



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE *Tetraselmis* sp., UTILIZANDO EL GEN 18S ARNr”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Previa a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR:**

ELVIS KEVIN CRESPIB BUESTAN

**TUTOR:**

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2019



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE *Tetraselmis* sp., UTILIZANDO EL GEN 18S ARNr”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Previa a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR:**

**ELVIS KEVIN CRESPIB BUESTAN**

**TUTOR:**

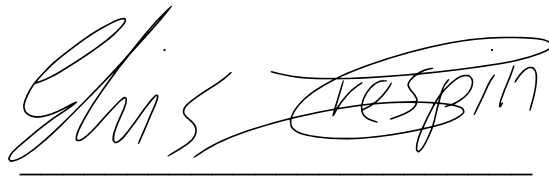
**Blga. JANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2019**

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por las ideas, hechos, investigación y resultados expuestos en este trabajo de titulación, pertenecen exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A handwritten signature in black ink, reading "Elvis Crespín". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath it.

Elvis Kevin Crespín Buestan  
**C.I: 0106651714**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Angelita y Erodí, gracias a su apoyo y esfuerzo quienes me permitieron llegar a cumplir hoy un sueño más, por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía. Además de haberme dado la vida, siempre confiaron en mí porque Dios está conmigo siempre.

## **AGRADECIMIENTO**

A las autoridades y personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

En particular, a la Blga. Janeth Galarza Ph.D., tutora de tesis, porque con sus ideas científicas profesionales oriento nuestro trabajo.

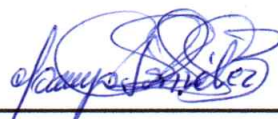
A mis padres, por ser mi pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



---

Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt.  
**Decana (e)**  
**Facultad de Ciencias del Mar**



---

Blga. Tanya González Banchón, Mgt.  
**Directora (e)**  
**Carrera de Biología Marina**



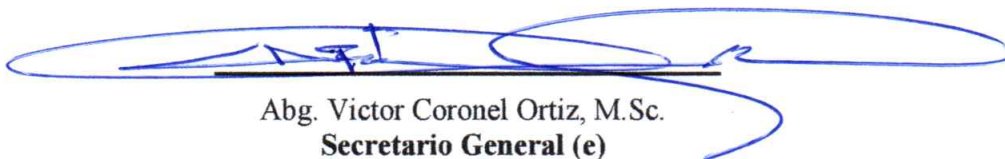
---

Acuic. José Melena Cevallos, Ph.D.  
**Docente de Área**



---

Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.  
**Tutor**



---

Abg. Victor Coronel Ortiz, M.Sc.  
**Secretario General (e)**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	- 7 -
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	- 10 -
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	- 10 -
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 10 -
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	- 11 -
<b>5. MARCO TEÓRICO</b> .....	- 12 -
5.1. MICROALGA: GÉNERO <i>TETRASELMIS</i> .....	- 12 -
5.1.1. <i>Clasificación Taxonómica</i> .....	- 12 -
5.1.2. <i>Características Morfológicas</i> .....	- 12 -
5.1.3. <i>Distribución</i> .....	- 14 -
5.1.4. <i>Importancia</i> .....	- 14 -
5.2. BIOLOGÍA MOLECULAR .....	- 15 -
5.2.1. <i>ADN genómico</i> .....	- 15 -
5.2.2. <i>Extracción de ADN: Fundamento</i> .....	- 15 -
5.2.3. <i>Marcadores moleculares en la identificación de microalgas</i> .....	- 17 -
5.2.4. <i>Diversidad Genética en las microalgas verdes</i> .....	- 19 -
5.2.5. <i>Reacción en cadena de la Polimerasa PCR y sus aplicaciones</i> .....	- 20 -
5.2.6. <i>Mapeo Genético a través de enzimas de restricción</i> .....	- 22 -
<b>6. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	- 24 -
6.1. CEPA Y CULTIVO DE LA MICROALGA .....	- 24 -
6.2. PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	- 24 -
6.2.1. <i>Protocolo Método NaCl</i> .....	- 25 -
6.2.2. <i>Protocolo Método TENS</i> .....	- 25 -
6.3. PURIFICACIÓN DE ADN.....	- 26 -

6.4.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS <i>I8S</i> ARNr Y DISEÑO DE PARTIDORES .....	- 26 -
6.5.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>I8S</i> ARNr .....	- 27 -
6.6.	OBTENCIÓN DEL MAPA DE RESTRICCIÓN <i>IN SILICO</i> DEL GEN <i>I8S</i> ARNr .....	- 28 -
6.7.	OBTENCIÓN DEL MAPA DE RESTRICCIÓN EXPERIMENTAL .....	- 29 -
<b>7.</b>	<b>ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>- 30 -</b>
7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LA MICROALGA (013) .....	- 30 -
7.2.	COMPARACIÓN ADN NO PURIFICADO Y PURIFICADO.....	- 34 -
7.3.	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	- 35 -
7.4.	DISEÑO DE CEBADORES .....	- 36 -
7.5.	AMPLIFICACIÓN POR PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS.....	- 38 -
7.6.	MAPEO DE RESTRICCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO .....	- 40 -
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>- 44 -</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>- 50 -</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1** ADN GENÓMICO DE LA MICROALGA *TETRASELMIS*: CARRIL 1 AL 3 ADN GENÓMICO, ESTABLECIDOS CON EL PROTOCOLO TENS; CARRIL DEL 4 AL 6 ADN GENÓMICO, ESTABLECIDOS CON EL PROTOCOLO NaCl; LAS FECHAS NEGRAS INDICAN EL TAMAÑO DE BANDAS DEL MARCADOR DE PESO (PM: 1Kb INVITROGEN™) ..... - 31 -
- FIGURA 2** ESPECTROGRAMA DE ADN EXTRAÍDO CON EL PROTOCOLO TENS MEDIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UNA LONGITUD DE ONDA  $A_{260/280}$  Y  $A_{260}/A_{230}$  NM (NANODROP 2000CC) ..... - 32 -
- FIGURA 3** ESPECTROGRAMA DE ADN EXTRAÍDO CON EL PROTOCOLO NaCl MEDIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA, RELACIÓN DE ABSORBANCIA  $A_{260/280}$  Y  $A_{260}/A_{230}$  NM (NANODROP 2000cc)..... - 33 -
- FIGURA 4** ESPECTROGRAMA DE ADN PURIFICADO CON EL METODO ACETATO DE SODIO 3M, pH 5,2; MEDIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA, RELACIÓN DE ABSORBANCIA  $A_{260/280}$  Y  $A_{260}/A_{230}$  NM (NANODROP 2000cc). ..... - 34 -
- FIGURA 5** ALINEAMIENTO DE 14 SECUENCIAS DEL GEN ARNr *18S*. **A:** VISTA GENERAL DEL ALINEAMIENTO DEL GEN ARNr *18S* DE DIFERENTES SECUENCIAS DE *TETRASELMIS*; **B:** SITIOS DE HIBRIDACIÓN, LOS CEBADORES FORWARD Y REVERSE (EN VERDE). ..... - 35 -
- FIGURA 6** RESULTADO DE LA PRUBA PRIMER-BLAST EN LA PAGINA WEB (NCBI), UTILIZANDO LOS CEBADORES PM 004 Y TH 101, CON UN PRODUCTO AMPLIFICADO A 1237 PB. .... - 37 -
- FIGURA 7** AMPLIFICACIONES POR PCR CON CEBADORES PM 004 – TH 101 PARA EL MARCADOR ARNr 18S. LOS CARRILES DEL 1 AL 5 REPRESENTAN EL GÉNERO TETRASELMIS; C (-): NEGATIVO; FLECHA NEGRA (DERECHA) INDICA EL TAMAÑO DEL FRAGMENTO; GEL DE AGAROSA AL 1%; PM: FLECHAS NEGRAS (IZQUIERDA) INDICAN EL TAMAÑO DE LAS BANDAS DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR. .... - 38 -
- FIGURA 8** MODELAMIENTO *IN SILICO* DEL PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL GEN ARNr *18S* PRODUCIDOS POR LAS ENZIMA (*Bst*UI, *Rsa*I Y *Msp*I), PM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1 KB. .... - 40 -
- FIGURA 9** MAPEO DE RESTRICCIÓN EXPERIMENTAL DEL GEN ARNr *18S*; *Bst*UI, *Rsa*I Y *Msp*I SON ENZIMAS UTILIZADAS EN LA DISGESTIÓN ; C (-) PRODUCTO NO DIGERIDO; LAS FLECHAS NEGRAS INDICAN EL TAMAÑO DE BANDAS DEL MARCADOR DE PESO (PM: 1Kb INVITROGEN™); GEL DE AGAROSA DEL 1%. .... - 42 -

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b> CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE LOS PROTOCOLOS TENS Y NaCl. .....	- 30 -
<b>TABLA 2</b> PARTIDORES DISEÑADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS 18S ARNr.....	- 36 -
<b>TABLA 3</b> IDENTIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MICROALGAS DEL GÉNERO TETRASELMIS UTILIZADAS EN EL DISEÑO DE LOS PARTIDORES, NÚMERO DE ACCESO EN GENBANK PARA LAS SECUENCIAS DEL GEN ARNr 18S. ....	- 37 -

## **GLOSARIO**

### **ADN complementario (ADNc)**

Molécula de DNA, copiada de un RNA mensajero por medio de la transcripción inversa, debido a esto carece de los intrones presentes en el DNA genómico. La secuencia del ADN complementario permite que el orden de aminoácidos de una proteína sea deducido; La expresión del ADNc en una célula recombinante puede ser utilizada para producir grandes cantidades de esta proteína in vitro.

### **ARN ribosómico (ARNr)**

Moléculas de ARN que forman parte estructural y funcional del ribosoma.

### **ADN polimerasa I**

Enzima que elimina el cebador del ARN al principio de cada fragmento y rellena con los dNTPs apropiados.

### **Banco de secuencias**

Base de datos que contiene una o más secuencias de ADN, ARN o proteínas. Varios de estos bancos son públicos y pueden ser consultados en Internet.

### **Cebador – Partidor (primers)**

Es un oligonucleótido que contiene un grupo extremo 3' libre que es complementario con una cadena de ADN y funciona como punto de inicio para la adición de nucleótidos para copiar la cadena de molde en el PCR.

### **Desnaturalización**

Es el rompimiento de enlaces no covalentes que afectan en el desplegamiento de la cadena polipeptídica, en ácidos nucleicos, se refiere al rompimiento de enlace de hidrógeno entre bases, lo que provoca las dobles cadenas se separan en moléculas de cadena sencilla. El calentamiento o la exposición a ciertos productos químicos producen la desnaturalización, normalmente esto lleva a la pérdida de la función biológica.

### **Mapa de restricción**

Técnica que permite encontrar la secuencia de genes dentro de una molécula de ADN, la molécula de ADN se fragmenta con enzimas de restricción, cada fragmento es secuenciado, después de la molécula completa es fragmentada con otras enzimas de restricción y secuencia repetida, las secuencias obtenidas en ambos casos se comparan entre sí, de tal manera que la secuencia total de genes puede ser determinada.

### **Molde**

Secuencia de ADN que sirve como guía para la síntesis de moléculas de ADNc o ARN, durante la replicación o la transcripción.

### **Endonucleasa**

Una enzima que rompe los ácidos nucleicos en determinados sitios internos de enlace y produce fragmentos de ácido nucleico de distinta longitud.

### **Enzima de restricción**

Una enzima que fragmenta el ADN en sitios muy específicos, estas enzimas que dividen la doble cadena del ADN en fragmentos en determinados sitios en el interior de la molécula.

### **Expresión genética**

Proceso por el cual la información codificada en los genes se convertirá en un fenotipo convertido.

### **Sitio de Restricción**

Lugar-especifico (endonucleasas de restricción) haciendo cortes en la doble banda del ADN.

## ABREVIATURAS

<b>16S</b>	subunidad menor (30S)
<b>18S</b>	Subunidad menor del operón ribosomal
<b>28S</b>	subunidad grande
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARNr</b>	ADN ribosomal
<b>ITS</b>	Región espaciadora interna
<b>ITS-1</b>	Región espaciadora interna 1 localizado entre 18S y 5.8S ADNr
<b>ITS-2</b>	Región espaciadora interna 2 localizado entre 5.8S y 26S ADNr
<b>pb</b>	par de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b><i>rbcL</i></b>	Subunidad mayor del gen de la ribulosa bifosfato carboxilasa
<b><i>tuf A</i></b>	factor de alargamiento del plástido
<b><i>atpB</i></b>	ATP sintasa subunidad beta

## RESUMEN

En el Litoral de la Península de Santa Elena se aisló y cultivó una cepa de microalga (PM-013) que forma parte del Proyecto INCYT-PNF-2017M3112, identificada por taxonomía convencional como *Tetraselmis*. En la mayoría de microalgas el gen ARNr *18S* es utilizado como marcador en la identificación molecular. En este trabajo se utilizó el gen marcador ARNr *18S* para la identificación de la cepa (PM-013), el mismo inició con la amplificación y obtención del mapa de restricción *in silico* mediante herramientas bioinformáticas PRIMER-BLAST *in silico* y NEBcutter v2.0. Mientras que en la parte experimental se realizó la extracción del ADN total aplicando el Protocolo TENS, y para la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron cebadores específicos diseñados en el programa Geneious Prime® 2019. v1.3. El producto de PCR fue digerido con enzimas de restricción. La extracción del ADN alcanzó una concentración de 4344,8 ng/μL y una pureza de 2,05 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Los cebadores PM 004 y TH 101 entregaron un producto de PCR de 1237 pb, el mismo que fue digerido por las enzimas *Bst*U1, *Msp*1 y *Rsa*1 obteniéndose el mapa de restricción experimental. El tamaño de los fragmentos fue corroborado al comparar los mapas de restricción *in silico* y experimental. Los estudios moleculares aplicados indican que la cepa PM-013 es efectivamente *Tetraselmis* sp.

**Palabras clave:** Chlorophyta, mapa de restricción, gen ARNr *18S*, enzimas de restricción.

## ABSTRACT

On the Santa Elena Peninsula coast, was isolated and cultivated a strain of microalgae (PM-013) which is part of the Project INCYT-PNF-2017M3112, identified by conventional taxonomy such as *Tetraselmis*. In most microalgae the ARNr *18S* gene is used as a marker in molecular identification. In this work we used the marker gene ARNr *18S* to identify the strain (PM-013), it started with the amplification and obtaining of the *in silico* restriction map using bioinformatics tools PRIMER-BLAST *in silico* y NEBcutter v2.0. While the experimental part carried out the extraction of total DNA using the TENS Protocol, and for polymerase chain amplification (PCR) specific primers designed in the Geneious Prime® 2019. v1.3. program was used. The PCR product was digested with restriction enzymes. DNA extraction reached a concentration of 4344,8 ng/μL and a purity of 2,05 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. The PM 004 and TH 101 primers delivered a 1237 bp PCR product, the same that was digested by the enzymes *Bst*UI, *Msp*I and *Rsa*I obtaining the experimental restriction map. The size of the fragments was corroborated by comparing the *in silico* and experimental constraint maps. The molecular studies applied indicate that strain (PM-013) is effectively *Tetraselmis* sp.

**Keywords:** Chlorophyta, restriction map, *18S* rRNA gene, restriction enzymes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La microalga verde *Tetraselmis*, es un género muy complejo, comúnmente se la reconoce por ser una célula redondeada con 4 flagelos (Arora, 2016). Exhibiendo una pared celular bastante gruesa de naturaleza orgánica (Cáceres, 2009) y, por lo general, presentan célula elíptica o casi esférica (Guiry & Guiry, 2018) rodeada por una teca, que está compuesta por la unión de varias escamas pequeñas cuadradas producidas en el aparato de Golgi (Lee, 2008), su locomoción es sentido antihorario y en línea recta (Leliaert, y otros, 2012). Los cloroplastos se encuentran rodeados ante una doble envoltura membranosa y su interior se acentúan los tilacoides agrupados en las lamelas, sus pigmentos fotosintéticos son la clorofila a y b, consta de una pigmentación como carotenos y xantofilas, implicados en mecanismos de fotoprotección (Pérez, 2014). En su ambiente natural pueden encontrarse en forma solitaria y coloniales, pueden aparecer en forma de quiste, según sean los entornos medioambientales.

La descripción morfológica y su taxonomía fue primero estudiada por F. Stein en 1878 (Guiry & Guiry, 2018), incluyéndola dentro del Phylum Prasinophytas, y posteriormente por datos moleculares concluyen que pertenece al Phylum de las Chlorophytas (Arora, 2016), que incluye a la clase Chlorodendrophyceae divergentes tempranas. Las Chlorophytas constituyen del linaje verde, y son consideradas el ancestro en común las algas verdes y las plantas superiores, relacionando un parentesco



histórico evolutivo entra ambos (Tragin, Lopes dos Santos, Christen, & Vaultot, 2016). Su morfología abarca desde pequeños microorganismos unicelulares hasta estructuras pluricelulares más complejas, encontrándolas en ambientes marinos y terrestres.

Las Chlorodendrophyceae fueron tradicionalmente consideradas como miembros de las Prasinophytas, pero también compartían varias características con los clados Ulvophyceae, Trebouxiophyceae y Chlorophyceae (Leliaert, y otros, 2012), esta relación fue confirmada por los datos filogenéticos *18S* y multigénicos (Cocquyt, y otros, 2010). Por esta razón actualmente, el género *Tetraselmis* se encuentra clasificado en la Clase Chlorodendrophyceae de las Chlorophytas (Guiry & Guiry, 2018).

A lo largo del tiempo evolutivo, la vida se ha diversificado, pero todas las formas de vida comparten genes y proteínas "universales" que presentan ciertos grados de variabilidad, lo que les permite ser utilizados como marcadores moleculares para acceder a la diversidad biológica (Tragin, Lopes dos Santos, Christen, & Vaultot, 2016), determinando regiones del ADN más idóneas, que destaquen el número de copias por genoma, el nivel de expresión; y si es necesario optar por los marcadores moleculares que interfieren en las relaciones filogenéticas y discriminar las diferentes clases de organismos que componen el Phylum Chlorophyta, para mejorar su identificación y análisis filogenéticas de las microalgas.

En la década de los 90's, la aplicación de los análisis filogenéticos con marcadores moleculares se introdujo en la taxonomía de las algas (Juliet & Lewis, 2007), reportando desde sus inicios incongruencias análisis de identificación con la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos. Utilizando distintos marcadores moleculares como los ITS, *16S*, ARNr *18S*, *28S* ADNr, y los genes *rbcL*, *tuf A*, *atpB* (nucleares, mitocondriales y cloroplastidiales) ayudaron con los análisis filogenéticos que han revelado un gran número de linajes crípticos dentro de un mismo phylum (e.g. *Halimeda incrassata*, *Caulerpa racemosa* y *Codium fragile*) (Ximenes, y otros, 2017).

La información científica demuestra, para hacer la identificación en la división Chlorophyta utilizan diferentes marcadores moleculares tales como, *rbcL*, *ITS1*, *ITS2*, *18S ARNr*, *16S ARNr* (Arora, et al., 2013; Kusumawati, et al., 2015; Turmel, et al., 2016). El gen *18S ARNr* resalta para la identificación de microalgas en general. Mientras, para la identificación molecular de *Tetraselmis* esta descrito la utilización del gen *18S ARNr*, el mismo que es amplificado por PCR usando cebadores específicos para los segmentos flanqueantes, obteniéndose fragmentos entre 500 pb hasta 1,750 de pares de bases, después de un análisis de secuenciación identifican a la microalga como *Tetraselmis* spp. (Arora, Anil, Leliaert, Delany, & Mesbahi, 2013).

La generalidad de los ARNr, son múltiples copias de genes ARNr y al poseer gran cantidad, estas moléculas son fáciles de amplificar mediante la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para la identificación de la secuencia (Gonzalez & Sylvester, 2007). El gen ARNr *18S* es utilizado en estudios filogenéticos y es un marcador importante para amplificar por PCR para el análisis de la identificación molecular. Recientemente, se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen ARNr *18S* en la *Tetraselmis indica* que se han analizado con éxito para su identificación y las relaciones filogenéticas (Arora, Anil, Leliaert, Delany, & Mesbahi, 2013). Además, se fundamenta por utilizar secuencias conservadas de evolución lenta (ARNr *18S*) se efectúa la relación filogenética entre organismos distantes, lo que ayuda a establecer relaciones entre linajes y Phylum (Hillis & Dixon, 1991). Sin embargo, las regiones variables de evolución rápida, (*ITS* y *ETS*) que se utiliza para análisis filogenéticos a nivel de especie, también son ampliamente utilizados por los laboratorios clínicos para la rápida identificación taxonómica de microorganismos (Gonzalez & Sylvester, 2007).

Entonces, la técnica de la PCR en la identificación de un gen marcador se considera ser prometedor, y su principio consiste en amplificar un gen dado (en el presente caso, ARNr *18S*) con cebadores específicos de un grupo taxonómico y monitorear la formación del producto, y el número de copias del gen se deduce del número de ciclos de PCR, observándose bandas con un cierto nivel de fluorescencia en la electroforesis (Zhu, Massana, Not, Marie, & Vaultot, 2005). Para ello, la actividad enzimática del ADN polimerasa que posee la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN, se

relacionan en tres ciclos principales de las que se organiza la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay De Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Para utilizar la técnica de PCR, es fundamental el diseño de cebadores, que son oligonucleótidos que flanquean la región a amplificar. El diseño de cebadores se realiza utilizando secuencias nucleotídicas del gen de interés que son descargadas de la página web NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los cebadores son diseñados de manera que sean complementarios a la molécula de ADN y deben cumplir ciertas condiciones: los cebadores conviene mantenerse entre 15-35 pb y poseer un mínimo del 55% en G+C en toda la secuencia del cebador. Luego debe ser evaluados a través de softwares bioinformáticos como PRIMERS-BLAST, con la finalidad de asegurar que ambos pares de cebadores hibriden entre el molde y las cadenas de doble hélice sean extendidas por la Taq Polimerasa en dirección (5'-3'), evitando la formación potencial de horquilla. (Pinzón, 2007).

Para identificar molecularmente a las microalgas usualmente se basa en la secuenciación por el método de (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Así también existen otras técnicas moleculares como el mapeo genético, mediante la digestión con enzimas de restricción. Esta técnica es a través de un modelamiento *in silico* conociendo sus sitios de restricción, luego con un producto de PCR amplificado se digiere (cortes enzimáticos) al gen de interés, generando fragmentos de diferentes

tamaños y, permitiendo al biólogo molecular determinar la ubicación relativa de secuencias en la molécula de ADN (Hepfer & Turchi, 1989).

Los patrones de restricción se predicen a través de programas bioinformáticos, que luego son confirmados en el laboratorio, midiendo el tamaño y la posición del fragmento observado directamente en un gel de agarosa, visualizado por fluorescencia (František, 2005). En la nueva era del conocimiento, el mapeo de secuencias de ADN, utilizando enzimas de restricción. Así también, la aplicación de la PCR en la amplificación de genes de interés tiene importantes aplicaciones en estudios de genética, biología molecular y biotecnología. Por estos motivos, en el presente trabajo se propone aplicar técnicas moleculares basadas en el estudio del gen ARNr *18S* para la identificación de *Tetraselmis* spp. aislada de la Península de Santa Elena.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La taxonomía tradicional sigue siendo una forma teórica y práctica, aunque contiene una capacidad de incorporar numerosos datos de diversas fuentes, básicamente mantiene un análisis comparativo de caracteres, evaluación de semejanzas entre los organismos, estos datos ayudan a los agrupamientos y clasificación. Aunque, el problema sigue siendo la determinación de la “cantidad de semejanza”, es decir se lo hace *visualmente* y la cantidad de tiempo/dedicación necesaria, para que el taxónomo pueda realizar un trabajo adecuado, y esto no permite analizar con rapidez el conocimiento de la biodiversidad.

Para fortalecer estos conocimientos, los nuevos estudios se han sometido a la revolución molecular basada en el estudio de la molécula del ADN, que empezó desde el año 2000. La nueva era del conocimiento a través de los ordenadores que conduce a la aplicación de técnicas moleculares, primordiales a la hora de identificar un organismo, reuniendo caracteres moleculares (marcadores, secuencias nucleotídicas) utilizando en genes, proteínas, ARNr – ADNr que los codifican.

En la actualidad las herramientas moleculares son una prioridad en la identificación de especies. Es importante porque ayuda a corroborar la información taxonómica existente sobre las microalgas y a su vez permiten descubrir nuevas especies basadas en los marcadores moleculares como ITS nucleares, el *16S*, ARNr *18S*, *28S* ADNr, los

genes *rbcL*, *tuf A*, *atpB* entre otros. En la mayoría de estudios de identificación molecular utilizan el gen ARNr *18S*, debido a que este gen posee una característica de algunas regiones genómicas que presentan poca variabilidad dentro de una especie, por lo tanto, son uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas. De esta manera, se ha logrado identificar bacterias, micro-macro algas y un sin número de organismos marinos, que hasta los mismos taxónomos no habían podido diferenciar a nivel de especie. Así también, la información científica indica que la mayoría de microalgas de la Clase Chlorodendrophyceae han sido identificadas y analizadas sistemáticamente con el gen ARNr *18S*, lo que ha permitido registrar nuevos géneros-especies y sus secuencias forman parte del banco de genes GENBANK (NCBI), donde todo investigador posee fácil acceso a todas las secuencias para iniciar sus estudios moleculares. Por esta razón, en esta investigación se propone utilizar tecnología avanzada para la identificación a nivel molecular de una cepa de microalga identificada taxonómicamente como *Tetraselmis*.

El desarrollo de esta investigación permitirá involucrar estudios de alto nivel y podrá asegurar la identificación de *Tetraselmis* siguiendo métodos y técnicas científicamente comprobadas como son el diseño de cebadores, amplificación del gen ARNr *18S* por PCR y mapeo genético. Lo cual, aportará con los primeros acercamientos a la identificación molecular, del género *Tetraselmis*, ya que hasta el momento solo existen registros basados en la taxonómica tradicional. Además, no existen estudios

moleculares que revelen que especie del género *Tetraselmis* se encuentra distribuidas en las costas ecuatorianas.

En el Ecuador el INOCAR (Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador) ha reportado alrededor de 300 especies de microalgas identificadas a nivel de taxonómica clásica. Por lo tanto, es importante hacer uso de las herramientas moleculares como la PCR y genes marcadores como el ARNr *18S* usando mapeos genéticos a través de las enzimas de restricción para identificar microalgas reportadas como importantes a nivel de biodiversidad o biotecnología. Finalmente, es importante porque se iniciará aplicando técnicas modernas que en otros países lo utilizan de manera cotidiana para los estudios de caracterización molecular de diferentes organismos.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo General**

- Aplicar técnicas moleculares basadas en el estudio del gen *18S ARNr* para la identificación de *Tetraselmis* spp. aislada de la Península de Santa Elena.

#### **3.2.Objetivos específicos**

- Establecer un protocolo de extracción de ADN de alta calidad para análisis genéticos moleculares del gen *18S ARNr*.
- Diseñar cebadores específicos para el gen *18S ARNr* de *Tetraselmis* a partir de secuencias registradas en el GenBank que permitan la amplificación de este gen a través de la PCR.
- Obtener un mapa de restricción específico para el gen *18S ARNr* de *Tetraselmis*, que permita obtener un primer acercamiento a la identificación molecular de la especie.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el gen marcador ARNr *18S* ofrece un estudio eficiente y eficaz en la identificación molecular de microalgas, entonces la utilización del gen ARNr *18S* permitirá el primer acercamiento en la identificación de la cepa (PM-013) aislada de la Península de Santa Elena.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Microalga: Género *Tetraselmis*

Actualmente *Tetraselmis*, corresponde a la siguiente clasificación, tomada de Algaebase por (Guiry & Guiry, 2018):

#### 5.1.1. Clasificación Taxonómica

**Reino:** Plantae.

**Filo:** Chlorophyta.

**Subfilo:** Chlorophytina

**Clase:** Chlorodendrophyceae Massjuk, 2006

**Orden:** Chlorodendrales

**Familia:** Chlorodendraceae.

**Género:** *Tetraselmis* F. Stein, 1878

#### 5.1.2. Características Morfológicas

*Tetraselmis* es un organismo unicelular verde, con células usualmente móviles, de forma elipsoides a ovoides. Son ligeramente curvadas, pero nunca torcidas; con cuatro flagelos idénticos en 2 pares distintos. La célula abarca un solo cloroplasto en forma de copa, con un pirenoide central. Pared celular media a gruesa, más o menos rígida (Guiry & Guiry, 2018).

La reproducción vegetativa es por división del protoplasto dentro de la pared de la célula madre, las células hijas se hinchan completamente antes de la liberación, estos

germinan por división en 4 células y no hay reproducción sexual registrada (Butcher, 1959). Aunque, cuando sus células se enquistan, la posición del surco es una ligera irregularidad o hay un adelgazamiento de la pared celular (Butcher, 1959).

Las especies de *Tetraselmis* por lo general su locomoción es en línea recta, con el ápice en el extremo delantero, el cuerpo, al mismo tiempo, va girando en sentido antihorario (Arora, 2016). Sin embargo, las especies de este género difieren en la forma celular, el tamaño, la presencia o la ausencia de pirenoides, la morfología del cloroplasto, etc., pero muchas de estas características se han descrito de manera deficiente y la taxonomía del género se encuentra en un estado de confusión (Guiry & Guiry, 2018).

Este es un género muy extendido, común y muy variable, una o más de las especies que se han recolectado donde se han tomado muestras. Según Guiry & Guiry, (2018) menciona que dentro de la Familia Chlorodendraceae existen 3 géneros: *Prasinocladus* con 3 especies, *Scherffelia* con 8 especies y *Tetraselmis* con 33 especies. El género a estudiar es eurihalino con un amplio rango de tolerancia. Algunas especies de *Tetraselmis* se producen en el plancton, y algunas aparecen como endosimbiontes en los metazoos, por ejemplo, en el *Acoel turbellarian Convoluta* (Guiry & Guiry, 2018).

### **5.1.3. Distribución**

Este género es cosmopolita, caracterizados por mantenerse en ambientes tanto salinos como dulces, según Macías, et al., (2018) reportado por el Instituto Nacional de Pesca (INP), se reporta la primera floración microalgal de *Tetraselmis*, en la Playa rosada y Salango alcanzando densidades desde 10 000 cel.ml<sup>-1</sup> a 210 000 cel.ml<sup>-1</sup>, su desarrollo y proliferación fue idóneo por la disponibilidad de nutrientes que reflejaron mínimas concentraciones de nitrato < 0,3 µM NO<sub>3</sub> y altos valores a 0,3 y 4,0 µM para fosfato y el silicato, respectivamente.

### **5.1.4. Importancia**

La microalga marina *Tetraselmis* adquiere gran importancia en la actualidad por ser una de las especies más utilizadas en la acuicultura de moluscos y crustáceos, y para su posible utilización se caracteriza por presentar altas tasas de crecimiento y posee proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos en cantidades adecuadas para alimentación de organismos marinos por lo que es muy utilizada en el sector acuícola nacional e internacional (Macías, Coello, & García, 2018). Además de poseer compuestos bioactivos, vitamina E, carotenoides, compuestos fenólicos y terpenos con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas (Macías, Coello, & García, 2018). Y en los últimos años se ha despertado un gran interés por su producción a gran escala (Cid, Abalde, & Herrera, 1992).

## **5.2. Biología Molecular**

### **5.2.1. ADN genómico**

El ácido desoxirribonucleico (ADN), Frederick Miescher fue el primero en observar esta molécula, a finales del siglo XIX, basados en conocimientos biológicos hacen algo único de una especie en general, el ADN es información evolutiva que se transmiten de los organismos a sus descendientes durante su reproducción, presentando componentes fundamentales como una base nitrogenada (adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C)), azúcar y fosfato (Green E. , 2019). Cumpliendo una función principal, que todo el ADN dentro de un gen se transcribe en ARN, pero los segmentos de ARN (denominados intrones) se eliminan y permanecen en el núcleo, mientras que los otros segmentos (llamados exones) se vuelven a unir y salen del núcleo donde se traducen a secuencias de aminoácidos (Plomin & Spinath, 2004).

### **5.2.2. Extracción de ADN: Fundamento**

La extracción de biomoléculas como ADN, ARN y proteínas es el método más crucial utilizado en biología molecular. Es el punto de partida para los procesos como la amplificación de genes. El ADN, el ARN y las proteínas pueden aislarse de cualquier material biológico, como tejidos, células, u otras muestras vivas o conservadas para fines biotecnológicos (Chee & Chin, 2009).

Entonces, el ADN es una molécula integrada por cadenas doble hélice unidas entre sí, están constituidos por un azúcar (desoxirribosa), fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina), la combinación de los estos construyen el esqueleto de la molécula unidas a través de puentes de hidrógeno, la cual conservan la estructura helicoidal (Alejos, Aragón, & Cornejo, 2019).

En el transcurso del tiempo se han venido estandarizando métodos de extracción con el propósito de obtener una concentración y una alta calidad de ADN, para eliminar inhibidores potenciales que interfieren el tratamiento de la molécula (Alejos, Aragón, & Cornejo, 2019). Técnicas clásicas que se formularon en los años 50, fue utilizar solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido aislarlo por precipitación con etanol, bajo estas condiciones ayuda a la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

Estas técnicas en los centros de investigación requieren preparar soluciones y la extracción puede durar unas horas incluso varios días por muchos pasos que deben cumplirse. En general, para una extracción exitosa de los ácidos nucleicos requiere cuatro pasos importantes: la lisis efectiva de las células; desnaturalización; inactivación de las nucleasas, por ejemplo, RNasa para la extracción de ARN y DNasa para la

extracción de ADN, siempre y cuando la pastilla celular esté libre de impurezas y contaminación (Chee & Chin, 2009).

### **5.2.3. Marcadores moleculares en la identificación de microalgas**

Los genes nucleares como *18S*, *ITS1* y *ITS2* y genes de cloroplastos como *rbcl*, *tufA* y *23S* se han utilizado para la identificación molecular de microalgas verdes (Buchheim, y otros, 2011). Por lo tanto, la identificación a nivel de géneros-especies es una función importante para comprender su enfoque genético, porque pueden ser morfológicamente similares pero una composición genética diferente y, por lo tanto, tienen diferentes expresiones de proteínas (Cronberg & Laugaste, 2005). Entre todos los marcadores mencionados, el marcador 18S ARNr se ha utilizado con éxito con mayor precisión (Huss, y otros, 1999) y es un gen conservado (Henriques, Inessa, Carla, & Henriques, 2016). Sin embargo, este método solo puede aplicarse cuando el ADN que se extrae de un monocultivo microalgal, ya que el aislamiento y mantenimiento del cultivo requiere mucho esfuerzo, tiempo significativo, habilidad manual e instalaciones específicas.

Existen otros métodos como la ribosa bifosfato carboxilasa (*rbcl*) que se dirige al gen del cloroplasto, se lo ha utilizado en el estudio de la filogenia, ya que puede ser fácilmente amplificado en organismos fotosintéticos (Wongsawad & Peerapornpisal, 2014). Sin embargo, hay muchos marcadores propuestos para diferentes grupos, como la citocromo oxidasa I (COX I), un marcador oficial para las algas pardas (McDevit &



Saunders, 2010) y diatomeas (Evans, Wortley, & Mann, 2007). Aunque en las microalgas verdes el gen (COX I) es demasiado variable y requiere que los cebadores específicos que puedan diferenciar al taxón, la amplificación de este gen ha fallado para algunos taxones de las Chlorophytas (Henriques, Inessa, Carla, & Henriques, 2016).

Por otra parte, existen algunos estudios utilizando marcadores moleculares de repetición de secuencia inter simple (ISSR) y ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD), ya que los marcadores ISSR son confiables, altamente polimórficos, de bajo costo y menos laboriosos, necesitan solo una pequeña cantidad de ADN y son muy rápidos en comparación con la mayoría de los otros marcadores moleculares. En cambio, la técnica RAPD tiene amplias aplicaciones en reproducción, evolución genética, mapeo genético, genética de poblaciones y es capaz de producir muchos marcadores con bajo costo y alta velocidad (Chikkaswamy & Chandra, 2016).

En el Ecuador se realizó un estudio a nivel molecular de las microalgas Chlorophytas proponiendo amplificar regiones con el gen 18S y ITS, una de la especie a estudiar fue la *Chlorella* sp., los resultados de secuenciación con el 18S encontraron un 100% de similitud con *Chlorella sorokiniana*, pero la máxima identidad encontrada para el gen ITS fueron del 86% con *Micractinium reisseri*, evidenciando que esta microalga puede corresponder al género *Micractinium* (Flores, Maldonado, & Ortiz, 2016).

#### **5.2.4. Diversidad Genética en las microalgas verdes**

A lo largo de la historia, la tierra ha sido testigo de la aparición y desaparición de organismos adaptados a sus entornos contemporáneos y, a veces, estos organismos han modificado profundamente el medio ambiente (Scott, y otros, 2008), por ejemplo, lo que proporciona la oxigenación al océano y la atmósfera son microorganismo fotosintéticas que comenzaron hace unos 3.500 millones de años, y el fitoplancton eucariota adquirió posteriormente un cloroplasto, un orgánulo dentro de la membrana celular y desde ese momento marcó el origen de la fotosíntesis oxigenada en las eucariotas (Yoon, Hackett, Ciniglia, Pinto, & Bhattacharya, 2004).

Al comienzo de su historia evolutiva, los eucariotas fotosintéticos divergieron en dos linajes principales: el linaje verde (que incluye algas verdes y las plantas terrestres) y el linaje rojo (incluidas las diatomeas y los dinoflagelados) (Falkowski, Schofield, Katz, Van de Schootbrugge, & Knoll, 2004). Estos dos linajes se separaron hace aproximadamente 1.100 millones de años según las estimaciones del reloj molecular (Yoon, Hackett, Ciniglia, Pinto, & Bhattacharya, 2004) lo que marca el inicio de la diversificación de algas en el océano. Existe una cantidad de diferencias fundamentales entre los miembros de estos dos linajes, en particular es por su contenido de pigmento, la composición del oligoelemento celular y la composición del gen plastidio (Falkowski, Schofield, Katz, Van de Schootbrugge, & Knoll, 2004).

La historia evolutiva de estos linajes es probablemente mucho más compleja de lo que se pensó originalmente, ya que se ha sugerido que el genoma nuclear de las diatomeas contiene genes verdes (Moustafa, y otros, 2009). Sin embargo, desde el Triásico, los principales grupos de fitoplancton eucarióticos pertenecen al linaje rojo (Falkowski, Schofield, Katz, Van de Schootbrugge, & Knoll, 2004).

Es necesario un conocimiento detallado de la diversidad de microalgas verdes para reconstruir las relaciones filogenéticas dentro del linaje verde. En el medio marino, la diversidad, ecología y distribución del fitoplancton verde es poco conocida, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en grupos como las diatomeas o los dinoflagelados. Finalmente, las algas verdes podrían adquirir importancia económica porque en los últimos años se han desarrollado aplicaciones potenciales en sectores industriales como la acuicultura, las farmacias y los biocombustibles (Mishra, Mandoli, & Jha, 2008).

#### **5.2.5. Reacción en cadena de la Polimerasa PCR y sus aplicaciones**

La PCR es un método revolucionario que se dio a partir de 1983 por Kary Mullis sintetizó esta información existente en una de las herramientas más poderosas de la biología molecular, método para hacer copias ilimitadas de ADN (NCBI, 2017), utilizando un tubo de ensayo, una fuente de calor y algunos reactivos simples como

Agua, PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, cebador *Forward*, cebador *Reverse*, ADN polimerasa.

Sin embargo, en términos técnicos, la PCR se puede definir como un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de secuencias específicas de ADN (en forma pura o mezclas complejas) utilizando dos cebadores oligonucleótidos que hibridan con cadenas opuestas, y flanquean la región de interés en el ADN objetivo (Atawodi, Atawodi, & Dzikwi, 2010).

La PCR está ayudando en la investigación un método estándar en todos los centros de investigación que realizan la amplificación de genes, la reacción en cadena de la polimerasa es utilizada por un amplio espectro de científicos, en una gama cada vez mayor de disciplinas científicas como la microbiología y la biología molecular; permitiendo la determinación y cuantificación de los cambios en la expresión génica, esta técnica han proporcionado una mejor comprensión para el diagnóstico y la investigación científica básica (Debnath, Prasad, & Bisen, 2010).

Por otra parte, la PCR también se usa en laboratorios forenses y es especialmente útil porque solo se requiere una pequeña cantidad de ADN original, por ejemplo, se puede obtener suficiente ADN de una gota de sangre o un solo cabello (Atawodi, Atawodi, & Dzikwi, 2010). Además, la mayoría de los ejemplos de las aplicaciones de la PCR en

la investigación científica puede darse a través de: secuenciación directa de ADN amplificado *in vitro*; Ingeniería de ADN para satisfacer necesidades específicas; Detección de mutaciones; Detección de la expresión génica; Amplificación específica de una especie; Secuencia de ADN mediante PCR inversa; Análisis de secuencias de ADN en gametos individuales y Análisis evolutivo (Atawodi, Atawodi, & Dzikwi, 2010).

#### **5.2.6. Mapeo Genético a través de enzimas de restricción**

Uno de los pasos básicos en los estudios del genoma es la creación de mapas físicos, dicho mapa de una cadena de ADN consiste en la información sobre las ubicaciones de los marcadores, que son subsecuencias cortas específicas (Blazewicz, Kasprzak, Sterna, & Weglarz, 1996).

Hay muchas formas de construir mapas, pero una de ellas es la creación de mapas físicos digiriendo la molécula de ADN con cientos de enzimas de restricción únicas, por lo que los investigadores pueden usar la distribución de estos sitios de reconocimiento en una molécula de ADN para construir un "mapa" de la secuencia, estas enzimas cortan la molécula de ADN dentro de patrones cortos y específicos llamados sitios de restricción (Blazewicz, Kasprzak, Sterna, & Weglarz, 1996), también se las denomina tijeras moleculares debido a su capacidad para generar fragmentos de restricción que terminan con secuencias definidas. Después de la

digestión, se miden las longitudes de los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa y se reconstruye el orden de estos fragmentos, en función de sus longitudes.

Esta técnica requiere una planificación cuidadosa para los mapas de restricción significativos. El primer paso en un experimento de mapeo es identificar los tamaños de los fragmentos de restricción que se generarán a partir de una molécula de ADN con diferentes enzimas.

Una variedad de programas bioinformáticos que generan estos mapas de restricción *in silico* proporcionando datos tabulares con detalles sobre las longitudes y posiciones de los fragmentos de restricción en la secuencia de ADN. La lista de enzimas que cortan una secuencia particular siempre es impresionante, pero solo unas pocas enzimas suelen resultar prácticas para el experimento.

## **6. MARCO METODOLÓGICO**

### **6.1. Cepa y cultivo de la microalga**

La muestra corresponde a la cepa PM-013 de la colección del proyecto (INCYT-PNF-2017M3121), su medio de cultivo está desarrollado a base de un Fertilizante agrícola, seguido de una solución de metasilicatos, más la preparación de vitaminas (biotina + tiamina 1ml /l), cada una de las soluciones fueron colocadas en relación de 1 ml/L para el crecimiento de la microalga y obtención de biomasa, 1 L de cultivos se mantuvieron por triplicado durante 6 días bajo las siguientes condiciones: temperatura de 22 a 25°C con fotoperiodo luz/oscuridad (12H/12H), la biomasa fue obtenida mediante centrifugación a 13.000 rpm por 8 minutos y almacenadas a -20°C.

### **6.2. Pruebas de Extracción de ADN genómico**

Para la extracción de ADN se probaron 2 protocolos de extracción i) Técnica de extracción por NaCl modificado (Aljanabi & Martinez, 1997) y ii) Técnica de extracción por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCI) modificado (Green & Sambrook, 2012). Los 2 métodos fueron evaluados de acuerdo a su concentración y pureza.

### **6.2.1. Protocolo Método NaCl**

*Protocolo modificado de extracción con NaCl* (Aljanabi & Martinez, 1997) con 1 g de muestra de *Tetraselmis* en tubos eppendorf se trataron con 600 µL de tampón de extracción y 70 µL de SDS (dodecilsulfato sódico) que se incubó a 55°C por 15 minutos. Luego, se adicionó 200 µL de NaCl 5M, y fueron centrifugados a 10.000 rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, y se agregaron 700 µL de etanol al 95% y se dejó reposar. Las muestras fueron centrifugadas, descartando el sobrenadante y se comenzó el lavado adicionando 800 µL de etanol frío al 70%. Inmediatamente fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se procedió al secado. Finalmente, la pastilla celular fue resuspendido entre 30 y 50 µL de Agua UltraPure™. La calidad y cantidad del ADN genómico extraído se lo evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y NANODROP 2000cc, respectivamente y finalmente se conservó a -20°C.

### **6.2.2. Protocolo Método TENS**

*Protocolo de extracción TENS* (Green & Sambrook, 2012) *modificado con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico* (FCI), a un 1 g de muestra de *Tetraselmis* se trataron con 400 µl de buffer TENS, más 2 µl de proteinaza K y se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se añadió 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo: isoamil alcohol (24:1). Las muestras fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos. Luego, se



transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf con 500 µl de etanol al 95% helado y se lo dejó reposar en el congelador por 1 hora. Se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos (se precipitó el ADN). La pastilla celular fue lavada con 300 µl de etanol al 75% helado. Finalmente, se resuspendieron con 50 µl de Agua UltraPure™, y se conservó a -20°C.

### **6.3. Purificación de ADN**

La purificación de ADN se aplicó mediante el método de  $C_2H_3NaO_2$  (3M, pH 5,2), es una sal que ayuda la precipitación y la limpieza del ADN (Rocha, 2002). Por cada 100 µl de ADN se colocó 10 µl de  $C_2H_3NaO_2$ . Luego se añadió 250 µl de etanol al 95% helado y se lo dejó reposar en el congelador a -20°C por 1 hora. Se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos (se precipitó el ADN). La pastilla celular fue lavada con 250 µl de etanol al 75% helado. Finalmente, se resuspendieron con 40 µl de Agua UltraPure™.

### **6.4. Análisis de secuencias 18S ARNr y Diseño de partidores**

Los cebadores para la identificación del gen *18S* fueron diseñados a partir de 14 secuencias nucleotídicas de la base de datos GENBANK (NCBI) con los códigos de acceso descritos (**Tabla 2**), y el alineamiento de las secuencias se ejecutó con ClustalW

Alignment v2.0.12 (Julie, Toby, Frédéric, François, & Desmond, 1997) implementado en el software Geneious Prime® 2019. v1.3.

Los pares de cebadores fueron: PM-004 *Forwards* (5'-AGAAACGGCTACCACATCCA -3') y TH101 *Reverse* (Yáñez, 2011) modificado para ser un cebador específico (5'- TGTACAAAGGGCAGGGACGTAATC-3') evaluados en Oligo Calculator version 3.27 (Kibbe, 2007). Finalmente, para que los cebadores diseñados garanticen ampliar el gen *18S ARNr* se utilizará la herramienta PRIMER – BLAST *in silico* (NCBI).

### **6.5. Amplificación del gen *18S ARNr***

El gen *18S ARNr* fue amplificado por PCR usando el protocolo descrito por (Yáñez, 2011). La preparación de la mezcla para la PCR descrita por (Yáñez, 2011) fue la siguiente: Buffer 1X, 0,2 mM de dNTPs, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.125 mM de cada cebador, 1 U *Taq* DNA Polymerase (INVITROGEN) y 1 µl de ADN. La PCR fue realizada en un termociclador T100 thermal cycler (Bio-Rad) utilizando como programa una denaturación inicial de 94°C por 10 min seguido por 35 ciclos (94°C por 40 s, 61±4°C por 30 s, 72°C por 1 min 30 s) y una elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en agarosa 1% y con BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) a 100 volts por 1 hora (Olmos, Paniagua, & Contreras, 2000). El gel teñido con SYBR™ Green PCR Master Mix fue visualizado en un

Transiluminador UV y el registro de imágenes de los geles se llevó a cabo empleando el smartPhone IOS 13 y Nikkor 3300.

#### **6.6. Obtención del mapa de restricción *in silico* del gen *18S* ARNr**

El producto de PCR fue digerido por las enzimas de restricción previamente obtenidas a partir del mapa *in silico*, con la herramienta bioinformática NEBcutter v2.0 (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003) disponible para poder corroborar la identificación molecular del género *Tetraselmis*.

Las enzimas de restricción que fueron seleccionadas: *Bst*UI, *Msp*I y *Rsa*I con NEBcutter v2.0 (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003), mostraron patrones de restricción que pueden ser reproducidos y comprobados a través de una digestión, cada enzima se preparó individualmente con un volumen final de 30 µL, el protocolo de digestión siguió instrucciones de la casa comercial de las enzimas (INVITROGEN). La digestión se trató con 10 µl del producto de PCR *18S*, inmediatamente se añadió 5 µl 10x Buffer TANGO, seguidamente se aforó 14.6 µl de Agua UltraPure™. Finalmente, se colocó 0,4 µl de la enzima, incubados a 37°C por 2 horas en el T100 thermal cycler (Bio-Rad). Los productos digeridos fueron separados en el gel de agarosa al 1%, con tinción de SYBR® Green y visualizados en un Transiluminador con UV.

## **6.7. Obtención del mapa de restricción experimental**

La identificación de *Tetraselmis* se realizó comparando los mapas de restricción *in silico* y experimental con las enzimas de restricción *BstUI*, *MspI* y *RsaI*. La comparación de los tamaños de los fragmentos obtenidos indicó la veracidad de los resultados.

## 7. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 7.1. Extracción de ADN genómico de la microalga (013)

Se realizaron seis extracciones de ADN, tres de ellas con el protocolo modificado TENS y tres con el protocolo modificado NaCl. La calidad de extracción se fundamentó en la alta concentración  $> 1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de ADN, mientras que la pureza óptima se evaluó en la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280} \text{ nm}$  entre los valores cercanos de 1,8 a 2,0 y  $A_{260}/A_{230} \text{ nm}$  en los valores cercanos de 2,0 a 2,2 (Pinto, 2015).

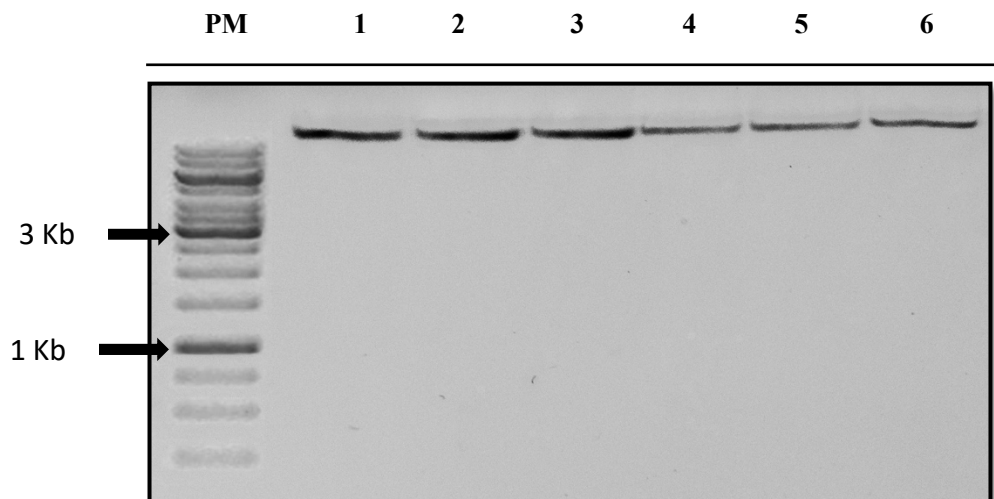
La extracción del Protocolo TENS dio como resultado valores de concentración entre  $3115,9 \text{ ng}/\mu\text{L} - 4344,8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  y una pureza óptima de 1,7 – 2,0. Este resultado significa que el protocolo resultó ser efectivo y eficiente. Mientras que la extracción del Protocolo NaCl resultó una concentración entre  $524,6 - 1899,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$  y con una pureza óptima de 1,8 – 2,0 (**Tabla. 1**). A pesar de ser menos concentrado el ADN, la pureza fue óptima.

**Tabla 1** Concentración y pureza del ADN extraído a partir de los protocolos TENS y NaCl.

Muestras de <i>Tetraselmis</i>	TENS		Muestras de <i>Tetraselmis</i>	NaCl	
	Relación $A_{260}/A_{280}$	[C] ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )		Relación $A_{260}/A_{280}$	[C] ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )
<b>1</b>	$1,66 \pm 0,08$	4344,8	<b>4</b>	$2,09 \pm 0,08$	1899,0
<b>2</b>	$1,90 \pm 0,05$	4519,4	<b>5</b>	$1,92 \pm 0,06$	1304,9
<b>3</b>	$2,05 \pm 0,06$	3115,9	<b>6</b>	$1,84 \pm 0,07$	524,6

De acuerdo al análisis de la varianza de un factor, la concentración de ADN resulta, que la implementación de los dos Protocolos TENS y NaCl existen diferencias significativas ( $0,01 < 0,05$ ). En cambio, su pureza de ADN utilizando ambos protocolos mencionados anteriormente no se encontraron diferencias significativas ( $0,586 < 0,05$ ).

Los dos protocolos de extracción dieron como resultado una buena concentración de ADN (mayor a  $1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) y una pureza de calidad para estudios moleculares. La integridad del ADN fue evaluada en un gel de agarosa, notándose que efectivamente la extracción de ADN aplicando los dos protocolos, resultó ser eficiente (**Fig. 1**).

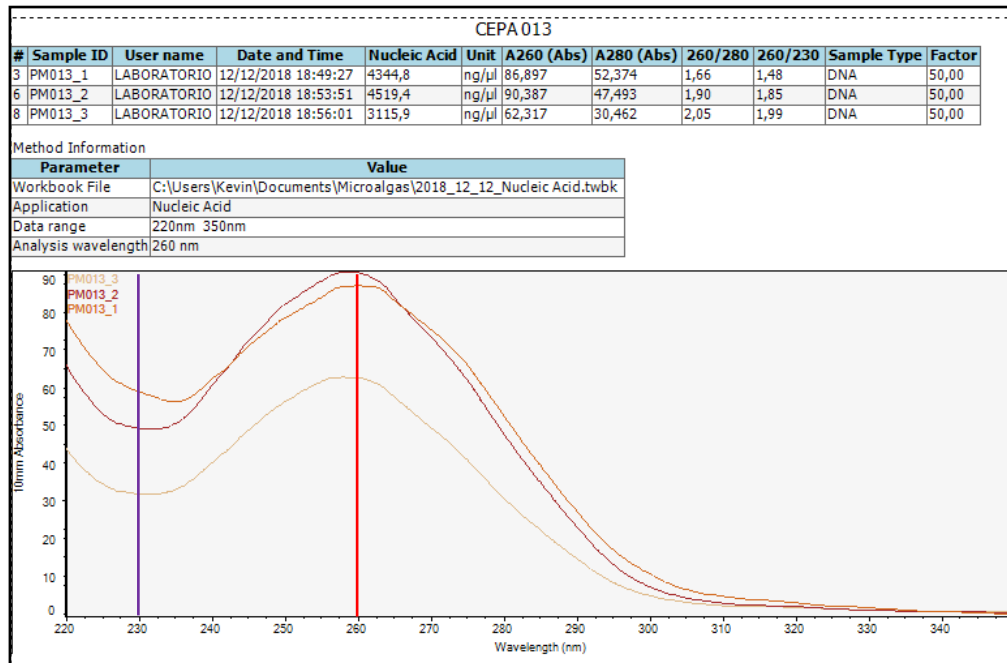


**Figura 1** ADN genómico de la microalga *Tetraselmis*: Carril 1 al 3 ADN genómico, establecidos con el Protocolo TENS; Carril del 4 al 6 ADN genómico, establecidos con el protocolo NaCl; las flechas negras indican el tamaño de bandas del marcador de peso (PM: 1Kb INVITROGEN™)

Sin embargo, los valores obtenidos en el protocolo de NaCl mostraron una mejor pureza entre 1,8 – 2,0 como se demuestra en el gel de agarosa en la Figura 1, con bandas

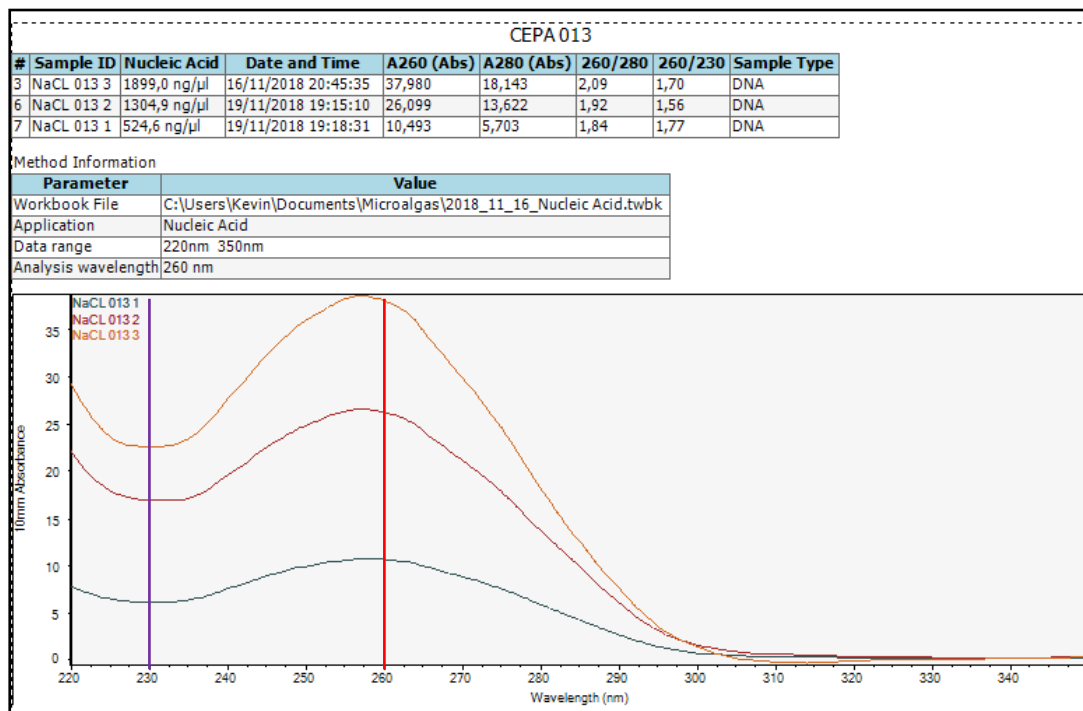
fuerzas carriles 1 - 3 con el protocolo TENS y bandas débiles carriles 4 – 6 con el protocolo NaCl.

La calidad y pureza del ADN extraído con el Protocolo TENS fue medida por espectrofotometría. Resultando un espectrograma en la relación de absorbancia vs longitud de onda, las 3 muestras presentaron un pico promedio de 1,87 en cuanto a su relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  nm demostrando una pureza óptima. Aunque, en la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{230}$  nm presentó un valor promedio entre las 3 muestras de 1,77 este resultado significa que hay sustancias contaminantes presentes en la solución de ADN (**Fig. 2**).



**Figura 2** Espectrograma de ADN extraído con el protocolo TENS medido por espectrofotometría en relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  nm (NANODROP 2000cc)

Por lo tanto, la concentración y pureza del ADN extraído con el Protocolo NaCl resultó en el espectrograma en la relación de absorbancia vs longitud de onda, las 3 muestras presentaron un pico promedio 1,95 en cuanto a su relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  nm mostrando una pureza óptima. Sin embargo, la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{230}$  nm presentó un valor promedio entre las 3 muestras de 1,68 resultando que hay sustancias contaminantes presentes en la solución de ADN (**Fig. 3**)

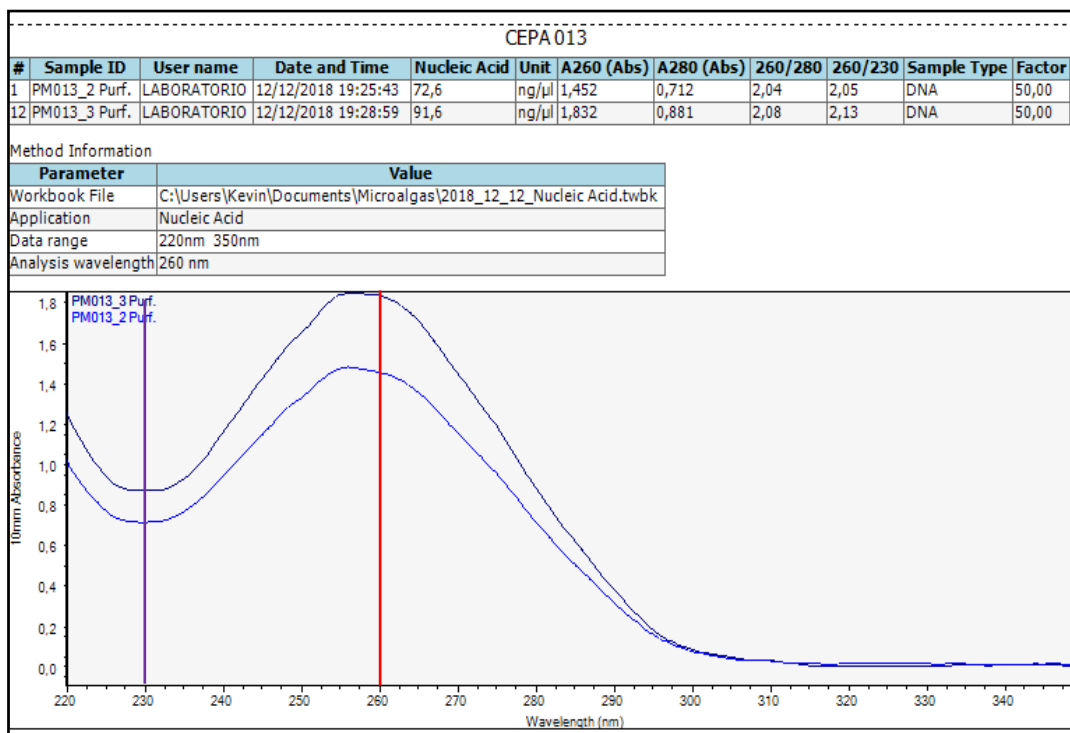


**Figura 3** Espectrograma de ADN extraído con el protocolo NaCl medido por espectrofotometría, relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  nm (NANODROP 2000cc).



## 7.2. Comparación ADN no purificado y purificado

Al haber presencia de contaminantes en las muestras (PM013 2) - (PM013 3) de ADN del protocolo TENS, que resultaron tener altas concentraciones de 4344,8 ng/μL – 3115 ng/μL y baja pureza de acuerdo a la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{230}$  con 1,85 – 1,99, ambas muestras se trató con el método de  $C_2H_3NaO_2$  (3M, pH 5,2), resultando obtener una pureza óptima de 2,04 (PM013 2) y 2,08 (PM013 3) en relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  nm y  $A_{260}/A_{230}$  nm alcanzó una pureza óptima de 2,05 (PM013 2) y 2,13 (PM013 3) demostrado en el espectrograma de la figura 4.



**Figura 4** Espectrograma de ADN purificado con el método acetato de sodio 3M, pH 5,2; medido por espectrofotometría, relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  nm (NANODROP 2000cc).

### 7.3. Alineamiento de Secuencias

Para establecer una relación genética entre el género a estudiar se seleccionaron especies relacionadas al género *Tetraselmis*, se tomaron 14 secuencias del gen ARNr ribosomal *18S* desde el GENBANK (NCBI, 2017) (Tabla. 3), estas secuencias fueron importadas en formato fasta para ser analizadas en el programa Geneious Prime® 2019. v1.3. La alineación con ClustalW Alignment v2.0.12 demostró que las secuencias



**Figura 5** Alineamiento de 14 secuencias del gen ARNr *18S*. **A:** Vista general del alineamiento del gen ARNr *18S* de diferentes secuencias de *Tetraselmis*; **B:** Sitios de hibridación, los cebadores Forward y Reverse (en verde).

presentaban un rango de conservación entre los 380 a 1680 pb. Sobre la base de conservación entre las diferentes secuencias alineadas, se diseñó un conjunto de cebadores conservados y específicos (PM 004, TH101) que se utilizaron para la identificación del género *Tetraselmis* (Fig. 5).

#### 7.4. Diseño de Cebadores

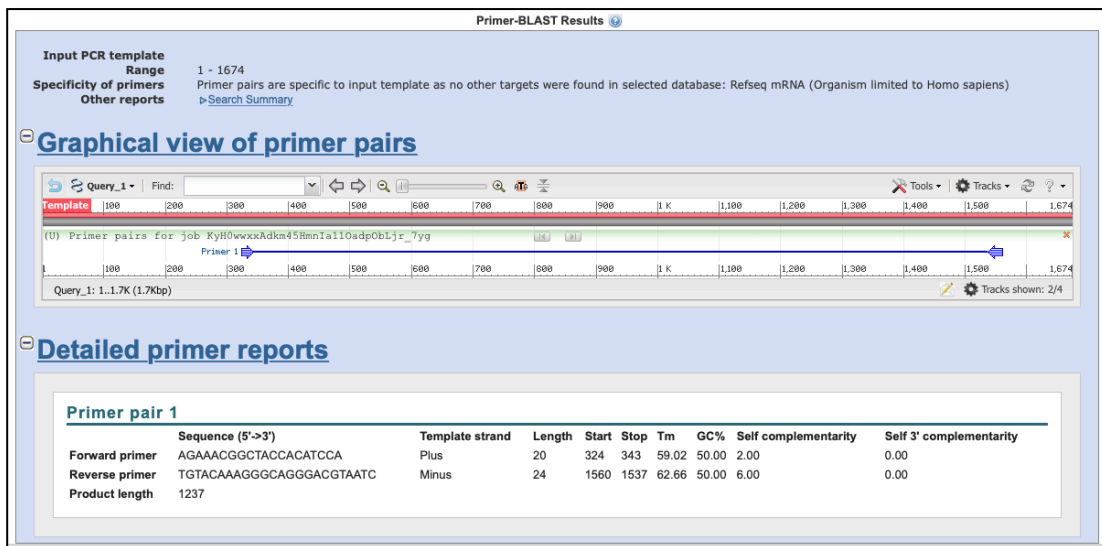
Los cebadores PM-004 *Forward* (5'- AGAAACGGCTACCACATCCA -3') y TH101 *Reverse* (Yáñez, 2011) modificado (5'- TGTACAAAGGGCAGGGACGTAATC-3') se diseñaron a partir del número de nucleótido 380 al 1680 pb de la secuencia conservada, respectivamente. El análisis *in silico* de la especificidad de los cebadores cumplieron las condiciones y parámetros de diseño (Tabla. 2).

**Tabla 2** Cebadores diseñados para la amplificación de las secuencias *18S* ARNr

Región de ADN	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Largo (pb)	G+C (%)	Tm <sup>1</sup> (°C) Teórico	Ta <sup>2</sup> (°C) usado en este estudio	Tamaño del amplicón (pb)
<i>18S</i>	PM 004 F	AGAAACGGCTACCACATCCA	20	50	59	61	1237
	TH 101 R	TGTACAAAGGGCAGGGACGTAATC	24	50	62		

<sup>1</sup>Tm: temperatura de desnaturalización  
<sup>2</sup>Ta: temperatura de hibridación

Además, una amplificación *in silico* en el PRIMERS – BLAST, estos cebadores generaron un producto de PCR a 1237 pb teniendo como templado o molde una secuenciación de *Tetraselmis* (Fig. 6).



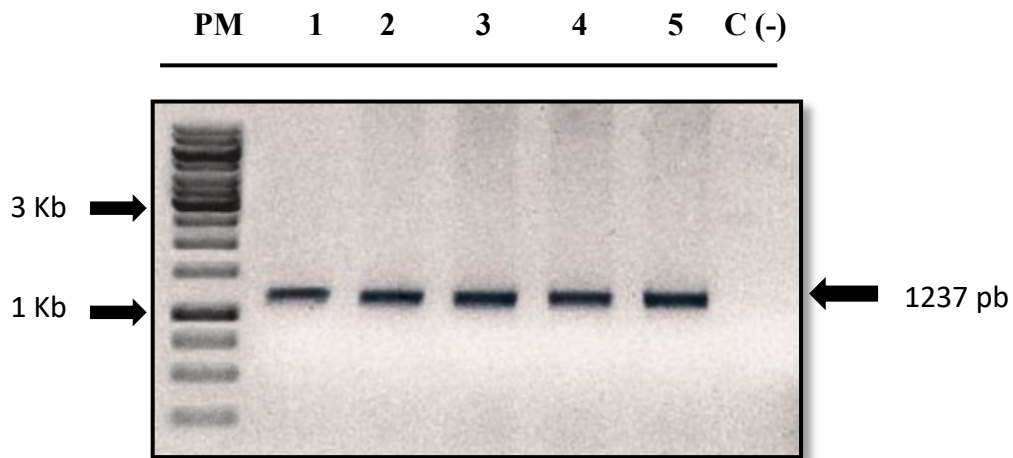
**Figura 6** Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web (NCBI), utilizando los cebadores *PM 004* y *TH 101*, con un producto amplificado a 1237 pb.

**Tabla 3** Identificación de las secuencias de microalgas del género *Tetraselmis* utilizadas en el diseño de los partidores, número de acceso en GenBank para las secuencias del gen ARNr *18S*.

Organismo	GenBank	Loci	Lugar de origen	Tamaño (pb)	Autor
<i>Tetraselmis chuii</i>	JN903999.1	Nc. 18S	Europa - Chequia	1751	Hasikova, T. (2017)
<i>Tetraselmis suecica</i>	JF489949.1	Nc. 18S	España - Pontevedra	1674	Alonso, M <i>et al.</i> , (2012)
<i>Tetraselmis chuii</i>	FJ559401.1	Nc. 18S	Korea - Busan	1642	Lee, H., (2009)
<i>Tetraselmis sp.</i>	KT860859.1	Nc. 18S	Francia – Roscoff	1622	Le Gall, F <i>et al.</i> , (2015)
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	KU561107.1	Nc. 18S	China - Guangdong	1719	Yang, X <i>et al.</i> , (2017)
<i>Tetraselmis carteriiiformis</i>	FJ559384.1	Nc. 18S	Korea - Busan	1641	Lee, H., (2009)
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	FJ559380.1	Nc. 18S	Korea - Busan	1641	Lee, H., (2009)
<i>Tetraselmis striata</i>	JQ315739.1	Nc. 18S	Korea - Busan	1674	Lee, H., (2009)
<i>Tetraselmis sp.</i>	GQ917221.1	Nc. 18S	Sur Korea	1674	Lee, H., (2009)
<i>Tetraselmis convolutae</i>	U05039.1	Nc. 18S	USA - Ángeles	1804	de Jesús, M.D., (1994)
<i>Tetraselmis sp.</i>	KT860880.1	Nc. 18S	Francia – Roscoff	1628	Le Gall, F <i>et al.</i> , (2015)
<i>Tetraselmis sp.</i>	AJ431370.2	Nc. 18S	India - Maharashtra	1701	Nasare, K.S., (2011)
<i>Tetraselmis marina</i>	KY045847.1	Nc. 18S	España - Pontevedra	1669	Rial, D <i>et al.</i> , (2017)
<i>Tetraselmis sp.</i>	HQ651184.1	Nc. 18S	Reino Unido	1626	Arora, M <i>et al.</i> , (2011)

### 7.5. Amplificación por PCR con cebadores específicos

Los cebadores PM 004 y TH 101 amplificaron un producto de 1237 pb estos resultados obtenidos demostraron claramente que el gen ARNr *18S* estaba presente en el género *Tetraselmis* (013), confirmando que los cebadores diseñados en este estudio son altamente específicos para el género *Tetraselmis*. El gel de agarosa presentó el producto de PCR con el tamaño esperado de 1237 pb, tal como se lo predijo en el PRIMER – BLAST *in silico* (Fig. 7). Solo se obtuvo una secuencia de nucleótidos que corresponde al gen ARNr 18S, consiguiéndose específicamente 1237 pb, que 1674 pb representan el 100% de la longitud promedio del amplicón (pb) de las 14 secuencias, y el 74% representa su cobertura para la identificación de la cepa 013 *Tetraselmis*.

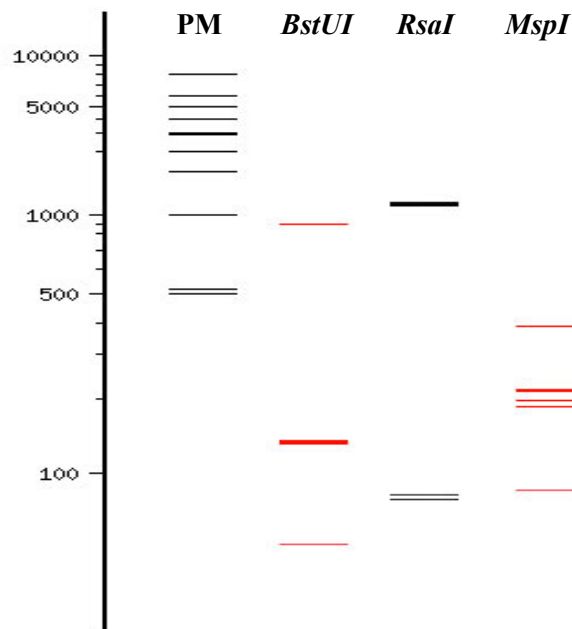


**Figura 7** Amplificaciones por PCR con cebadores PM 004 – TH 101 para el marcador ARNr *18S*. Los carriles del 1 al 5 representan el género *Tetraselmis*; C (-): negativo; flecha negra (derecha) indica el tamaño del fragmento; gel de agarosa al 1%; PM: flechas negras (izquierda) indican el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular.

Para el diseño de los cebadores específicos, algunos estudios (Fawley & Fawley, 2004; Lee & Hur, 2009; Yáñez, 2011) recomiendan realizar los alineamientos a base de las secuencias del servidor GENBANK (NCBI), secuencias conservadas que contienen al gen ARNr *18S*. Sin embargo, Yáñez, (2011) en su estudio demostró con el diseño de cebadores degenerados “universales” para amplificar el gen ARNr 18S, con secuencias del Phylum Chlorophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Bacillariophyta y Rhodophyta ha logrado amplificar el gen ARNr 18S con 1230 pb en la microalga *Tetraselmis suecica*. De forma similar, en nuestro caso los resultados demostraron con el diseño de cebadores específicos para el género *Tetraselmis*, PM 004 y TH 101 se logró amplificar el gen ARNr 18S, con 1237 pb, tal como lo demuestra Yáñez, (2011) con 7 nucleótidos de diferencia. Por otra parte, existen estudios con diferentes microalgas, que logran amplificar el gen ARN *18S*, por ejemplo: Baskara, et al., (2018) obtuvo un amplicón de 1200 pb en *Tetraselmis striata*, Chin, et al., (2018) logró amplificar el gen con 1500 pb en *Pyrodinium bahamense*, Olmos, et al., (2000) con diferentes cepas de *Dunaliella* logró obtener un producto de PCR del gen con un tamaño de 2170 pb. Estas comparaciones nos revelan que los tamaños del gen ARNr 18S oscilan alrededor de las 2500 pb (Cruz, 2012). Por esta razón, queda demostrado que se logró amplificar el ADN genómico del género *Tetraselmis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## 7.6. Mapeo de restricción del producto amplificado

Una vez obtenido el producto de PCR, se procedió a obtener un modelamiento *in silico* del patrón de restricción con el programa NEBcutter 2.0. Las enzimas de restricción seleccionadas fueron *Bst*UI, *Rsa*I y *Msp*I, enzimas que tuvieron más de dos cortes en la secuenciación del gen ARNr *18S*. La figura 8 indica el modelamiento *in silico* del mapa de restricción con las enzimas seleccionadas.



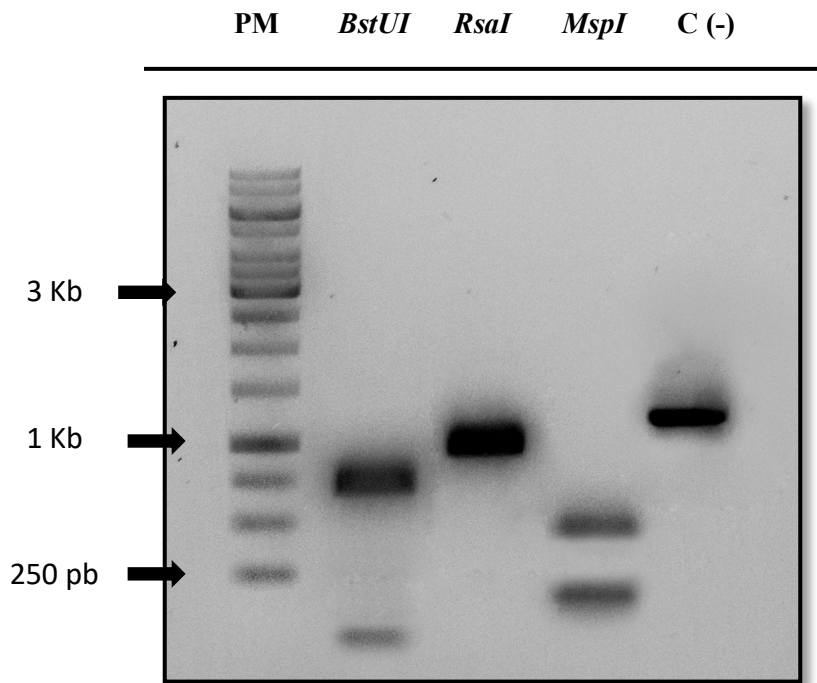
**Figura 8** Modelamiento *in silico* del patrón de restricción del gen ARNr *18S* producidos por las enzima (*Bst*UI, *Rsa*I y *Msp*I), PM: marcador de peso molecular 1 Kb.

Una vez obtenido el mapa *in silico*, se procedió a lo experimental resultando el mapa de restricción esperado. Al comparar los mapas de restricción *in silico* y experimental se corroboró el tamaño de los fragmentos resultantes, así: *Bst*UI realizó cuatro cortes,

la cual solo tres cortes fueron visibles en el gel de agarosa, una banda de 889 pb y dos bandas de 140 - 142 pb solapadas. La enzima *RsaI* realizó 3 cortes siendo visibles una sola banda de 1114 pb. La enzima *MspI* realizó cinco cortes, eran visibles dos bandas, una de 381 pb y seguida de tres bandas solapadas que fueron de 211 – 193 – 169 pb. Se debe considerar que algunos cortes que se digirieron con las tres enzimas, no fueron posibles de visualizar las bandas, debido al tamaño de los fragmentos eran de pequeño peso molecular bajo de 100 pb.

El tamaño de los fragmentos obtenidos de manera experimental confirmó que la cepa de la microalga 013 analizada en este estudio es efectivamente *Tetraselmis*. Así se determina que, para estudios de identificación de un organismo, los cebadores específicos para el gen ARNr *18S* digerido con enzimas de restricción son técnicas moleculares altamente confiables y fácilmente manejables en laboratorios básicos de biología molecular.





**Figura 9** Mapeo de restricción experimental del gen ARNr *18S*; *Bst*UI, *Rsa*I y *Msp*I son enzimas utilizadas en la digestión ; C (-) producto no digerido; las flechas negras indican el tamaño de bandas del marcador de peso (PM: 1Kb INVITROGEN™); gel de agarosa del 1%.

## 8. CONCLUSIONES

El protocolo eficiente para la extracción de ADN de la microalga *Tetraselmis* fue el Protocolo TENS propuesto por (Green & Sambrook, 2012). Con éste se obtuvo un mejor rendimiento en la extracción, con una alta concentración de 4344,8 ng/ $\mu$ L y una pureza óptima de 2,05. Sin embargo, el protocolo de NaCl es una técnica que mostró ventajas en cuanto a sencillez, rapidez, reproducibilidad y seguridad para el investigador, ya que no requiere la exposición a solventes orgánicos peligrosos.

Los cebadores específicos PM-004 *Forward* (5' - AGAAACGGCTACCATCCA - 3') y TH101 *Reverse* (5' - TGTACAAAGGGCAGGGACGTAATC-3'), cumplieron las características de diseño, con un 50% de G+C, Tm de 61°C para amplificar un producto de 1237 pb del gen *18S* ARNr. Lo cual, condujo a identificar a nivel de género a la microalga *Tetraselmis*.

Finalmente, la comparación en mapa de restricción *in silico* y el mapeo de restricción experimental, con las enzimas *Bst*UI, *Rsa*I y *Msp*I, resultaron con tamaños de fragmentos iguales. Este hecho, permitió confirmar que la microalga cepa 013 efectivamente pertenece al género *Tetraselmis*.

## 9. RECOMENDACIONES

Obtener la secuenciación de la microalga *Tetraselmis*, ayudaría con la comparación de todas las secuencias en el servidor del NCBI, para interferir en relaciones estructurales o evolutivas, y de este modo identificar nuevas especies con distintos genes.

En cuanto al patrón de restricción se puede realizar otro modelamiento *in silico* con otras enzimas de restricción para distinguir familias y géneros.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alejos, L., Aragón, M. d., & Cornejo, A. (2019). Extracción y purificación de ADN. México: Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, México D.F., México C.P. 09340.
- Aljanabi, S., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(1), 4692-4693.
- Arora. (2016). Tetraselmis: Introducción. *The Botanica*, 155-175.
- Arora, M., Anil, A., Leliaert, F., Delany, J., & Mesbahi, E. (2013). Tetraselmis indica (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *European Journal of Phycology*, 48(1), 61–78.
- Atawodi, S., Atawodi, J., & Dzikwi, A. (2010). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review . *Sahel Medical Journal*, 13(2), 54-63.
- Baskara, A., Jayakumar, T., Ganasan, M., Mohan, N., Senthil, C., Nagaraj, S., . . . Chang, C. (2018). Mass cultivation of new algae Tetraselmis straiata BBRR1 under open raceway ponds for biodiesel and biocrude production. Tamil Nadu, India: Preprints.
- Blazewicz, J., Kasprzak, M., Sterna, M., & Weglarz, J. (1996). Selected combinatorial optimization problems arising in molecular biology. *Ricerca Operativa*, 80, 35–63.
- Buchheim, M., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F., Merget, B., & Wolf, M. (2011). Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLOS ONE*, 6, 1-10.
- Butcher, R. (1959). *An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters* (4ª edición ed.). London: Fishery Investigations.
- Cáceres, S. (2009). *Aislamiento Y Caracterización De Las Principales Microalgas Presentes En El Sistema Hidropónico Del Tipo Raíz Flotante*. Recuperado el 10 de Junio de 2018, de Repositorio Universidad de Chile: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/117608/Scarlett%20Cáceres.pdf?sequence=1>
- Chaney, L., Sharp, A., Evans, C., & Udall, J. (2016). Genome Mapping in Plant Comparative Genomics. *Trends in Plant Science*, 21(9), 770–780.
- Chee, S., & Chin, B. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 574398, 2-9.
- Chikkaswamy, K., & Chandra, R. (2016). Molecular Distinction of Algae using Molecular Marker. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 5(9), 489-495.

- Chin, W., Teoh, P., Anton, A. & Kumar, S., 2018. Molecular Characterization And Identification Of Ribosomal Dna Sequences Of A Harmful Algal Bloom Species, *Pyrodinium Bahamense* Var. *Compressum*. *Biotechnology Research Institute*, 1(1), pp. 1-8.
- Cid, A., Abalde, J., & Herrera, C. (1992). Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos. *Cah. Biol. Mar.*, 33(33), 169-178.
- Cienfuegos, A., Conn, J., Gomez, G., & Correa, M. (2008). Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev Biomed*, 19(1), 35–44.
- Cocquyt, E., Gile, G., Leliaert, F., Verbruggen, H., Keeling, P., & Clerck, O. (2010). Complex phylogenetic distribution of a non-canonical genetic code in green algae. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 2-9.
- Cronberg, G., & Laugaste, R. (2005). *New species of Uroglena and Ochromonas (Chromulinales, Chrysophyceae) from Estonia*. (vol. Suppl. 128 ed.). Estonia: J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung.
- Cruz, J., 2012. *Comparación De Genes De Arn Ribosomal 18s De Tres Cepas Del Género Euglena: E. Pailasensis, E. Mutabilis Cpcc293 y Una Euglena Encontrada En Un Riachuelo Ácido Del Parque Nacional Volcán Rincón De La Vieja*. Cartago: Instituto Tecnológico De Costa Rica.
- Debnath, M., Prasad, G., & Bisen, P. (2010). Polymerase Chain Reaction. *Omics Technology*(9), 129-152.
- Evans, K., Wortley, A., & Mann, D. (2007). An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158, 349-364.
- Falkowski, P., Schofield, O., Katz, M., Van de Schootbrugge, B., & Knoll, A. (2004). Why is the land green and the ocean red? – In: Thierstein, H.R. & Young, J.R. (eds.), *Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact*. Springer, 427–453.
- Fawley, M. & Fawley, K., 2004. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Phycological Society of America*, Volumen 40, pp. 223-225.
- Flores, F., Maldonado, S., & Ortiz, J. (2016). Identificación molecular de microalgas clorófitas del Ecuador. *ResearchGate*, 1-2.
- František, M. (2005). *Physical Mapping – Restriction Mapping* (4th edition ed.). USA: Molecular Cell Biology.
- Gonzalez, I., & Sylvester, J. (2007). rRNA Genes: Evolution. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 1-5.
- Green, E. (2019). *National Human Genome Research Institute*. Recuperado el 21 de 06 de 2019, de <https://www.genome.gov>

- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guiry, M. (30 de mayo de 2018). *AlgaeBase*. Obtenido de World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway: <http://www.algaebase.org>
- Guiry, M., & Guiry, G. (30 de mayo de 2018). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. Recuperado el 11 de Junio de 2019, de World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway: <http://www.algaebase.org>
- Henriques, H., Inessa, L., Carla, M., & Henriques, A. (2016). tufA gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae*, 31(2), 155-165.
- Hepfer, C., & Turchi, S. (1989). An Introduction to Restriction Mapping of DNA. *BIOCHEMICAL EDUCATION*, 17(1), 48-50.
- Hillis, D., & Dixon, M. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*, 66(4), 411-453.
- Huss, V., Frank, C., Hartmann, E., Hirmer, M., Kloboucek, A., & Seidel, B. (1999). Biochemical Taxonomy and Molecular Phylogeny of the Genus *Chlorella* Sensu Lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35, 587-598.
- Julie, T., Toby, G., Frédéric, P., François, J., & Desmond, H. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Juliet, B., & Lewis, J. (2007). *Unravelling the algae. the past, present and future of algal systematics*. London, UK: Systematics Association special volume series, 75.
- Kibbe, W. (2007). *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*. Recuperado el 6 de Junio de 2019, de <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- Kusumawati, L., Wahyudi, R., Pinontoan, R., Gorreti, M., & Panggabean, L. (2015). Sequence Analysis of 18S DNA of *Melosira* sp., *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp. AND *Porphyridium* sp. *The 3rd International Conference on Biological Science 2013*, 2, 592-597.
- Lee, R. (2008). Basic characteristics of the algae. *In Phycology*, 3-30.
- Lee, H. & Hur, S., 2009. Genetic Relationships among Multiple Strains of the Genus *Tetraselmis* Based on Partial 18S rDNA Sequences. *Algae*, 24(4), pp. 205-212.
- Leliaert, F., Smith, D., Moreau, H., Herron, M., Verbruggen, H., Delwiche, C., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1-46.
- Macías, P., Coello, D., & García, D. (2018). *Floración de Tetraselmis sp., en la zona costera frente a las Provincias de Manabí y Santa Elena (Abril 2018)*. Guayaquil: Instituto Nacional de Pesca.

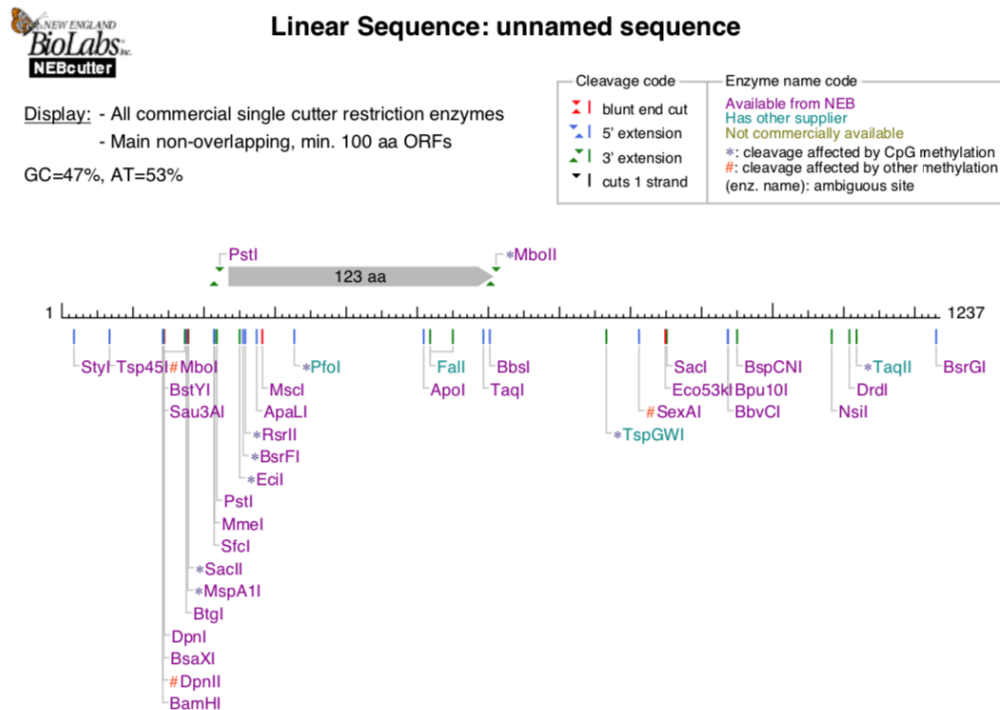
- McDevit, D., & Saunders, G. (2010). A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia*, *49*, 235-248.
- Mishra, A., Mandoli, A., & Jha, B. (2008). Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, *35*, 1093–1101.
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U., Bowler, C., Valentin, K., & Bhattacharya, D. (2009). Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science*, *324*, 1724–1726.
- NCBI. (2017). *National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el 22 de 06 de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Olmos, J., Paniagua, J., & Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 80–84.
- Peréz, A. (2014). Desarrollo de nuevos marcadores genómicos para estudios de biodiversidad en fotobiontes liquénicos. Microalgas eucarióticas como fuente de recursos de utilidad biotecnológica. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Pinto, R. (2015). Controles de calidad de ácidos nucleicos. España: VI Congreso "Red Nacional de Biobancos".
- Pinzón, A. (2007). Introducción al diseño “in silico” de primers. *Laboratorio de Micología y Fitopatología*, 3-8.
- Plomin, R., & Spinath, F. (2004). Intelligence: Genetics, Genes, and Genomics. *Journal of Personality and Social Psychology*, *86*(1), 112–129.
- Rocha, P. (2002). *Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite*. Bogotá, Colombia: Laboratorio de Marcadores Moleculares, Área de Fisiología y Mejoramiento.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, EE.UU: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463-5467.
- Scott, C., Lyons, T., Bekker, A., Shen, Y., Poulton, S., Chu, X., & Anbar, A. (2008). Tracing the stepwise oxygenation of the Proterozoic ocean. *Nature*, *452*, 456–459.
- Sorof, M., & Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*, 192-212.
- Tamay De Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, *2*(2), 70-78.

- Tragin, M., Lopes dos Santos, A., Christen, R., & Vaultot, D. (2016). Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences. *Perspectives in Phycology*, 3(3), 141–154.
- Turmel, M., De Cambiaire, J., Otis, C., & Lemieux, C. (2016). Distinctive architecture of the chloroplast genome in the chlorodendrophycean green algae *Scherffelia dubia* and *tetraselmis* sp. CCMP 881. *PLoS ONE*, 11(2), 1-22.
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*, 31, 3688-3691.
- Wongsawad, P., & Peerapornpisal, Y. (2014). Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 505-510.
- Ximenes, C., Cassano, V., de Fátima de Oliveira, M., Pedrosa, M., Gurgel, C., Verbruggen, H., & Pereira, S. (2017). Systematics of the genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil including the description of *Halimeda jolyana* sp. *In Phycologia*, 56(4), 369–381.
- Yáñez, R. (2011). Categorización taxonómica en base a marcadores moleculares de microalgas extremófilas nativas del Norte de Chile. Chile: FACULTAD DE CIENCIAS; INSTITUTO DE BIOLOGÍA.
- Yoon, H., Hackett, J., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol*, 21, 809-818.
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D., & Vaultot, D. (2005). Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1), 79–92.



## 11. ANEXOS

1. MAPA DE RESTRICCIÓN *IN SILICO* OBTENIDA EN EL PROGRAMA NEBCUTTER, PRODUCTO DE PCR DIGERIDO CON TODAS LAS ENZIMAS COMERCIALES DEL GEN ARNr 18S.



2. Vista de todas las enzimas de restricción

Pick all	Enzyme	Specificity	Cuts	% activity in			
				1.1	2.1	3.1	CS
<input type="checkbox"/>	AciI	C <sup>^</sup> CG <sub>^</sub> C	5	10	25	100	100
<input type="checkbox"/>	AgsI	TT <sub>^</sub> S <sup>^</sup> AA	5	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	AluI	AG <sup>^</sup> CT	5	25	100	50	100
<input type="checkbox"/>	AlwI	GGATCNNNN <sup>^</sup> N <sub>^</sub>	2	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	ApaLI	G <sup>^</sup> TGCA <sub>^</sub> C	1	100	100	10	100
<input type="checkbox"/>	ApeKI	G <sup>^</sup> CWG <sub>^</sub> C	3	25	50	100	10

<input type="checkbox"/>	<b>ApoI</b>	R <sup>^</sup> AATT <sub>^</sub> Y	1	10	75	100	75
<input type="checkbox"/>	<b>AseI</b>	AT <sup>^</sup> TA <sub>^</sub> AT	2	10	50*	100	10
<input type="checkbox"/>	<b>AvaII</b>	G <sup>^</sup> GWC <sub>^</sub> C	3	50	75	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>BaeGI</b>	G <sub>^</sub> KGCM <sup>^</sup> C	2	75	75	100	25
<input type="checkbox"/>	<b>BamHI</b>	G <sup>^</sup> GATC <sub>^</sub> C	1	75*	100*	100	100*
<input type="checkbox"/>	<b>BanI</b>	G <sup>^</sup> GYRC <sub>^</sub> C	2	10	25	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>BanII</b>	G <sub>^</sub> RGCY <sup>^</sup> C	2	100	100	50	100
<input type="checkbox"/>	<b>BbsI</b>	GAAGACNN <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	1	100	100	25	75
<input type="checkbox"/>	<b>BbvCI</b>	CC <sup>^</sup> TCA <sub>^</sub> GC	1	10	100	50	100
<input type="checkbox"/>	<b>BbvI</b>	GCAGC(N) <sub>8</sub> <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	3	100	100	25	100
<input type="checkbox"/>	<b>BccI</b>	CCATCNNNN <sup>^</sup> N <sub>^</sub>	2	100	50	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>BceAI</b>	ACGGC(N) <sub>12</sub> <sup>^</sup> NN <sub>^</sub>	3	100*	100*	100	100*
<input type="checkbox"/>	<b>BcoDI</b>	GTCTCN <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	4	50	75	75	100
<input type="checkbox"/>	<b>BfaI</b>	C <sup>^</sup> TA <sub>^</sub> G	6	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>Bpu10I</b>	CC <sup>^</sup> TNA <sub>^</sub> GC	1	10	25	100	25
<input type="checkbox"/>	<b>BsaI</b>	GGTCTCN <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	2	75*	75	100	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsaJI</b>	C <sup>^</sup> CNNG <sub>^</sub> G	4	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsaWI</b>	W <sup>^</sup> CCGG <sub>^</sub> W	2	10	100	50	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsaXI</b>	<sub>^</sub> NNN <sup>^</sup> (N) <sub>9</sub> AC(N) <sub>5</sub> CTCC(N) <sub>7</sub> <sub>^</sub> NNN <sup>^</sup>	1	50*	100*	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsiHKAI</b>	G <sub>^</sub> WGCW <sup>^</sup> C	2	25	100	100	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsII</b>	CCNN <sub>^</sub> NNN <sup>^</sup> NNGG	4	50	75	100	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsmAI</b>	GTCTCN <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	4	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsmFI</b>	GGGAC(N) <sub>10</sub> <sup>^</sup> NNNN <sub>^</sub>	6	25	50	50	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsmI</b>	GAATG <sub>^</sub> CN <sup>^</sup>	2	25	100	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>Bsp1286I</b>	G <sub>^</sub> DGCH <sup>^</sup> C	4	25	25	25	100
<input type="checkbox"/>	<b>BspCNI</b>	CTCAG(N) <sub>7</sub> <sub>^</sub> NN <sup>^</sup>	1	100	75	10	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsrFI</b>	R <sup>^</sup> CCGG <sub>^</sub> Y	1	25	25	0	100
<input type="checkbox"/>	<b>BsrGI</b>	T <sup>^</sup> GTAC <sub>^</sub> A	1	25	100	100	25
<input type="checkbox"/>	<b>BsrI</b>	ACTG <sub>^</sub> GN <sup>^</sup>	2	10	50	100	10
<input type="checkbox"/>	<b>BssHII</b>	G <sup>^</sup> CGCG <sub>^</sub> C	2	100	100	100	100

<input type="checkbox"/>	BstNI	CC <sup>^</sup> W <sub>Δ</sub> GG	3	10	100	100	75
<input checked="" type="checkbox"/>	BstUI	CG <sup>^</sup> CG	5	50	100	25	100
<input type="checkbox"/>	BstYI	R <sup>^</sup> GATC <sub>Δ</sub> Y	1	25	100	75	100
<input type="checkbox"/>	BtgI	C <sup>^</sup> CRYG <sub>Δ</sub> G	1	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	BtsCI	GGATG <sub>Δ</sub> NN <sup>^</sup>	3	10	100	25	100
<input type="checkbox"/>	BtsIMutI	CAGTG <sub>Δ</sub> NN <sup>^</sup>	3	100	50	10	100
<input type="checkbox"/>	Cac8I	GCN <sup>^</sup> NGC	9	50	75	100	100
<input type="checkbox"/>	CviAII	C <sup>^</sup> AT <sub>Δ</sub> G	3	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	CviKI-1	RG <sup>^</sup> CY	22	25	100	100	100
<input type="checkbox"/>	CviQI	G <sup>^</sup> TA <sub>Δ</sub> C	2	75	100*	100	75*
<input type="checkbox"/>	DdeI	C <sup>^</sup> TNA <sub>Δ</sub> G	4	75	100	100	100
<input type="checkbox"/>	DpnI	GA <sup>^</sup> TC	1	100	100	75	100
<input type="checkbox"/>	DpnII	<sup>^</sup> GATC <sub>Δ</sub>	1	25	25	100*	25
<input type="checkbox"/>	DrdI	GACNN <sub>Δ</sub> NN <sup>^</sup> NNGTC	1	25	50	10	100
<input type="checkbox"/>	EaeI	Y <sup>^</sup> GGCC <sub>Δ</sub> R	2	10	50	10	100
<input type="checkbox"/>	EciI	GGCGGA(N) <sub>9</sub> <sub>Δ</sub> NN <sup>^</sup>	1	100	50	50	100
<input type="checkbox"/>	Eco53kI	GAG <sup>^</sup> CTC	1	100	100	10	100
<input type="checkbox"/>	EcoNI	CCTNN <sup>^</sup> N <sub>Δ</sub> NNAGG	2	50	100	75	100
<input type="checkbox"/>	EcoP15I	CAGCAG(N) <sub>25</sub> <sup>^</sup> NN <sub>Δ</sub>	2	75	100	100	100
<input type="checkbox"/>	FaiI	YA <sup>^</sup> TR	10	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	FalI	<sub>Δ</sub> (N) <sub>5</sub> <sup>^</sup> (N) <sub>8</sub> AAG(N) <sub>5</sub> CTT(N) <sub>8</sub> <sub>Δ</sub> (N) <sub>5</sub> <sup>^</sup>	1	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	FatI	<sup>^</sup> CATG <sub>Δ</sub>	3	10	100	50	50
<input type="checkbox"/>	Fnu4HI	GC <sup>^</sup> N <sub>Δ</sub> GC	6	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	FokI	GGATG(N) <sub>9</sub> <sup>^</sup> NNNN <sub>Δ</sub>	3	100	100	75	100
<input type="checkbox"/>	FspEI	CC(N) <sub>12</sub> <sup>^</sup> NNNN <sub>Δ</sub>	147	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	HaeIII	GG <sup>^</sup> CC	3	50	100	25	100
<input type="checkbox"/>	HhaI	G <sub>Δ</sub> CG <sup>^</sup> C	4	25	100	100	100
<input type="checkbox"/>	HinP1I	G <sup>^</sup> CG <sub>Δ</sub> C	4	100	100	100	100
<input type="checkbox"/>	HinfI	G <sup>^</sup> ANT <sub>Δ</sub> C	6	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	HpaII	C <sup>^</sup> CG <sub>Δ</sub> G	7	100	50	10	100

<input type="checkbox"/>	HphI	GGTGA(N) <sub>7</sub> ΔN <sup>✓</sup>	2	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	Hpy166II	GTN <sup>✓</sup> NAC	2	100	100	50	100
<input type="checkbox"/>	Hpy188I	TC <sub>Δ</sub> N <sup>✓</sup> GA	3	25	100	50	100
<input type="checkbox"/>	Hpy188III	TC <sup>✓</sup> NN <sub>Δ</sub> GA	5	100	100	10	100
<input type="checkbox"/>	HpyAV	CCTTC(N) <sub>5</sub> ΔN <sup>✓</sup>	2	100	100	25	100
<input type="checkbox"/>	HpyCH4III	AC <sub>Δ</sub> N <sup>✓</sup> GT	3	100	25	10	100
<input type="checkbox"/>	HpyCH4IV	A <sup>✓</sup> CG <sub>Δ</sub> T	2	100	50	25	100
<input type="checkbox"/>	LmnI	GCTC <sub>Δ</sub> CN <sup>✓</sup>	4	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	LpnPI	CCDG(N) <sub>10</sub> <sup>✓</sup> NNNN <sub>Δ</sub>	31	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	MaeIII	<sup>✓</sup> GTNAC <sub>Δ</sub>	4	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	MboI	<sup>✓</sup> GATC <sub>Δ</sub>	1	75	100	100	100
<input type="checkbox"/>	MboII	GAAGA(N) <sub>7</sub> ΔN <sup>✓</sup>	2	100*	100	50	100
<input type="checkbox"/>	MluCI	<sup>✓</sup> AATT <sub>Δ</sub>	8	100	10	10	100
<input type="checkbox"/>	MlyI	GAGTC(N) <sub>5</sub> <sup>✓</sup>	3	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	MmeI	TCCRAC(N) <sub>18</sub> ΔNN <sup>✓</sup>	1	50	100	50	100
<input type="checkbox"/>	MnlI	CCTC(N) <sub>6</sub> ΔN <sup>✓</sup>	13	75	100	50	100
<input type="checkbox"/>	MscI	TGG <sup>✓</sup> CCA	1	25	100	100	100
<input type="checkbox"/>	MseI	T <sup>✓</sup> TA <sub>Δ</sub> A	8	75	100	75	100
<input type="checkbox"/>	MslI	CAYNN <sup>✓</sup> NNRTG	2	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	MspAII	CMG <sup>✓</sup> CKG	1	10	50	10	100
<input checked="" type="checkbox"/>	MspI	C <sup>✓</sup> CG <sub>Δ</sub> G	7	75	100	50	100
<input type="checkbox"/>	MspJI	CNNR(N) <sub>9</sub> <sup>✓</sup> NNNN <sub>Δ</sub>	221	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	MwoI	GCNN <sub>Δ</sub> NNN <sup>✓</sup> NNGC	4	10	100	100	100
<input type="checkbox"/>	NciI	CC <sup>✓</sup> S <sub>Δ</sub> GG	4	100	25	10	100
<input type="checkbox"/>	NlaIII	<sub>Δ</sub> CATG <sup>✓</sup>	3	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	NlaIV	GGN <sup>✓</sup> NCC	5	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	NsiI	A <sub>Δ</sub> TGCA <sup>✓</sup> T	1	10	75	100	25
<input type="checkbox"/>	PfoI	T <sup>✓</sup> CCNGG <sub>Δ</sub> A	1	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	PleI	GAGTCNNNN <sup>✓</sup> N <sub>Δ</sub>	3	25	50	25	100

<input checked="" type="checkbox"/>	PspGI	^CCWGG_	3	25	100	50	100
<input type="checkbox"/>	PstI	C_TGCA^G	1	75	75	100	50*
<input checked="" type="checkbox"/>	RsaI	GT^AC	2	25	50	10	100
<input type="checkbox"/>	RsrII	CG^GWC_CG	1	25	75	10	100
<input type="checkbox"/>	SacI	G_AGCT^C	1	100	50	10	100
<input type="checkbox"/>	SacII	CC_GC^GG	1	10	100	10	100
<input type="checkbox"/>	Sau3AI	^GATC_	1	100	50	10	100
<input type="checkbox"/>	Sau96I	G^GNC_C	4	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	ScrFI	CC^N_GG	7	100	100	100	100
<input type="checkbox"/>	SetI	_ASST^	19	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	SexAI	A^CCWGG_T	1	100	75	50	100
<input type="checkbox"/>	SfaNI	GCATC(N)_5^NNNN_	4	10	75	100	25
<input type="checkbox"/>	SfcI	C^TRYA_G	1	75	50	25	100
<input type="checkbox"/>	SgeI	CNNG(N)_9^NNNN_	77	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	StyD4I	^CCNGG_	7	10	100	100	100
<input type="checkbox"/>	StyI	C^CWWG_G	1	10	25	100	10
<input type="checkbox"/>	TaqI	T^CG_A	1	50	100	50	100
<input type="checkbox"/>	TaqII	GACCGA(N)_9_NN^	1	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	TatI	W^GTAC_W	2	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	TauI	G_CSG^C	3	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	TfiI	G^AWT_C	3	50	100	100	100
<input type="checkbox"/>	TseI	G^CWG_C	3	75	100	100	100
<input type="checkbox"/>	Tsp45I	^GTSAC_	1	100	50	10	100
<input type="checkbox"/>	TspDTI	ATGAA(N)_9_NN^	4	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	TspGWI	ACGGA(N)_9_NN^	1	-	-	-	-
<input type="checkbox"/>	TspRI	_NNCASTGNN^	3	25	50	25	100