



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN MEDIO AMBIENTE

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“UTILIZACIÓN DEL GEN 18S, COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIATOMEAS EPILÍTICAS”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero en Medio Ambiente

Autor:

Salomé Estefania Mishque Cevallos

Tutor:

M Sc. Manuel Patricio Clavijo Cevallos

Latacunga – Ecuador

Junio, 2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **Mishque Cevallos Salomé Estefania** declaro ser autor (a) del presente proyecto de investigación: **“Utilización del gen 18s, como marcador genético para la identificación molecular de diatomeas epilíticas”**, siendo M.Sc. Manuel Patricio Clavijo Cevallos tutor (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

.....
Mishque Cevallos Salomé Estefania

Número de C.I. 172226509-5

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **MISHQUE CEVALLOS SALOMÉ ESTEFANIA**, identificado con C.C. N° **172226509-5**, de estado civil **SOLTERO** y con domicilio Calle Barriga, Barrio La Primavera, cantón Mejía, quien en lo sucesivo se denominará **EL/LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.- LA/EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería en Medio Ambiente, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado de titulación de Proyecto de Investigación la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Unidad Académica según las características que a continuación se detallan:

Historial académico.- (Septiembre 2012 – Febrero 2013 hasta Abril – Agosto 2018).

Aprobación HCA.- 25 de abril de 2017.

Tutor.- Mg Manuel Patricio Clavijo Cevallos

Tema: **“UTILIZACIÓN DEL GEN 18S, COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIATOMEAS EPILÍTICAS”**

CLÁUSULA SEGUNDA.- LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio INSTITUCIÓN al, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA.- Por el presente contrato, **LA/EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA.- OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA/EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio INSTITUCIÓN al que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA.- El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA/EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA.- El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA.- CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.- Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA/EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA.- LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.- **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la

resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA.- En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA.- Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 22 días del mes de Junio del 2018.

Salomé Estefania Mishque Cevallos

EL CEDENTE

Ing. MBA. Cristian Tinajero Jiménez

EL CESIONARIO

AVAL DEL DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Director del Trabajo de Investigación sobre el tema: **“UTILIZACIÓN DEL GEN 18S, COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIATOMEAS EPILÍTICAS”**, de **MISHQUE CEVALLOS SALOMÉ ESTEFANIA** con C.C.172226509-5, de la carrera de INGENIERÍA EN MEDIO AMBIENTE, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científico-técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Validación de Proyecto que el Honorable Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Latacunga, Junio de 2018

Firma

TUTOR DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

M Sc. Manuel Patricio Clavijo Cevallos

C.C. 0501444582

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: **MISHQUE CEVALLOS SALOMÉ ESTEFANIA** con C.C.172226509-5, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Proyecto.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa INSTITUCIONAL.

Latacunga, Junio de 2018

Para constancia firman:

.....
LECTOR 1

M Sc. Fonseca Kalina.

C.C. 172353445-7

.....
LECTOR 2

M Sc. Núñez Andrea

C.C. 172049098-4

.....
LECTOR 3

Ing. Chasi Paolo Mg

C.C. 050240972-5

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios por guiar camino y ayudarme a tomar las mejores decisiones.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por haberme abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera.

Agradezco a mis docentes PhD. Isabel Ballesteros, PhD. Pablo Castillejo y M Sc. Patricio Clavijo, por su tiempo, paciencia y por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus conocimientos científicos.

Mi agradecimiento también va dirigido a la Universidad Internacional SEK, por haberme permitirme realizar mi proyecto de investigación en sus instalaciones.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación a mis queridos padres Manuel Mishque, Nelly Cevallos por su apoyo, amor, consejos, comprensión y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar.

A mis abuelitos Julio Cevallos, Fanny Toapanta, Juan Mishque y Juana Yaguarshungo por confiar en mí y darme su apoyo incondicional.

A mis amados hermanos Israel y Yessenia Mishque quienes son mis cómplices y mi fuente de fuerza para seguir adelante.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mi tío Iván Cevallos que aunque no esté con nosotros, sus palabras las llevo grabadas en mi mente y corazón.

Por ultimo pero no menos importantes a mis queridas amigas Lorena Sánchez, Karen Gallo, María José Nacimba y Cristina Pachacama por compartir conmigo alegrías y tristezas.

Mishque Cevallos Salomé Estefania

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TITULO: “UTILIZACIÓN DEL GEN 18S, COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIATOMEAS EPILÍTICAS”

Autor/es: Mishque Cevallos Salomé Estefania

RESUMEN

Las comunidades de diatomeas se encuentran presentes en todos los sistemas acuáticos siendo altamente sensibles a cualquier cambio en el estado ecológico, en particular a la concentración de los nutrientes, es por esta razón que son usadas como bioindicadores de la calidad de agua. Para ello, se han realizado identificaciones morfológicas que requieren de gran habilidad microscópica y el uso de guías taxonómicas. Para reducir la complejidad de identificación se han implementado herramientas moleculares basadas en códigos de barras genético que ayudan a complementar el biomonitoreo de los cuerpos de agua, siendo el mayor limitante para su uso la falta de secuencias de diatomeas epilíticas en el Ecuador.

El presente trabajo estuvo enmarcado en evaluar el uso potencial del gen 18SV4 como código de barras de ADN en diatomeas epilíticas del Ecuador, evaluando y comprobando su capacidad de discriminación entre las especies y la factibilidad de usar cebadores universales. Para ello fue necesario analizar las secuencias depositadas en el NCBI, de diatomeas epilíticas de diferentes orígenes, por medio de su alineamiento usando el programa UNIPROGEN determinando la región que presenta variabilidad interespecifica, y las zonas flanqueantes que permiten su amplificación en todas las especies. Se establecieron cultivos de diatomeas en el medio de cultivo CHU # 10, para poder realizar los análisis moleculares, extracción de ADN y amplificación por PCR.

No se pudo obtener un cultivo puro por lo que el trabajo se realizó con un cultivo mixto de algas verdes y diatomeas en el que se observaron por microscopia cuatro especies de diatomeas, que fueron identificadas con el uso de guías taxonómicas. Se extrajo el ADN del cultivo por dos métodos: Protocolo de Kit de aislamiento de ADN Power Soil y el Protocolo de extracción buffer, se establecieron las condiciones para la amplificación por PCR y finalmente se realizó una DGGE que permitió separar las bandas de ADN de 3 de las 4 especies presentes en el cultivo: *Gomphonema langenula*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula cataracta-rheni* y *Nitzschia acidoclinata*

Palabras claves: diatomeas epilíticas, 18SV4, código de barras, ADN, CHU #10, cebadores universales, NCBI, UPROGEN, PCR, extracción, amplificación.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

AGRICULTURAL AND NATURAL RESOURCES FACULTY

TITLE: "USE OF THE GEN 18S, AS A GENETIC MARKER FOR THE MOLECULAR IDENTIFICATION OF EPILITHIC DIATOMS"

Author: Mishque Cevallos Salomé Estefania

ABSTRACT

The diatomaceous communities are present in all aquatic systems, being highly sensitive to any change in the ecological status, in particular to the concentration of nutrients. That is why they are used as bio indicators of water quality. To do this, morphological identifications have been made that require great microscopic skill and the use of taxonomic guides. To reduce the complexity of identification, molecular tools based on genetic barcodes have been implemented that help complement the biomonitoring of water bodies, the greatest limitation for their use being the lack of epithelial diatoms sequences in Ecuador to practice on.

The task presented was based on evaluating the potential use of the 18SV4 gene as a DNA barcode in the epilithic diatoms of Ecuador, evaluating and verifying its ability to differentiate between species and the feasibility of using universal primers. For this it was necessary to analyze the sequences deposited in the NCBI of epilithic diatoms of different origins, by analyzing their alignment using the UNIPROGEN program, which determined the regions that presented interspecific variability, and the flanking zones that allow their amplification in all species. Diatomaceous cultures were established in the CHU # 10 culture medium, in order to perform the molecular analyzes, DNA extraction and PCR amplification.

A pure culture could not be obtained, so the work was carried out with a mixed culture of green algae and diatoms in which four species of diatoms were observed under a microscope, which were then identified with the use of taxonomic guides. The DNA of the specific culture was extracted by two methods: The process using the Powersoil DNA isolation kit and the extraction buffer method. The conditions were established for the amplification by PCR and finally a DGGE was made that allowed the separation of the DNA bands of 3 of the 4 species present in the crop: *Gomphonema langenula*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula cataractarheni* and *Nitzschia acidoclinata*

Key words: epithelial diatoms, 18SV4, barcode, DNA, CHU # 10, universal primers, NCBI, UPROGEN, PCR, extraction, amplification.

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
DEDICATORIA	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
ÍNDICE GENERAL	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	3
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS:.....	5
4.1. General.	5
4.2. Específicos.	5
5. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	6
6.- FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	7
6.1. Diatomeas	7
6.2. Morfología de las diatomeas	7
6.3. Importancia como indicadores biológicos en el ambiente	8

6.4. Importancia de los códigos de barras de ADN.....	8
6.5. Fundamento de la Electroforesis.....	8
6.6. Importancia de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.....	9
6.7. Aplicaciones de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	9
6. PREGUNTAS CIENTÍFICA	9
7. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	10
7.1. Análisis de las secuencias in silico (programas de computador)	10
7.2. Ubicación del lugar a muestrear	10
7.3. Muestreo de diatomeas.....	10
7.3.1. Materiales	11
7.4. Medio de Cultivo.....	11
7.4.1. Materiales:.....	11
7.4.2. Equipos:.....	12
7.5. Obtención cultivo axénico	12
7.5.1. Repique y diluciones.....	12
7.5.2. Limpieza por centrifuga.....	12
7.5.3. Microscopio invertido.....	13
7.5.4. Limpieza de diatomeas	13
7.6. Extracción de DNA:.....	13
7.6.1. Protocolo extracción buffer	14
7.6.2. Protocolo de Kit de aislamiento de ADN PowerSoil.....	14
7.6.2.1. Materiales	14
7.6.2.2. Reactivos.....	14
7.6.3. Cuantificación de ADN extraído	16
7.7. Amplificación de los genes candidatos mediante PCR.....	16
7.7.1. Electroforesis en gel de agarosa	16
7.8. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).....	16
8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	18
8.1. Matriz con secuencias de diatomeas epilíticas alineadas	18

8.2. Obtención del Cultivo axénico.....	21
8.3. Determinación del método de extracción	26
8.4. Amplificación mediante PCR	27
8.5. Separación de bandas por medio de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)	28
8.6. Metodología óptima.....	29
10. IMPACTOS.....	29
10.1. Técnicos	29
10.2. Sociales.....	30
10.3. Ambientales.....	30
10.4. Económicos.....	30
11. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO:	30
12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
12.1. Conclusiones.....	31
12.2. Recomendaciones.....	32
14. BIBLIOGRAFÍA	32
15. ANEXOS	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Alineamiento de las 72 secuencias	20
Figura 2: Diferenciación de géneros Cyclotella, Encyomena y Gomphonema	21
Figura 3: Cultivo de diatomeas	22
Figura 4: Cultivos de diatomeas en corning.....	23
Figura 5: Limpieza de diatomeas por centrifugación.....	24
Figura 6: Resultado del microscopio invertido	24
Figura 7: Cultivo de diatomeas epílicas	25
Figura 8: Especies identificadas	25
Figura 9: Comprobación de los dos métodos de extracción de ADN en gel de agarosa. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2, 3 las muestras de ADN extraídas con el kit y los carriles 4 y 5 las muestras de ADN de la extracción con buffer	26
Figura 10: Resultado de PCR en gel de Agarosa	27
Figura 11: Las Bandas se muestran con asteriscos	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Punto a muestrear	10
Tabla 2: Listado de las secuencias presentes en las bases de datos.....	19
Tabla 3: Cebadores seleccionados para la amplificación	21
Tabla 4: Condiciones de PCR para la amplificación del gen 18SrRNA.....	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Hoja de vida	34
Anexo 2: Aval de traducción	37
Anexo 3: Ubicación de Cebadores	38
Anexo 4: Alineamiento de las secuencias de las especies	39
Anexo 5: Procedimiento para la obtención del Cultivo axénico.....	42
Anexo 6: Desarrollo de la extracción de ADN	44
Anexo 7: Resultado de la extracción de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%	44
Anexo 8: Procedimiento del electroforesis en gel de gradiente desnaturizante.....	46

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Utilización del Gen 18S, como marcador genético para la identificación molecular de diatomeas epilíticas”

Fecha de inicio:

Abril del 2017.

Fecha de finalización:

Mayo del 2018.

Lugar de ejecución:

Universidad Internacional SEK

Facultad que auspicia:

Ciencias agropecuarias y recursos naturales

Carrera que auspicia:

Ingeniería de medio ambiente

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto de Macroinvertebrados

Equipo de Trabajo:

Tutor: M Sc. Patricio Clavijo Cevallos

Autor: Mishque Cevallos Salomé Estefania

Lector 1: M Sc. Fonseca Kalina

Lector 2: M Sc. Andrea Núñez

Lector 3: Ing. Paolo Chasi

Área de Conocimiento:

UNESCO: Servicios

Sub área: 85 Protección del medio ambiente

Línea de investigación:

Línea 1 (UTC) Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Sub línea 4: Conservación de especies.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La identificación precisa de las especies de diatomeas está basada principalmente en las características morfológicas de las frústulas de sílice para lo que se requiere una gran experiencia, habilidad en microscopía y el uso de guías taxonómicas especializadas.

Sin embargo, el uso de herramientas moleculares puede ayudar a reducir la complejidad del proceso de identificación. Para poder desarrollar y aplicar técnicas de identificación y cuantificación basadas en herramientas moleculares es necesario conocer las especies de diatomeas presentes en los sistemas acuáticos de Ecuador y obtener sus secuencias de referencia, creando una base de datos que esté disponible para todos los investigadores. En Europa existen varias iniciativas al respecto, como la base *R:Syst-diatom* desarrollada por el INRA (Instituto Nacional Francés de Investigación en Agricultura) (Rimet et al., 2014) en la que se incluyen el nombre de las especies, fotos, puntos de muestreo, y las secuencias de referencia.

En el caso de diatomeas se han propuesto varios marcadores de ADN como candidatos para la identificación de especies, entre ellos la región hipervariable V4 del gen 18SrRNA y el gen de la subunidad grande de la ribulosa- 1,5- bisfosfatocarboxilasa oxigenasa (rbcL) (Pawlowski, Lejzerowicz, Apotheloz-Perret-Gentil, Visco, & Esling, 2016) El principal limitante en la aplicación de estos marcadores es la falta de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas, especialmente en el caso de Ecuador.

Para la generación de la base de datos de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas de Ecuador es necesario en primer lugar obtener los cultivos axénicos de las especies, para poder aislar el ADN de cada una de ellas, amplificar las secuencias de los genes marcadores y relacionar la secuencia con la identificación morfológica de la especie.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las diatomeas epilíticas son empleadas como bioindicadores de calidad de agua siendo su uso ampliamente reconocido e incluso de evaluación obligatoria en normativas de calidad de ciertos países, como por ejemplo los pertenecientes a la Unión Europea. Sin embargo, el proceso para la identificación de las especies es arduo desde las salidas al campo como el trabajo en laboratorio y la identificación por microscopio. No se disponen de guías taxonómicas de diatomeas de Ecuador lo que dificulta la identificación de algunas especies. Se están realizando trabajos para avanzar en la identificación de diatomeas presentes en los ríos de Ecuador y establecer las especies bioindicadoras de calidad de agua.

El desarrollo de técnicas genómicas para la evaluación de ecosistemas acuáticos, basada en el uso de bioindicadores, es de gran ayuda para superar muchos de los problemas referentes a la identificación de especies y podrían complementar o incluso reemplazar la bioevaluación tradicional.

El presente proyecto pretende establecer las bases para iniciar la aplicación de técnicas de análisis genético en la evaluación de sistemas acuáticos. La fase previa para poder implementar biomonitoreo basado en herramientas moleculares es el cultivo de diatomeas en laboratorio y la obtención de cultivos axénicos. Los cultivos axénicos permiten analizar individualmente cada especie y poder relacionar la taxonomía con la secuencia de los genes marcadores.

Por tanto, es necesario poner a punto la metodología para la obtención del medio de cultivo óptimo para el crecimiento de las diatomeas epilíticas, determinar la metodología para la extracción de ADN de los cultivos y la amplificación de las secuencias de ADN.

4. OBJETIVOS:

4.1. General.

- Establecer la metodología para la identificación de diatomeas epilíticas basada en marcadores genéticos.

4.2. Específicos.

- Analizar las secuencias del gen 18S de diatomeas epilíticas disponibles en las bases de datos.
- Establecer un cultivo puro para diatomeas epilíticas.
- Establecer la metodología para el análisis del gen 18S en diatomeas epilíticas.

5. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

OBJETIVOS	ACTIVIDAD	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD
Objetivo 1 Comparar las secuencias del gen 18S de diatomeas epilíticas.	Buscar las secuencias en bases de datos de genes.	Matriz con secuencias de diatomeas alineadas	Uso de la página del Centro nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Descarga de las secuencias en formato FASTA.
	Alineamiento de las secuencias	Obtención de las secuencias de cebadores universales de diatomeas para el gen 18S	Análisis de las secuencias con UGENE. Búsqueda de las regiones para los cebadores.
Objetivo 2 Establecer un cultivo puro para diatomeas epilíticas.	Preparación de medios de cultivo para diatomeas.	Determinación del medio de cultivo más favorable para el crecimiento de Diatomeas.	Preparación de medios de cultivo con distintas recetas.
	Inoculación con muestras de diatomeas recogidas del Río Cutuchi Examen de los cultivos mediante microscopia	Obtención del Cultivo axénico.	Siembra de los medios y crecimiento de diatomeas. Selección de distintas colonias, y cultivo en placas individuales. Toma de muestras de los cultivos para su inspección al microscopio para determinar si es una única especie.

<p>Objetivo 3</p> <p>Establecer la metodología para el análisis del gen 18S en diatomeas epilíticas.</p>	<p>Aislamiento de ADN y amplificación</p>	<p>Separación de bandas de las especies por medio del DGGE.</p>	<p>Extracción usando distintos métodos.</p> <p>Comprobación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.</p> <p>Utilización del PCR y cebadores universales</p>
---	---	---	---

6.- FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1. Diatomeas

Son algas microscópicas eucariotas y autótrofas es decir, productores primarios, compuestas por sílice (SiO₂). Estas microalgas responden rápidamente al aumento o a la disminución de los nutrientes del medio en el que se desarrollan. Adicionalmente, constituyen un componente esencial en los ciclos de carbono y de silicio de los ecosistema (Blanco, Álvarez, Cejudo, & Bécarez, 2010).

6.2. Morfología de las diatomeas

La taxonomía de las diatomeas está basada en la morfología de la pared de sílice, llamada frústulo, refinada esculpida, y está dividida en dos mitades (valvas) que encajan como una placa de Petri. La valva mayor del frústulo es denominada epiteca y la valva menor de hipoteca. En la valva se desarrollan toda una serie de ornamentaciones que permiten la identificación taxonómica. Longitudinalmente, en muchas especies la valva está atravesada por un delgado surco llamado rafe, que atraviesa la teca hasta el protoplasto. La locomoción de las células es posible gracias a la hendidura del rafe, ya que bajo ella se halla un orgánulo en forma de cinta, formado por fibrillas, que puede contraerse rítmicamente. (Lobo et al., 2016).

6.3. Importancia como indicadores biológicos en el ambiente

Las diatomeas son bioindicadores de la calidad del agua, gracias a su sensibilidad frente a determinados factores ambientales (parámetros físicos, concentración de determinadas sustancias, etc.). Cuando su sensibilidad es alta, la presencia del factor conlleva la desaparición de los individuos sensibles a éste. Las especies pueden tener una sensibilidad media frente al factor o incluso ser indiferentes al mismo, con lo que su papel como bioindicadores se ve mermado. Por ejemplo, la distribución de las distintas especies de diatomeas tiene una clara relación con la contaminación orgánica, ya que no todas poseen la misma tolerancia a dicha contaminación. Existen especies intolerantes, las cuales no se encuentran en zonas con contaminación orgánica, especies facultativas, que no son capaces de tolerar un estrés severo, y especies tolerantes, aquellas que aumentan proporcionalmente su densidad poblacional en la comunidad de diatomeas cuando los niveles de contaminación orgánica son elevados (Blanco et al., 2010).

6.4. Importancia de los códigos de barras de ADN

La implementación de códigos de barras de ADN ha desarrollado grandes expectativas ya que facilita el levantamiento de la biodiversidad, determina especies crípticas y ha sido de gran utilidad en estudios ecológicos, donde la identificación de material biológico en estados juveniles es un impedimento en cuanto a la caracterización y composición florística del bosque de estudio (Hebert & Cywinska, 2003).

6.5. Fundamento de la Electroforesis

La electroforesis es una herramienta que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas. En un principio se utilizaron geles de almidón, pero posteriormente se reemplazaron por geles de agarosa y poliacrilamida, impartiendo a una carga negativa, misma que ocasiona que migren al ánodo de un circuito eléctrico. Este principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración (Zárate, 2009).

6.6. Importancia de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

Esta técnica DGGE fue reportada inicialmente en S. G. Fischer y L. S. Lerman. 1983 y mejorada al pasar los años. Consiste en que un fragmento de ADN de doble cadena puede ser desnaturalizado por medios físicos (temperatura) o químicos (agentes desnaturalizantes como urea). El punto de desnaturalización de tal fragmento de ADN aumentará con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y también por la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de Guanina (G) y Citocina (C), aumentando la probabilidad en el incremento de secuencias que lleven consecutivamente G o C (García, 2000).

6.7. Aplicaciones de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

Es una técnica que hace parte en un grupo heterogéneo de técnicas moleculares conocidas como métodos de rastreo molecular, debido a que permiten discernir diferencias o composiciones discretas entre muestras de moléculas de complejidad variable. En el caso específico de DGGE, al ser posible discriminar dos cadenas dobles de ADN con el mismo tamaño pero con diferencias en secuencia si la energía necesaria para llegar a su desnaturalización es diferente. DGGE permite entonces definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de GC (Luque, J & Herráez, Á, 2016).

6. PREGUNTAS CIENTÍFICA

¿El gen 18S como marcador genético facilita el proceso de identificación molecular de diatomeas epilíticas?

¿La metodología aplicada para el análisis del gen 18S en diatomeas epilíticas es la adecuada?

7. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1. Análisis de las secuencias *in silico* (programas de computador)

Se procedió a buscar en la base de datos de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), obteniéndose todas las secuencias en formato FASTA. Posteriormente se realizó un análisis y alineamiento con el programa UNIPROGEN para crear una homología posicional.

7.2. Ubicación del lugar a muestrear

Para la obtención de diatomeas epilíticas, se procedió a tomar las muestras de un punto no contaminado del nacimiento del Río Cutuchi, dentro del Parque Nacional Cotopaxi. En este punto se espera tener mayor abundancia de especies de diatomeas respecto a los puntos con contaminación.

Tabla 1: Punto a muestrear

UBICACIÓN		COORDENADAS UTM	ELEVACIÓN
Provincia	Cantón	X : 777413 E	3564m
	Cotopaxi Latacunga	Y : 9928892 N	

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

7.3. Muestreo de diatomeas

Ya determinado el punto de muestreo se procedió a:

- Tomar una piedra de 15 a 20 cm, esta debe tener un sustrato de color pardo en la superficie de la roca, esto es un indicador de diatomeas epilíticas.
- Una vez seleccionada la piedra se procedió a lavarla con agua destilada para retirar el exceso de tierra.
- Se procedió a raspar la superficie con un cepillo de cerdas suaves, haciendo caer este sustrato pardo en una fuente.
- Se recolectó 300 mL de muestra en un frasco estéril.

7.3.1. Materiales

- Cepillo de cerdas suaves
- Bandeja o fuente
- Agua destilada
- Guantes
- Botellas plásticas o de vidrio
- Etiquetas

7.4. Medio de Cultivo

Para la determinación del medio de cultivo más favorable, se utilizó el listado de medios citados en (Andersen & Harrison, 2005). Se realizó medio líquido y sólido, donde fueron sembradas las diatomeas epilíticas y colocadas en un lugar adaptado con luces para su crecimiento por 8 días, las 24 horas al día.

7.4.1. Materiales:

- 10 cajas Petri
- 10 tubos de ensayo
- 10 frascos falcón
- Papel aluminio
- Mortero
- Vasos Erlenmeyer
- Agitadores
- Etiquetas
- Agitador magnético
- Pipetas
- Focos LED
- Papel Aluminio
- Filtros

7.4.2. Equipos:

- Balanza analítica
- Campana
- Auto clave
- Micropipeta
- Mechero
- Plancha de calentamiento
- Microscopio
- Potenciómetro

7.5. Obtención cultivo axénico

Se realizaron repiques, diluciones sucesivas, centrifugación y también se recurrió a la utilización de un microscopio invertido, para la separación de las diferentes colonias y poder obtener un cultivo axénico.

7.5.1. Repique y diluciones

Fueron realizados a los 8 días de crecimiento de las diatomeas epilíticas cada 8 días, 6 días, 4 días, 2 días y 1 día, para separar las células de diatomeas y poder conseguir el cultivo axénico.

7.5.2. Limpieza por centrífuga

Se tomaron 4 mL de muestra de cultivo líquido de diatomeas y se centrifugaron a 3 000 rpm por 7 minutos, repitiendo este procedimiento 4 veces. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se retiraron las algas verdes de la superficie, ya que las diatomeas por tener un cuerpo cubierto de sílice permanecen al fondo. Con ayuda del microscopio se observó la disminución de algas verdes y se sembraron en medio líquido y sólido.

7.5.3. Microscopio invertido

Se utilizó este microscopio por su estructura invertida, ya que permite observar las muestras situadas en el fondo de un recipiente gracias a la fuente de luz que está ubicada por encima de la platina.

Se procedió a tomar una célula de diatomea para sembrarla en cultivo previamente preparado y poder obtener un cultivo axénico.

7.5.4. Limpieza de diatomeas

Se utilizó el procedimiento explicado en Lobo et. al., (2016). Con algunos cambios según la necesidad del proyecto.

- En un tubo de ensayo se colocó 6 mL del cultivo, 2 mL de HNO₃ y 2 mL de agua oxigenada, completando un total de 10 mL.
- En un vaso de precipitación con pedazos de cerámica (evita el alto burbujeo al hervir), se añadió agua hasta el nivel de la muestra en los tubos de ensayo y se puso a hervir por 2 horas en una plancha de calentamiento, es necesario que todo el proceso se realice en una campana de extracción de gases.
- Tras su enfriamiento, se procedió a centrifugar la muestra a 3000 rpm por 7min y se retiró el sobrenadante (se repitió este proceso 6 veces), hasta eliminar todo el HNO₃.
- Se procedió a fijar la muestra en placas permanentes. En una plancha de calentamiento a 200° C y se colocó en un cubre objetos con 2 gotas de la muestra y una gota de alcohol al 70% con el fin de evitar amontonamiento de diatomeas. Después en un porta objetos se añadió una gota de Naphrax, se lo retira de la plancha de calentamiento, colocando el cubre objetos, se presiona suavemente para un fijado homogéneo y se espera hasta que la muestra se seque y poderlo mirar al microscopio.

7.6. Extracción de DNA:

Se compararon dos métodos de extracción con sus respectivos protocolos:

7.6.1. Protocolo extracción buffer

El protocolo es similar a (Edwards, Johnstone, & Thompson, 1991)

1. Se tomó 1 mL de los 2 cultivos líquidos en un tubo eppendorf y se llevó a centrifugar a 3 minutos a 4000 rpm, después se añadió 400 µl de tampón de extracción.
2. Se llevó a centrifugar a 13.000 rpm durante 7 minutos para separar las proteínas, enzimas etc. Después se recogió 350 µl pasando a un tubo eppendorf nuevo.
3. Se agregó 300 µl de isopropanol, y mezclamos por inversión del tubo, dejando reposar por 2 minutos en frío llevamos a la centrifugadora por 7 minutos a 13000 rpm y quitamos el sobrante por inversión del tubo procurando que no se caiga el pellet.
4. Se añadió 500 µl de Etanol al 70 %, procurando no despegar el pellet, se llevó a centrifugar por 7 minutos a 13000 rpm, y se procede a eliminar el Etanol por inversión del tubo.
5. Por último se añadió 50 µl de agua esterilizada y se deja a temperatura ambiente por 5 minutos para que se resuspenda el DNA.

7.6.2. Protocolo de Kit de aislamiento de ADN PowerSoil

7.6.2.1. Materiales

- Powerbead tubes
- spin filter

7.6.2.2. Reactivos

- Reactivo C1
- Reactivo C2
- Reactivo C3
- Reactivo C4
- Reactivos C5
- Reactivos C6

La extracción del DNA total bacteriano se realizó mediante el protocolo de extracción de DNA genómico del PowerSoil® DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories. El procedimiento se detalla a continuación:

Se añadieron 1 mL de la muestra a los *Powerbead tubes* y se homogenizó durante tres segundos. Se añadieron 60 µl de solución C1 y se homogenizó brevemente. Se colocaron los tubos en sentido horizontal sobre la almohadilla del vortex con cinta adhesiva y se los homogenizó a máxima velocidad durante 10 minutos. La solución C1 contiene SDS y otros agentes disruptores que ayudan al proceso de lisis celular.

Se centrifugaron los tubos a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a los tubos de 2 mL proporcionados por el kit. Se añadieron 250 µl de solución C2, la cual contiene agentes que precipitan todo material orgánico e inorgánico que no sea DNA, y se homogenizaron los tubos durante cinco segundos. Se incubaron estas muestras a 4°C por cinco minutos. Se centrifugaron los tubos a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, y evitando el pellet, se transfirieron 600 µl de sobrenadante a otro tubo de 2 mL (nuevo). Se añadieron 200 µl de solución C3 y se homogenizó brevemente, se incubaron los tubos a 4°C por cinco minutos y se centrifugaron a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, se transfirieron 750 µl de sobrenadante a un tubo de 2 mL (nuevo). Se añadió 1,2 mL de solución C4 y se homogenizó durante cinco segundos. Esta solución tiene una alta concentración de sales, lo que permitirá que el DNA se una a la membrana de sílice en el siguiente paso.

Se cargaron 675 µl en un *spin filter* y se centrifugó a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante que traspasó el filtro o membrana y se añadió otros 6 µl de sobrenadante al *spin filter* para centrifugar a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se cargó el sobrenadante restante en el *spin filter* y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

Se añadieron 500 µl de solución C5 para lavar el DNA unido a la membrana y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Inmediatamente se descartó el sobrenadante que atravesó la membrana y se centrifugó a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se colocó cuidadosamente el *spin filter* en un tubo de 2 mL (nuevo) y

se añadió 100 µl de solución C6 al centro del filtro para diluir el DNA y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente se descartó el *spin filter* y el DNA en el tubo estuvo listo para usarse en procesos downstream.

7.6.3. Cuantificación de ADN extraído

Para comprobar la cantidad de ADN de las muestras extraídas, se utilizó el equipo Qubit 2.0 fluorometer, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se preparó una solución 1:200 con el fluorocromo y el buffer de medida. Se tomó 190 µl de la solución con 10 µl de la muestra a medir. Dejamos reposar por 2 minutos y se procedió a medir. En el equipo nos da directamente la concentración de ADN de la muestra en (ng/mL).

7.7. Amplificación de los genes candidatos mediante PCR

Siguiendo el protocolo kit Go Taq® Green Master Mix. Las reacciones para la PCR contenían: 25 µl Taq Green Master Mix 2X, 1 µl de Primer A (0,2 µM), 1 µl Primer B (0,2 µM), 22 µl Agua libre de nucleasas y 1µl ADN, completando un volumen de 50 µl.

7.7.1. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), para lo cual se disolvieron 2g de agarosa en 200 mL de TAE 1X, y se incorporó al gel 6 µl de Bromuro de Etidio para visualizar las bandas de ácido nucleico al exponerlo a la luz ultravioleta. Una vez solidificado el gel se colocó en la cubeta de electroforesis, y se cargaron 10 µl de cada muestra más 1 µl de buffer de carga y se verificó su peso con un marcador molecular de 1kb. La electroforesis se realizó a un voltaje constante (110 V) durante 1 hora. Tras la electroforesis se procedió a la visualización de los fragmentos bajo luz ultravioleta en el trans iluminador Enduro.

7.8. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

- Se lavaron los cristales con agua y jabón y posteriormente con alcohol sin que queden manchas. Se colocó la goma amarilla alrededor del cristal con esquinas circulares haciendo que coincidan las muecas de la goma con las esquinas del cristal. A

continuación, se ubicaron los separadores a ambos lados del cristal de forma que quedaron totalmente pegados a la goma. Se colocó el otro cristal encima y se apretó fuertemente. Se sujetaron los dos cristales con las pinzas (pinzas cristales): tres en la base y tres en cada lado para colocar la estructura en forma vertical. Seguidamente se llenó con agua la cubeta de gradiente y se puso en marcha la bomba, de modo que se rellenaron los cristales hasta que rebosaron. Se secó muy bien el interior de los cristales con papel filtro.

- Para el funcionamiento de la cubeta de gradiente se debe comprobar el funcionamiento de la bomba peristáltica y del agitador con los imanes.
- A continuación se realizó el gradiente del gel 40% (Low) y 60% (High) para un volumen de 13 mL.
- El persulfato de amonio al 10% se preparó colocando 1g de APS en 1 mL de agua destilada.
- Es importante tener todo preparado para el siguiente paso, ya que el APS y el TEMED son polimerizantes, se debe comprobar que las válvulas de gradiente y de la cubeta estén cerradas (posición vertical y perpendicular respectivamente).
- Una vez colocadas las mezclas en la cubeta y con el agitador funcionando, se abrieron las válvulas en el siguiente orden: válvula de gradiente y válvula de la cubeta, se puso en marcha la bomba peristáltica. Inmediatamente después se colocó la aguja entre los dos cristales para que caiga la mezcla dentro. Cuando el espacio entre los cristales estuvo lleno, se retiró la aguja y se pasó agua destilada caliente por el sistema de gradiente para evitar que polimericen los restos de mezcla en las mangueras. Se colocó el peine formador de pocillos.
- Se esperó treinta minutos hasta que el gel polimerice. Una vez polimerizado, se retiró el peine despacio y se limpiaron los cristales y los pocillos con agua destilada ultrapura sin dejar restos de gel.
- Consecutivamente se llenó la cubeta de DGGE con 21L de TAE 1x. Cuando el gel estuvo listo, se puso a calentar la cubeta hasta los 60°C (54°C en el equipo equivalen a 60°C). Mientras tanto se montó el gel sin las pinzas (pinzas cristales) en el soporte quitando la parte de abajo de la goma amarilla para que esté en contacto con el buffer. Se sujetó con las pinzas de soporte.
- Se apagó todo el baño colocó el gel en la cubeta de forma que las conexiones del soporte quedaron en la parte derecha.

- Se limpiaron bien los pocillos del gel con una pipeta cogiendo TAE 1x de la cubeta.
- Para cargar las muestras se añadieron 1 µl de loading buffer 6x a los 1 µl de marcador molecular de 1kb. Una vez cargadas, se conectó el gel a la fuente y se rellenó con TAE 1x, se encendió nuevamente el calentador y se esperó hasta que alcance los 60°C. A continuación se encendió la fuente de alimentación programándola a 120v durante 3 horas.
- Para visualizar las bandas se apagó la fuente de alimentación y el calentador, esperando hasta que llegue a 0°C. Se sacó el gel escurriendo bien el TAE y se retiró del soporte.
- Para separar los cristales se los lavó con agua destilada ocasionando que se deslicen.
- La tinción se realizó colocando el cristal plano con el gel en una bandeja + 40 µl de bromuro de etidio en concentración de 10mg/mL durante 1 hora. Para desteñirlo se dejó el gel en agua destilada por 20 minutos. Finalmente, se observó el gel en el transiluminador Enduro.

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. Matriz con secuencias de diatomeas epilíticas alineadas

Del trabajo realizado por Castillejo et al. (2018), se identificaron un total de 67 especies de las cuales en la base de datos el NCBI solo se encontraron secuencias disponibles para 36, que indica que el 50 % de las especies de diatomeas epilíticas del río Pita de Ecuador están sin secuenciar.

Para las 36 especies se han identificado 72 secuencias que provienen de muestras de distintos orígenes a nivel mundial pero ninguna es proveniente de Ecuador. En la tabla 4 se muestran las especies de las que se obtuvieron las secuencias que serán analizadas en el presente trabajo.

Tabla 2: Listado de las secuencias presentes en las bases de datos

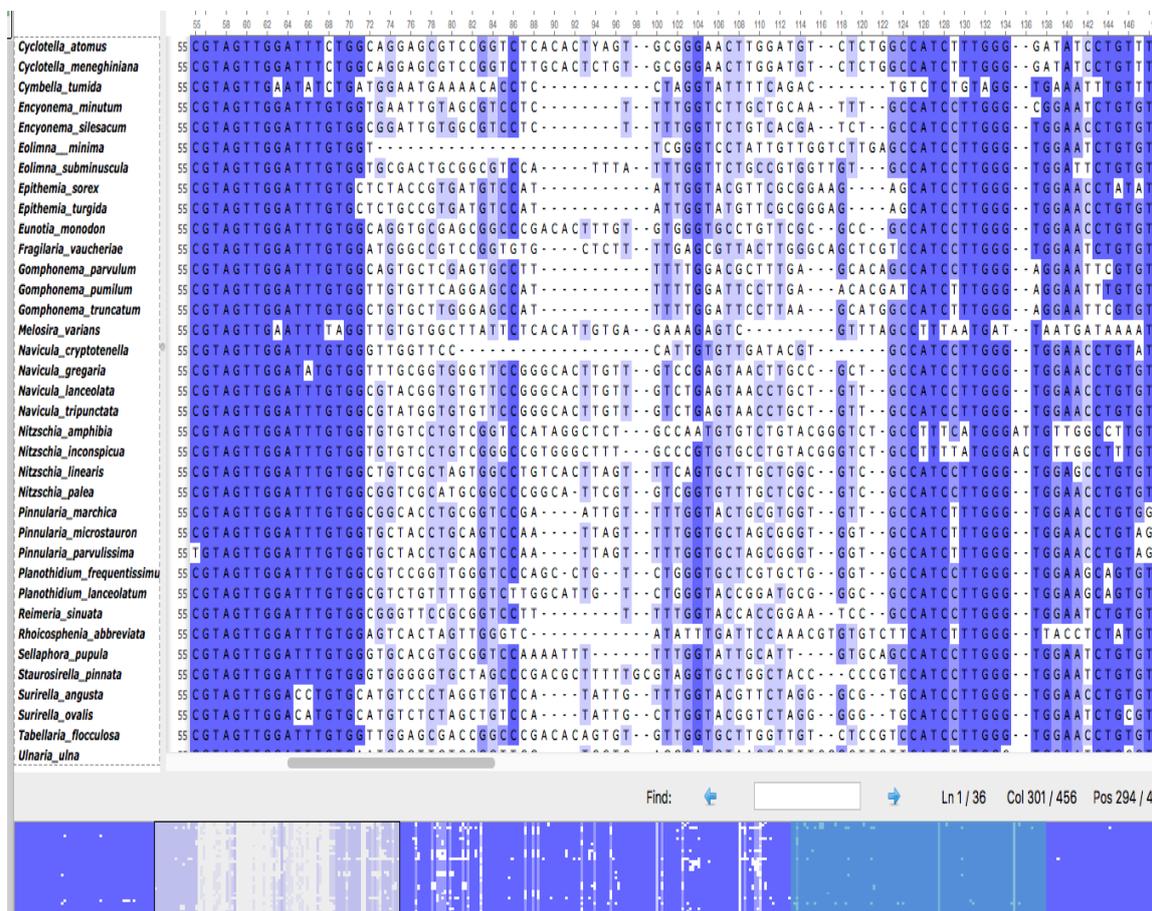
ID NCBI	GÉNERO	ESPECIE	ID NCBI	GÉNERO	ESPECIE
>DQ514858.1	Cyclotella	atomus	>AJ243065.1	Melosira	Varians
>AY221723.1	Cyclotella	meneghiniana	>KF417683.1	Navicula	Cryptotenella
>AY496206.1	Cyclotella	meneghiniana	>KU561109.1	Navicula	Cryptotenella
>AY496210.1	Cyclotella	meneghiniana	>AM502011.1	Navicula	Cryptotenella
>AY496211.1	Cyclotella	meneghiniana	>KU561150.1	Navicula	Gregaria
>AY496212.1	Cyclotella	meneghiniana	>KU561154.1	Navicula	Gregaria
>AY496213.1	Cyclotella	meneghiniana	>AY485484.1	Navicula	Lanceolata
>KT072987.1	Cyclotella	meneghiniana	>KT072979.1	Navicula	Tripunctata
>KT386323.1	Cyclotella	meneghiniana	>KT072977.1	Nitzschia	Amphibia
>AM236073.1	Cyclotella	meneghiniana	>KC736636.1	Nitzschia	Inconspicua
>JN790274.1	Cymbella	tumida	>AJ867013.1	Nitzschia	Linearis
>KJ011639.1	Encyonema	minutum	>KT072985.1	Nitzschia	Palea
>KJ011640.1	Encyonema	minutum	>JN418569.1	Pinnularia	Marchica
>KJ011641.1	Encyonema	minutum	>AM501983.1	Pinnularia	Microstauron
>JN790275.1	Encyonema	silesacum	>AM501984.1	Pinnularia	Microstauron
>JN790276.1	Encyonema	silesacum	>JN418591.1	Pinnularia	Parvulissima
>JN790277.1	Encyonema	silesacum	>KF417663.1	Planothidium	frequentissimum
>KT072991.1	Encyonema	silesacum	>KJ658409.1	Planothidium	frequentissimum
>KF417668.1	Eolimna	minima	>KT072986.1	Planothidium	frequentissimum
>KT072989.1	Eolimna	subminuscula	>KJ658411.1	Planothidium	Lanceolatum
>HQ912409.1	Epithemia	sorex	>AJ535189.1	Planothidium	Lanceolatum
>AB546734.1	Epithemia	sorex	>JN790290.1	Reimeria	Sinuata
>HQ912410.1	Epithemia	turgida	>JN790291.1	Reimeria	Sinuata
>AB085831.1	Eunotia	monodon	>JN790292.1	Reimeria	Sinuata
>EU260469.1	Fragilaria	vaucheriae	>KT072996.1	Reimeria	Sinuata
>AM497733.1	Fragilaria	vaucheriae	>KJ011673.1	Rhoicosphenia	Abbreviata
>AM497735.1	Fragilaria	vaucheriae	>EF151975.1	Sellaphora	Pupula
>JN790283.1	Gomphonema	parvulum	>EF151983.1	Sellaphora	Pupula
>JN790284.1	Gomphonema	parvulum	>EF151984.1	Sellaphora	Pupula
>JN790285.1	Gomphonema	parvulum	>EF465472.1	Staurosirella	Pinnata
>JN790286.1	Gomphonema	parvulum	>KT072995.1	Surirella	Angusta
>KJ011659.1	Gomphonema	parvulum	>KX120728.1	Surirella	Ovalis

>KC736629.1	Gomphonema	pumilum	>KX120732.1	Surirella	Ovalis
>AM501956.1	Gomphonema	truncatum	>HQ912584.1	Tabellaria	Flocculosa
>AM501967.1	Luticola	goeppertiana	>KC736643.1	Ulnaria	Ulna
>KT072969.1	Melosira	varians			

Elaborado por: PhD. Isabel Ballesteros y Estefania Mishque, (2018).

Con las secuencias anteriores se realizó un alineamiento que se muestra en la **figura 1**, las zonas azules indican mayor consenso y las zonas blancas indican diferencias entre las secuencias. Se observa zonas que presentan variabilidad flanqueada por zonas conservadas. Estas características son necesarias para el uso de una secuencia como código de barras genético. El resto de las secuencias alineadas se pueden observar en el **anexo 1**.

Figura 1: Alineamiento de las 72 secuencias de siatomeas epilíticas encontradas en el NCBI



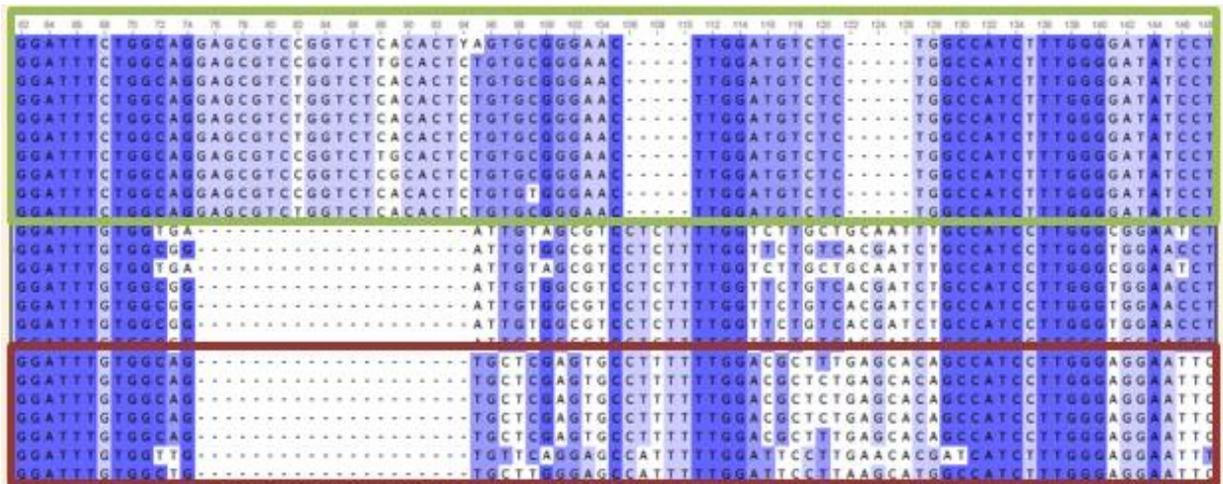
Fuente: UNIPROGENE

Elaborado por: PhD. Isabel Ballesteros & Estefania Mishque, (2018).

En la **figura 2**, se muestra el alineamiento para 3 géneros *Cyclotella* con color rojo, *Encyonema* con color blanco y *Gomphonema* con color verde, donde se evidencia que las

especies del mismo género quedan agrupadas y se diferencian de las secuencias de otros géneros. Esto indica que esta región tendría utilidad para distinguir las diatomeas.

Figura 2: Diferenciación de géneros *Cyclotella*, *Encyomena* y *Gomphonema*



Fuente: UNIPROGENE

Elaborado por: Ph.D. Isabel Ballesteros & Estefania Mishque, (2018)

Una vez determinada la región como código de barras genético, se determinaron los cebadores más adecuados para su amplificación, que hibridan en las zonas flanqueantes conservadas, las cuales se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 3: Cebadores seleccionados para la amplificación

	Nombre del primer	Secuencia	Tamaño de amplificación	Referencia
18SV4 region	DIV4for	GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG	420 pb	(Apothéloz-Perret-Gentil et al., 2017a)
18SV4 region	DIV4rev3	CTCTGACAATGGAATACGAATA		(Visco et al., 2015)

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

8.2. Obtención del Cultivo axénico.

En la **figura 3**, se muestra un cultivo obtenido, tras repiques y diluciones, formado por 8 especies de diatomeas, libre de microalgas verdes. Sin embargo, este cultivo se perdió por contaminación con hongo del ambiente o problemas de manipulación.

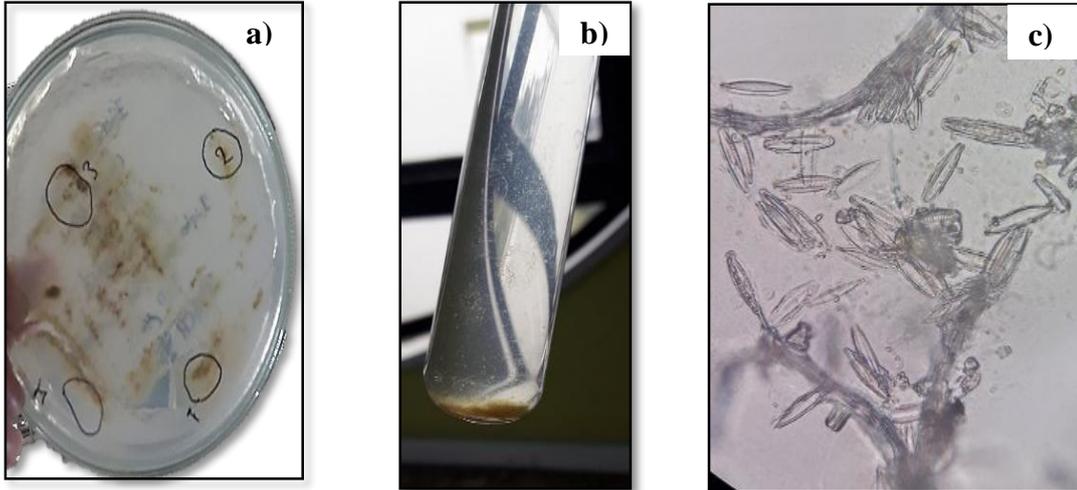
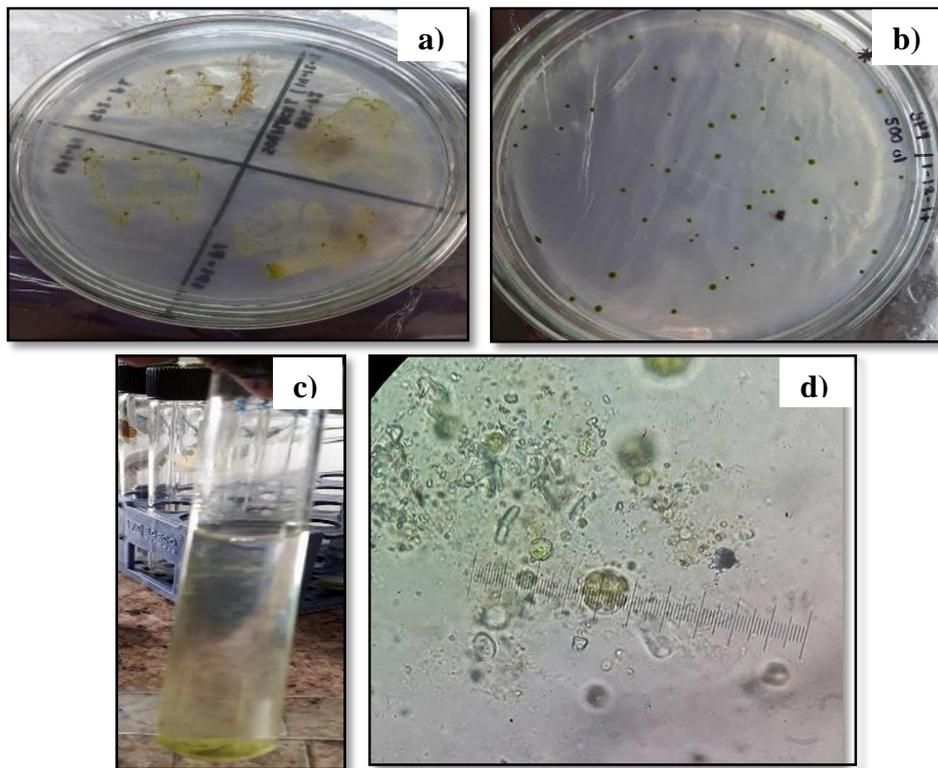


Figura 3: a) Repiques. b) diluciones c) visualización microscópica

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

Después se realizó el mismo procedimiento para obtener el cultivo axénico, pero los cultivos se tornaban verdes a los 8 días. Se comenzó a repicar y hacer diluciones a menos tiempo pero los resultados fueron los mismos. Al observar al microscopio se podía ver mayor cantidad de algas verdes y muy pocas diatomeas. Se puede observar en la **figura 4**.

Figura 4: a) cultivo de diatomeas, b) repiques, c) diluciones, d) visualización microscópica

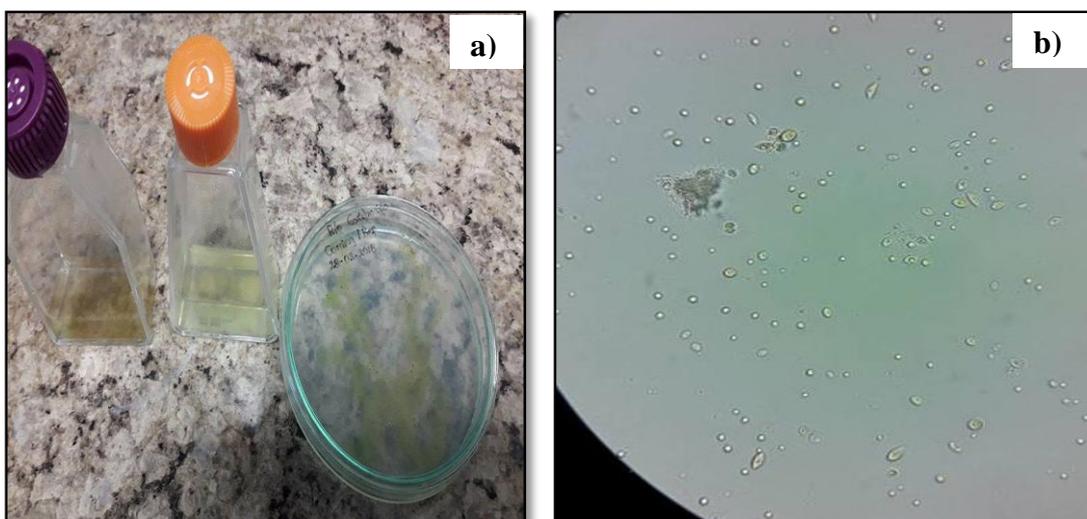


Elaborado

por: Estefania Mishque, (2018)

En la **figura 4**, se cambió los tubos de cristal por un matraz de polietileno para cultivo celular, ya que es estéril y cuenta con ventilación para evitar la contaminación con hongos. Aunque se realizara los repiques y diluciones más seguidas daban el mismo resultado, obteniendo más algas verdes que diatomeas.

Figura 4: a) Cultivos de diatomeas en corning, b) Visualización de los cultivos al microscopio



Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

En la **figura 5 y 6**, se muestra el resultado de la limpieza por centrifuga y la célula extraída por el microscopio invertido, donde se obtiene los mismos resultados de algas verdes.

Figura 5: Limpieza de centrifugación



diatomeas por

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

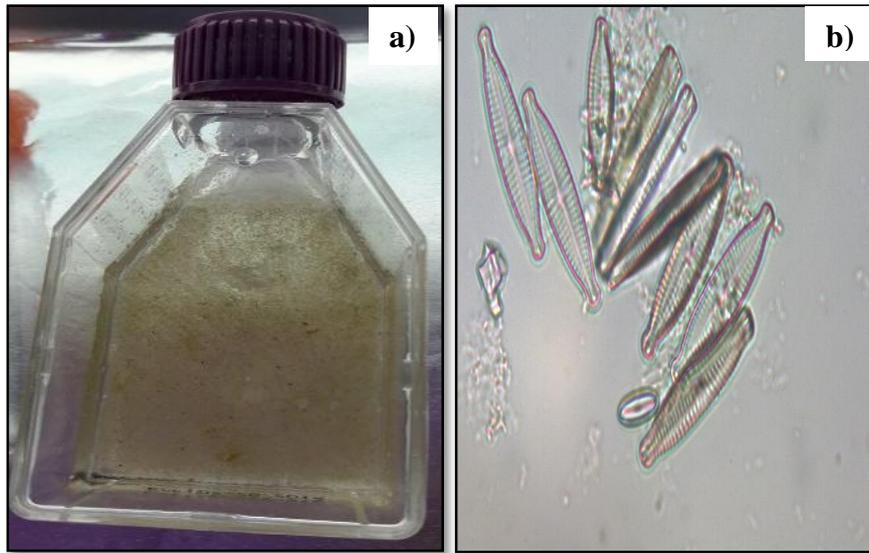
Figura 6: Resultado del microscopio invertido



Elaborado por: Estefania Mishque, (2018).

Finalmente se obtuvo un cultivo enriquecido en diatomeas y con bajo número de microalgas verdes, se muestra en la **figura 7**, Este cultivo se seleccionó para la extracción, observación microscópica y la DGGE.

Figura
de
b)

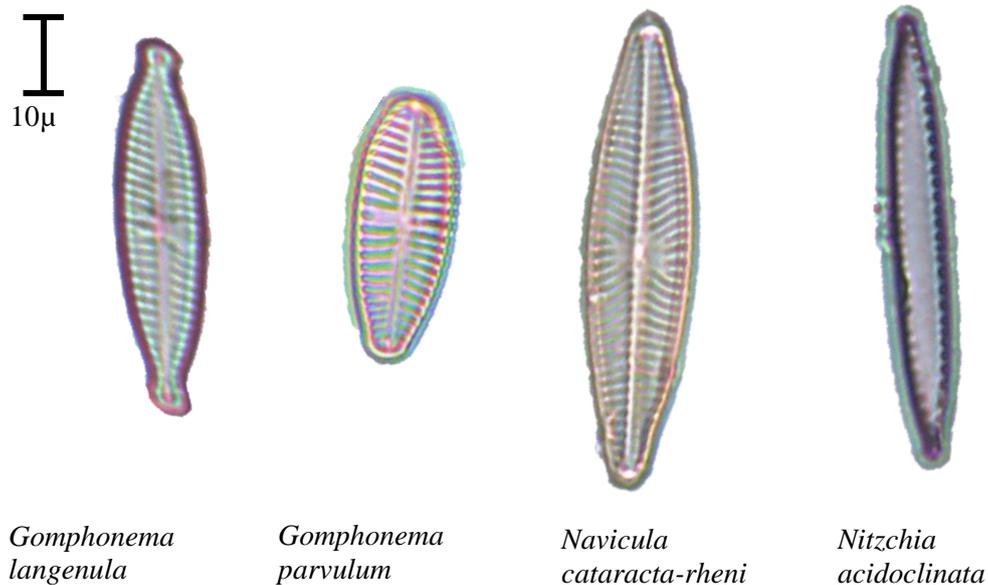


7: a) Cultivo diatomeas seleccionado, Visualización microscópica

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

En la **figura 8**, se puede observar los esqueletos 4 especies de diatomeas que se encontraron en el estudio por microscopia de la muestra del cultivo. Se realizó la identificación de estas especies con las guías de estudios realizados anteriormente teniendo en cuenta su tamaño, estrías, rafe y forma.

Figura 8: Especies identificadas



Elaborado por: Estefania Mishque, (2018).

8.3. Determinación del método de extracción

El método más eficiente de extracción de ADN es el que se realizó con el buffer de extracción, ya que es un método muy simple y no requiere de muchos pasos en comparación al Kit comercial.

En la **figura 9**, se comprueba la extracción de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa, donde se puede observar con el método de extracción buffer se obtiene mayor cantidad de ADN, siendo la banda más visible, a diferencia del método basado en el kit.

Figura 9: Comprobación de los dos métodos de extracción de ADN en gel de agarosa. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2, 3 las muestras de ADN extraídas con el kit y los carriles 4 y 5 las muestras de ADN de la extracción con buffer



Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

8.4. Amplificación mediante PCR

Una vez obtenido el ADN, se procedió a la amplificación de la región seleccionada en un termociclador. Las condiciones de reacción en el termociclador empleadas para la amplificación del gen 18S, se muestran en la **tabla 4**.

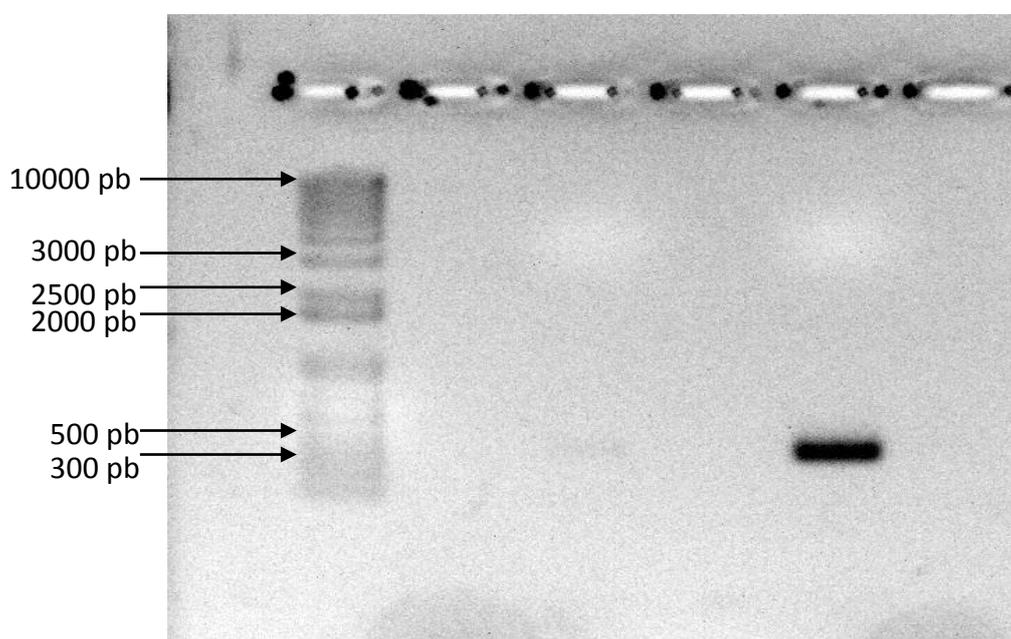
Tabla 4: Condiciones de PCR para la amplificación del gen 18SrRNA.

Fase		Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
Desnaturalización inicial		95 ° C	3 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	95° C	30 segundos	40
	Anillamiento	50 ° C	45 segundos	
	Elongación	72 ° C	1 minutos	
Elongación Final		72 ° C	5 minutos	1

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

El resultado de la amplificación se muestra en la **figura 10** donde se puede observar que las bandas tienen un tamaño de amplificación de 400 pb, dando a concluir que los cebadores utilizados en la amplificación fueron los indicados, además se puede determinar que las condiciones mostradas en la **tabla 4** y los ciclos propuestos para la PCR fueron los adecuados y se podrán utilizar en otras investigaciones.

Figura 10: Resultado de PCR en gel de Agarosa



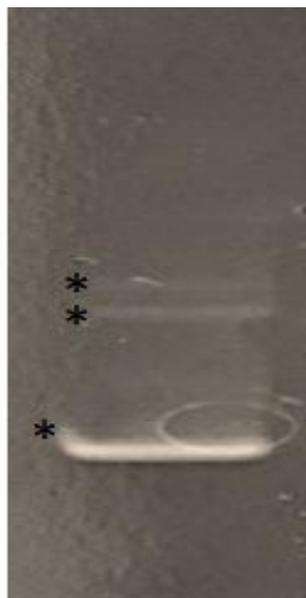
Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

8.5. Separación de bandas por medio de Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)

El producto de la amplificación de la PCR, se obtuvo a partir de una muestra de cultivo de varias especies de diatomeas por los que esperamos que haya varias secuencias de la región 18S. Para diferenciar las secuencias obtenidas se realizó una electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE). Esta técnica permite separar productos de amplificación con diferencia en su composición de bases nucleotidas.

En la **figura 11**, se puede observar el resultado de la DGGE en el que se divisan 3 bandas separadas. La razón por la que no se observan las 4 bandas de las 4 especies identificadas, puede ser porque los fragmentos de ADN son del mismo tamaño o el ADN de una de las especies era insuficiente y no permitiendo que los cebadores se acoplen y permitan la amplificación.

Figura 11: Resultado de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, las bandas se muestran con asteriscos



Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

8.6. Metodología óptima

Después de haber realizado los experimentos se determinó que la mejor metodología para la utilización del gen 18S como marcador genético, es la siguiente:

1. Realizar el alineamiento de las secuencias de diatomeas epilíticas existentes en el banco de datos de NCBI.
2. Los cebadores más óptimos fueron DIV4for (GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG) y DIV4rev3 (CTCTGACAATGGAATACGAATA)
3. Para el crecimiento de las diatomeas epilíticas se utilizó el medio de cultivo CHU # 10.
4. Se trabajó con un cultivo mixto de algas verdes y diatomeas epilíticas
5. La extracción de ADN se realizó con el método de extracción Buffer y la comprobación se realizó con la electroforesis en gel de agarosa por 2 horas a 100 voltios.
6. Se realizó la amplificación, determinando que las condiciones de PCR mostrados en la **Tabla 4**, comprobando el resultado con la electroforesis en gel de agarosa.
7. Para la separación de bandas se utilizó la Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) por 3 horas a 120 voltios.

10. IMPACTOS

10.1. Técnicos

- La aplicación de las técnicas genómicas ayudarían a reducir el proceso de identificación de las especies de diatomeas epilíticas.
- Se utilizaría a las comunidades de diatomeas epilíticas como bioindicadores para monitorear el estado ecológico de los cuerpos de agua del Ecuador, complementando el biomonitoreo y bioevaluación del estado ecológico de los cuerpos de agua.
- Al conocer el estado biológico de los cuerpos de agua por medio del análisis de las diatomeas epilíticas, se detectaría perturbaciones o impactos ambientales en los sistemas acuáticos.

10.2. Sociales

- Mejoraría la calidad de agua para consumo, riego, agricultura, ganadería, etc., y por ende mejoraría la calidad de vida de la población.

10.3. Ambientales

- Preservación de la biodiversidad acuática.
- Mejoramiento de la calidad de agua a largo plazo.
- Se implantaría un nuevo parámetro en la normativa de calidad de agua, así como leyes y decretos de protección a los ecosistemas acuáticos.

10.4. Económicos

- Reducción de costos en las actividades en las salidas de campo, en los análisis de laboratorio y tiempo.

11. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO:

RECURSOS	PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO			
	Cantidad	Unidad	V. Unitario	V. Total
Equipos				
Computador (uso)	60	Horas	1,00	60,00
Equipos de laboratorio	151	Horas	2,50	377.50
Materiales y suministros				
Material de gabinete	45	Unidades	0.50	22.50
Material de laboratorio	17	Cajas	33.40	567.80

Material bibliográfico y fotocopias				
Impresiones y copias del proyecto	1	Resma	3,50	3.50
Libros (uso)	10	Horas	5,00	50,00
Otros recursos				
Transporte, salida de campo	2		10,00	20,00
Alimentación	40		3,50	140,00
			TOTAL	1,241.30
			IMPREVISTOS 10%	124.13
			TOTAL	1365.43

Elaborado por: Estefania Mishque, (2018)

12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.1. Conclusiones

- El análisis de las secuencias del gen 18S de diatomeas epilíticas depositadas en la base de datos permitió establecer la zona para su uso como código de barras genético en diatomeas epilíticas de Ecuador.
- Se estableció la mejor metodología para el cultivo de diatomeas en laboratorio. Para ello se trabajó con el medio de cultivo CHU # 10, aplicando técnicas como repiques y diluciones sucesivas, limpieza por centrifuga, entre otras.

- Se comprobó la utilidad del gen 18S como marcador molecular, consiguiendo el aislamiento de ADN de cultivos de diatomeas, la amplificación de la zona génica de interés y la diferenciación de las secuencias específicas mediante DGGE.
- El establecimiento de cultivos puros de diatomeas presenta dificultades por el crecimiento de algas verdes o por problemas de contaminación.

12.2. Recomendaciones

- La metodología planteada en el presente trabajo se puede utilizar para otros estudios relacionados con la identificación de especies que tengan el gen 18S.
- Utilizar otros medios de cultivo para el crecimiento de diatomeas epilíticas y comparar con el CHU # 10 utilizado en el estudio y poder determinar el medio más óptimo.
- Continuar con los estudios moleculares para la identificación de diatomeas epilíticas y poder obtener una base de datos de ADN de las secuencias de las especies que existen en el Ecuador.
- Difundir la información del presente proyecto a las autoridades competentes, para establecer un nuevo parámetro en la normativa ambiental vigente.

14. BIBLIOGRAFÍA

Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P., & Pawlowski, J.

(2017a). Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1231-1242.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>

Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P., & Pawlowski, J.

(2017b). Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1231-1242.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>

- Blanco, S., Alvaréz, I., Cejudo, C., & Bécarez, E. (2010). *Guía de las diatomeas de la cuenca del Duero*.
- Castillejo, P., Chamorro, S., Paz, L., Heinrich, C., Carrillo, I., Salazar, J. G., ... Lobo, E. A. (2018). Response of epilithic diatom communities to environmental gradients along an Ecuadorian Andean River. *Comptes Rendus Biologies*.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.03.008>
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349.
- García, D. H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia, 11.
- Hebert, P. D., & Cywinska, A. (2003). Identificación biológica a través de códigos de barras de ADN, 9.
- Lobo, E. A., Heinrich, C. G., Schuch, M., Düpont, A., Costa, A. B. D., Wetzel, C. E., & Ector, L. (2016). Índice trófico de qualidade da água: guia ilustrado para sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros, 59.
- Lorete, J. (2015). Nuevas Perspectivas de en Paleopatología a traves de la genética.
Recuperado a partir de
http://www.uam.es/otros/sepal/actas/actas_files/trabajos/04_San%20Fernando/17%20Pon.11.pdf
- Luque, J., & Herráez, Á. (2016). *Biología_molecular_e_ingeniería_genética.pdf*. Madrid, España: Elsevier España, S.A.
- Pawlowski, J., Lejzerowicz, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Visco, J., & Esling, P. (2016). Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *European Journal of Protistology*, 55, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>

- Rimet, F., Trobajo, R., Mann, D. G., Kermarrec, L., Franc, A., Domaizon, I., & Bouchez, A. (2014). When is Sampling Complete? The Effects of Geographical Range and Marker Choice on Perceived Diversity in *Nitzschia palea* (Bacillariophyta). *Protist*, *165*(3), 245-259. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.03.005>
- Visco, J. A., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Esling, P., Pillet, L., & Pawlowski, J. (2015). Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. *Environmental Science & Technology*, *49*(13), 7597-7605. <https://doi.org/10.1021/es506158m>
- Zárate, C. B. (2009). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones*, 194.

15. ANEXOS

Anexo 1: Hojas de vida

Datos Personales:		
Nombres:	Salome Estefania	
Apellidos:	Mishque Cevallos	
Cedula de Identidad:	172226509-5	
Estado Civil:	Soltera	
Dirección:	Barrió La Primavera – Machachi.	
Teléfono:	022314 024	

E – mail:	esttefy5@gmail.com
Formación Académica:	
Secundaria:	
Colegio Nacional Machachi Área de estudio: Ciencias en Químico Biólogo	
Superior:	
Actualmente cursa el último ciclo de la carrera de Ingeniería Ambiental en la Universidad Técnica de Cotopaxi.	
Experiencia Laboral	
Pasante. Laboratorios de la Universidad internacional SEK Pasante. Laboratorio AQLAB Pasante. Empresa Auditora Culturani 2017	
----- Firma	

CURRICULUM VITAE			
DATOS PERSONALES			
NOMBRES:	MANUEL PATRICIO		
APELLIDOS:	CLAVIJO CEVALLOS		
CEDULA DE CIUDADANÍA:	0501444582		
NUMEROS TELÉFONICOS:	032824577 – 0992050541		
E-MAIL:	patricio_clavijo2005@yahoo.com		
	manuel.clavijo@utc.edu.ec		
ESTUDIOS REALIZADOS			
NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO EN EL SENESCYT	CODIGO DE REGISTRO SENESCYT

TERCER	LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA EDUCACION ESPECIALIDAD BIOLOGIA Y QUIMICA	3 DE AGOSTO DEL 1992	1010-02-142218
CUARTO	MASTER EN CIENCIAS DE LA EDUCACION MENSION PLANEAMIENTO DE INSTITUCIONES DE EDUCACION SUPERIOR	03 DE JUNIO DEL 2003	1020-03-399385
CUARTO	DIPLOMADO SUPERIOR EN NUEVAS TECNOLOGIAS DE LA INFORMACION Y COMUNICACIÓN Y SU APLICACIÓN EN LA PRACTICA DOCENTE ECUATORIANA	19 DE OCTUBRE DEL 2007	1008-07-668233
CUARTO	MAGISTER EN GESTIÓN AMBIENTAL	28 de JUNIO DEL 2017	1036-2017-185915

EXPERIENCIA LABORAL

- ❖ Asistente Científico del Área de Plantas Terrestres – Estación Científica Charles Darwin- Galápagos. 1991.
- ❖ Asistente de cátedra de Microbiología y Zoología. Universidad Técnica de Ambato. Febrero 1992 - 1993.
- ❖ Ayudante de Laboratorio de Microbiología y Biotecnología. Universidad Técnica de Ambato. Febrero 1992 - 1993.
- ❖ Vicerrector del Colegio “HUAMBALO” – Prov. del Tungurahua. Agosto 2003 – 2009.
- ❖ Gerente del laboratorio de larvas de camarón “CEGAL”. Prov. De El Oro. 1999-2001.
- ❖ Docente de la Universidad Técnica de Cotopaxi – Desde Abril 2001
- ❖ Coordinador Nacional de Ciencias Experimentales del Proyecto de Nuevo Bachillerato Ecuatoriano – Ministerio de Educación. 2010.
- ❖ Director de la Carrera de Ingeniería en Medio Ambiente – UTC 2016

PONENCIAS

- Ponente en las XV Jornadas Nacionales de Biología Guayaquil.
- Expositor en el I Congreso Internacional de Investigación Científica Universidad Técnica de Cotopaxi, tema: Estimación de la calidad del agua del río Cutuchi, Latacunga, Cotopaxi, mediante análisis de bioindicadores.
- Expositor en el I Congreso Internacional de Investigación Científica Universidad Técnica de Cotopaxi, tema: Blended-Learning en el proceso de enseñanza – aprendizaje de la Matemática en Primero de BGU.

SEMINARIOS DICTADOS

- Expositor en el Seminario de Diseño de Tesis – Cotopaxi - 2005
- Expositor en Curso Teórico – Práctico de Educación para la Salud - Tungurahua - Huambalo febrero 2009.
- Expositor en el Tercer Foro Ambiental sobre la Influencia de Virus AH1N1 y su relación con el Medio Ambiente – U.T.C. – Latacunga junio 2009.
- Expositor en el Seminario de “Diseño de Tesis”. Colegio de Ingenieros Agrónomos de Cotopaxi.- UTC. Latacunga septiembre 2005.
- Facilitador en el Taller sobre el Nuevo Bachillerato Unificado Ecuatoriano, Universidad Nacional de Loja. Loja 2011.

ARTICULOS

- UNIVERSIDAD Y SECTOR PRODUCTIVO - Revista ALMA MATER N° 3 –

Universidad Técnica de Cotopaxi – Latacunga septiembre 1998.
➤ LA SINERGIA INSTITUCIONAL - Revista ALMA MATER N° 4 – Universidad Técnica de Cotopaxi – Latacunga junio 1999.
➤ Compilaciones Teóricas y Prácticas sobre: QUÍMICA GENERAL, QUÍMICA ORGÁNICA, BIOQUÍMICA, QUÍMICA ANALÍTICA, BIOLOGIA Y MICROBIOLOGÍA, GENÉTICA, ÁREAS NATURALES DEL ECUADOR, BIOTECNOLOGIA.
..... Firma

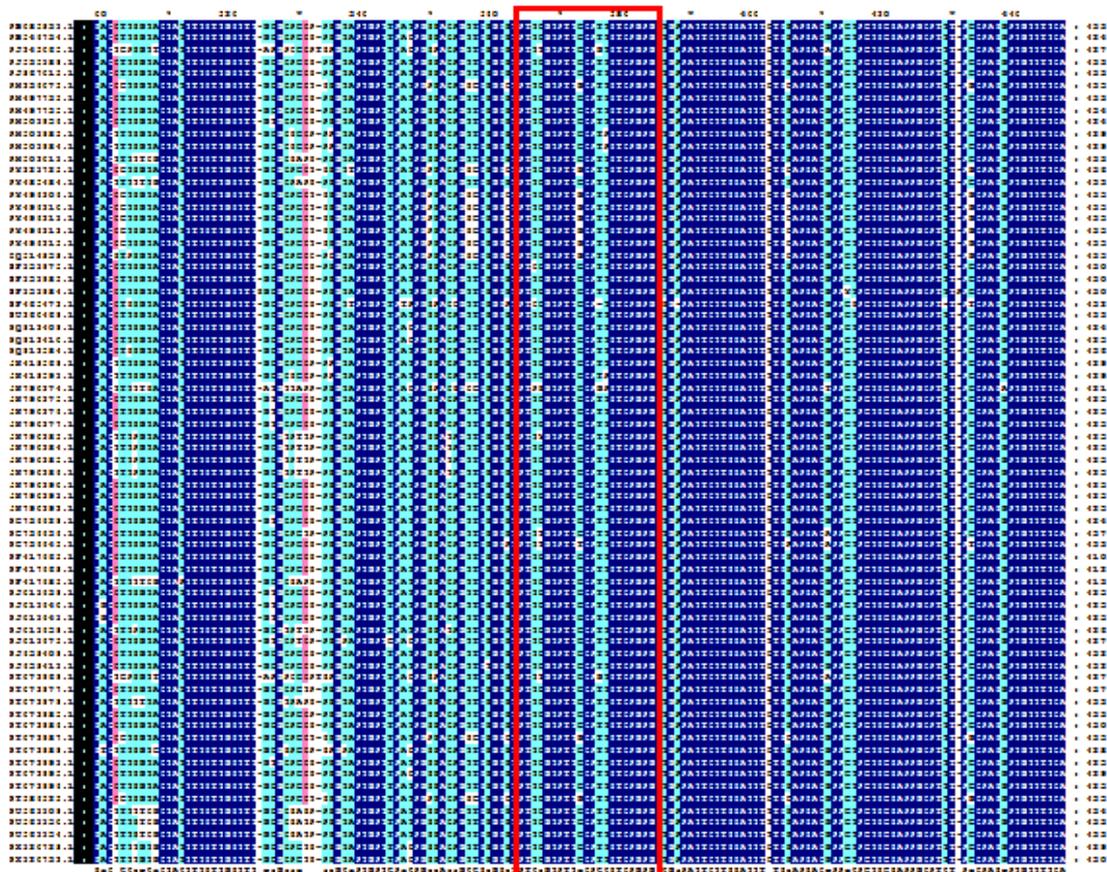
Anexo 2: Aval de traducción

Anexo 3: Ubicación de Cebadores

>Gomphonema truncatum 18S rRNA gene, strain AT-195Gel09
 TAGTCATACGCTCGTCTCAAAGATTAAGCCATGCACGTCTAAGTATAAATACATCACTGTGAACTGCGAATGGC
 TCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACAT
 GCATCAATACCCCTTCTCGGGTAGTATTTATTAGATTGAAACCAACCCCTTCGGGGTGATGTGGTGATTTCATAATA
 AGTTTGCGAATCGCATGACCTAGTCGGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTA
 TTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACGGAGGATTAGGGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTAC
 CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATG
 CCGGGCCTTTCAGGTCTGGCACTTGGAAATGAGAACAACCTCAAACCACTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTC
 TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG
 GATTTGTGGCTGTGCTTGGGAGCCATTTTTGGATTCCCTTAAGCATGGCCATCTTTGGGAGGAATTCGTGTGGCAT
 TAGCTTGTTCATGGGGGATACTCAACGTTTACTGTGAAAAAATCAGCGCGTTCAAAGCAAGCTTATGCTGTGAA
 TGTATTAGCATGGAATAATAAGATAGGACCTTGGTACTATTTTTGTTGGTTTGTGCACCGAGGTAATGATTAATAG
 GGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTTTGGAAGACGAACTACTGCGAAA
 GCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTC

TTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGTAGAGTTTCGTAATGTCTCTATCAGCACCTTAGGAGAAATCATA
AGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG
TGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGGTCAGACATAGTGAGGGATTGACAGATTG
AGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTC
CGTTAACGAACGAGACCGCTGCCTGCTAAATAGCTCGGTTAGTGATTTTCACCTGGCTTGAGCTTCTTAGAGGGAC
GTGCATAAATTTAAATGCAGGAAGATAGCGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGC
GCGTACACTGATGTGTTCAACGAGTTTTTCCCTGGCTGAGAAGCCTGGGCAATCTTTTGAACTCGCATCGTGAT
AGGGATAGATTATTGCAATTATTGATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAGACGCAAATCATCAATTTGCGTCGATT
ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGACTCGGGATTGTGAG
TGTTGCCTTCACTGGTGATGTTTGAAGAAGTGTCTAAACCTTATCATTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAG
GTTTCC

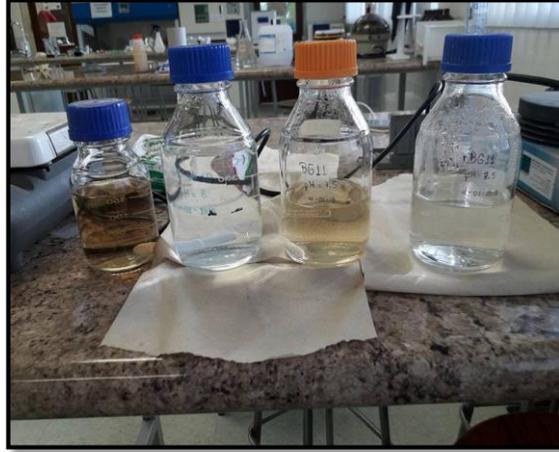
Elaborado por: PhD. Isabel Ballesteros & Estefania Mishque



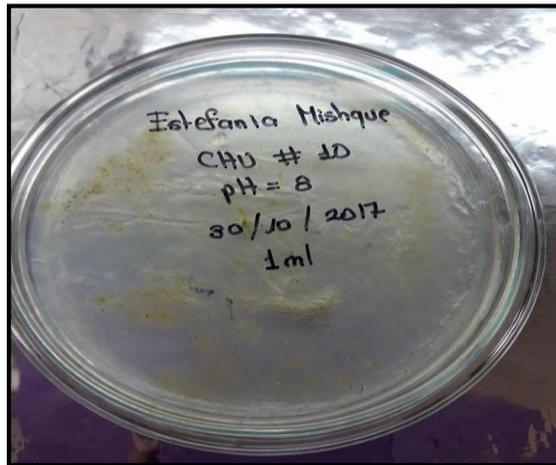
Ane
xo
4:
Alin
eami
ento
de
las
secu
enci
as de
las
espe
cies

Anexo 5: Procedimiento para la obtención del Cultivo axénico

1. preparación del medio CHU # 10



2. Siembra de diatomeas



3. Repiques sucesivos de colonias



4. Diluciones sucesivas



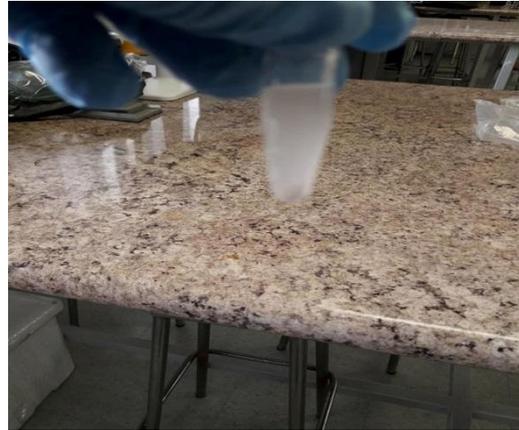
5. Limpieza de diatomeas por centrifugación



6. Cultivo mixto seleccionada de diatomeas

Anexo 6: Desarrollo de la extracción de ADN

1. Extracción de ADN por Kit comercial



2 Extracción de ADN por Buffer



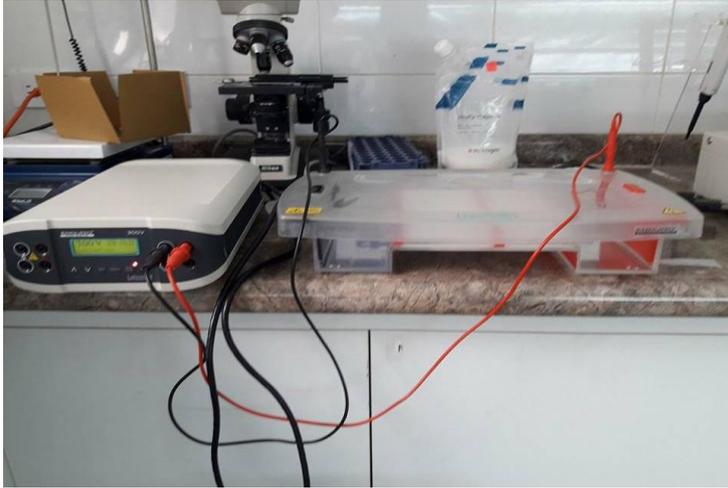
Anexo 7: Resultado de la extracción de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%

1. Marcador de peso molecular de 1Kb

molecular y marcador

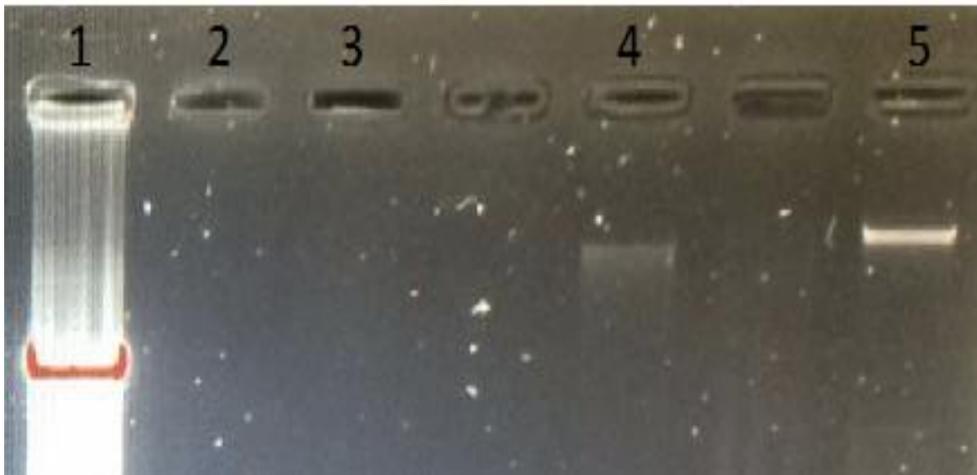


2. Cámara y condiciones para la electroforesis



Condiciones para
corrida en equipo
electroforesis en gel
de agarosa al 1%
Voltios: 100
Tiempo: 2 horas

3. Visualización de bandas en el equipo ENDURO



Anexo 8: Procedimiento para la amplificación de ADN

1. Preparación de las muestras



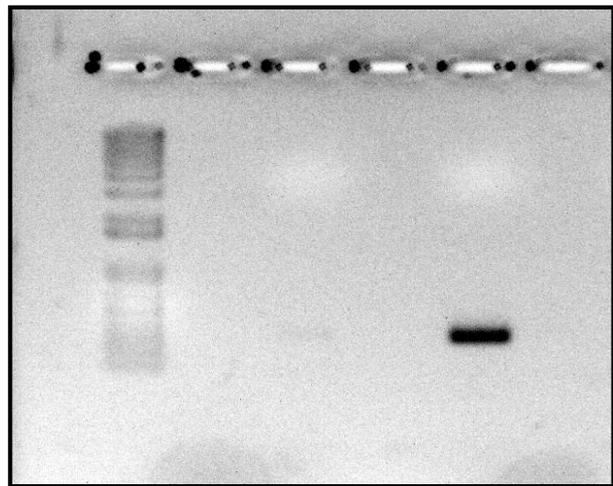
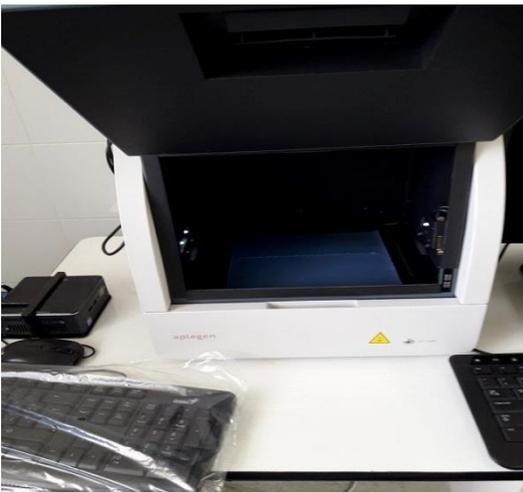
Receta para 50ul
Master Green: 25 ul
Cebador 1: 1ul
Cebador 2: 1ul
Agua: 22ul
ADN: 1ul

2. Carga de muestras en el equipo de electroforesis



Condiciones para corrida en
equipo electroforesis en gel de
agarosa al 1%
Volteos: 120
Tiempo: 2 HORAS

3. Visualización en el equipo ENDURO



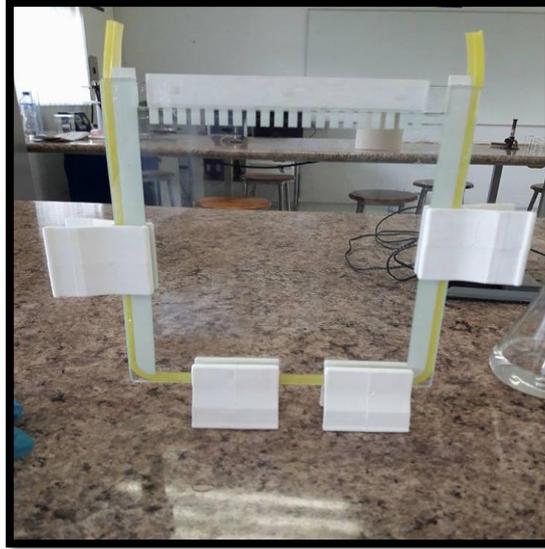
Anexo 8: Procedimiento del electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante

1.

Acoplamiento de equipo



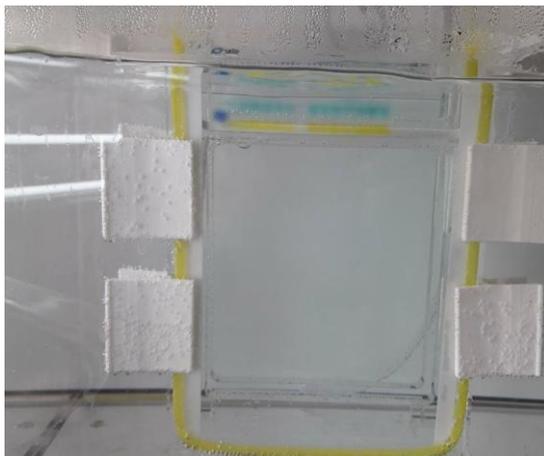
2. Secado de gel de poliacrilamida



3. Carga de muestras en los pasillos



4. Corrida de gel y condiciones



Condiciones

Temperatura constante: 60°C

Voltaje: 120

Tiempo: 2 horas

5. Resultado de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, visualizado por el Transiluminador UV

