Por este motivo es ideal su preservación y conocer si interfieren en la calidad como producto final haciendo que el investigador elija un método óptimo, frente a investigaciones realizadas.

A pesar de la deficiencia de información en Ecuador sobre este tipo de estudio, en otros países ya se han realizado investigaciones que pueden servir como base para seguir explorando y actualizando los protocolos en este tipo de organismos, así mismo, alentar a otros investigadores sobre el estudio molecular en estas especies marinas con alto potencial biotecnológico.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar productos de ADN de dos géneros de macroalga Rhodophyta, mediante la aplicación de tres protocolos de extracción, determinando el de mejor de calidad.

5. OBJETIVO ESPECIFICO

1. Identificar el género de las macroalgas Rhodophytas, por medio de taxonomía clásica.
2. Evaluar los 3 protocolos de extracción, utilizando muestras secas y congeladas de dos géneros de Rhodophyta.
3. Determinar el método óptimo de extracción y preservación, en ambos géneros, mediante espectrofotometría y electroforesis.

6. HIPOTESIS

H1: Existe efecto o diferencia significativa de calidad, entre los protocolos de extracción de ADN en ambos géneros de macroalgas Rhodophyta.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos cumplen funciones esenciales en las células, son moléculas que contienen la información de expresión genómica necesaria para el desarrollo y funcionamiento de los organismos, estos son, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

El ADN está compuesto por dos cadenas complementarias enrolladas entre sí, denominado doble hélice, cada cadena se compone de un grupo fosfato, desoxirribosa y base nitrogenada, dando origen a los nucleótidos: adenina, guanina, citocina y timina, (MedlinePlus, 2021) estos nucleótidos, se emparejan entre sí para formar los denominados, pares de bases, en la que se une, una adenina con una timina y una guanina con una citocina. Esta unión química se forma por enlaces de hidrógenos, donde, el orden secuencial de estas bases a lo largo de toda la estructura codifica las instrucciones necesarias para la producción de moléculas de ARN (NIH, 2024); otra característica importante del ADN es que puede duplicarse por sí misma.

La estructura del ARN es distinta del ADN, puesto que cuenta con una sola cadena, formada por grupos fosfatos, una azúcar ribosa, y el nucleótido timina es reemplazado por un uracilo; existen distintos tipos de ARN: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt) (NIH, 2024). Finalmente,

el ARN conduce a la formación de las proteínas esenciales para el desarrollo de los procesos biológicos.

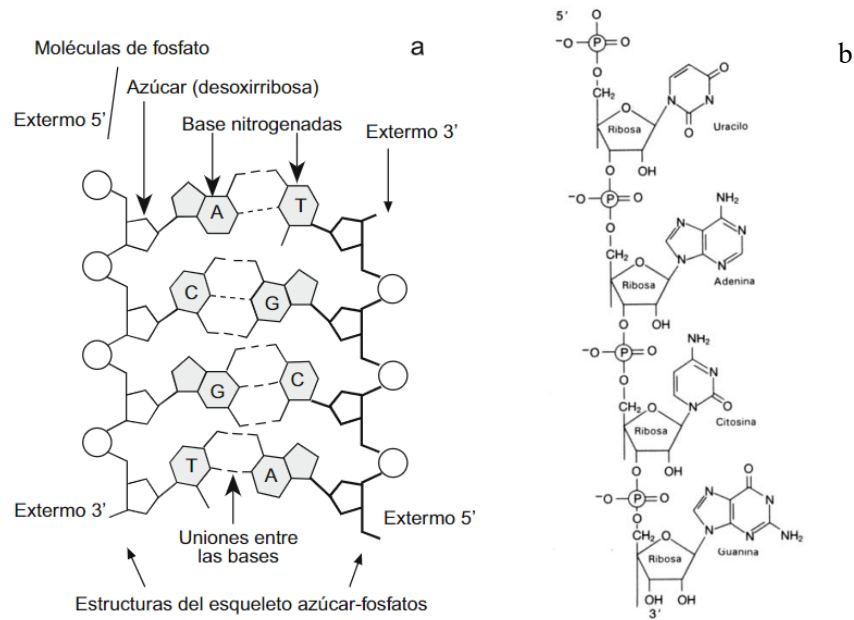


Figura 1: a) Estructura molecular de ADN (Martínez-Frías, 2010). **b)** Estructura molecular de ARN (Burriel, 2023).

7.2. Importancia del ADN en estudios moleculares

La biología molecular se ha convertido en un pilar fundamental que impulsa los avances en la ciencia moderna, facilitando que las investigaciones se desarrollen de manera acelerada, específica y óptima (Cervantes, 2003). Todo inicia con la obtención del ADN, cuando se trata de análisis genéticos, conforme a lo que requiera el investigador, puede emplear varias técnicas de manipulación para su análisis, como las secuenciaciones de genes; reacción de la cadena polimerasa (PCR), porisequenciación; Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), entre otros. (Angarita, Torres & Diaz, 2017).

Estas técnicas se han aplicado en varios campos de investigación, ayudando a comprender y diagnosticar enfermedades, así como también, contribuyendo en diferentes soluciones y mejoramiento. En la medicina estas técnicas ayudan a secuenciar largas y cortas cadenas con el fin de detectar, por ejemplo, mutaciones en el ADN; identificar restos biológicos, que comúnmente se realiza en el campo de las ciencias forenses; realizar pruebas de paternidad; así como el mejoramiento o prevención de enfermedades hereditarias. (Angarita, Torres & Diaz, 2017).

En la acuicultura las técnicas moleculares se han aplicado en la búsqueda de nuevas especies, óptimas para el consumo humano, así como conocer cuál es su relación filogenética con otras especies; también, se han realizado estudios para su

mejoramiento genético, como los que ya se han llevado a cabo en peces, camarones y moluscos, además del descubrimiento de enfermedades y como tratarlas en estas especies. (Flores, 2017).

De la misma manera el estudio molecular en las plantas ha llevado al mejoramiento genético de cultivos con importancia alimenticia, teniendo la capacidad de resistir a plagas, enfermedades y sequias, contribuyendo con la industria alimentaria (Beas, Ortuño & Armendáriz, 2009), así como también, se han desarrollado profilácticos a partir de los nutrientes que las plantas poseen.

Estas y un sin fin de aplicaciones más se pueden realizar a partir del estudio molecular del ADN para el beneficio del medio ambiente, salud y sociedad en general, si bien esta rama lleva pocos años estudiándose, abre múltiples posibilidades de innovación para las futuras generaciones.

7.3. Métodos de extracción de ADN

Como ya se ha mencionado antes la extracción de ADN es un proceso fundamental para el estudio molecular, por esa razón existen varios métodos de extracción que se adaptan a las diferentes características que poseen las muestras, existiendo protocolos sencillos y prácticos hasta protocolos más complejos con productos nocivos, para un aislamiento eficaz del ADN.

7.3.1. Método CTAB

En este método de extracción hace uso de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB), un detergente aniónico que permite la ruptura de la pared celular, y junto con agentes como EDTA y TRIS-HCL, forma complejos insolubles, posterior a ello, se separan los residuos orgánicos adicionando cloroformo, y precipita estas moléculas de ADN con etanol teniendo como resultado un ADN puro, facilitando sus posteriores aplicaciones, este método es muy utilizado en tejidos vegetales, sin embargo también se puede aplicar para otro tipo de muestras (FUJIFILM, 2014).

7.3.2. Método pK-SDS

Este método de extracción tiene como componentes principales el uso de sodium dodecyl sulfate (SDS) y proteinasa K (pK). La proteinasa K contribuye a la degradación de las proteínas presentes en la muestra, además de llevar a una estructura primaria los enlaces polipeptídicos que son fácilmente degradados, (Angulo et al., 2020) por otro lado inhibe la actividad enzimática de las DNAasa en conjunto con el detergente aniónico SDS; teniendo como resultado un ADN de alto peso molecular, (FUJIFILM, 2014) este es un método sencillo y muy utilizado en tejidos animal y vegetal.

7.3.3. Método Salting-out

Posterior a una lisis mecánica, este método emplea sales inorgánicas, que ha altas concentraciones, contribuye a que los compuestos orgánicos de la fase acuosa sean menos solubles, y en conjunto con otros reactivos químicos como Tris-HCl y proteinasa K, mantienen la inactivación de enzimas que puedan interferir en el ADN, haciendo que estos compuestos orgánicos precipiten y luego poder sepáralos por centrifugación; estas sales generalmente son el cloruro de sodio (NaCl) y perclorato de sodio (NaClO₄), la ventaja de este método es que no necesita de disolvente inorgánicos como cloroformo, alcohol isoamílico o fenol, pero en ocasiones, adicionalmente el pellet de ADN final debe ser purificado para ser utilizado en otras aplicaciones moleculares (FUJIFILM, 2014).

7.3.4. Método Fenol-Cloroformo

Una vez degradado el tejido de la muestra, la purificación de ADN con este método, se realiza con la adición de fenol y cloroformo, cuando estas son separadas por fuerzas centrifugas da lugar a 2 fases; la primera, la fase acuosa que se encuentra en la parte superior, aquí se encuentra los ácidos nucleicos; y la segunda, la fase orgánica, que se ubica en la parte inferior donde las proteínas están atrapadas en fenol y los lípidos en el cloroformo, luego de la obtención del ADN se precipita con etanol e isopropanol para eliminar restos de moléculas que no fueron eliminadas por completo. Este es un método utilizado en distintos tipos de muestra, brindando una pureza eficaz y capaz de amplificar fragmentos de interés (Orfao & Morent, 2011).

7.3.5. Kits Comerciales

Los kits de extracción comercial, generalmente vienen con buffers de lisis, lavado y unión específico, para el tipo de tejido a utilizar, así como los materiales desechables, esta consiste en colocar la muestra en una membrana de sílice, que se absorbe a una matriz selectiva de manera reversible, que se adhiere durante el proceso de eliminación de los compuestos orgánicos, y después, por medio de un buffer TE eluye el ADN de la matriz quedando un ADN puro; este es un método rápido de emplear, eficiente, pero alto en costo (Orfao & Morent, 2011).

7.3.6. Extracción mediante Cloruro de Cesio (CsCl)

El cloruro de cesio se incorpora en la purificación del ADN, una vez que se ha realizado el lisado con un buffer a partir de detergentes aniónicos como Tris-HCl, SDS y EDTA; incluyendo una ultracentrifugación y bromuro de etidio, este último ayuda la visualización de los ácidos nucleicos por medio de luz UV, por electroforesis, teniendo como resultado un ADN purificado (FUJIFILM, 2014). Sin embargo, a pesar de que se garantiza obtener un ADN de buena calidad, este método es alto en costo, lleva mayor tiempo de empleo y utiliza reactivos nocivos para la salud.

7.4. Etapas de extracción de ADN

Los procesos para llevar a cabo la extracción de ADN, consiste, en alcanzar la disgregación del tejido para liberar los ácidos nucleicos, los reactivos a emplear en este proceso dependerán del tipo de tejido que se esté utilizando, ya sea vegetal, animal, bacteriano o fúngico (Orfao & Morent, 2011), tanto en protocolos de kits comerciales como protocolos tradicionales se tienen que cumplir con las siguientes etapas:

7.4.1. Lisis celular

El objetivo de la lisis es disgregar el tejido celular compuesto por lípidos y proteínas, permitiendo la liberación del ácido nucleico de manera rápida, este proceso se puede realizar de tres maneras, por medio de un método físico, químico y enzimático.

La lisis por el método físico consiste en triturar o moler la muestra utilizando herramientas físicas que al contacto con la muestra logren esa ruptura, este método se realiza por medio de un mortero de cerámica, vidrio molido, perlas metálicas y también nitrógeno líquido, para posteriormente combinar con otros métodos de lisis. En cuanto a la lisis química se logra con el uso de productos químicos, como sales de guanidina, detergentes como SDS, entre otros; que van alterando las membranas celulares y desnaturalizando proteínas, cuando el tipo de muestra posee paredes celulares muy resistentes como, de hongos, plantas y bacterias, es cuando se emplean

métodos enzimáticos para facilitar el proceso, estas enzimas suelen ser proteinasa K, colagenasa, celulasa, ribonucleasas, liticasa, lipasa (Promega, 2024).

7.4.2. Aislamiento del ADN

Cuando se ha realizado esta ruptura de la célula y liberación de los ácidos nucleicos es importante separar el ADN de la materia orgánica, como proteínas, lípidos y sacáridos, esta separación se realiza comúnmente por centrifugación y filtración, incluyendo otros compuestos químicos como cloroformo, fenol y alcohol isoamílico, cada uno de estos métodos ayudan al aislamiento del ADN (Promega, 2024).

7.4.3. Precipitación

Una vez que se ha separado el ADN de los restos orgánicos es importante la precipitación, con el uso de etanol, isopropanol y altas concentraciones de sales como NaCl, este paso, es importante para eliminar restos de materia orgánica (Science Learning Hub-Pokapū Akoranga Pūtaiao, 2009). debido a que el ADN no es soluble a altas concentraciones de este alcohol y sales, se sigue manteniendo en el medio, sin alteraciones.

7.4.4. Lavado de ADN

El lavado del ADN se realiza comúnmente con alcohol al 70%, para eliminar restos de sales y otras proteínas presentes en las muestras, además de asociar los ácidos

nucleicos en la matriz, cuando se hace uso de estas, por lo general estas matrices se emplean en los kits comerciales (Promega, 2024).

7.4.5. Purificación

Para la obtención de un ADN puro libre de impurezas, en esta etapa algunas moléculas de ADN aún se encuentran adheridas a ciertas proteínas por lo que para liberarlas generalmente usan acetato de sodio o de amonio con un pH específico, para precipitarlas obteniendo una muestra totalmente pura, también se suele utilizar ribonucleasa A para eliminar el ARN presente en las muestras (SHI, 2009).

7.4.6. Resuspensión

Finalmente, cuando se obtiene el pellet de ADN, se diluye a una solución de baja fuerza iónica, estas pueden ser, buffer TE, compuesto por Tris-HCl de 10 mM y EDTA de 0,1mM con un pH de 8; otra opción es el agua destilada libre de ADNasa y ARNasa; una vez realizada esta dilución se realiza cuantificación y estimación de pureza para determinar la calidad y consecuentemente conservarla a una temperatura mínima de -20°C para poderle dar otros usos como PCR, secuenciación y otras técnicas moleculares.

8.5. Técnicas de cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN es una etapa importante en varias aplicaciones moleculares, nos indica la cantidad de ADN presente en una muestra. Actualmente existen varios métodos para conocer qué tan puras e íntegras están las muestras, a continuación, se mencionan de las más utilizadas en el área de la biología molecular.

7.5.1. Electroforesis

La electroforesis es una de las metodologías más utilizadas para interpretar la calidad de ADN obtenido; después de realizar la extracción, contribuye a aislar los fragmentos de ADN conforme a su tamaño, visualizarlo mediante una tinción y estimar la concentración e integridad del ADN, por otro lado, se puede extraer fragmentos de interés para seguir siendo utilizadas en diferentes aplicaciones moleculares (Cornejo, 2014).

Las electroforesis pueden llevarse a cabo en agarosa o poliacrilamida, ambos tienen su modo de empleo y propiedades específicas, por lo que su aplicación depende de los objetivos que quiera alcanzar del investigador, la elaboración del gel de poliacrilamida es más compleja, migran de manera vertical y tienen limitación al momento de la separación de los fragmentos, entre 5 a 600 pb, pero con una resolución muy alta; por el contrario, el gel de agarosa es más sencillo de preparar, separa y purifica los fragmentos de ADN desde 50 pb hasta 40 kb, dependiendo de la concentración de agarosa, pero tiene un poder de resolución menor (Cornejo, 2014).

La concentración del gel de agarosa forma una red fibrosa, empleada como filtro, es inversamente proporcional al tamaño del poro (Montalvo & Lugo, 2016), es decir mientras menos concentrado sea el gel de agarosa, más grande es el tamaño del poro, permitiendo el paso de moléculas de mayor tamaño.

Durante la preparación del gel, a este se le añade un colorante como bromuro de etidio o SYBER SAFE, ambos son comúnmente utilizados en electroforesis, esta sustancia tiene como función entrelazarse entre las bases nitrogenadas del ADN y es visible cuando se refracta con luz ultravioleta. Este gel se coloca en una cámara de electroforesis, sumergido en una solución de tampón con un pH en torno a 8, posteriormente las moléculas de ADN proceden a migrar del polo negativo al polo positivo, “La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular” (Padilla, 2014).

7.5.2. Espectrofotometría

La espectrofotometría ayuda en el análisis cuántico de las proteínas y ácidos nucleicos, estos absorben la luz UV a diferentes espectros de absorción, por las bases nitrogenadas, aromáticas y nucleotídicas que posee, en una molécula de ADN la absorbancia máxima es de 260 nm, brindando una estimación de su pureza y concentración (Villareal, Iglesias & Pérez, 2009), si la celda en la que se disuelve la muestra de ADN tiene una longitud de 1cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica, para el ADNdc la densidad óptica es igual a 50 µg/mL. La proporción de

absorbancia en 260 nm y 280 nm se utiliza para determinar la pureza de una muestra de ADN, mostrando un valor >1.8 valores por debajo de este umbral se considera presencia de proteínas; otra estimación de pureza de ácidos nucleicos es la relación 260/230, este rango de pureza es óptimo cuando esta entre 2.0-2.2, si los valores están por debajo, la contaminación de sebe a compuestos fenólicos, carbohidratos, entre otros (Cornejo, 2014).

7.5.3. Fluorometría

Como su nombre indica, en la fotometría se utiliza marcadores fluorescentes que se adhieren a ácidos nucleicos específicos, siendo visibles con un fluorómetro, esta técnica es más específica que la espectrofotometría por absorbancia, debido a que estos marcadores una vez enlazados con el ADN o ARN la luz se intensifica. El fluorómetro mide la luz, emitida perpendicularmente al haz de excitación (Villareal, Iglesias & Pérez, 2009), siendo más tolerantes a la contaminación presente en la muestra, hay que hacer énfasis en que esta técnica al igual que la espectrofotometría, no nos permite conocer que tan degradada esta una muestra, más solo la concentración y pureza que estas poseen.

Esta técnica funciona, cuando se excita la muestra por medio de la absorción de un fotón de luz, ya que las moléculas poseen niveles de energía. Estas moléculas colisionan entre si haciendo que pierdan energía vibracional inferior, al estado electrónico excitado, que poco a poco van descendiendo a los niveles de vibración del

estado electrónico basal; estas moléculas en su estado basal pueden estar en diversos niveles vibracionales por lo que estos fotones tienen distinta energía y frecuencia, Analizando estos niveles de frecuencia podemos determinar la estructura de los niveles de vibración de una muestra (Pérez, 2024).

7.5.4. PCR en tiempo real

Para comprobar la funcionalidad del ADN extraído también es posible empleando la técnica PCR, cuando una muestra tras haber sido analizada mediante electroforesis y no mostrar resultados óptimos dentro del criterio de validez establecido, no implica que no se puedan emplear para posteriores estudios, sin embargo, podría presentar resultados fuera de lo previsto. (banco ADN)

El método qPCR o reacción en la cadena polimerasa en tiempo real es un método se lleva a cabo con el uso de colorantes fluorescentes o sondas específicas que cuando se enlazan con el ADN emiten fluorescencia, una vez que se ha añadido la mezcla de qPCR, mediante el uso del termociclador mide la intensidad de luz emitida en cada ciclo, esta fluorescencia será proporcional a la cantidad de ADN amplificado (Barrera et al., 2016), la sensibilidad y especificidad que posee permite determinar de manera exacta la cantidad de ADN presente en las muestras, sin embargo es un método complejo largo y costoso. (Berthold, 2024).

7.6. Extracción de ADN en macroalgas

Como se conoce, las macroalgas Rhodophytas cumple un rol importante en el ecosistema, adicional a eso, en la actualidad las algas rojas también sustentan varias industrias farmacéuticas, alimenticias y cosméticas. El estudio por esta especie se basa principalmente en la genética, para descubrir los compuestos beneficiosos que posee, cuáles son sus procesos fisiológicos y metabólico, así como conocer la relación que tienen con otras especies, como han venido evolucionando y adaptándose a los cambios que se presentan en su hábitat (Khatri et al., 2023). Del mismo modo, al ser de importancia económica se requieren estudios sobre cultivos de algas, sin que afecten a las especies silvestres, manteniendo un equilibrio óptimo en el ecosistema.

En comparación con las microalgas, la disponibilidad de datos de secuencias de ADN en las macroalgas sigue siendo escasa, la secuenciación y el ensamblaje del genoma de las algas rojas son un desafío debido a su estructura genómica grande y compleja. A partir del progreso en la técnica de secuenciación de próxima generación (NGS) y su bajo costo, ha permitido realizar la comparativa genómica en este filo de macroalgas, proporcionando conocimientos importantes, tanto ecológicos, fisiológicos, de reproducción y evolutivos (Khatri et al., 2023).

Mayormente los estudios que se han realizado en las macroalgas Rhodophytas han sido del género *Porphyra*, *Gracilaria*, *Pyropia*, y en menor medida géneros como *Kappaphycus*, *Grateloupia*, *Laurencia*, *Asparagopsis*, *Bangia*, *Eucheuma* y

Plocamium (Khatri et al., 2023), debido a que son ricos en polisacáridos, aminoácidos, pigmentos y carotenoides; siendo aprovechados principalmente en países asiáticos.

Recientemente en ciertas regiones tropicales de América latina se ha incentivado el estudio en algas del género *Acanthophora*, ya que es muy abundante en las zonas intermareales, ciertamente, la especie *Acanthophora spicifera* es considerada como una especie invasora, (Ávila et al., 2012) por lo que el estudio de este género contribuiría a sacar ventaja de aquello aprovechando las propiedades que posee y desarrollar una bioeconomía azul (Guillen et al., 2022). Por otra parte, algas Rhodophytas de estructuras calcáreas de la familia Coralinaceae contribuyen ecológicamente con los ecosistemas arrecifales, ya que permanecen comúnmente en estos ambientes, aportan con carbonato de calcio manteniendo saludables estos ecosistemas. (Cornwall et al., 2023).

Como ya se ha mencionado antes, las algas rojas poseen una pared celular dura con alta cantidad de compuesto orgánicos, lo cual la liberación del ADN para estudios moleculares es dificultosa, existiendo así, los diversos protocolos para solucionar este inconveniente.

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1. Obtención de la muestra

Las muestras fueron extraídas de la zona intermareal rocosa de Ballenita, provincia de Santa Elena, misma que contó con el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), código: MAATE-DNB-CM-2018-0099 perteneciente al Proyecto INCYT-PNF-2017M3112. Las muestras fueron colectadas en tres estaciones de manera aleatoria dentro de un área de 170 m², posteriormente se colocaron en frascos plásticos de 150 mL con agua de mar (Florez-Leiva et al, 2010), para ser trasladadas al Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Figura 2: Puntos de recolección de muestras. **E1):** Estación 1; **E2):** Estación 2; **E3):** Estación 3. (Google Earth)

Tabla 1: Coordenadas de las respectivas estaciones dentro del área de estudio.

Estaciones	Coordenadas
Estación 1	2°12'21.3"S 80°52'54.1"W
Estación 2	2°12'20.9"S 80°52'55.8"W
Estación 3	2°12'21.2"S 80°52'57.7"W

8.2. Procesamiento de muestras

Una vez en el laboratorio las muestras se lavaron con agua salada y agua destilada, seguidamente se retiraron los epifitos adheridos con ayuda de pinzas de disección, las cuales se esterilizaron con alcohol y un mechero, posterior a eso, fueron colocadas sobre papel toalla, para absorber el exceso de agua y finalmente se separaron las muestras para su identificación taxonómica convencional y preservación para la respectiva extracción de ADN (Florez-Leiva et al., 2010).

8.2.1 Identificación taxonómica convencional

Se realizó identificación del *Género* de forma convencional, observando a nivel macro y microscópico características morfológicas como el talo, fronda, color, forma, textura, etc. Conociendo la variedad de algas Rhodophytas existentes, fue imprescindible asistir a base de datos como *AlgaeBase*, *INaturalist*, así mismo, trabajos de investigación sobre macroalgas reportadas en Ecuador, entre ellos los

estudios de (Cárdenas et al., 2020) (Batten, 2023) (Pozo, 2014) y (Cuvi & Cornejo, 2020), para la respectiva identificación de las algas.

8.2.2. Preservación de muestra

Para la preservación de las muestras se realizaron dos métodos diferentes, con el propósito de analizar si interfieren en la calidad del producto de ADN final, el primer método se realizó para obtener muestras secas, tal proceso consistía en situar las algas de las diferentes estaciones en sobres de papel filtro y colocadas dentro de un frasco cubiertas totalmente en gel de sílice (Florez et al., 2010); el segundo método fue mediante congelación, las algas se situaron en bolsas herméticas pequeñas y almacenadas a -20°C (Jung, 2021).

8.3 Extracción de ADN

Al iniciar la extracción la cantidad de muestra depositada en los tubos Eppendorf de 1.5 mL para todos los protocolos fue de 10 mg y rotuladas mediante códigos para su fácil identificación, el diseño de códigos se empleó de la siguiente manera (**E1 AS2 S**), donde: (E1) indica la estación y numero de las misma, (A) genero del alga (literal **C** para *Corallina* y literal **A** para *Acanthophora*), (S1) sitio dentro de la estación y (S) el método de preservación utilizado (**S** para muestra seca y **F** para muestras congeladas).

Se realizaron tres réplicas por cada protocolo (Figura 3). Los protocolos se llevaron a cabo mediante la preparación de buffers, el primer protocolo de extracción se dio por el método universal en el que se utiliza cloruro de sodio (NaCl), este es un protocolo planteado por (Aljanabi & Martínez, 1997) y modificado por (Escalante, 2019) y (Rodríguez, 2017). El segundo protocolo que se utilizó fue por el método de enzimático de (Wattier, Prodöhl & Maggs, 2000), un protocolo modificado de (Dellaporta, Wood & Hicks, 1983) donde utiliza enzimas como proteinasa K y ribonucleasa A, Finalmente, el tercer protocolo se llevó a cabo a través del método CTAB estandarizado por (Soltis Lab, 2002) y planteado por (Doyle & Doyle, 1987) y (Cullings 1992), en el que utilizan compuestos vigorosos como Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB), β -mercaptoetanol, polivinilpirrolidona (PVP) y Cloroformo.



Figura 3: Diseño de distribución de muestras con cada género de Rhodophyta y método de preservación, por cada protocolo de extracción. (Imagen creada en BioRender)

8.3.1 Protocolo 1: Método universal NaCl

Una vez colocadas las muestras en los respectivos tubos Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 600 μ L de buffer de extracción que contenía (Tris-HCl 0.05M y EDTA 0.1M); 70 μ L de SDS al 10% y 20 μ L de proteinasa K (Thermo Scientific™) en una concentración de 20 mg/mL, las muestras se maceraron con ayuda de un pistilo de polipropileno para la ruptura celular, seguidamente, se incubaron a 55°C por 1 hora. Transcurrido el tiempo, se incorporó 200 μ L de cloruro sódico (NaCl 5M), llevando a la microcentrífuga (Labnet) durante 5 minutos a 10000 rpm, luego se transfirieron 800 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, y se agregó 800 μ L de

etanol frío al 100% dejando en reposo toda la noche a -20°C; al día siguiente, se purificó el ADN añadiendo acetato de sodio (3M, pH 5,2) en una proporción de 1:10, se homogenizaron las muestras y se colocó etanol frío al 100% en una relación 1:1; dejando en reposo durante 30 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. El pellet de ADN fue lavado dos veces con 800 µL etanol frío al 70% centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos; finalmente las muestras se secaron a 37°C y se resuspendieron en 50 µL de agua destilada UltraPure™ (Invitrogen™) libre de ARNasas y ADNasas para almacenar a -20°C.

8.3.2 Protocolo 2: Método enzimático

En el segundo protocolo se requirió preparar un tampón de extracción que contenía 135.7 mL de (Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.05M, NaCl 0.5M), 13.3 mL de SDS 20% y 288 µL Proteínasa K (20mg/mL) (Thermo Scientific™), una vez preparado el tampón, se añadió 1.3 mL en cada uno de los tubos Eppendorf y se maceró con la ayuda de un pistilo de polipropileno, a continuación, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 30 minutos agitando frecuentemente, luego las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos y se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL; en seguida, se añadió 10 µL de Ribonucleasa A (Thermo Scientific™) a una concentración de 2 mg/mL, después se llevó a incubación a 37°C y -20°C durante 30 minutos respectivamente; transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos y se transfirieron 700 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf junto con 700 µL de isopropanol frío. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a -20°C, para luego centrifugar a

13000 rpm durante 30 minutos; el pellet de ADN fue lavado 3 veces con 1 mL de etanol frío al 70%, centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos en cada lavado. Finalmente se secaron a 37°C y el pellet de ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de agua destilada UltraPure™ (Invitrogen™) libre de ARNasas y ADNasas para almacenar a -20°C.

8.3.3 Protocolo 3: Método CTAB

El tercer protocolo mediante CTAB, se preparó 50 mL de buffer de extracción, se mezcló 5 mL de Tris-HCl 1M, 2 mL NaCl 5M, 14 mL EDTA 0.5M, 29 mL de agua destilada y 1 g de CTAB, una vez preparado el buffer se añadió 2 g de PVP y 250 µL de β-mercaptoetanol. En cada tubo Eppendorf con muestra, se colocó 500 µL de buffer y se maceró con la ayuda de un pistilo de polipropileno; luego se incubó por 1 hora a 55°C, seguidamente se incorporó 500 µL de cloroformo y alcohol isoamílico en una relación 24:1 y se llevó a la microcentrífuga (Labnet) durante 8 minutos, cabe mencionar que para este protocolo siempre se centrifugó a 15000 rpm; posteriormente se transfirieron 300 µL de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf añadiendo 24 µL acetato de amonio a 7.5M, 175 µL de isopropanol frío y se centrifugó durante 3 minutos; el pellet de ADN se lavó 2 veces con 700 µL de etanol al 70% y 95% centrifugando durante 1 minuto en cada lavado. Finalmente se secó a 37°C y resuspendió en 50 µL agua destilada UltraPure™ (Invitrogen™) libre de ARNasas y ADNasas para almacenar a -20°C.

8.4 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se llevó a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™), la calibración del equipo se efectuó con 2 μ L de agua destilada UltraPure™ (Invitrogen), mientras que la lectura de las muestras de ADN se realizó con un volumen de 5 μ L.

La absorbancia cuantificada por el espectrofotómetro nos brinda los datos necesarios para analizar la calidad del ADN extraído, la absorbancia en 260 nm, junto con el factor 50 establecido en el equipo, nos proporciona información sobre la concentración de ácidos nucleicos; otro parámetro de calidad que nos ayuda a percibir la espectrofotometría es la pureza del ADN, se considera un ADN “puro” cuando la relación de absorbancia en 260 nm y 280 nm se encuentran en un rango entre 1.8 a 2 (Thermo Scientific Inc, 2009), no obstante, también se considera “pureza aceptable” cuando este es ≥ 1.6 , si los valores de absorbancia se encuentran por debajo del rango establecido, se afirma que existe presencia de proteínas y otros compuestos fenólicos, por ende está contaminado. (Banco ADN, 2020) Finalmente, la relación de absorbancia en 260 nm y 230 nm es un parámetro secundario que indica concentración de contaminantes en la muestra, por lo que, para el análisis de calidad en la presente investigación solo se analizó la concentración y la relación de absorbancia 260/280.

Tabla 2: Criterios de validez para estimar la calidad de ADN, mediante espectrofotometría (Banco ADN, 2020).

Ratio	Intervalo	Criterios de validez
A260/A280	$\geq 1.8 - 2.1$	Pureza óptima
	$\geq 1.6 - 1.7$	Pureza aceptable
	< 1.6	ADN contaminado (presencia de proteínas y compuestos fenólicos)

8.5 Estimación de la integridad de ADN

La integridad del ADN se puede estimar mediante electroforesis, siguiendo la metodología planteada por (Kumari, 2013) con algunas modificaciones, se preparó un gel de agarosa al 1%, donde se pesó 1 gramo de agarosa y se mezcló en 100 mL de TAE 1X, de la solución madre TAE 10X UltraPure™ (Invitrogen™), seguidamente se añadió 3 μ L de tinte de ADN SYBR™ Safe (Invitrogen™), y se colocó en el molde para geles; una vez solidificado el gel, se ubicó en la cámara de electroforesis (Labnet Enduro™) que contenía tampón TAE 1X, por último, se cargó en cada pocillo una mezcla de 12 μ L de muestra de ADN con 3 μ L de tampón de carga de gel BlueJuice™ (10X) (Invitrogen™), y se migro a 60V por 45 minutos, 50 mA.

Una vez concluida la electroforesis se evaluó de manera estandarizada la integridad del ADN otorgando el criterio de validez dispuesto por el “Programa de control de calidad de ADN y ARN” (Banco ADN, 2020).

Tabla 3: Criterio de validez para estimar la integridad de ADN mediante electroforesis, de acuerdo con el Programa de Control de Calidad de Muestras de ADN y ARN (Banco de ADN, 2020).

Integridad de ADN	
Criterios de validez	Característica
Integridad alta	Banda definida sin <i>smear</i>
Integridad adecuada	Banda definida en la parte superior del gel y un ligero <i>smear</i> en la parte inferior
Parcialmente degradado	Presencia de <i>smear</i> en la parte superior y banda difusa en la parte inferior
Totalmente degradado	El <i>smear</i> se encuentra concentrado en la parte inferior del gel

8.6. ANALISIS ESTADISTICO


En el análisis estadístico de los resultados, se evaluaron las diferencias entre los tres protocolos de extracción para el género de Rhodophyta 1 y 2, para ello, se utilizó la prueba estadística de Kruskal Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) y cuando este fue significativo, se realizó la prueba Post Hoc de Dunn, para evaluar la comparación por pares de los protocolos correspondientes; también, para evaluar la diferencia de calidad entre las muestras secas y congeladas empleadas en las extracciones de ADN por cada protocolo, se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947). Los parámetros evaluados en todos los análisis fueron la pureza (relación A260/A280) y concentración del ADN; finalmente todos los análisis se consideraron significativos con “ $p < 0.05$ ” y se realizaron en el software R versión 4.2.1.


9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. Identificación taxonómica de las macroalgas en estudio

Las muestras de Rhodophytas analizadas en la presente investigación fueron extraídas de la zona intermareal rocosa de Ballenita, las características morfológicas revisada a nivel macroscópico y microscópico, nos condujo a identificarlas como macroalgas del género *Corallina* y *Acanthophora*, pertenecientes a la familia Corallinaceae y Rhodomelaceae respectivamente. Detalles sobre sus características se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Características de los géneros de Rhodophytas en estudio **a:** género *Corallina*; **b:** género *Acanthophora*

MACROALGAS	CARACTERÍSTICAS
<p>a</p>  <p style="text-align: center;">4 cm</p> <p>Reino: Plantae Phylum: Rhodophyta Clase: Florideophyceae Orden: Corallinales Familia: Corallinaceae Género: <i>Corallina</i> (Linnaeus, C., 1758)</p>	<p>Alga calcárea de coloración roja a verde, talo fuertemente adherido al sustrato por una porción basal, con ejes erectos geniculados e intergeniculados, ramificaciones pinnadas y aplanadas, tonalidad blanquecina en el ápice de las frondas, textura dura y escamosa (Solé & Pardo, 2010).</p>

<p>b</p>  <p>Reino: Plantae Phylum: Rhodophyta Clase: Florideophyceae Orden: Ceramiales Familia: Rhodomelaceae Género: <i>Acanthophora</i> (Lamouroux, 1813)</p>	<p>Alga de color amarillo parda, marrón verdoso en las frondas y marrón oscuro en el estipe, disco de adhesión con talo liso y cartilaginoso, rizoides ápteros, posee ramificación espiniforme, agrupadas de manera irregular radial (Titlyanov et al., 2017) (Guiry, 2022)</p>
--	---

9.2. Análisis de calidad del ADN entre protocolos

9.2.1. Genero *Corallina*, muestras congeladas

Las 82 muestras de ADN extraídas de la macroalga *Corallina* congelada, entre los tres protocolos ejecutados, no mostraron diferencia significativa en la concentración de ADN ($p = 0.29$), sin embargo, la mediana de valores de los tres protocolos indicaba que CTAB provee mayor concentración (Figura 4). Por el contrario, en la relación de absorbancia en 260/280, si mostro diferencia significativa ($p = 0.002$), destacando además que la mediana de valores, indica pureza óptima (≥ 1.8) para el protocolo CTAB y pureza aceptable (≥ 1.6) para los protocolos NaCl y método enzimático (Figura 5).

Las comparaciones múltiples por pares obtenidas entre protocolos (tabla 5), indica que pesar de la ausencia de diferencia de calidad en la concentración de ADN entre los tres protocolos, la diferencia prevalece en el coeficiente de pureza A260/A280, manifestando que CTAB hace mayor significancia frente a NaCl y al método enzimático, ($p = 0.003$ y $p = 0.01$ respectivamente), concluyendo que el protocolo óptimo aplicado para extraer ADN en *Corallina* congelada es por el método CTAB.

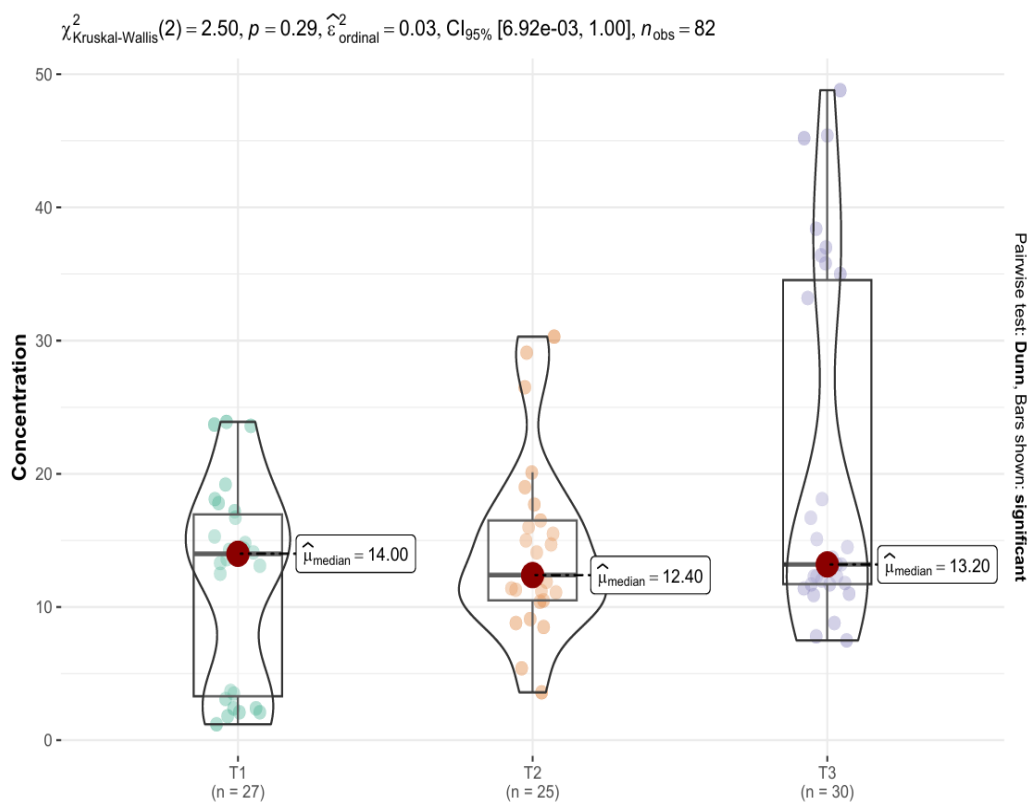


Figura 4: Concentración de ADN (ng/μL) de *Corallina* congelada por cada protocolo de extracción. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que el método CTAB (T1) posee mayor concentración que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

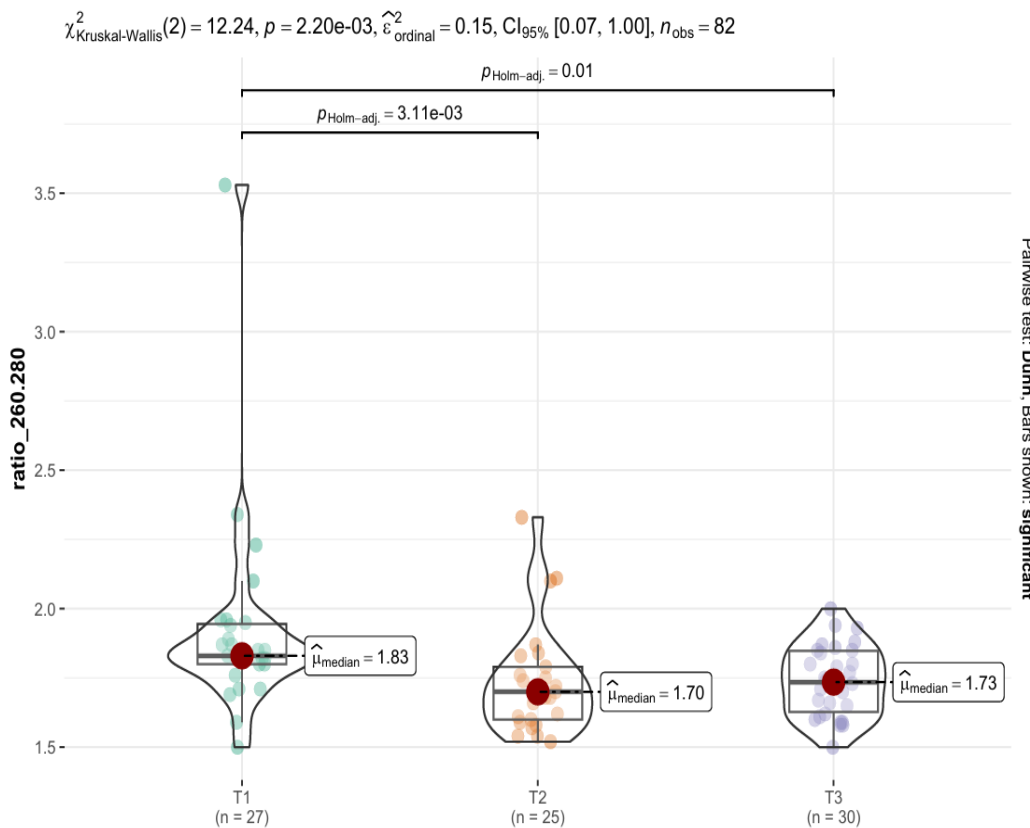


Figura 5: Pureza de ADN (A260/A280) de *Corallina* congelada por cada protocolo. Donde ($p_{\text{Holm-adj}}$) indica la diferencia significativa que existe mediante prueba de pares múltiple y la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que el método CTAB (T1) posee mayor pureza, que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

Tabla 5: Comparación de p values de los tres protocolos frente a *Corallina* congelada. Donde T1: método CTAB; T2: método NaCl; T3: método enzimático; “-”: no hay significancia

Protocolos de extracción	Concentración ng/ μL	Ratio A260/A280	Observación
T1 vs T2 vs T3	-	$p = 0.002$	Método óptimo T1
T1 vs T2	-	$p = 0.003$	
T1 vs T3	-	$p = 0.01$	
T2 vs T3	-	-	

9.2.2. Género *Corallina* muestras secas

Con 77 muestras totales analizadas entre los tres protocolos CTAB ($n=27$), NaCl ($n=23$) y método enzimático ($n=27$), el análisis de calidad respecto a la concentración de ADN, no mostro diferencia significativa ($p = 0.16$), las medianas de los protocolos exhibieron valores superiores a los 20 ng/ μ L (Figura 6). Contrariamente en el análisis de pureza en la relación A260/A280 si mostró diferencia significativa ($p = 0.001$), la comparación múltiple por pares de Dunn indica que el método CTAB hace esta significancia frente NaCl y el método enzimático ($p = 0.0038$ y $p = 0.0037$, respectivamente) destacando, además, que las medianas obtenidas en esta relación para los tres protocolos se encuentran dentro del rango de pureza óptima (≥ 1.8) (Figura 7). Con los resultados obtenidos podemos afirmar que los tres protocolos ejecutados son óptimos para extraer ADN en el género *Corallina* seca, a pesar de ello el protocolo con el que se alcanza mayor concentración y pureza, es el protocolo CTAB (Tabla 6).

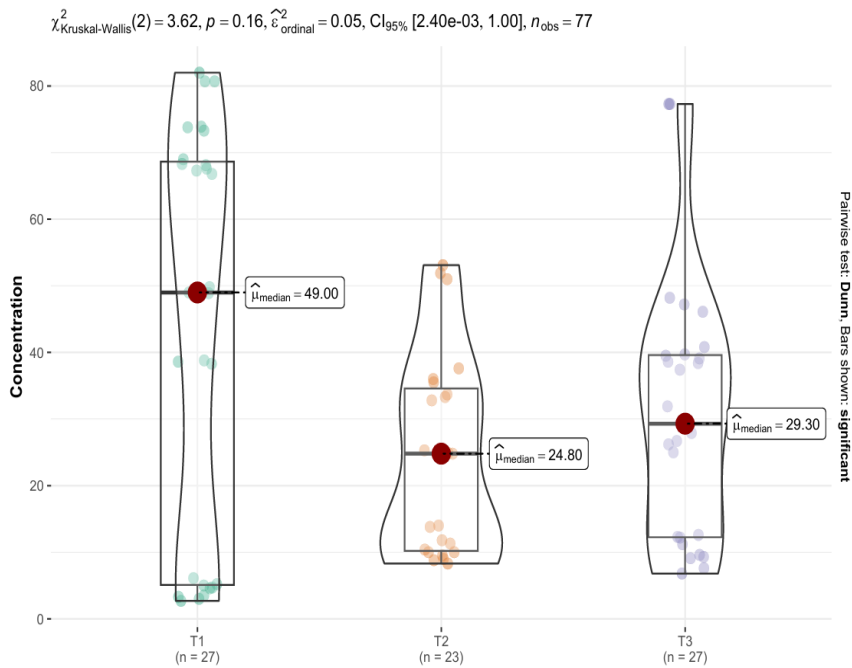


Figura 6: Concentración de ADN (ng/μL) de *Corallina* seca por cada protocolo de extracción. Donde la mediana de valores (μ_{median}) indica que el método CTAB (T1) posee mayor concentración que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

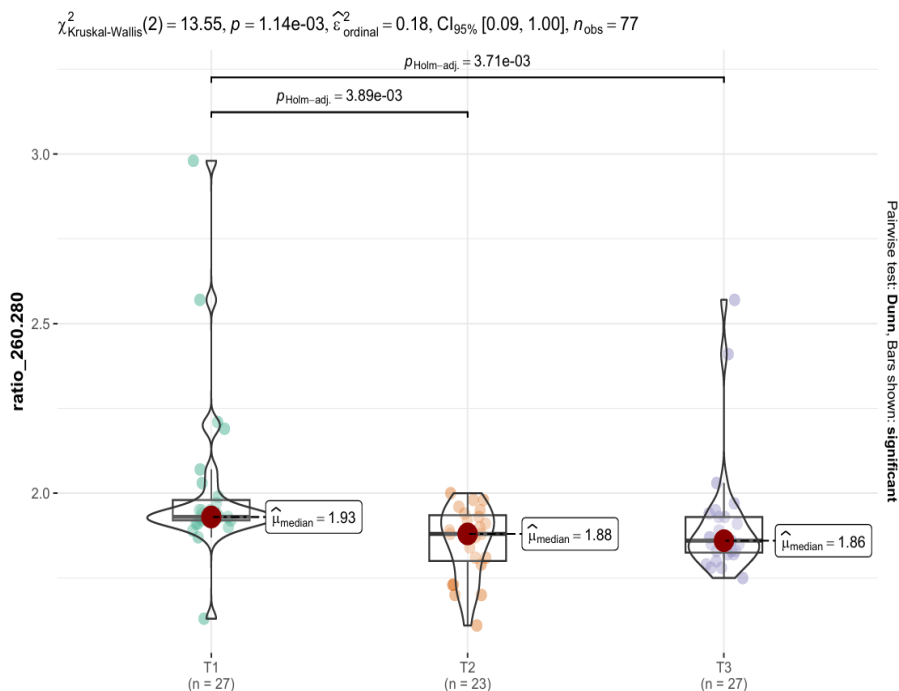


Figura 7: Pureza de ADN (A260/A280) de *Corallina* seca, por cada protocolo. Donde ($p_{\text{Holm-adj}}$) indica la diferencia significativa que existe mediante prueba de pares múltiple y la mediana de valores (μ_{median}) indica que el método CTAB (T1) posee mayor pureza, que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

Tabla 6: Comparación de *p values* de los tres protocolos frente a *Corallina* seca, donde: **T1:** método CTAB; **T2:** método NaCl; **T3:** método enzimático; “-”: no hay significancia

Protocolos de extracción	Concentración ng/μL	Ratio A260/A280	Observación
T1 vs T2 vs T3	-	$p = 0.001$	Método óptimo T1
T1 vs T2	-	$p = 0.0038$	
T1 vs T3	-	$p = 0.0037$	
T2 vs T3	-	-	

9.2.3. Genero *Acanthophora* muestras congeladas

En el género *Acanthophora* congelada, se realizó análisis de 73 muestras, NaCl ($n = 18$), CTAB ($n = 28$) y método enzimático ($n = 27$) demostrando que si existe diferencia significativa en la concentración de ADN ($p = 0.003$), el valor de la mediana de los protocolos, indica que posee mayor concentración el método por NaCl (Figura 8). La pureza del ADN calculada en la relación A260/A280, también manifiesta que existe diferencia significativa ($p < 0.001$), demostrando distintos criterios de validez en las medianas para los tres protocolos, en CTAB, el valor de la mediana se manifiesta como pureza óptima presentando una absorbancia ≥ 1.8 , seguidamente el protocolo por el método enzimático se determina como pureza aceptable ≥ 1.6 y en último lugar el protocolo por NaCl con valor < 1.6 (Figura 9). Con estas diferencias podemos definir que el protocolo NaCl ofrece alta concentración de ADN, pero se ve influenciada la pureza, incumpliendo los criterios de validez establecidos, por lo que afectaría en análisis posteriores, contrariamente el método CTAB provee buena pureza en sus muestras, pero la concentración es deficiente, situándose en un punto medio el protocolo por el método enzimático con una pureza aceptable y una mediana de concentración de 9 ng/μL.

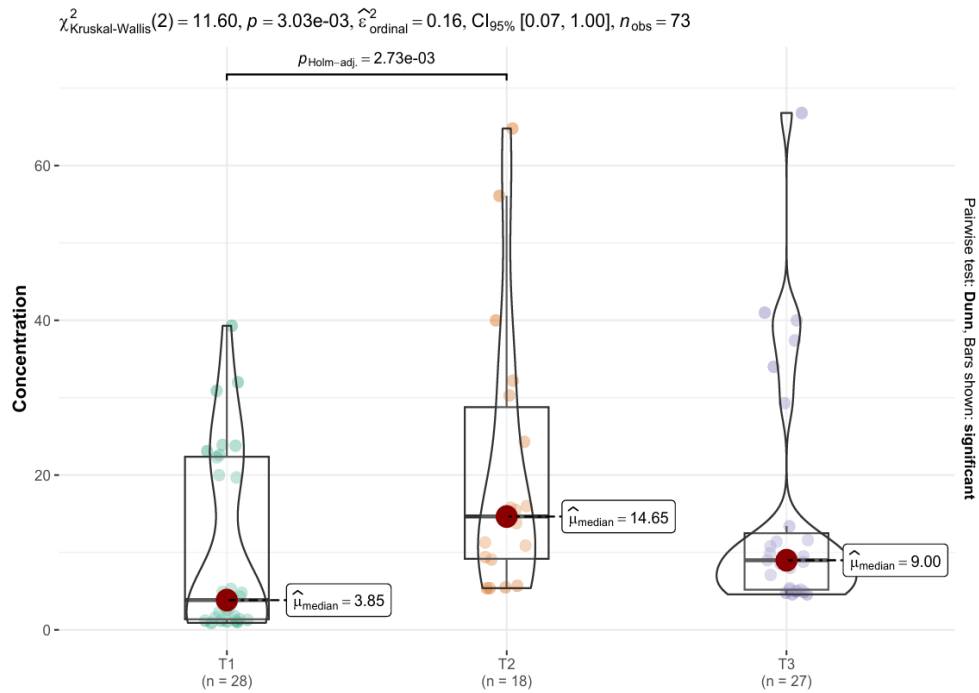


Figura 8: Concentración de ADN (ng/ μ L) de *Acanthophora* congelada, por cada protocolo de extracción. Donde ($p_{\text{Holm-adj}}$) indica la diferencia significativa que existe entre método CTAB (T1) y método NaCl (T2), así mismo, la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que el método NaCl (T2) posee mayor concentración de ADN que el método CTAB (T1) y método enzimático (T3).

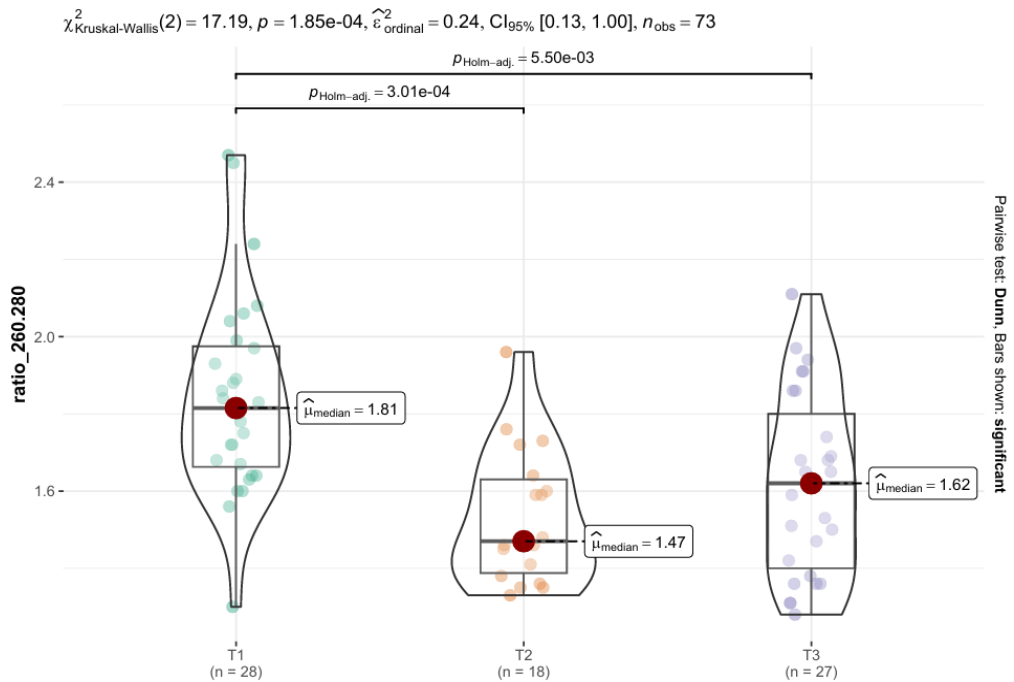


Figura 9: Pureza de ADN (A260/A280) de *Acanthophora* congelada, por cada protocolo. Donde ($p_{\text{Holm-adj}}$) indica la diferencia significativa que existe, mediante prueba de pares múltiple y la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que el método CTAB (T1) posee mayor pureza, que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

Tabla 7: Comparación de *p values* de los tres protocolos frente a *Acanthophora* congelada donde **T1:** método CTAB; **T2:** método NaCl; **T3:** método enzimático; “-”: no hay significancia

Protocolos de extracción	Concentración ng/μL	Ratio A260/A280	Observación
T1 vs T2 vs T3	$p = 0.0030$	$p < 0.001$	Método óptimo T3
T1 vs T2	$p = 0.0027$	$p = 0.003$	
T1 vs T3	-	$p = 0.005$	
T2 vs T3	-	-	

9.2.4. Genero *Acanthophora* muestras secas

El número total de muestras analizadas en el género *Acanthophora* seca fueron 74, CTAB ($n = 28$), NaCl ($n = 18$) y método enzimático ($n = 28$). El análisis de calidad en la concentración de ADN mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis no se observaron diferencias significativas entre protocolos ($p = 0.05$), no obstante, los valores de las medianas nos indican que donde se evidencia mayor concentración es el protocolo NaCl, seguido del método enzimático y posteriormente CTAB (Figura 10). En cuanto al parámetro de pureza A260/A280, si se mostró diferencias significativas en los tres protocolos de extracción ($p < 0.001$) la prueba múltiple de pares, indican que el método CTAB hace mayor significancia frente al método NaCl y método enzimático mientras que entre el método enzimático y el método por NaCl la significancia es menor (tabla 53), asimismo el valor de la mediana, evidencia que el criterio de pureza para CTAB se encuentra dentro del rango óptimo calificándola como pureza optima (≥ 1.8), seguido el método NaCl como pureza aceptable (≥ 1.6) y finalmente el método enzimático con valor menor a < 1.6 mostrando presencia de contaminación y por ende calidad eficiente de ADN (Figura 11). Con los valores

obtenidos y comparados estadísticamente (Tabla 8), se indica que el método de extracción óptimo para extraer ADN en *Acanthophora* seca es por el método CTAB brindando una pureza óptima y una concentración considerable.

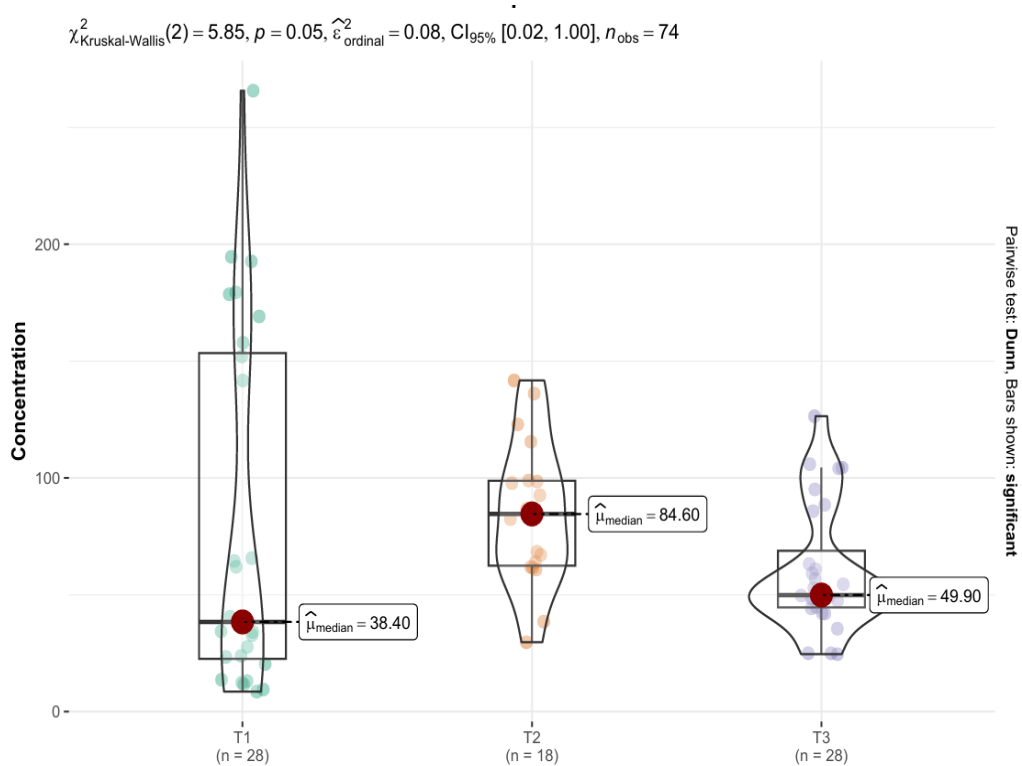


Figura 10: Concentración de ADN (ng/μL) de *Acanthophora* seca por cada protocolo de extracción. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que el método NaCl (T2) posee mayor concentración que el método CTAB (T1) y método enzimático (T3).

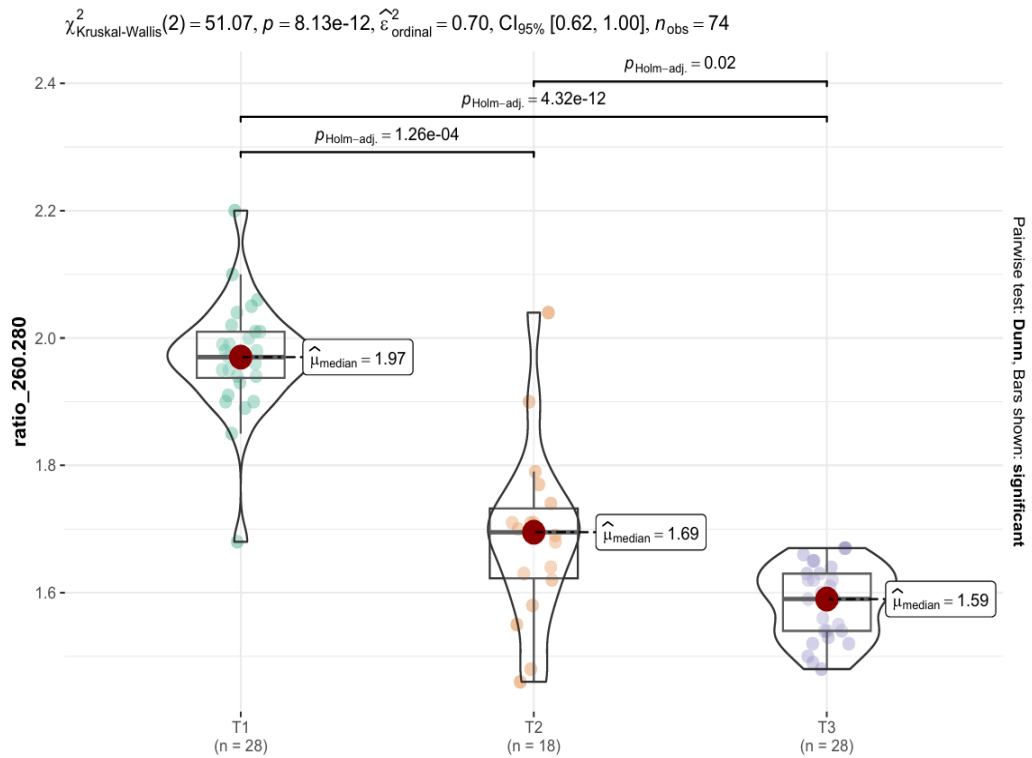


Figura 11: Pureza de ADN (A260/A280) de *Acanthophora* seca, por cada protocolo. Donde ($p_{\text{Holm-adj}}$) indica la diferencia significativa que existe en los tres métodos mediante prueba de pares múltiple y la mediana de valores (μ_{median}) indica que el método CTAB (T1) posee mayor pureza, que el método NaCl (T2) y método enzimático (T3).

Tabla 8: Comparación de p values de los tres protocolos frente a *Acanthophora* seca donde T1: método CTAB; T2: método NaCl; T3: método enzimático; “-”: no hay significancia

Protocolos de extracción	Concentración ng/ μ L	Ratio A260/A280	Observación
T1 vs T2 vs T3	-	$p < 0.001$	Método óptimo T1
T1 vs T2	-	$p < 0.001$	
T1 vs T3	-	$p < 0.001$	
T2 vs T3	-	$p = 0.02$	

9.3. Calidad de ADN por método de preservación

Tras haber interpretado las diferencias de calidad entre protocolos, se procedió a analizar la diferencia de calidad de los métodos de preservación empleados por cada protocolo de manera independiente, este análisis llevado a cabo con la prueba no paramétrica de Mann Whitney determinaba la preservación más factible de utilizar al momento de realizar la extracción.

9.3.1. Protocolo CTAB frente al género *Corallina*

El análisis de calidad de ADN empleando el protocolo CTAB fueron un total de 54 muestras, manifestando diferencia significativa en la concentración ($p > 0.001$), en la figura 12, se muestran las medianas de ambas preservaciones, siendo evidente que la técnica mediante secado por silica gel, brinda mayor concentración de ADN que las muestras congeladas a la hora de trabajar con este protocolo, por otro lado el coeficiente de pureza, determinada en la absorbancia 260/280 también mostro diferencias significativas ($p=2.59e-03$) (Figura 13), la mediana de ambas preservaciones mostraban valores dentro de los rangos óptimos de pureza (≥ 1.8), por lo tanto se puede afirmar que, al realizar extracción de ADN en género *Corallina* mediante protocolo CTAB, es recomendable trabajar con muestras secas, brindando alta concentración y pureza del ADN.

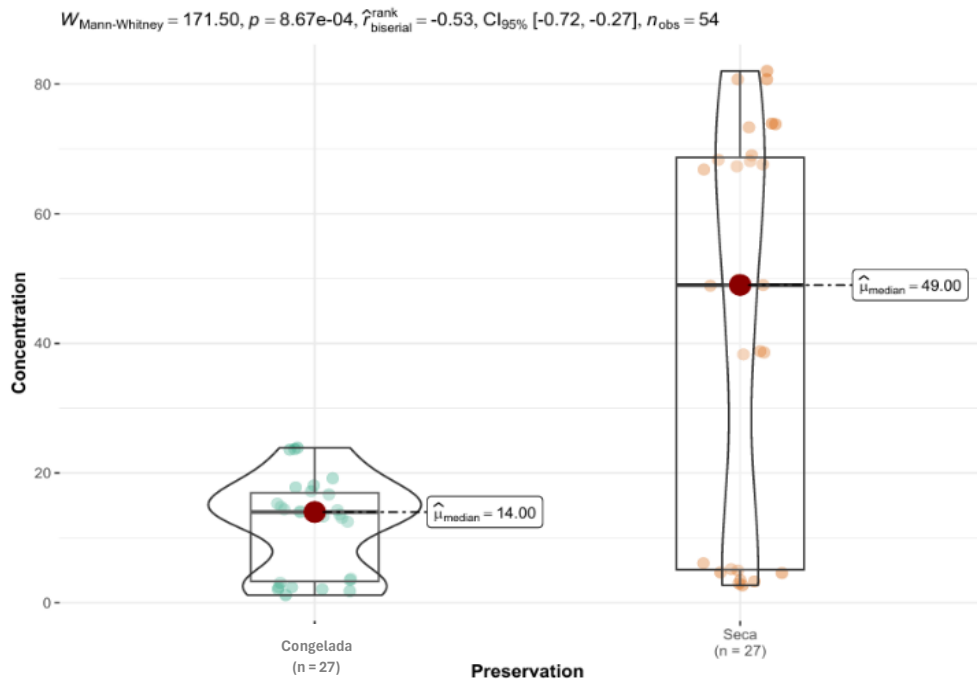


Figura 12: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo CTAB. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

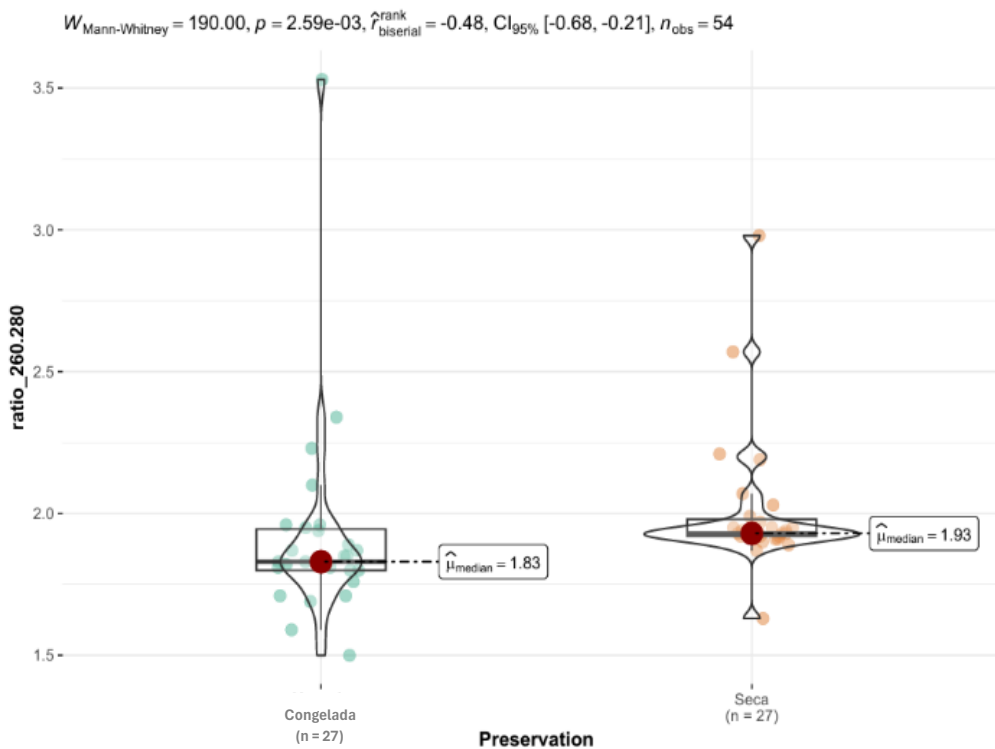


Figura 13: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo CTAB. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor pureza.

9.3.2. Protocolo universal (NaCl) frente al género *Corallina*

Con 48 muestras analizadas en el protocolo NaCl, 25 congeladas y 23 secas, la prueba de Mann Whitney no mostró diferencia significativa en el parámetro de concentración ($p=0.10$) sin embargo, la distribución no normal de los datos, mostraba una mediana de valores mayor en las muestras secas con silica gel (Figura 13), en la relación de absorbancia 260/280 si se evidenció diferencia significativa ($p=1.03e-03$), teniendo una pureza optima (≥ 1.8) con el método de preservación seco y una pureza aceptable (≥ 1.6) en las muestras por congelamiento (Figura 14). Concluyendo que al extraer ADN en el género *Corallina*, lo ideal es utilizar muestras secas, por la diferencia significativa en el parámetro A260/A280 y proveer mayor concentración.

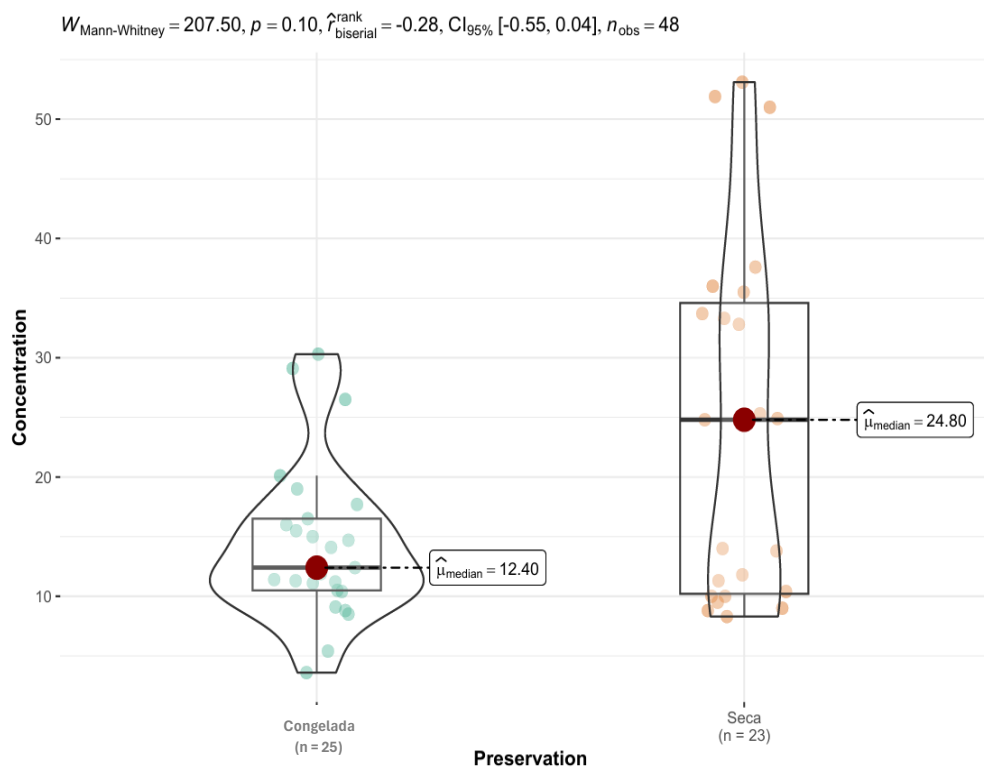


Figura 14: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo NaCl. Donde la mediana de valores (μ_{median}) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

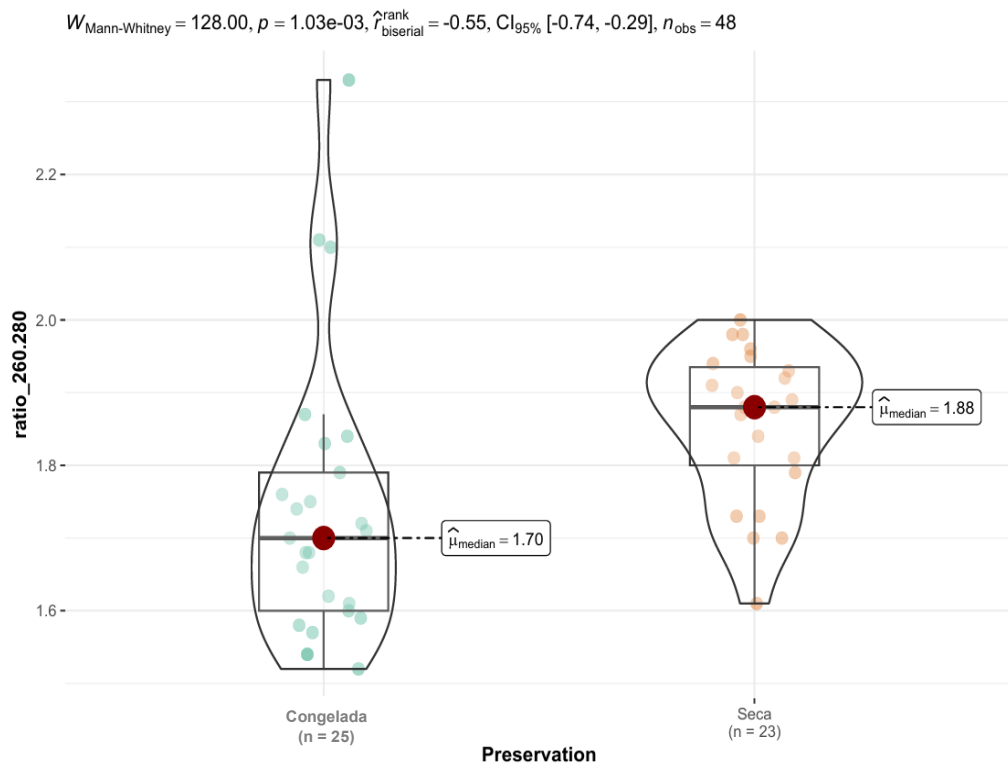


Figura 15: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo NaCl. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor pureza.

9.3.3. Protocolo enzimático frente al Género *Corallina*

En el protocolo por método enzimático, se analizaron 57 muestras totales, 30 por congelamiento y 27 secadas con gel de sílice; al analizar la concentración de ADN con la prueba estadística de Mann Whitney, no se mostró diferencia significativa ($p=0.09$), no obstante, considerando el valor de la mediana las muestras secas presentan mayor concentración (Figura 16). El análisis en la pureza, determinada en la relación A260/A280, indicó que si existe diferencia significativa ($p > 0.001$), reflejando una mediana de pureza óptima en las muestras secas y una pureza aceptable en las muestras congeladas. Corroborando así, que el método óptimo para obtener ADN de calidad por el método enzimático es utilizando muestras secas.

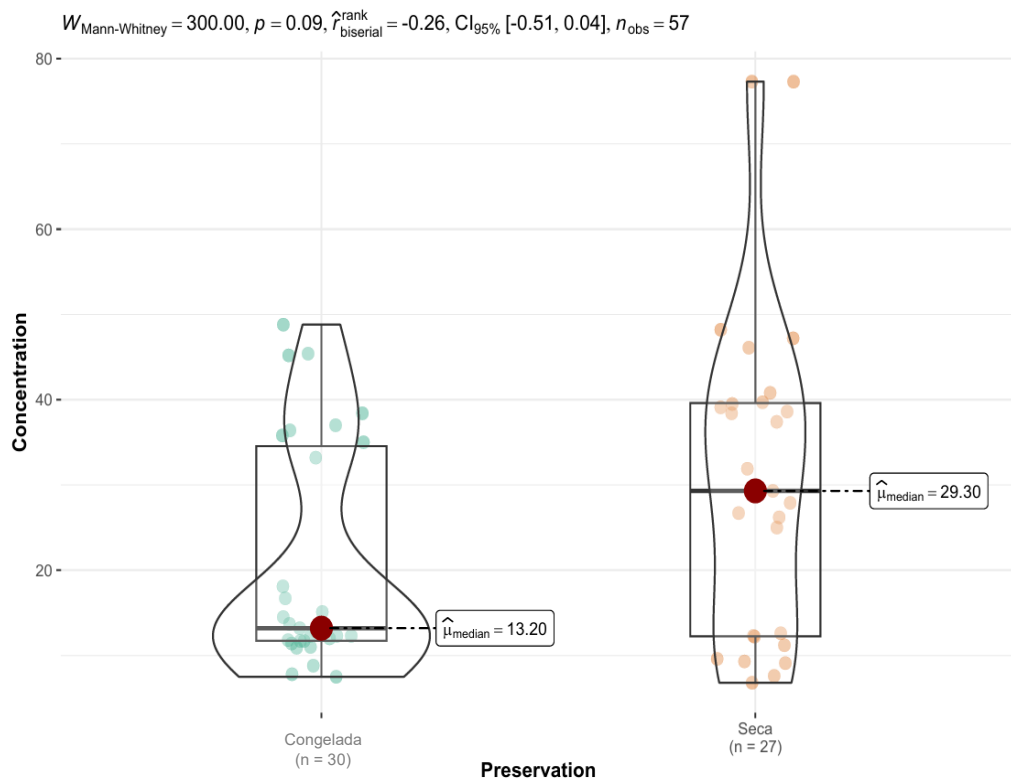


Figura 16: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo enzimático. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

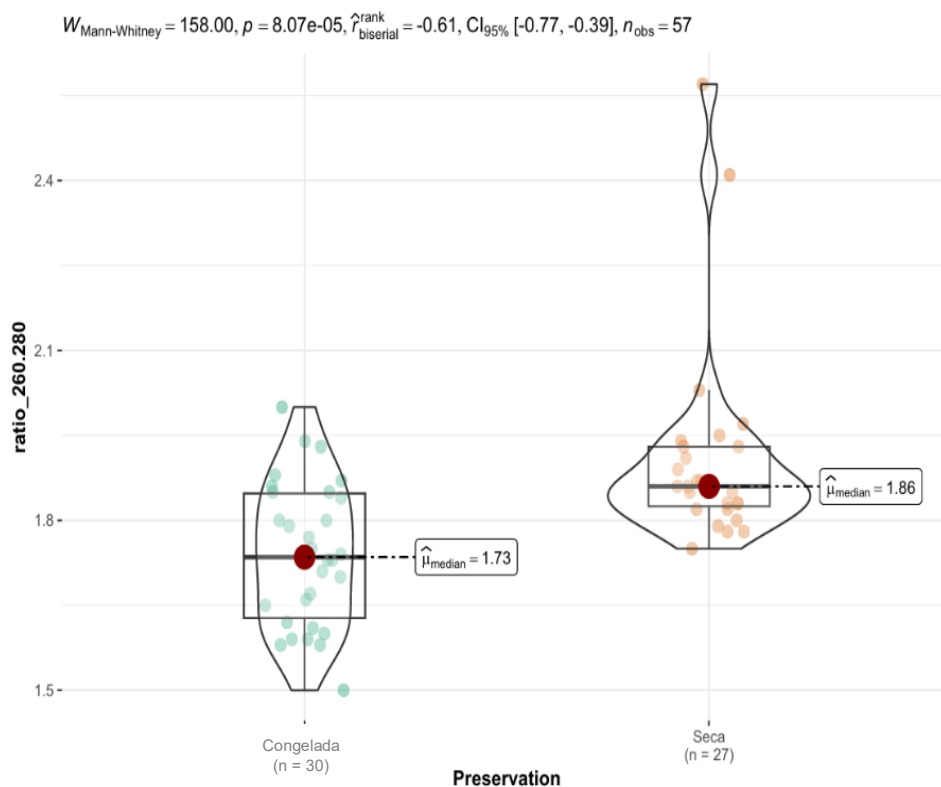


Figura 17: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Corallina* mediante el protocolo enzimático. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor pureza.

9.3.4. Protocolo CTAB frente al género *Acanthophora*

En el género *Acanthophora* se analizaron 56 muestras de ADN mediante el protocolo CTAB, 28 congeladas y 28 secas, la prueba estadística de Mann Whitney reveló que existe diferencia significativa en la concentración de ADN ($p < 0.001$) destacando, además, que el valor de la mediana en las muestras de preservación seca exhibe mayor concentración (Figura 18). Así mismo, analizando la pureza del ADN, relación A260/A280 en el espectro, demostró diferencias significativas entre los métodos de preservación ($p = 3.08e-03$), sin embargo, a pesar de la diferencia, los datos de la mediana indican que ambos métodos se encuentran dentro del rango óptimo de pureza (≥ 1.8) (Figura 19), estableciendo que el método óptimo a la hora de realizar la extracción en *Acanthophora* es utilizar muestras secas por lo que brinda mayor concentración de ADN.

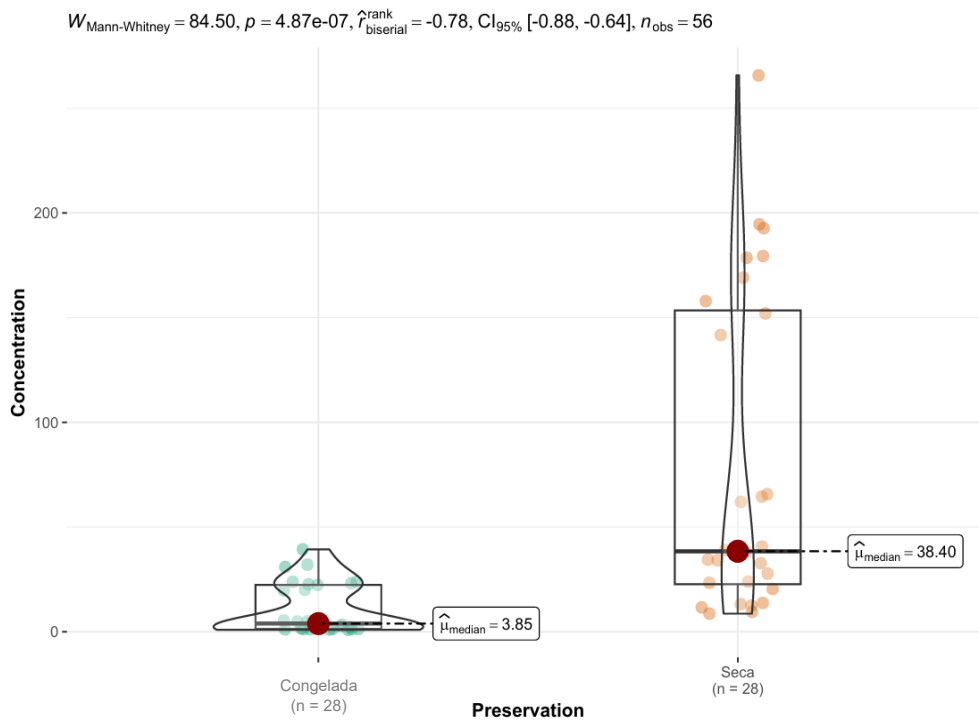


Figura 18: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo CTAB. Donde la mediana de valores (μ_{median}) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

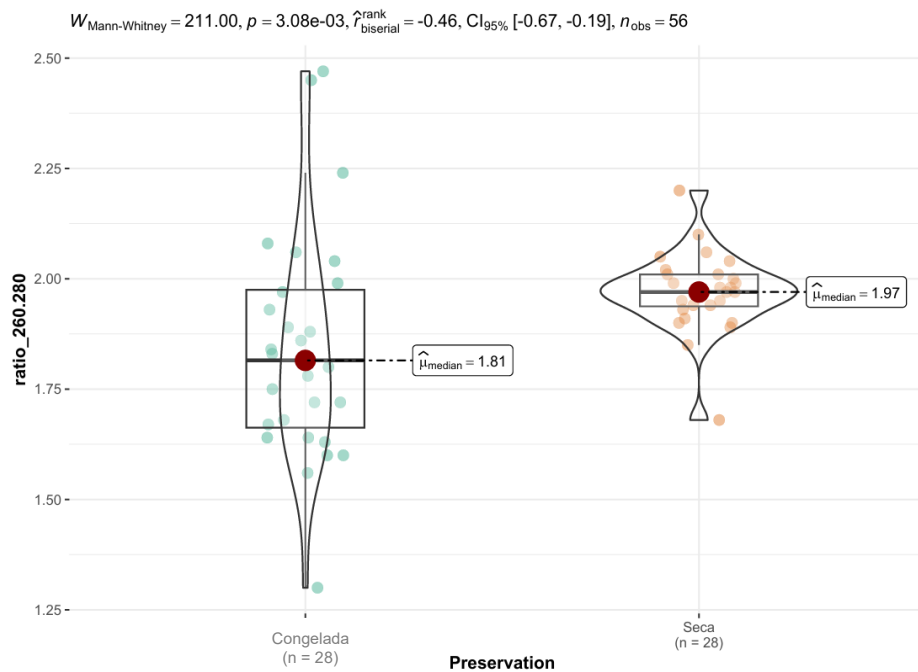


Figura 19: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo CTAB. Donde la mediana de valores (μ_{median}) indica que la preservación seca brinda mayor pureza.

9.3.5. Protocolo universal (NaCl) frente al género *Acanthophora*

El análisis total de 36 muestra de los métodos de preservación en el protocolo NaCl, demostró diferencia significativa en la concentración de ADN ($p < 0.001$), evidenciando por la mediana de valores, una concentración relevante en las muestras secas (Figura 20). En el parámetro de pureza A260/A280 también se mostró diferencia significativa ($p = 8.20e-03$) expresando para los valores de la mediana, una pureza aceptable (≥ 1.6) en las muestras secas y para las muestras congeladas un ADN contaminado (< 1.6) (Figura 21). Reafirmando que el método eficaz para la obtención de un ADN admisible en este protocolo es utilizando muestras secas.

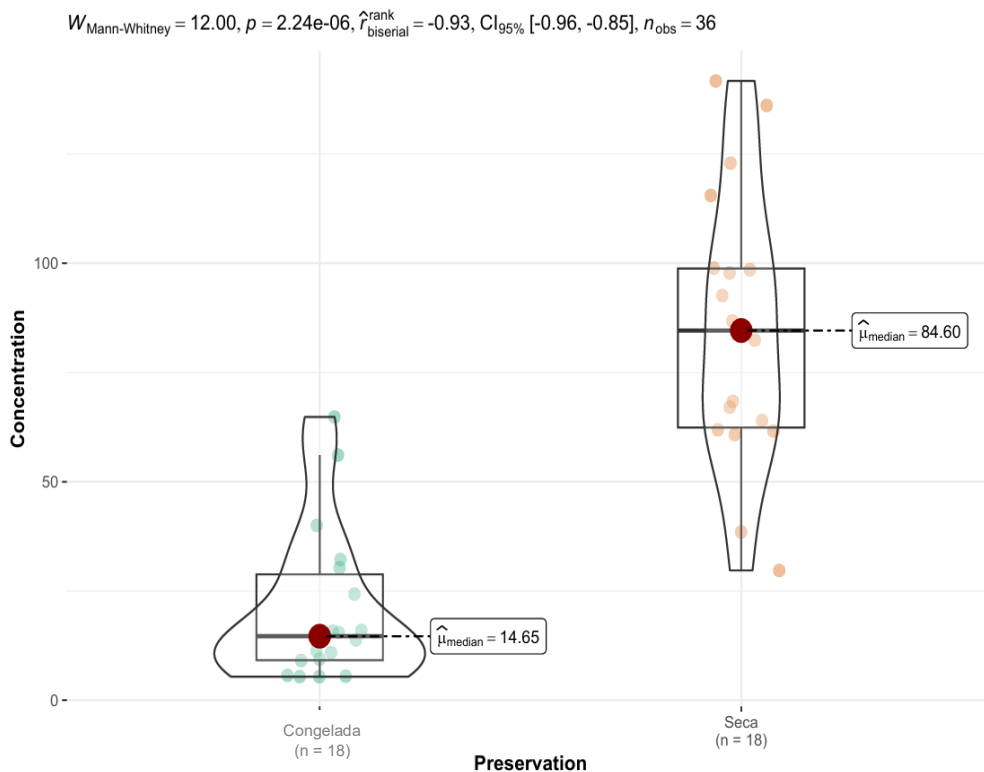


Figura 20: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo CTAB. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

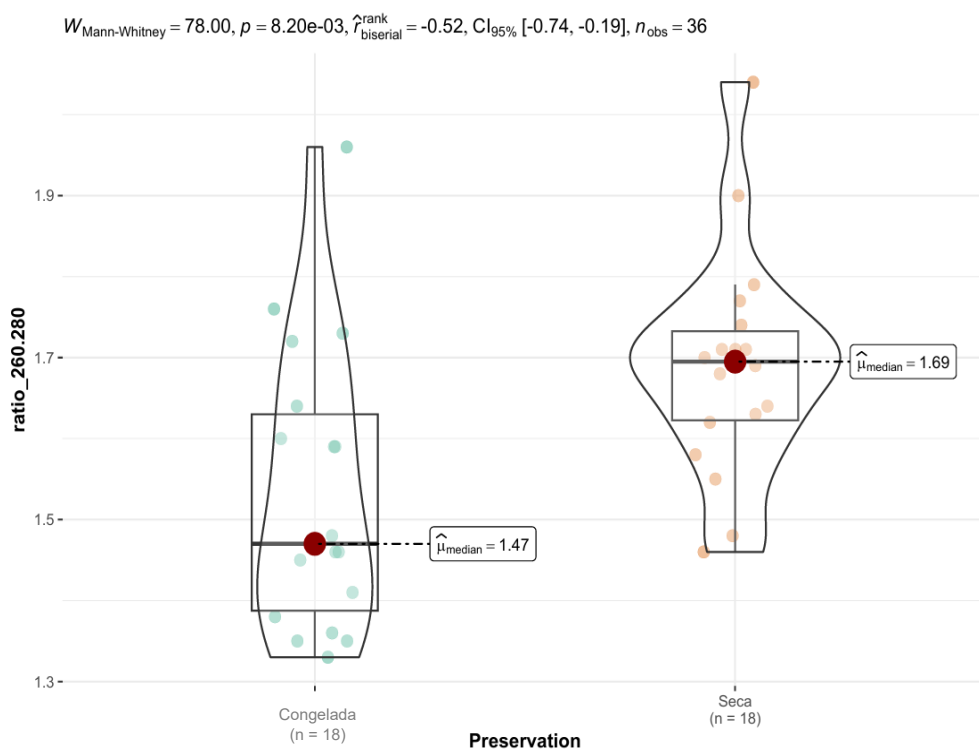


Figura 21: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo NaCl. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor pureza.

9.3.6. Protocolo enzimático frente al Género *Acanthophora*

El análisis de las extracciones realizadas por el método enzimático, fueron un total de 55 muestras, la prueba de Mann Whitney demostró que existe diferencia significativa entre los métodos de preservación en la concentración de ADN ($p < 0.001$) los datos de las medianas revelan que el método por secado es el que dispone una concentración más elevada a diferencia de las muestras congeladas (Figura 22). El indicador de calidad de pureza en la relación A260/A280, no mostró diferencia significativa entre los métodos de preservación ($p = 0.74$), sin embargo, de acuerdo con la mediana, el valor de las muestras congeladas se encuentra en el intervalo de pureza aceptable y en las muestras secas, un intervalo de ADN contaminado (< 1.6), no obstante los valores graficados de las muestras congeladas (húmedas) se presentan muy dispersos, en comparación de las muestras secas (Figura 23), concluyendo que a pesar de que las muestras congeladas se encuentren dentro este intervalo aceptable de pureza en comparación del grupo opuesto, no presenta diferencias significativas, y aquel, que alcanza mayor concentración de ADN es la muestra seca, por lo tanto, es el método más apropiado a la hora de realizar la extracción.

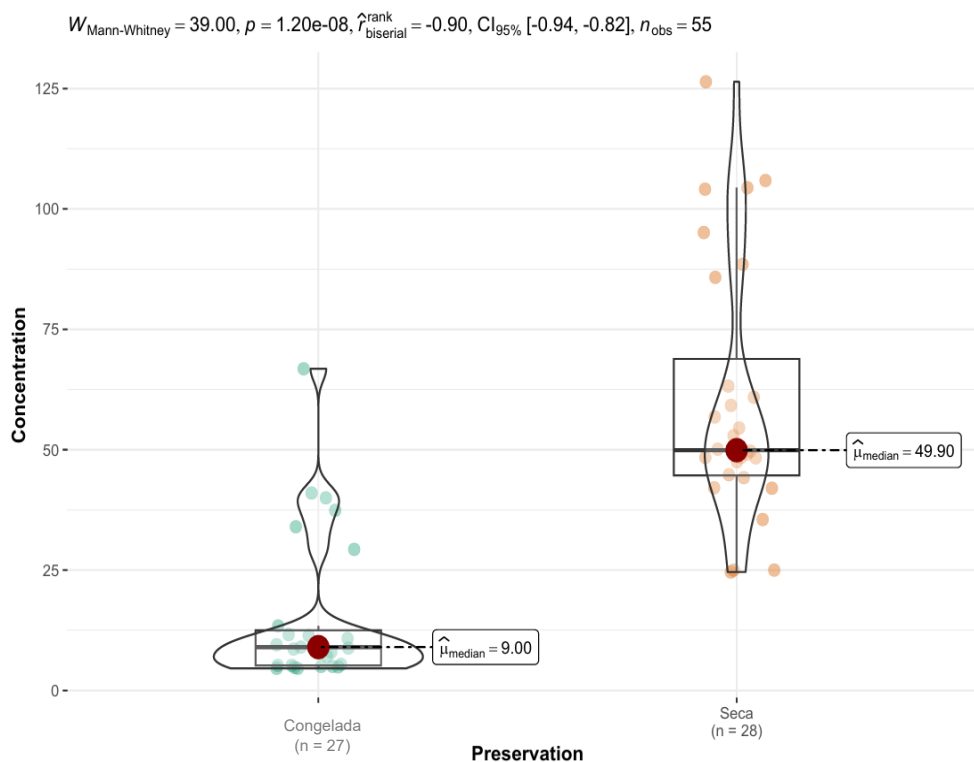


Figura 22: Comparación de la concentración de ADN (ng/μL), de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo enzimático. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación seca brinda mayor concentración de ADN.

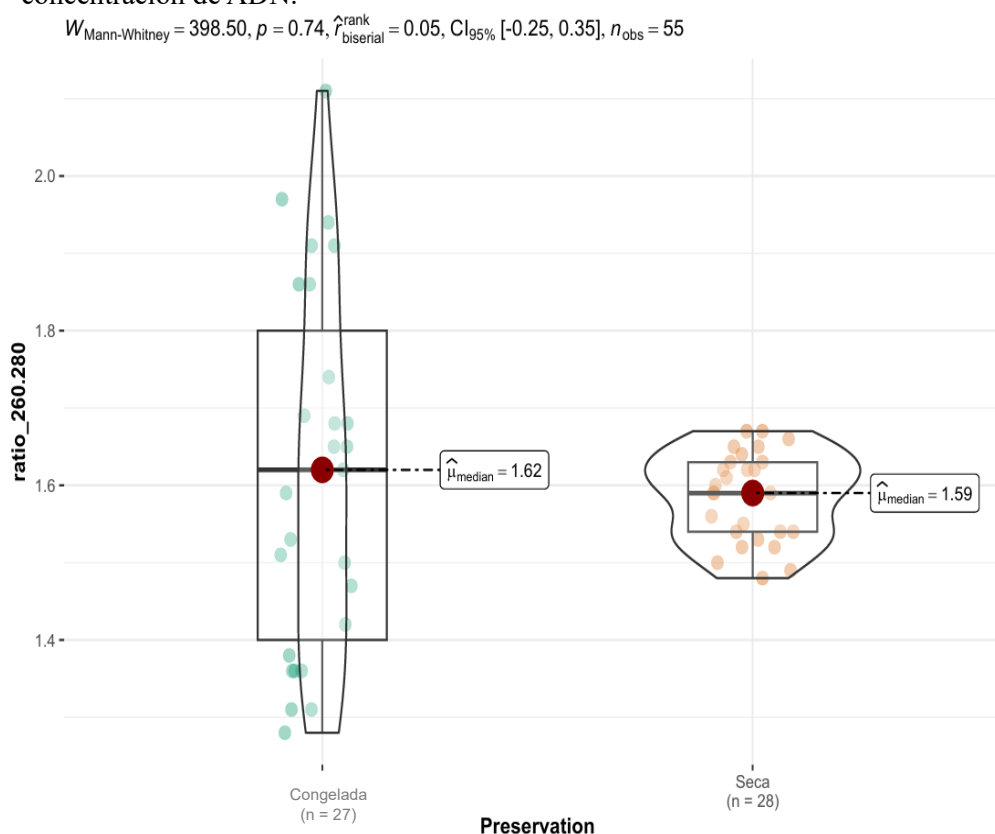


Figura 23: Comparación de la Pureza de ADN, relación A260/A280, de los métodos de preservación (seco y congelada) de *Acanthophora* mediante el protocolo enzimático. Donde la mediana de valores ($\hat{\mu}_{\text{median}}$) indica que la preservación por congelamiento brinda mayor pureza.

9.4. Integridad del ADN

Las muestras cargadas en los pocillos corresponden a cada protocolo, género y método de preservación evaluados en la presente investigación, y tras la migración de ADN en el gel de agarosa al 1% (Figura 24), podemos notar en su mayoría, bandas intensas en los pocillos cargados con muestras secas, sin embargo, existe variación en los patrones de las bandas. En las muestras del carril 3 y 7 podemos notar bandas intensas en la parte superior del gel, definiendo como ADN integro; por otro lado, las muestras del carril 5 y 11 se aprecia ADN de alta concentración, pero parcialmente degradado por la presencia de *smear*, esto podría deberse a la presencia de contaminantes en la muestra como proteínas, polisacáridos, alcoholes, etc. Las muestras del carril 9 y 12 podemos notar bandas definidas pero muy tenues, estas corresponden a muestras extraídas por el método CTAB calificándolas con integridad adecuada, pero bajas en concentración, del mismo grupo, en la muestra del carril 10 se presenta ADN parcialmente degradado y finalmente las muestras del carril 1, 2, 4, 6 y 8 existe ausencia de banda por lo tanto no se puede calificar como ADN integro, sin embargo tras haber realizado el análisis por espectrofotometría se deduce que la ausencia de la banda se debe a la presencia de contaminantes y baja concentración de ADN por lo que es un indicativo valido para notar esta ausencia.

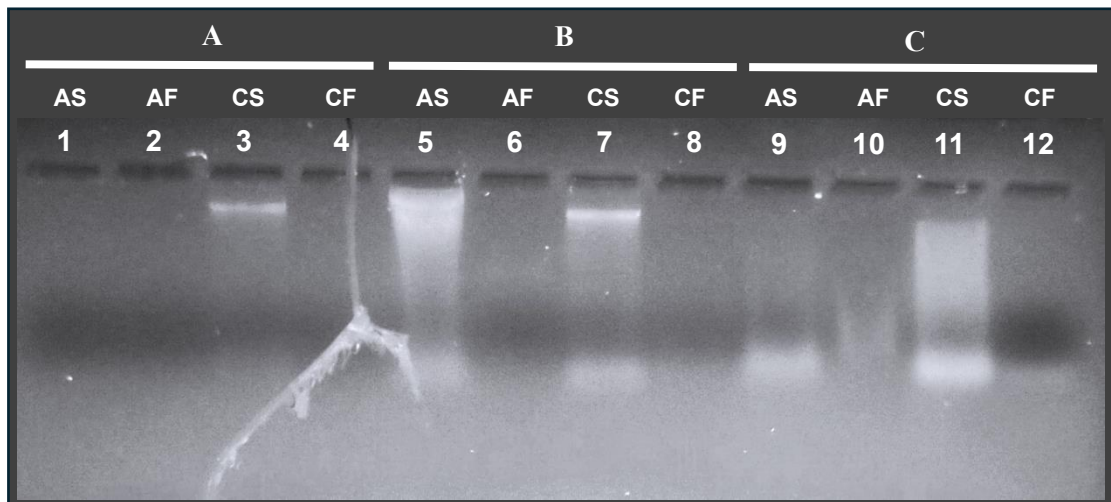


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los diferentes protocolos empleados. Grupo A) protocolo mediante NaCl; grupo B): protocolo por método enzimático; y grupo C): protocolo mediante CTAB. AS: *Acanthophora* seca; AF: *Acanthophora* congelada; CS: *Corallina* seca; CF: *Corallina* congelada

10. DISCUSIONES

Las dos especies de macroalgas Rhodophyta (*Acanthophora* y *Corallina*) seleccionadas para este estudio, tienen el potencial de diversificar los resultados obtenidos de los protocolos de extracción de ADN. A pesar de pertenecer al mismo filo Rhodophyta, estos géneros presentan diferencias significativas en sus estructuras y composición celular. En el caso de *Acanthophora* cuenta con una estructura cartilaginosa, siendo ricas en polisacáridos, celulosa y agarosa; estos componentes le han conducido a ser objeto de estudio en los últimos años. Del mismo modo, la composición del género *Corallina* posee las mismas características, con la diferencia que produce carbonato de calcio, proveyéndole rigidez y esqueleto al alga siendo necesario e importante su aplicación molecular, para estudios ambientales, por ejemplo, en arrecifes coralinos (Cornwall et al, 2023).

Respecto a protocolos de extracción de ADN, es poco lo que está publicado en estas especies, ya que la mayoría de los protocolos de extracción estandarizados en Rhodophytas, se realizan en especies del Orden: Bangiales, Palmariales, Gelidiales entre otras. (Wattier, Prodöhl, & Maggs, 2000) (Yang, et al.,2013).

Optimización de los protocolos de extracción de ADN

Como era de esperarse, los resultados demostraron que el género *Acanthophora* y *Corallina* se comportaban de manera diferente con cada protocolo de extracción aplicado. Sin embargo, se comprobó que para ambos géneros el protocolo eficaz era mediante CTAB, lo cual coincide con el estudio de (Yang et al, 2013) donde aplican diferentes protocolos de extracción obteniendo mejores resultados con

protocolo CTAB en una macroalga identificada como *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta), en la que, al obtener el ADN, verificaron su calidad por digestión con enzimas de restricción y PCR, obteniendo una digestión completa y amplificación óptima de los cebadores. En nuestro estudio, pese a que no se verificó la calidad con enzimas de restricción, ni por PCR debido a que estos procesos conllevan un tiempo considerable de investigación, y la finalidad de este estudio fue dejar establecido un método de extracción de ADN preciso y efectivo para realizar posteriormente estudios moleculares de cualquier índole; se demostró mejores rendimientos con este protocolo, donde la mediana de concentración de masa seca en el género *Acanthophora* y *Corallina* eran de 49ng/μL y 38ng/μL, respectivamente con una pureza A260/A280 óptima (> 1.8), las cuales fueron mayor en comparación del método planteado por (Ramakrishnan, Anwar & Mohandass, 2017) donde en género *Acanthophora* obtienen una concentración aproximada de 34 ng/μL, en la que si bien no utiliza CTAB el protocolo es muy similar, porque incluyen reactivos como el β-mercaptoetanol, PVP, cloroformo/alcohol isoamílico, al igual que otros protocolos planteados por (Lee & Lee, 2003) (Choi et al., 1998) quienes también aplicaron en diversas especies de algas Rhodophytas. La utilidad de emplear CTAB en la extracción de ADN, es que, al estar en contacto con la membrana biológica del tejido de las algas, captura los lípidos, liberando el ADN y junto con otros productos como PVP minimizan el efecto de los metabolitos secundarios y polisacáridos (Heikrujam, Kishor & Mazumder, 2020).

Por otra parte, (Joubert & Fleurence, 2005 y 2008) y (Kumari, 2013) emplean en sus protocolos, una lisis enzimática previo a la extracción de ADN utilizando celulasa, xilanasas y β -glucanasas, lo cual les permitió tener un alto rendimiento de ADN. En el estudio de (Joubert & Fleurence, 2005 y 2008) aplicado en *Gracilaria verrucosa* y *Palmaria palmata* (Rhodophytas) obtienen un rendimiento superior a 300 ng/g y 600 ng/g respectivamente. Mientras que, (Kumari, 2013) emplea la extracción sobre en macroalgas rojas, verdes y pardas obteniendo un rendimiento entre 6-10 μ g/g; estos son rendimientos ideales para realizar posteriores trabajos moleculares como PCR, RFLP y secuenciación. Si bien parece ser un método eficaz, tiende a ser más costoso y toma más tiempo en llevar a cabo el proceso de extracción.

La obtención de ADN por el método enzimático, aplicado en nuestro estudio, se emplean enzimas como proteinasa K y ARNasa A en el buffer de extracción, haciendo que el proceso sea más rápido, en comparación de los métodos antes mencionados, además que en este protocolo no se utilizan químicos nocivos como β -mercaptoetanol, PVP o cloroformo, estos aspectos hacen la diferencia en la calidad del producto de ADN.

Aun así, el ADN obtenido por este método enzimático no deja de estar en un rango de “calidad aceptable”, la mediana de concentración, en muestras secas del género *Corallina* es de 29.3 ng/ μ l con una pureza >1.8, y del género *Acanthophora* 49.9 ng/ μ l con una pureza >1.5, siendo evidente la presencia de impurezas en este género, ya que se encuentra por debajo del rango óptimo de pureza A260/A280 establecido entre 1.8 y 2.1. Así mismo la integridad de ADN, analizada por electroforesis en gel de agarosa, el género *Corallina* presento bandas definidas

denotando un ADN integro; mientras que el género *Acanthophora* se visualizaba con buena concentración de ADN, pero también presentaba *smear*, lo cual era previsible, debido a la baja pureza que se obtuvo mediante espectrofotometría; nuestros resultados coincidían con los hallazgos obtenidos por (Wattier, Prodöhl, & Maggs, 2000), en la que usando este mismo protocolo, su evaluación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5%, obtuvieron bandas definidas de alto peso molecular, en especies del orden Corallinales y ligero *smear* en una especie del orden Ceramiales, órdenes a las que pertenecen el género *Corallina* y *Acanthophora*.

Si bien el protocolo mediante NaCl propuesto por (Aljanabi & Martinez, 1997) y modificado por (Rodríguez, 2017) se le considera universal por su fácil aplicación en tejidos animal, vegetal e inclusive fúngico, y uso de químicos inocuos; en algas Rhodophytas va a depender del género al que se quiera aplicar. Nuestros resultados mostraron mejor extracción en las algas del género *Corallina*, mientras que en el género *Acanthophora*, el producto de ADN presentaba una consistencia gelatinosa de color rosa. Se presume que este hecho, se debe a que el protocolo no logro eliminar completamente los polifenoles. En un estudio de (Velasco, 2005) menciona que, a fin de prevenir esta consistencia y coloración en el pellet de ADN, es ideal implementar reactivos como PVP en los buffers de extracción; estos polifenoles se unen al ADN y precipitando junto con ellos, por lo que, durante la extracción, el PVP actúa con la eliminación de esos compuestos polifenólicos (Heikrujam, Kishor & Mazumder, 2020).

En base a este protocolo los resultados de (Aljanabi, & Martinez, 1997) consiguieron un rendimiento de ADN entre 500-800 ng/mg con una pureza de >1.77, nuestros resultados con muestras secas el género *Corallina* oscilaban un rendimiento de 121 ng/mg, pureza >1.8 y en *Acanthophora* con 421 ng/mg, pero con una pureza inferior a 1.6 por lo no se obtuvo buenos resultados con esta última. La información con este protocolo sobre macroalgas rojas es escasa, sin embargo, en un estudio de (Escalante, 2019) desarrollo este protocolo modificado, en cepas de microalgas, obteniendo buenas concentraciones y pureza mayor a 1.6, valores superiores, en comparación con nuestros resultados. Por último, en cuanto a la integridad de ADN por electroforesis, solo se pudo visualizar una banda integra en el género *Corallina* seca, coincidiendo con la concentración y pureza óptima brindada por la espectrofotometría.

Eficiencia de la preservación de muestras utilizadas

Finalmente los resultados estadísticos, mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en los métodos de preservación, utilizados en las extracciones, determinado que las muestras secadas con silica gel proporcionaban mejor rendimiento y pureza en los tres protocolos, coincidiendo con el estudio de (Joubert, & Fleurence, 2008) donde realizaron pruebas de extracción en el alga *Palmaria palmata* utilizando muestras secas y congeladas a -20°C , estas muestras congeladas habían sido preservadas por un periodo de tres meses, obteniendo como resultado, mayor rendimiento de ADN con algas secas. No fue así para el estudio realizado por (Mendoza, 2003) en algas pardas de la especie *Sargassum lapazeanum*, en la que comparaban muestras preservadas en etanol, secas con silica gel y congelación a -20°C donde, mayor rendimiento de ADN

tuvieron en las algas congeladas; por lo que, el tiempo de preservación a -20°C podría influir en la calidad. Otros estudios de extracción como (Lee & Lee, 2023) y (Yang et al, 2013) preservan sus muestras a una temperatura de -80°C y -70°C , lo cual es óptimo para preservar el ADN de las muestras a utilizar.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

11.1. Conclusiones

Los protocolos de extracción de ADN empleados en este estudio son muy conocidos y aplicado en diferentes especies, sin embargo, muy poco se había estudiado en el género *Corallina* y *Acanthophora*, géneros pertenecientes a la familia Corallinaceae y Rhodomelaceae, demostrando que los resultados obtenidos son de gran importancia.

Los análisis estadísticos mostraron que si existe diferencia significativa entre los tres protocolos de extracción de ADN ($p < 0.05$), conduciendo al rechazo de la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alterna planteada, esta diferencia significativa se evidenció tanto en pureza A260/A280, como en concentración de ADN, aunque en algunos casos esta diferencia estadística no existía en la concentración, por lo que se optó por definir la calidad, con la pureza A260/A280; este parámetro es primordial e importante, ya que, de no estar dentro del rango establecido dificulta posteriores trabajos moleculares. El protocolo eficaz en ambos géneros fue mediante CTAB, seguido del método enzimático, y por último el protocolo universal mediante NaCl, que solo se recomienda en el género *Corallina*.

Por otro lado, el análisis estadístico mostro diferencia significativa ($p < 0.05$) entre muestras de algas congeladas y muestras secas con gel de sílice, tanto para

Acanthophora y *Corallina*, en los tres protocolos. Determinando que el mejor método extracción es utilizando muestras secas; utilizar silica gel, es un método óptimo ya que no se necesita de otros equipos como estufas o incubadoras para su rápido secado, además de evitar el riesgo de quemarlas, dañar las células y degradar el ADN.

Finalmente, la integridad del ADN mediante electroforesis visualizada en un gel de agarosa al 1% mostró “integridad alta” en el género *Corallina* seca en los tres protocolos, mientras que en el género *Acanthophora* seca, solo se logró visualizar bandas en el protocolo CTAB y método enzimático, acompañado de ligeros *smear* (bandas difusas y sin definición clara), considerándolos como “integridad adecuada”; en el caso de las muestras congeladas utilizadas en este estudio, al poseer baja concentración de ADN, la intensidad de las bandas eran deficientes e incluso ausentes en la electroforesis. Utilizar un método óptimo de extracción de ADN va a depender de la especie en la que se quiera trabajar.

11.2. Recomendaciones

Se recomienda continuar con pruebas de identificación molecular de las macroalgas utilizadas en este trabajo, para determinar con mayor precisión a la especie que pertenecen, incentivando además conocer sobre su filogenia y potencial biotecnológico.

Probar la calidad de ADN de muestras congeladas, en distintos periodos de tiempo, para conocer el tiempo óptimo de empleo de las muestras de algas con las que se va a trabajar. Así mismo, manejar equipos y productos químicos, utilizando protección adecuada para evitar daños, ya que algunos productos son muy nocivos al estar en contacto con el operador.

Emplear técnicas de lisis mecánica previo a la extracción de ADN, para una mejor ruptura celular y obtener la mayor concentración de ADN, actualmente existen técnicas como, el uso de perlas magnéticas, vidrio molido, y arena refinada.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, S. & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25 (22), 4692-4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692
- Angarita, M., Torres, M., Diaz K. (octubre, 2017). Molecular biology techniques for research development. A literature review. *Revista Hav. cienc méd* vol.16 no.5. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1729519X2017000500012&script=sci_arttext&lng=en
- Angulo, A. et al. (agosto, 2020). Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN genómico en babosas plagas (*mollusca*: gasterópoda). *Revista Científica ECOCIENCIA* 7(1390-9320):1-15. DOI:10.21855/ecociencia.74.380
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (octubre, 2020). Programa de Control de calidad de muestras de ADN y ARN. Salamanca: Universidad de Salamanca. Edición 2, 1-10. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Barrera, G. et al. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Rev. colomb. biotecnol* vol.18 no.2. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Batten S. (2023). “Caracterización macroalgal y macroinvertebrados asociados de la zona intermareal rocosa en la playa La Viejita de la Base Naval de Salinas, provincia de Santa Elena”. [Trabajo de titulación, Universidad estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/10143>

- Beas, Z, Ortuño, S., Armendáriz, B. (2009). *Biología Molecular Fundamentos Y Aplicaciones*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. De C.V. ISBN 13: 978-970-10-6921-9.
- Berthold (2024). *Métodos De Cuantificación De DNA*. Berthold Technologies GmbH & Co.KG. <https://www.berthold.com/es/bioanalitica/aplicaciones/cuantificacion-dna/metodos/>
- Burriel, V. (2023). *Estructura y Propiedades De Los Ácidos Nucleicos*. Universidad de Valencia. https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/AcidosNucleicos_veronica.pdf
- Cardenas-Calle et al. (2020). Marine invertebrate and seaweed biodiversity of continental coastal Ecuador. *Biodiversity Data Journal* 8: e53818. <https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e53818>
- Cervantes, G. (2003). Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Revista Médica Herediana* Vol.14(4). 230-233). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000400014
- Choi, H-S. et al. (1998). Rapid and efficient purification of nucleic acids from the macroalga *Porphyra* Rhodophyta. *J. Korean Soc Food Sci.* Vol 27(6) 1166-1172. <https://koreascience.kr/article/JAKO199811920154363.pdf>
- Cornejo, A. et al. (julio, 2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, (INECC-Semarnat). ISBN: 978-607-8246-72-4

- Cornwall, C et al. (2023). Crustose coralline algae can contribute more than corals to coral reef carbonate production. *Communications earth & environment* Vol. 4:105. <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00766-w>
- Cullings, K.W. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.
- Cuvi N. & Cornejo X. (diciembre, 2020). Una revisión actualizada de las macroalgas marinas del Ecuador continental. *Rev. Cient. Cien. Nat. Ambien.* 14(2):201-209. ISSN: 2773-7772
- Dellaporta, S., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Escalante K. (2019). Efecto de la temperatura en la amplificación del Gen 18S ARNr de dos microalgas a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR. [Trabajo de titulación, Universidad estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5245>
- Flores, C. (2017). Aplicaciones de la biología molecular en la acuicultura. *Encuentro*. Num. 75(2006). <https://revistasnicaragua.cnu.edu.ni/index.php/encuentro/article/view/3357>
- Florez-Leiva et al. (mayo, 2010). Recolección y preservación de macroalgas marinas: una guía para estudios ficológicos. *Revista Intropica Volumen 5*, 97-103. ISSN 1794-161X

- Fort, A., Guiry, M. & Sulpice, R. (2018). Magnetic beads, a particularly effective novel method for extraction of NGS ready DNA from macroalgae. *Algal Research*. Vol. 32, 308-3013. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.015>
- FUJIFILM (enero, 2014). 10 métodos de extracción de AND. FUJIFILM Wako chemicals U.S.A. Corporation. <https://www.wakolatinamerica.com/blog-reactivos/noticias-wako/post/10-metodos-de-extraccion-de-adn/>
- García, P. & Robaina, R. (22 February 2015). On reproduction in red algae: further research needed at the molecular level. Perspective article. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Development and EvoDevo*. Vol. 6 – 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00093>
- Guillen, P. et al. (2022). Valorization of the chemical diversity of the tropical red seaweeds *Acanthophora* and *Kappaphycus* and their applications in aquaculture: A review. *Frontiers in Marine Science*. Sec. Marine Biotechnology and Bioproducts. Volume 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.957290>
- Guillen, P. et al. (October 2022). Valorization of the chemical diversity of the tropical red seaweeds *Acanthophora* and *Kappaphycus* and their applications in aquaculture: A review. *Front. Mar. Sci.*, 27 Sec. Marine Biotechnology and Bioproducts. Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.957290>
- Guiry, G. et al. (febrero de 2022). *Corallina Linnaeus*, 1758. AlgaeBase. Publicación electrónica mundial, Universidad Nacional de Irlanda, Galway. <https://www.algaebase.org>

- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen. Doi:10.5772/intechopen.92206.
- Hong Y. et al. (octubre, 1995). DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *Journal. Applied Phycology* 7: 101-107. <https://doi.org/10.1007/BF00693055>
- Joubert, Y. & Fleurence, J. (2008) Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J Appl Phycol* 20:55–61. DOI 10.1007/s10811-007-9180-9
- Joubert, Y. & Fleurence, J. (junio, 2005). DNA Isolation Protocol for Seaweeds. *Plant Molecular Biology Reporter* 23(2), 197-197. DOI:10.1007/BF02772712
- Jung H. et al. (2021). Método optimizado para la extracción de DNA de *Sargassum liebmannii*. *E-Cucba*, 8(16), 45-49. <https://doi.org/10.32870/ecucba.vi16.197>
- Kang, M. et al. (2023). High-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing of plant genomes: An optimization of standard methods. *Applications in Plant Sciences* 11(3): e11528.
- Khatri, K., et al. (2023). Functional genomic and transformation resources for commercially important red macroalgae (Rhodophyta). *Algal Research*. Volume 74. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103227>
- Kim H. et al. (mayo, 2021). Método optimizado para la extracción de DNA de *Sargassum liebmannii*. *e-CUCBA* 8(16):45-49. DOI:10.32870/ecucba.vi16.197

- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583–621.
- Kumari, B. (marzo, 2013). DNA isolation protocol for different types of seaweeds from seashore areas of Rameshwaram. GTRP. *Applied Biology and Biotechnology* Vol. No. 1(2):5-10; www.gbtrp.com
- Lamouroux, J. V. F. (1813). Essai sur les genres de la famille des thalassiophytes non articulées. *Annales du Muséum d'Histoire Naturelle [Paris]*. 20: 21-47, 115-139, 267-293.
- Lee, Y. K. & Lee, H. K. (febrero, 2003). A simple Method for DNA Extraction from red algae. *Algae*. Vol 18(1): 65-69. <https://koreascience.kr/article/JAKO200318138125758.pdf>
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata [10th revised edition], vol. 1: 824 pp. Laurentius Salvius: Holmiae <https://biodiversitylibrary.org/page/726886>
- Maeda T. et al. (2012). Effective DNA extraction method for fragment analysis using capillary sequencer of the kelp, *Saccharina*. *J Appl Phycol*. Vol. 25(1):337–47. DOI:10.1007/s10811-012-9868-3
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics*, 18, 50–60.
- Martínez-Frías, M. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen*. Vol. 36(5), 273-277.

<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-pdf-S1138359310000596>

MedlinePlus (2021). ¿Qué es el ADN? Biblioteca Nacional de Medicina.
<https://medlineplus.gov/spanish/genetica/entender/basica/adn/>

Mendoza, C. G. (febrero, 2003). Estructura Genética De *Sargassum lapazeanum* (Saragssaceae: Phaephyceae) En Escalas Intrapoblacional, Local Y Regional: Estimación De Posibles Patrones De Dispersión. [Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Norte S.C.].
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2653>

Montalvo, C. & Lugo, N. (noviembre, 2016). Electroforesis: Fundamentos, Avances y Aplicaciones. Epistemus. Pag. 48-54. ISSN: 2007-8196 (electrónico).
<https://epistemus.unison.mx/index.php/epistemus/article/view/96/70>

NIH (2024). Ácido Desoxirribonucleico (ADN). National Human Genome Research Institute.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/%C3%81cido-desoxirribonucleico>

NIH (2024). ARN (ÁCIDO RIBONUCLEICO). National Human Genome. Research Institute. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN>

Orfao, A. & Morent, M. (2011). Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos. Red Nacional de Biobancos – ISCIII. <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>

Padilla, P. et al. (2014). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Universidad de Córdoba.

<https://www.studocu.com/es/document/universidade-de-vigo/bioestadistica/17-electroforesis-acs-nucleicos-geles-agarosa/12537176>

Patrick, E. M. & Julius, N. (30 de enero, 2010). Kruskal-Wallis Test. The Corsini Encyclopedia of Psychology. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0491>.

Pérez, G. (2024). Espectrometría de fluorescencia. Espectrofotometria.com. https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_fluorescencia#:~:text=Se%20trata%20de%20utilizar%20un,es%20la%20espectrometr%C3%ADa%20de%20absorci%C3%B3n

Pozo M. (2014). “Biodiversidad de macroalgas en los bajos “52, Casa lobos y Aquapark”, de la REMACOPSE demostrando la importancia y dominancia de géneros a diferentes profundidades, durante los meses de agosto 2013 a enero 2014”. [Tesis de grado, Universidad estatal Península de Santa Elena]. <http://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/1477>

Promega (2024). DNA Purification. <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#references-2ae16bef-0d6b-4ccc-a925-42fe16a15467>

Ramakrishnan, G., Anwar, A. & Mohandass, R. (Julio, 2017) A rapid and efficient DNA extraction method suitable for marine macroalgae. 3 Biotech 7:364. DOI 10.1007/s13205-017-0992-2

Rendina, F. et al. (septiembre, 2019). Physiological response of the coralline alga *Corallina officinalis* L. To both predicted long-term increases in temperature and short-term

heatwave events. *Marine Environmental Research*. Volume 150.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104764>

Rodríguez J. (2017). Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016. [Trabajo de titulación, Universidad estatal Península de Santa Elena]. <http://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/4265>

Sahu SK, Thangaraj M, Kathiresan K. (noviembre, 2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Mol Biol*. 2012:1–6. DOI: 10.5402/2012/205049

Science Learning Hub-Pokapū Akoranga Pūtaiao. (junio, 2009). DNA extraction. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>

Solé, M. & Pardo, P. (diciembre, 2010). Ficoflora marina del sur de la península de Macanao, isla de Margarita, Venezuela.: II. Rhodophytas. *Acta Botanica Venezuelica* 33(2):187-211. ISSN 0084-5906

Soltis Lab (2002). CTAB DNA Extraction Protocol. Universidad de Florida. <https://www.floridamuseum.ufl.edu/wp-content/uploads/sites/95/2014/02/CTAB-DNA-Extraction.pdf>

Tanaka, Y. et al. (15 de marzo, 2015). Bioremediation potential of tropical seaweeds in aquaculture: low-salinity tolerance, phosphorus content, and production of UV-absorbing compounds. *Aquaculture* Vol. 518.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734853>

- Thermo Scientific Inc. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. User Manual V1.0.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Titlyanov, E.A. et al. (abril, 2017). Chapter 4 - Common Marine Algae of Hainan Island (Guidebook). Coral Reef Marine Plants of Hainan Island 75-228.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811963-1.00004-4>
- Tuney, I. & Sukatar, A. (2010). DNA extraction protocol from Brown Algae. Tuney, I., & Sukatar, A. (2010). DNA extraction protocol from Brown Algae. *Biological Diversity and Conservation*, 3(1), 51-55. ISSN 1308-5301
- Velasco, M. R. (marzo, 2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Vol 3(1).
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117966>
- Villareal, L., Iglesias, A., Pérez, (2009). Manual de prácticas de laboratorio. ECITEC.
<https://citecuvp.tij.uabc.mx/bio/wp-content/uploads/2020/07/11816-Biologia-Molecular.pdf>
- Wattier, R.A., Prodöhl, P.A. & Maggs, C.A. (2000). DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 275–281
<https://doi.org/10.1007/BF02823999>
- Wilson, L. et al. (enero, 2016). DNA Extraction Techniques for Genomic Analyses of Macroalgae. In: Hu, ZM., Fraser, C. (eds) *Seaweed Phylogeography*. Springer, Dordrecht. DOI 10.1007/978-94-017-7534-2_15

Yang, L. et al. (2013). Improved methods for basic molecular manipulation of the red alga *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta: Bangiales). *J Appl Phycol* Vol 25. 245-252. DOI 10.1007/s10811-012-9858-5

13. ANEXOS

Anexo 1: Tabla de mediana estadística de concentración y pureza A260/A280 de ADN

Protocolos	Muestras	concentración ng/μl	Pureza A260/A280
CTAB	<i>Corallina congelada</i>	14	1,83
	<i>Corallina seca</i>	49	1,93
	<i>Acanthophora congelada</i>	3,85	1,81
	<i>Acanthophora seca</i>	38,4	1,97
NaCl	<i>Corallina congelada</i>	12,4	1,7
	<i>Corallina seca</i>	24,8	1,88
	<i>Acanthophora congelada</i>	14,65	1,47
	<i>Acanthophora seca</i>	84,6	1,69
ME	<i>Corallina congelada</i>	13,2	1,73
	<i>Corallina seca</i>	29,3	1,86
	<i>Acanthophora congelada</i>	9	1,62
	<i>Acanthophora seca</i>	49,9	1,59



Anexo 2: Limpieza de algas colectadas



Anexo 3: Rotulación de tubos Eppendorf, antes de iniciar el proceso de extracción de ADN