



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR”

Realizado por:

Daniela Alejandra Portilla Miranda

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

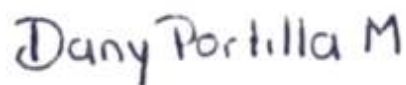
Quito 11 de Febrero 2021

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, DANIELA ALEJANDRA PORTILLA MIRANDA, con cédula de identidad 1721647855, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Daniela Alejandra Portilla Miranda

C.I. 1721647855

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
DIATOMEAS DEL ECUADOR

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR”**

Realizado por:

DANIELA ALEJANDRA PORTILLA MIRANDA

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



PhD. José Rubén Ramírez

DIRECTOR

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
DIATOMEAS DEL ECUADOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

SUSANA CHAMORRO

JUAN CARLOS NAVARRO

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



PhD(c). Susana Chamorro

REVISOR



PhD. Juan Carlos Navarro

REVISOR

Quito, 11 de Febrero 2021

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme llevado por este camino lleno de bendiciones, oportunidades y personas maravillosas.

A mis padres por estar para mí siempre dispuestos a apoyarme y darme ánimos para seguir adelante.

A mi hermano por enseñarme a valorar las pequeñas cosas y a ser siempre agradecida.

A mis profesores por motivarme y compartirme sus conocimientos.

A mis amigos por tantos buenos momentos vividos.

Muchas gracias

**EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
DIATOMEAS DEL ECUADOR**

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación

**BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES, APLICADOS A LA
GESTIÓN AMBIENTAL Y A LA BIOTECNOLOGÍA**

Y con el financiamiento de

Índice Biótico de Calidad de Aguas para el Ecuador

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-UISEK-P041516_3

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

11/02/2021

Para someter a:

To be submitted:

Evaluación de códigos de barras de ADN para la identificación de diatomeas del Ecuador

Daniela Portilla¹, José Rubén Ramírez^{1*}, Susana Chamorro¹,

Juan Carlos Navarro¹, Jennifer Moyón¹

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador. 11/02/2021

*AUTOR DE CORRESPONDECIA: José Rubén Ramírez, PhD. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-0986391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Códigos de barras para diatomeas del Ecuador

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Resumen

Existe una demanda creciente en el biomonitoreo de ecosistemas el cual incluye el muestreo de microorganismos bioindicadores. Para ello se han empleado a las diatomeas debido a su amplia diversidad de especies y a su rápida respuesta a variaciones en el medio. Para que su uso como bioindicadores sea eficaz, es necesario conocer su biodiversidad, y para este fin se han utilizado métodos de identificación morfológica los cuales han presentado ciertas dificultades. Como consecuencia, se han implementado métodos de identificación molecular mediante el uso de códigos de barras de ADN. El objetivo del estudio es evaluar los códigos de barras de las regiones 18s, *rbcL* e ITS en diatomeas aisladas de diferentes ecosistemas del Ecuador. La evaluación se la realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos, los cuales fueron elaborados usando como base la información disponible en el GenBank de NCBI. Además, se realizó la identificación morfológica utilizando la descripción original de las especies. Se logró el propósito de identificación con las regiones de 18s y *rbcL* presentando este último problemas en su amplificación. La región ITS presentó una mayor divergencia en comparación con las otras dos regiones, pero no se encontró suficiente información en las bases de datos. Los resultados mostraron un mayor éxito por parte de 18s para la identificación de las especies aisladas. Sin embargo, existe la necesidad de realizar estudios posteriores en especies del Ecuador para corroborar la utilidad de esta región en la identificación.

Palabras clave: diatomeas, bioindicadores, biodiversidad, códigos de barras, identificación molecular, herramientas filogenéticas.

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Abstract

There is a growing demand for ecosystem biomonitoring which includes the sampling of bioindicator microorganisms. For this, diatoms have been used due to their wide diversity of species and a rapid response to variations in the environment. For their use as bioindicators to be effective, it is necessary to know their biodiversity, and for this purpose morphological identification methods have been used which have presented certain difficulties. As a consequence, molecular identification methods have been implemented through the use of DNA barcodes. The aim of the study is to evaluate the barcodes of the 18s, *rbcL* and ITS regions in isolated diatoms from different ecosystems of Ecuador. The evaluation was carried out through the construction of phylogenetic trees, which were elaborated using the information available in the NCBI GenBank. Furthermore, the morphological identification was carried out using the original description of the species. The purpose of identification with the 18s and *rbcL* regions was achieved, presenting *rbcL* problems in its amplification. The ITS showed a greater divergence compared to the other two regions, but insufficient information was found in the databases. The results showed a greater success by 18s for the identification of the isolated species. However, there is a need for further studies in Ecuadorian species to corroborate the usefulness of this region in identification.

Key words: diatoms, bioindicators, biodiversity, barcodes, molecular identification, phylogenetic tools.

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Introducción

El uso de los diferentes recursos de un ecosistema da como resultado una serie de cambios y alteraciones, siendo de gran importancia una continua evaluación de las condiciones ecológicas, con el propósito de proteger y restaurar el medio ambiente. Para este fin se utiliza el biomonitoreo de cuerpos de agua que incluye el muestreo de especies acuáticas bioindicadoras que son organismos que revelan las presiones ejercidas sobre el medio ambiente con base en la diversidad, riqueza, estructura y función de sus comunidades (Lefrancois et al., 2018) (Maitland et al., 2020). Se ha encontrado que la composición de las comunidades de eucariotas refleja las condiciones ambientales y se encuentra estrechamente relacionada con la presencia de nutrientes, turbidez y pH (Chariton et al., 2015).

Las diatomeas son microorganismos eucariotas fotoautótrofos de gran importancia para entender los procesos que se dan en los ecosistemas, su conservación y calidad de agua, y es por ello que han sido ampliamente utilizadas como bioindicadores ecológicos. Su eficiencia como indicadores se fundamenta en su amplia diversidad taxonómica y sus preferencias ecológicas a niveles particulares de contaminación (Medinger et al., 2010). Adicionalmente, estos microorganismos tienen una gran plasticidad fisiológica que les permite adaptarse a diferentes factores como temperatura, salinidad, intensidad de luz y concentración de nutrientes que son la clave para su supervivencia en una amplia variedad de ecosistemas (Affan et al., 2007). El conocimiento de la composición taxonómica de las diferentes comunidades es indispensable para comprender los procesos ecológicos que se llevan al cabo en un ecosistema, así como también para su biomonitoreo y estudio del impacto ambiental ocasionado por diferentes agentes (Kermarrec et al., 2013).

Tradicionalmente, los datos necesarios para el biomonitoreo eran generados a través de la clasificación taxonómica morfológica utilizando las frústulas de las diatomeas. El tamaño,

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

forma y diseño de las valvas son las principales características tomadas en cuenta. Sin embargo, algunos de los caracteres morfológicos pueden distinguirse con poca facilidad como resultado de la reducción de tamaño durante el ciclo de vida (Visco et al., 2015) y en tales ocasiones se podría dificultar el proceso de clasificación y/o identificación a nivel de especie (Moniz & Kaczmariska, 2010).

En la actualidad, la implementación de estrategias moleculares mediante la utilización de códigos de barras de ADN constituye una buena respuesta para delinear la especie de un microorganismo o de diatomeas. Un código de barras de ADN es una región del genoma susceptible a mutaciones que cuenta con la capacidad de identificar organismo. Esta región a su vez tiene dos regiones flanqueantes conservadas para facilitar el diseño de los cebadores, y además debe ser obtenida por amplificación simple (Guo et al., 2015). Al utilizar códigos de barras como método de identificación se puede obtener información confiable a través de una secuencia estandarizada y corta de ADN, que puede ser generada fácilmente por métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y caracterizada para todas las especies (Savolainen et al., 2015). La codificación de muestras ambientales de ADN es un método innovador que se puede llevar al cabo con muestras provenientes de agua, aire o sedimento y sirve para el monitoreo de la biodiversidad de los diferentes hábitats ofreciendo una mayor resolución taxonómica (Deiner et al., 2017), reconstrucción de ecosistemas, conocimiento de la interacción entre especies, detección temprana de especies invasivas, detección de contaminantes, detección de especies raras, detección de especies con densidades bajas y biomonitoreo de calidad de agua y aire (Ruppert et al., 2020).

De todas las regiones que han sido utilizadas para la identificación de diatomeas, Moro et al. (2009) señala que la región v4 correspondiente a la región más variable de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18s, es bastante específica para la identificación. Esta región, junto con el gen de ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa *rbcL*, han demostrado ser útiles en

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

la discriminación de especies mostrando una taxonomía más diversa y teniendo los mejores resultados entre las regiones que han sido evaluadas (Rimet et al., 2016). Por otra parte, Moniz y Kaczmarska (2010), afirman que la región 5.8s + ITS2 es buena en la discriminación de la mayoría de especies en su investigación. El espaciador transcrito interno (ITS) ha sido considerado útil para definir niveles intraespecíficos o a nivel de población debido a su rápida evolución (Behnke et al., 2004). El carácter de un estudio molecular de identificación depende de: la calidad y la cobertura taxonómica de las bases de datos de referencia, los marcadores utilizados, el sesgo de la metodología, y los métodos bioinformáticos (Kermarrec et al., 2013). Existen investigaciones en las que se ha comprobado la correlación entre los resultados morfológicos y moleculares. A pesar de esto, existe todavía un enorme potencial de reducir las diferencias entre ambos tipos de estudios, resolviendo algunas limitaciones como lo son la existencia de bases de datos incompletas e inespecíficas, inconsistencias entre la taxonomía morfológica y molecular, el sesgo en el análisis cuantitativo de datos de la secuenciación, así como también el sesgo en la extracción de ADN, condiciones de PCR, especificidad de cebadores, preparación de bibliotecas y análisis de secuencias (Visco et al., 2015). Tomando en cuenta la necesidad de proponer el uso de una región adecuada que permita complementar estudios de taxonomía morfológica tradicional, mejorar la identificación molecular y los resultados que se han obtenido en artículos previos con las regiones 18s, *rbcL* e ITS, en el presente estudio se ha decidido evaluar códigos de barras pertenecientes a estas regiones, utilizando diatomeas provenientes de dos regiones diferentes del Ecuador.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas de dos locaciones de la provincia de Pichincha: Río Rumipamba (0°10'47.3"S 78°30'02.1"W) y de Lagos del Antisana (0°28'53"S 78°08'27"O).

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Antisana es un volcán de la Cordillera de los Andes con una altitud de 5 704m el cual se encuentra ubicado en las provincias de Pichincha y Napo, unos 50 km al sureste de la ciudad de Quito. Todas las muestras fueron colectadas bajo el permiso No. MAE-DNB-CM 2018-0028-0093 concedido por el “Fonag”, EPMAPS” y el “Ministerio del Ambiente”, Ecuador.

Para obtener muestras con diatomeas, se rasparon rocas y ramas que presentaban superficie con mucílago con la ayuda de un cepillo el cual se lavó con agua destilada, y se colocó la muestra en un frasco de plástico, previamente esterilizado con luz UV-C.

Cultivo

Las muestras fueron transportadas al laboratorio y sembradas inmediatamente en placas de agar. Se utilizó medio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) al 0,9% de agar con 50% más de silicato y se sembró con asa de Digralsky. Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente con intensidad de luz de 3 000 luxes, proporcionados por focos LED, en un fotoperiodo de 12h: 12h luz/oscuridad durante 15 días.

Identificación morfológica

Las colonias de diatomeas en las placas se observaron bajo un microscopio óptico y se comparó cada especie con las características proporcionadas por Lange-Bertalot, H. (1997) y Kociolek, P. (2011) para su identificación morfológica. Una vez identificadas las colonias éstas fueron repicadas, y se siguió el mismo procedimiento hasta obtener cultivos axénicos.

Amplificación por PCR y secuenciación

La región hipervariable v4 del ADNr de 18s se amplificó en un volumen final de 25uL utilizando 15uL de Go Taq Master Mix para la reacción y una concentración de 1uM para los cebadores. Se realizaron 35 ciclos que consistían en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, la hibridación de 1 minuto a

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

60°C, la extensión de 1,5 minutos a 72°C y la extensión final de 3 minutos a 72°C. Las regiones *rbcL* e ITS fueron amplificadas siguiendo el mismo protocolo, pero se probó un gradiente de temperaturas de hibridación buscando una mejor amplificación. En el caso de ITS se usó una concentración de primer de 0,4 uM. Las secuencias de las diferentes regiones con su temperatura de hibridación se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de cebadores para las regiones de 18s, *rbcL* e ITS

Primer	Secuencia	Temperatura de hibridación	Tamaño aproximado del amplicon	Referencia
DIV4for	5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG-3'	60°C	300pb	(Zimmerman et.al., 2010)
DIV4rev3	5'-CTCTGACAATGGAATACGAATA-3'	60°C	300pb	(Zimmerman et.al., 2010)
Forward	5'-CAGTTGCGGCTTTACGTTTAGA-3'	43°C-55°C	650pb	(Haro, 2019)
R3_1	5'-CCTTCTAATTTACCAACAACACTG -3'	43°C-55°C	650pb	(Vasselon et al., 2017)
ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	43°C-55°C	350 pb, 500 pb y 450 pb	(White, T et al., 1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	43°C-55°C	350 pb, 500 pb y 450 pb	(White, T et al., 1990)

Se verificaron los productos de amplificación por PCR mediante electroforesis 1h a 100v, en gel de agarosa al 1,5%, teñido con SYBR-safe (1uL/mL). Posteriormente, los amplicones se purificaron utilizando PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial y se mandaron a secuenciar a la empresa MacroGen®

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas a partir de los diferentes sets de cebadores fueron ensambladas en una secuencia consenso, usando GeneStudio Professional Edition (disponible en

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

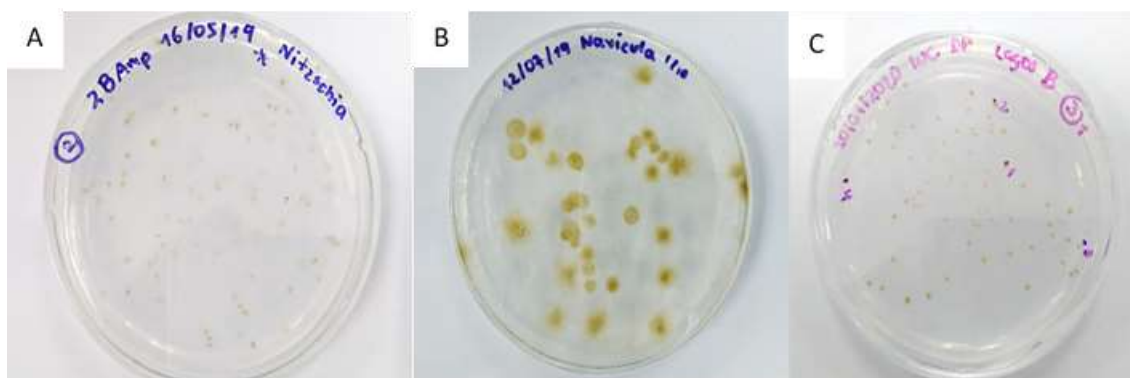
<http://www.genestudio.com>). A partir de los datos de la secuenciación se construyeron árboles filogenéticos mediante el software MEGA 10 utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de maximum likelihood bajo el modelo Kimura-2 con los datos del GenBank de NCBI como referencia. Se midió la divergencia genética mediante la matriz de distancias elaborada bajo el método de p-distance.

Resultados

Aislamiento e identificación morfológica de especies

En el presente estudio se obtuvo un total de 3 cultivos axénicos en placa, cuyas colonias presentaban una coloración marrón verdoso, aunque la morfología de las unidades de colonia varió entre las diferentes especies encontradas (Figura 1). A cada una de estas especies se les asignó el identificador institucional PCH00001 de Rumipamba, PCH00002 de Rumipamba y NP00001 de Antisana, para las especies encontradas en las zonas de Rumipamba y Antisana, respectivamente.

Figura 1. Cultivos axénicos en medio WC y agar al 0,9%. A) Colonias de Especie PCH00001 de Rumipamba. B) Colonias de Especie PCH00002 de Rumipamba. C) Colonias de Especie NP00001 de Antisana.



De acuerdo a la clasificación morfológica, la especie PCH00001 de Rumipamba corresponde a la descripción de (Agardh) W.Sm. 1853 de *Nitzschia linearis*. En la figura 2 se

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

puede observar la forma de las valvas lineales a lineal-lanceoladas a excepción del centro donde es ligeramente cóncavo, los ápices son redondeados casi capitados, el rafe colocado excéntricamente y las estrías paralelas. El largo se encuentra dentro del rango establecido, sin embargo, no coincide con la descripción del autor en las dimensiones del ancho ni en el número de fíbulas. No es posible contar el número de estrías en la foto de microscopía óptica.

Figura 2. Cultivo axénico PCH00001 de Rumipamba. Vista valvar (1-3). Vista pleural (4).

Largo: 102.5-104.9. Ancho: 8.7-8.9. Entre 7-9 fíbulas en 10 μm .



Tabla 2. Características morfológicas de *Nitzschia linearis* según (Agardh) W.Sm. 1853

Largo	60-150 μm
Ancho	4-6 μm
Estrías en 10 μm	35-38
Valvas	Lineales a lineal-lanceoladas con lados paralelos excepto cerca del centro que es cóncavo
Ápices	Redondeados y casi capitados
Rafe	Colocado excéntricamente, con un nódulo central distintivo
Fíbulas	Varían en tamaño y número de 11 a 14 en 10 μm
Estrías	Paralelas

Las características morfológicas de la especie PCH00002 de Rumipamba corresponden en su mayoría a la descripción de *Mayamaea atomus* según Lange-Bertalot & Bonik 1976. En la figura 3 se pueden observar las valvas elípticas a lineal-elípticas con extremos ampliamente redondeados, el rafe filiforme, el área axial ancha y el área central redondeada. Las dimensiones

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

tanto de largo como de ancho se encuentran dentro de lo establecido en la descripción y las estrías son invisibles.

Figura 3. Cultivo axenico PCH00002 de Rumipamba. Vista valvar (1-3). Vista pleural (4).

Largo:10,8-12,8. Ancho 4,9-6,9. Estrías invisibles.

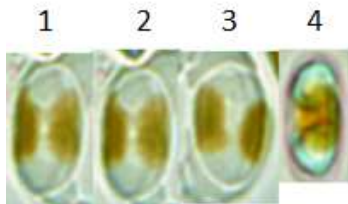


Tabla 3. Características de *Mayamaea atomus* según Lange-Bertalot & Bonik 1976

Largo	5,5-16 μm
Ancho	3-6,5 μm
Estrías en 10 μm	16-36
Valvas	Elípticas a lineal-elípticas con extremos ampliamente redondeados
Área axial	Estrecha a muy ancha
Área central	Pequeña a moderadamente grande, redondeada o más o menos transapicalmente ensanchada
Rafe	Filiforme que se encuentra en una nervadura mediana
Estrías	Variables en inclinación radial continua a radial muy fuerte, en el medio más o menos la misma longitud que el resto o individual más o menos acortada

La especie NP00001 de Antisana morfológicamente coincide con las características de *Nitzschia perminuta* según (Grunow in Van Heurck) H.Perag. En la figura 4 se pueden observar las valvas lineales a lineal-lanceoladas con márgenes paralelos, los ápices ligeramente alargados a redondeados y las estrías paralelas finamente punteadas. La descripción no coincide en las dimensiones ni en el número de fíbulas, y no es posible contar las estrías en la foto de microscopio óptico.

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Figura 4. Cultivo axénico NP00001 de Antisana. Vista valvar (1-3). Largo: 22,8-24,6. Ancho: 5,3-5,1. 9 fíbulas en 10um.

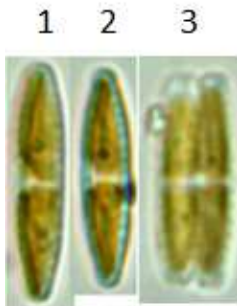


Tabla 4. Características de *Nitzschia perminuta* según (Grunow in Van Heurck) H.Perag. 1903

Largo	8-20 μm
Ancho	3-4 μm
Estrías en 10 μm	22-27
Fíbulas en 10 μm	11-13
Valvas	Lineales a lineal-lanceoladas, con márgenes paralelos. La valva distal se estrecha abruptamente para formar ápices ligeramente alargados a redondeados.
Estrías	Paralelas y finamente punteadas.

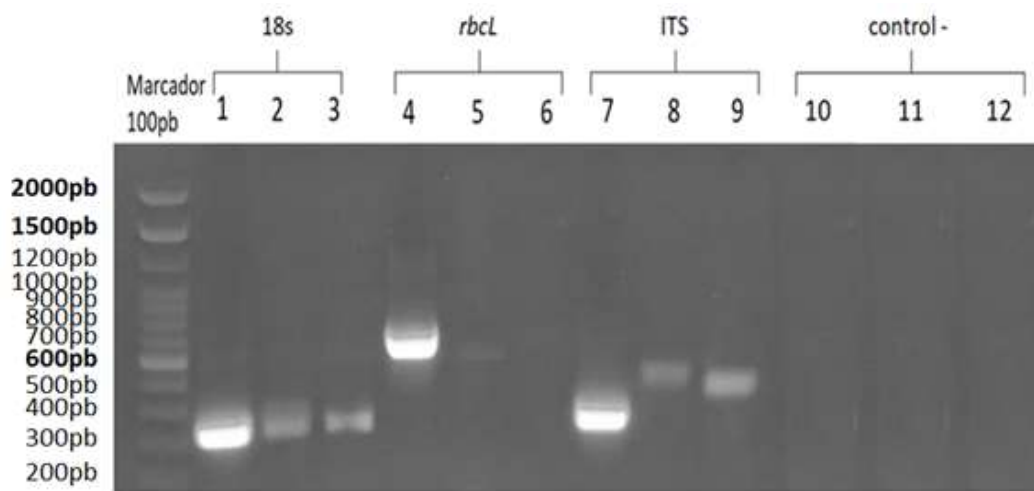
Identificación molecular y análisis filogenético

Se obtuvo el gel de electroforesis con las bandas correspondientes a las especies aisladas utilizando los 3 sets de cebadores en cada una de ellas. Se puede observar una amplificación satisfactoria de la región 18s con una banda de 300 pb en todas las especies. En el caso de *rbcL* se puede observar una banda clara de 650 pb correspondiente a la Especie PCH00001 de Rumipamba, y una banda tenue del mismo tamaño que pertenece a la Especie PCH00002 de Rumipamba. Este cebador no generó productos de amplificación para la especie de Antisana. En el caso de los cebadores ITS, se pueden observar los amplicones con diferentes tamaños para cada una de las especies, con longitudes aproximadas de 350 pb, 500 pb y 450 pb,

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

respectivamente. En ninguna de las amplificaciones por especie se observó más de un amplicón por especie.

Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR de los cultivos axénicos. 18S (1-3). *rbcL* (4-6). ITS (7-9). Especie PCH00001 de Rumipamba (1, 4, 7). Especie PCH00002 de Rumipamba (2, 5, 8). Especie NP00001 de Antisana (3, 6, 9). Control negativo 18s, *rbcL* e ITS (10-12).

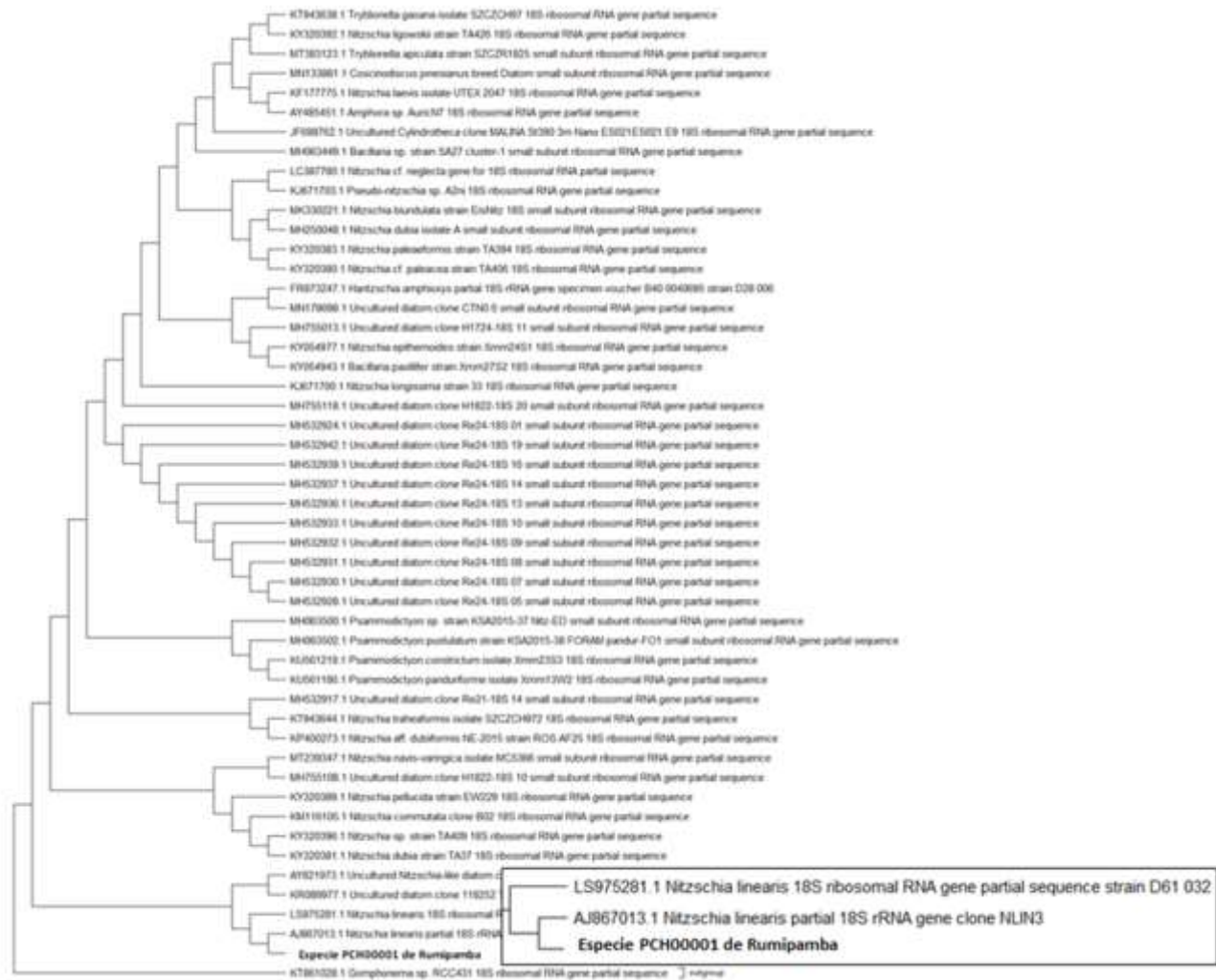


Análisis filogenético

La especie PCH00001 de Rumipamba se encuentra en el mismo clado de *Nitzschia linearis* con una divergencia de 0% (Figura 6). Por lo tanto, la especie PCH00001 de Rumipamba corresponde a *Nitzschia linearis* de acuerdo con el análisis molecular de la región 18s. Este resultado puede ser corroborado con *rbcL* (Figura 7) dado que ambas especies muestran una divergencia de tan solo 1,4%. En el caso de ITS (Figura 8) no se pudo establecer una identificación molecular debido a que no se encuentra información de especies cercanas en la base de datos.

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Figura 6. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región 18s.



EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Figura 7. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región *rbcL*.

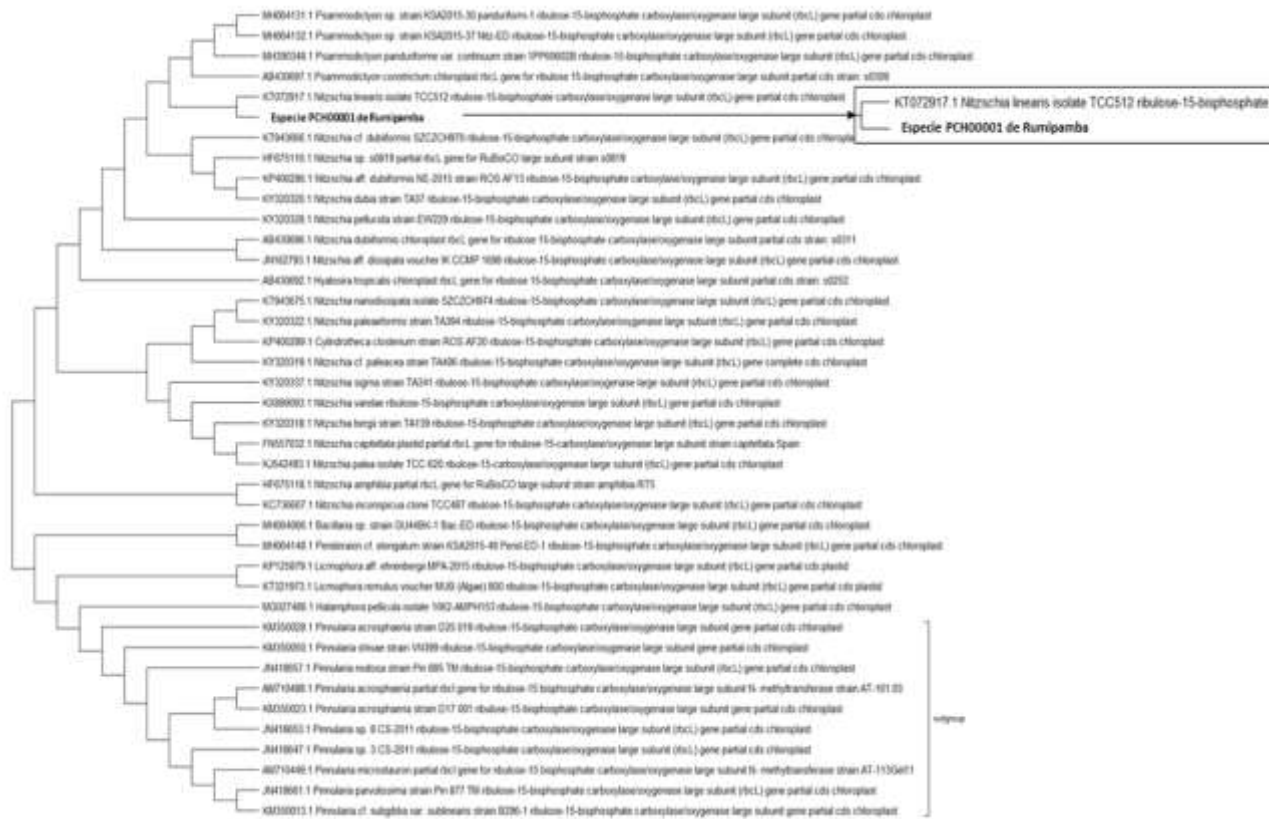


Figura 8. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región ITS.



EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Figura 11. Árbol filogenético Especie NP00001 de Antisana región 18s.

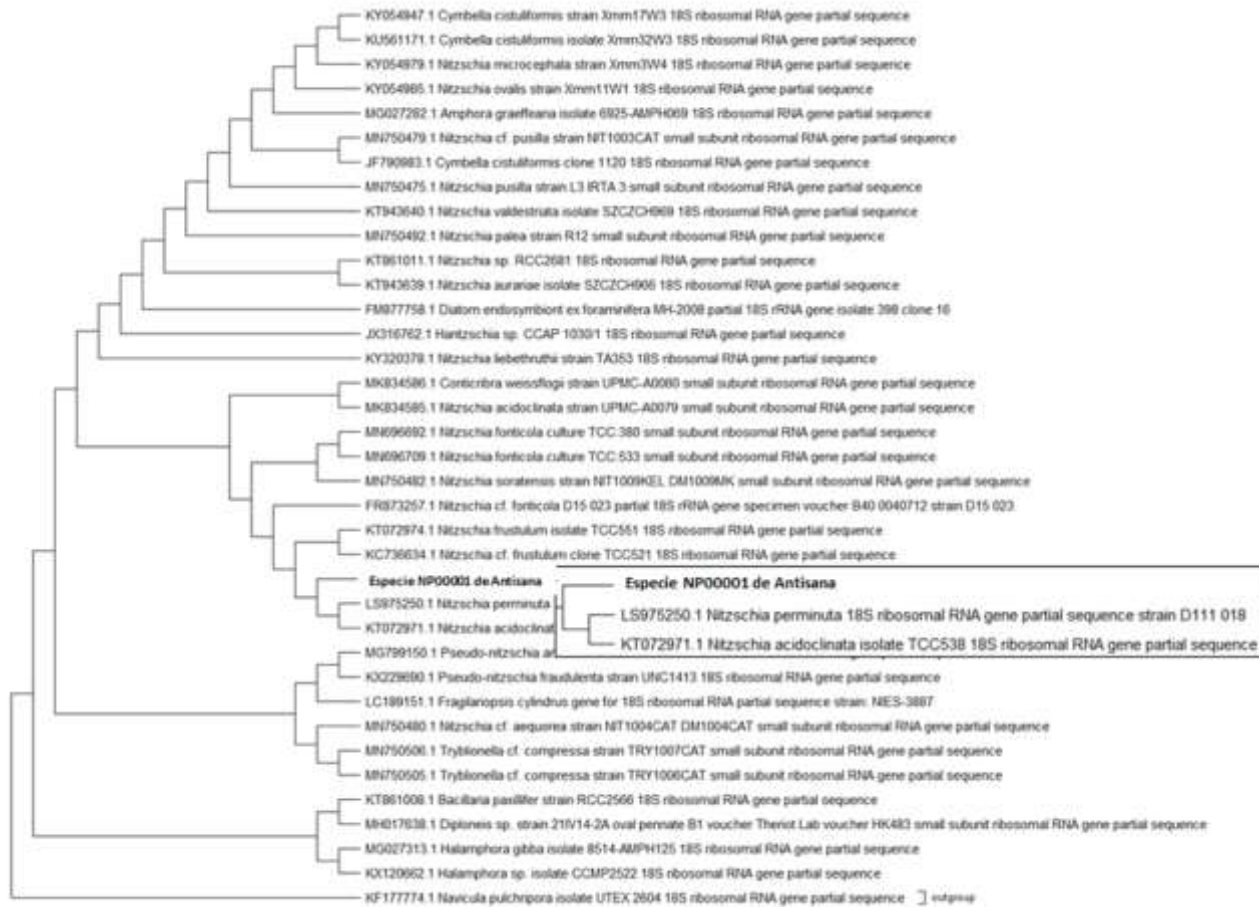
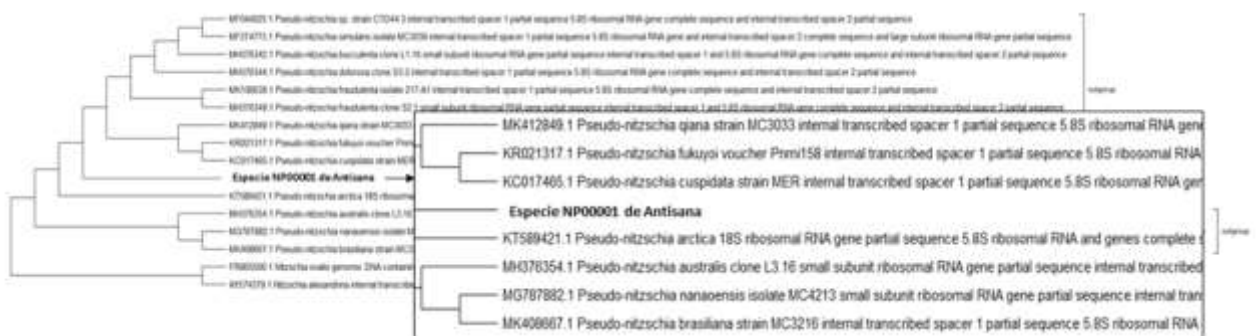


Figura 12. Árbol filogenético Especie NP00001 de Antisana región ITS.



En los árboles filogenéticos de las regiones 18s y *rbcL* de PCH00001 de Rumipamba y NP00001 de Antisana, la mayoría de especies pertenecen a la familia Bacillariaceae. En los árboles de 18s algunas especies del género Cymbellaceae se encuentran entre especies

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

del género Bacillariaceae (Figura 6) y algunas especies del género Lithodesmiaceae se encuentran entre especies del género Achnantheaceae (Figura 11).

Por otro lado, en el árbol de la región 18s de PCH00002 de Rumipamba, existen especies del orden Lithodesmiales y Achnanthes que se encuentran entre especies del orden Naviculales (Figura 10), y en el árbol de la región *rbcL* de la misma especie existen especies del orden Cymbellales que se encuentran entre las demás especies que pertenecen al orden Naviculales (Figura 11).

Discusión

En los diversos estudios moleculares de diatomeas se han utilizado diferentes regiones para su capacidad de identificar y delinear especies. Entre estas regiones algunas de las que han sido exitosas para esta tarea se encuentran la región v4 de 18s, la región de la enzima rubisco *rbcL* y la región de 5.8s + ITS2. Sin embargo, resulta necesario realizar una comparación de diferentes de códigos de barras descritos en la literatura y cotejar los resultados con análisis taxonómicos clásicos, para evaluar su verdadera capacidad de llevar a cabo una identificación adecuada y confiable. Se encontró que el set de cebadores que amplifica la región 18s cuenta con una mayor capacidad de detección y amplificación, como se puede verificar en las bandas generadas en el gel a partir de la PCR, por lo que podría ser idóneo al momento de diseñar un protocolo práctico para la identificación de especies utilizando un código de barras de ADN. Además, esta región cuenta con una mayor cantidad de información disponible en las bases de datos lo cual facilita significativamente el trabajo de identificación y a su vez lo hace más preciso (An et al., 2017). Las amplificaciones por PCR a partir de las especies PCH00002 y NP00001 se presentaron una intensidad considerablemente menor, lo cual pudiera estar asociado a una menor eficiencia de amplificación relacionada con posibles mismatches entre estos cebadores con sus templados respectivos. Esto refuerza la necesidad de diseñar cebadores

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

a partir de regiones conservadas para lograr una amplificación universal. Así como en el estudio de Zimmerman et al. (2011), en el caso de 18s, todas las especies de diatomeas tuvieron una adecuada amplificación.

Algunos autores como Rimet et.al., (2016) señalan a *rbcL* como un código de barras apropiado en la tarea de identificar especies, sin embargo, los cebadores para esta región empleados en este estudio presentaron una baja o nula amplificación en algunas ocasiones (NP00001 de Antisana y PCH00002 de Rumipamba), al igual que sucedió en el estudio de Haro, (2019), lo cual representaría un obstáculo en el proceso de identificación. Al alinear el primer forward de la región *rbcL* con la secuencia de *Mayamaea permitis* (Anexo A-1) y de la misma manera al alinear el primer con la secuencia de *Nitzschia perminuta* (Anexo A-2) existen varios mismatch, lo cual pudo haber impedido su unión para su posterior amplificación. Por otro lado, se pudo comprobar que la base de datos correspondiente a esta región es bastante amplia pues no hubo dificultad al encontrar las especies que se logró amplificar en el presente estudio (PCH00001 y PCH00002 de Rumipamba), y asimismo fue posible su identificación. En consecuencia, no sería apropiado descartar esta región sino más bien buscar cebadores con una mayor facilidad de amplificación.

En el caso de ITS se obtuvieron bandas utilizando una temperatura de hibridación inferior a la establecida como ideal, con lo cual se logró la unión de los cebadores con las secuencias de cada una de las especies aisladas a pesar de los mismatch (Anexos A-3 y A-4). Sin embargo, al contrario de lo que nos dicen Moniz y Kaczmarska, (2010) quienes lograron identificar la mayor parte de las especies pertenecientes a las clases Mediophyceae y Bacillariophyceae utilizando la región ITS, en este caso no se logró el propósito de identificación debido a que no se encontraron secuencias de especies similares en las bases de datos para lograr establecer una relación filogenética cercana con las especies aisladas. Por otra

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

parte, se encontró una gran variedad de especies de *Pseudonitzschia* por lo que podría ser un marcador muy útil en dicho género como también nos señalan los mismos autores.

De acuerdo a lo observado en los cladogramas de los diferentes códigos de barras, ITS presenta una distancia intraespecífica mayor, por lo tanto, ésta región podría ser más susceptible a mutaciones siendo de gran ayuda al momento de la identificación de especies. Además, las bandas obtenidas en la electroforesis presentaron diferentes tamaños, lo cual puede deberse a la gran cantidad de cambios evolutivos que esta región presenta. Esto concuerda con el estudio de Guo et al. (2015) que indica que ITS tiene una evolución dos veces más rápida que *rbcL*. Por su parte *rbcL* posee una mayor divergencia entre especies que 18s y ha mostrado ser un tanto más específico en la identificación molecular permitiéndonos una diferenciación a nivel de especie; sin embargo, con 18s también se logró una identificación a nivel de especie a excepción de *Mayamaea* que puede ser debido a su reciente separación como un nuevo género.

Las diatomeas son muy diversas presentando una amplia morfología y, así mismo variaciones en sus secuencias. Un punto importante a tomar en cuenta es la plasticidad fenotípica de las especies que al presentar ciertas variaciones morfológicas son nombradas como especies diferentes por los autores. Esto representa un problema al momento de buscar un consenso entre la clasificación morfológica y molecular, pues dichas variaciones pueden deberse a cambios en el ciclo de vida propios de la especie o a adaptaciones a condiciones externas del medio y como lo menciona Visco et al (2015) pueden no verse reflejados en la secuencia genómica. Es por ello que sería importante tomar en cuenta las condiciones físicas y químicas de los sitios de toma de muestras para entender de una mejor manera los cambios en las comunidades de diatomeas (Rivera et al., 2017).

En la identificación morfológica de este estudio se han presentado ciertas dificultades en la observación bajo el microscopio óptico, pues no es posible observar algunas de las

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

características lo cual representa un obstáculo para obtener una correcta identificación a nivel de especie como en el caso de *Mayamaea permitis* al ser una especie de muy pequeño tamaño. Además, existen características, sobre todo en las dimensiones, que no coinciden con la descripción de los autores, como es el caso de *Nitzschia perminuta*, con lo cual la observación bajo el microscopio óptico se torna un poco subjetiva al no encontrar una descripción perfecta de la especie y vernos obligados a buscar la mejor opción. En el caso de *Nitzschia linearis* fue más fácil la identificación tanto morfológica como molecular. Como consecuencia, la identificación molecular es más objetiva, y como lo mencionan algunos autores como Rimet et.al. (2016), es un método más preciso y que nos ahorra tiempo. Adicionalmente, se ha encontrado que la identificación mediante códigos de barras puede detectar una mayor cantidad de especies que los métodos morfológicos tradicionales, a pesar de sus limitaciones en la utilización de programas bioinformáticos e información de las bases de datos (Yang et al., 2017).

Se logró una identificación tanto morfológica como molecular, utilizando los códigos de barras correspondientes a 18s y *rbcL*, en las Especies PCH00001 y PCH00002 de Rumipamba y a su vez hubo consenso entre ambas partes. En el caso de la Especie NP00001 de Antisana se tuvo que recurrir a los resultados obtenidos en ambos métodos de identificación para lograr determinar la especie. A pesar de que las especies aisladas pertenecen a las familias Bacillariaceae y Naviculaceae que cuentan con una mayor cantidad de especies secuenciadas y a su vez información morfológica en comparación con las otras familias de diatomeas (Rimet et al., 2016), claramente existen diferencias entre la clasificación taxonómica morfológica y molecular siendo éste un problema a resolver. Para ello sería útil implementar bases de datos en las cuales se integre taxonomía morfológica y molecular además de autoecología, formas de vida y características ecológicas de las diatomeas (Rivera et al., 2018).

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Tomando en cuenta las dificultades que se presentaron en la amplificación con *rbcL* junto con los resultados obtenidos empleando la región 18s, esta última se presenta como la mejor opción para ser utilizada como código de barras de ADN bajo las características planteadas en este estudio. Pese a que en el estudio únicamente se evaluaron tres especies, éstas corresponden a diferentes regiones del Ecuador, y además se pudo ver un desarrollo similar en los procesos de aislamiento, amplificación y secuenciación de los datos con lo cual se obtuvo información importante que puede ser corroborada en estudios posteriores utilizando más especies de otras zonas del país.

Con el propósito de identificar la diversidad de especies de diatomeas en un cuerpo de agua para un biomonitoreo de calidad, diferentes autores como Zimmerman et.al. (2014) y Kermarrec et.al. (2013) han propuesto realizar una secuenciación masiva utilizando NGS (Secuenciación de Nueva Generación). La composición de las comunidades de diatomeas se encuentra relacionada con la calidad de agua de los últimos dos meses (Lefrancois et.al., 2018), con lo cual se puede notar la necesidad de contar con un proceso de identificación fácil y rápido. Con la identificación de especies mediante NGS es posible obtener resultados a partir de la muestra y con una única amplificación teniendo así la posibilidad de aplicarlo la cantidad de veces que sea necesario para obtener un mayor control sobre el biomonitoreo. Una vez completas las bases de datos con las secuencias correspondientes a un gran número de especies y después de establecer un protocolo con un código de barras común que funcione para todas ellas sería posible llevar al cabo esta propuesta. Es por ello que se debe destacar la importancia de encontrar un código de barras que proporcione resultados de identificación precisos en todas las especies, pues al tener una correcta identificación se pueden obtener resultados confiables al momento de determinar la calidad de agua y así poder brindarle el tratamiento adecuado para su posterior uso. Por otro lado, para delinear una nueva especie es indispensable su aislamiento,

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

siendo el protocolo de este estudio útil para obtener secuencias de nuevas especies y seguir completando las bases de datos.

Conclusiones

El uso de códigos de barras de ADN para la identificación de diatomeas ha sido de gran ayuda para obtener resultados más precisos y complementar la morfología clásica. En este estudio se puede comprobar que las especies de diatomeas aisladas pudieron ser correctamente identificadas con los códigos de barras de las regiones 18s y *rbcL*, y que a su vez coinciden con su respectiva descripción morfológica. No obstante, existieron ciertas dificultades en la amplificación con *rbcL* lo cual nos llevó a realizar variaciones en el protocolo de PCR dificultando el proceso de identificación con este marcador, y es por ello que se ha determinado a la región v4 de 18s establecida por Zimmerman et al., (2010) como la mejor opción de código de barras para la identificación de diatomeas del Ecuador. Sería importante emplear los códigos de barras utilizados en este estudio en diferentes puntos del país con el fin de obtener un número significativo de diatomeas que corrobore la utilidad de la región 18s en la identificación molecular. Además, esto ayudaría a completar las bases de datos con especies de nuestro país, con lo cual se abriría la posibilidad de utilizar NGS para la identificación de especies y obtener un biomonitoreo de cuerpos de agua confiable. Claramente existen ciertas diferencias entre la clasificación taxonómica morfológica y molecular, lo cual es un problema que se debe resolver. Para esto se podría considerar que al implementar las bases de datos moleculares se tome en cuenta la clasificación morfológica y de la misma manera al delinear nuevas especies morfológicamente realizar en conjunto una evaluación molecular para así poder llegar a un consenso entre ambas partes.

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Bibliografía

Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y. J., & Lee, J. B. (2007). Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju Island, Korea. *Journal of Phycology*, 43(4), 823–832. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00367.x>

An, S. M., Choi, D. H., Lee, J. H., Lee, H., & Noh, J. H. (2017). Identification of benthic diatoms isolated from the eastern tidal flats of the Yellow Sea: Comparison between morphological and molecular approaches. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179422>

Behnke, A., Friedl, T., Chepurnov, V. A., & Mann, D. G. (2004). Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 40(1), 193–208. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03037.x>

Chariton, A. A., Stephenson, S., Morgan, M. J., Steven, A. D. L., Colloff, M. J., Court, L. N., & Hardy, C. M. (2015). Metabarcoding of benthic eukaryote communities predicts the ecological condition of estuaries. *Environmental Pollution*, 203, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.047>

Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y., & Liu, Y. (2015). Comparison of potential diatom ‘barcode’ genes (The 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2015), 1369–1380.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>

Haro, A. (2019). Evaluación De Dos Genes Como Código De Barras De Adn Para La Identificación De Diatomeas Epilíticas En Ecuador. 85.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J. F., & Bouchez, A. (2013). Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: A test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 607–619.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12105>

Kociolek, P. (2011). *Nitzschia linearis*. In *Diatoms of North America*. Retrieved December 30, 2020, from https://diatoms.org/species/nitzschia_linearis

Kociolek, P. (2011). *Nitzschia perminuta*. In *Diatoms of North America*. Retrieved December 30, 2020, from https://diatoms.org/species/nitzschia_perminuta

Lange-Bertalot, H. (1997). *Frankophila, Mayamaea und Fistulifera: Drei neue Gattungen der Klasse Bacillariophyceae* Frankophila, Mayamaea and Fistulifera: Three new genera of the class Bacillariophyceae. *Archiv Fur Protistenkunde*, 148(1–2), 65–76.
[https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80037-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80037-1)

Lefrançois, E., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Blancher, P., Botreau, S., Chardon, C., Crepin, L., Cordier, T., Cordonier, A., Domaizon, I., Ferrari, B. J. D., Guéguen, J., Hustache, J. C., Jacas, L., Jacquet, S., Lacroix, S., Mazonq, A. L., Pawlowska, A., Perney, P., Pawlowski, J., ... Bouchez, A. (2018). Development and implementation of eco-genomic tools for aquatic

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

ecosystem biomonitoring: the SYNAQUA French-Swiss program. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34), 33858–33866. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2172-2>

Maitland, V. C., Robinson, C. V., Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2020). Freshwater diatom biomonitoring through benthic kick-net metabarcoding. *PLoS ONE*, 15(11 November), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242143>

Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R. V., Jost, S., Ottenwalder, B., Schlotterer, C., & Boenigk, J. (2010). Diversity in a hidden world: Potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04478.x>

Moniz, M. B. J., & Kaczmarek, I. (2010). Barcoding of Diatoms: Nuclear Encoded ITS Revisited. *Protist*, 161(1), 7–34. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.07.001>

Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M., Franc, A., & Bouchez, A. (2016). R-Syst::diatom: An open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. *Database*, 2016, 1–21. <https://doi.org/10.1093/database/baw016>

Rivera, S. F., Vasselon, V., Jacquet, S., Bouchez, A., Ariztegui, D., & Rimet, F. (2018). Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. *Hydrobiologia*, 807(1), 37–51. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3381-2>

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005).

Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805–1811.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1730>

Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., & Bouchez, A. (2017). Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science*, 36(1), 162–177.

<https://doi.org/10.1086/690649>

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 and Technology*, 49(13), 7597–7605.

<https://doi.org/10.1021/es506158m>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *Boletín Técnico/Technical Bulletin* (Vol. 55, Issue 2, pp. 272–279).

Yang, J., Zhang, X., Xie, Y., Song, C., Zhang, Y., Yu, H., & Burton, G. A. (2017). Zooplankton community profiling in a eutrophic freshwater ecosystem-lake tai basin by DNA metabarcoding. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01808-y>

Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N., & Gemeinholzer, B. (2015). Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 526–542. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Índice de figuras

Figura 1. Cultivos axénicos en medio WC y agar al 0,9%. A) Colonias de Especie PCH00001 de Rumipamba. B) Colonias de Especie PCH00002 de Rumipamba. C) Colonias de Especie NP00001 de Antisana.	16
Figura 2. Cultivo axenico PCH00001 de Rumipamba. Vista valvar (1-3). Vista pleural (4). Largo: 102.5-104.9. Ancho: 8.7-8.9. Entre 7-9 fíbulas en 10 um.	17
Figura 3. Cultivo axenico PCH00002 de Rumipamba. Vista valvar (1-3). Vista pleural (4). Largo:10,8-12,8. Ancho 4,9-6,9. Estrías invisibles.	18
Figura 4. Cultivo axénico NP00001 de Antisana. Vista valvar (1-3). Largo: 22,8-24,6. Ancho: 5,3-5,1. 9 fíbulas en 10um.	19
Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR de los cultivos axénicos. 18S (1-3). <i>rbcL</i> (4-6). ITS (7-9). Especie PCH00001 de Rumipamba (1, 4, 7). Especie PCH00002 de Rumipamba (2, 5, 8). Especie NP00001 de Antisana (3, 6, 9). Control negativo 18s, <i>rbcL</i> e ITS (10-12).	20
Figura 6. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región 18s.....	21
Figura 7. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región <i>rbcL</i>	22
Figura 8. Árbol filogenético Especie PCH00001 de Rumipamba región ITS	22
Figura 9. Árbol filogenético Especie PCH00002 de Rumipamba región 18s.....	23
Figura 10. Árbol filogenético Especie PCH00002 de Rumipamba región <i>rbcL</i>	24
Figura 11. Árbol filogenético Especie NP00001 de Antisana región 18s.....	25
Figura 12. Árbol filogenético Especie NP00001 de Antisana región ITS	25

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de primers para las regiones de 18s, <i>rbcL</i> e ITS.....	15
Tabla 2. Características morfológicas de <i>Nitzschia linearis</i> según (Agardh) W.Sm. 1853	17
Tabla 3. Características de <i>Mayamaea atomus</i> según Lange-Bertalot & Bonik 1976.	18
Tabla 4. Características de <i>Nitzschia perminuta</i> según (Grunow in Van Heurck) H.Perag. 1903.....	19

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Índice de Anexos

Anexo A-1. Alineamiento en Clustal Omega de *Mayamaea permitis* con el primer forward de la región *rbcL*..... 40

Anexo A-2. Alineamiento en Clustal Omega de *Nitzschia perminuta* con el primer forward de la región *rbcL*..... 40

Anexo A-3. Alineamiento en Clustal Omega de *Mayamaea permitis* con el primer reverse de la región ITS 41

Anexo A-4. Alineamiento en Clustal Omega de *Nitzschia perminuta* con el primer reverse de la región ITS 41

EVALUACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS DEL ECUADOR

Anexo A-3. Alineamiento en Clustal Omega de *Mayamaea permitis* con el primer reverse de la región ITS

R	-----	0
SEQ	AAATGAAATACGTAAATGAAATGAAATATATTTTTAATCATCAAGATTTTGAACGCACA	60
R	-----	0
SEQ	CTCCGTTTGGGTGATTTTTTTTGTTCGGGCTTGTGAGTGTCAATGAACCCCTCCAG	120
R	-----	0
SEQ	TTTGGATTTGATTGTTTGTGCTGGGGGGCGTAATTTAGGCCTGTGCTCCCTCCGTACAG	180
R	-----	0
SEQ	TCCGACGGTTTGTGACGCCTCGTTTATAATTACCAGGCTCGGTCCAAGTTCACACCGGC	240
R	-----GCATATCAATAAGCG-----	15
SEQ	CGTATTTAAACCACGGTTGGACGTACTGCTTGTCTGGACACCAGTCAGTCTGTGTGGCAA	300
	* * * * *	
R	-----GAGGA-----	20
SEQ	GCACCTCCGTCTTGTAGCTCTCGGGCCACAGAGACAACCAAGGAGGCTTGAAGCCAC	360

R indica la secuencia del cebador. SEQ indica la secuencia de *Mayamaea permitis*.

Anexo A-4. Alineamiento en Clustal Omega de *Nitzschia perminuta* con el primer reverse de la región ITS

R	-----	0
SEQ	TTAAGTTCGATTTCGCTGACCTCCGTGAATCATTAAAGTATTTTGAACGCACATTGCGCTTT	60
R	-----	0
SEQ	CCGGGATTTCCCGGTAGCATGCTTGTCTGAGTGTCTGTGGACCCACTCAGCGCTTGTG	120
R	-----	0
SEQ	CTCGTTGCAAGCGGCTGGATCGTATGGCCGTGTGCTTGACGGCACCTCGGTTTGAATTG	180
R	-----	0
SEQ	GTGATACCTTGACTGGAAAGGACCCGCCCTGCGTTGAGTCGCCTCTCCCTATCTTTGCT	240
R	-----	0
SEQ	TTTCTACCCATTGTTGTTTTGGGAGTGAAATGTAATGTGAGAGCGTACCGCGGCAAGGT	300
R	-----GCATATCA	8
SEQ	TCGACTCAACCCCGCCCGCGGTGGTGTGAGATCCACACTTACATCAAGCAAACA	360
	* * * * *	
R	ATAAGCGG-----AGGA--	20
SEQ	ACAAACCAACTTATTTATTTCTTTATCATACAAAGAGAAA	403
	* * * * *	

R indica la secuencia del cebador. SEQ indica la secuencia de *Nitzschia perminuta*.