Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Maestría en Ciencias en Acuicultura

Análisis genómico y desempeño de cultivos axénicos de tres especies de la microalga *Chaetoceros*

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Yira Diamanda Tapia Gallardo

Ensenada, Baja California, México

2019

Tesis defendida por Yira Diamanda Tapia Gallardo

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla Codirector de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez Directora de Estudios de Posgrado Resumen de la tesis **que presenta Yira Diamanda Tapia Gallardo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Análisis genómico y desempeño de cultivos axénicos de tres especies de la microalga Chaetoceros

Resumen aprobado por:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla Codirector de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra Codirectora de tesis

Actualmente la genómica es una disciplina que ha contribuido de forma significativa en la investigación biológica, estudiando el ADN de uno o múltiples organismos de forma integral y simultánea. Chaetoceros es uno de los géneros de diatomeas más utilizados en la acuicultura. Los objetivos de esta investigación fueron analizar el grado de similitud a nivel genómico entre Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans y Chaetoceros sp. por medio de métodos bioinformáticos, y caracterizar cultivos axénicos de estas especies de Chaetoceros. Para esto, se realizó el análisis bioinformático de las secuencias previamente obtenidas de cultivos no axénicos; y a partir de ello se conformaron y anotaron los genomas mitocondriales y del cloroplasto de cada una de las especies. Sin embargo, la mayoría de los contigs estuvieron asociados a secuencias bacterianas. Por lo cual, se realizaron cultivos axénicos y no axénicos de cada especie, lo cual permitió llevar a cabo la caracterización del crecimiento, fotosíntesis. Se estandarizó un protocolo de extracción de ADN. Se realizó la extracción de ADN de las muestras de los cultivos axénicos y no axénicos, y se evaluó la calidad, pureza e integridad. Para C. muelleri y C. calcitrans se obtuvo un genoma mitocondrial (GM) de 36,059 pb, mientras que para Chaetoceros sp. se obtuvo un tamaño de GM de 39,733 pb. El genoma del cloroplasto (GP) de C. muelleri fue de 116,284 pb, el de C. calcitrans fue de 116,556 pb y el de Chaetoceros sp. de 116,176 pb. Con el fin de elucidar las relaciones filogenéticas, se identificaron los marcadores moleculares COI, rbcL, psbA y 18S de las tres especies de Chaetoceros y se construyeron árboles filogenéticos para la aproximación de la identificación y caracterización de estas. A partir de estos resultados, se considera que la cepa de Chaetoceros sp. puede estar relacionada con Chaetoceros gracilis. La tasa de crecimiento y el contenido de clorofila a de las tres especies de *Chaetoceros* fue similar entre los cultivos axénicos y no axénicos. Los cultivos de las tres especies de Chaetoceros se mantuvieron axénicos durante cuatro días. En C. muelleri se evaluó el mayor contenido de clorofila c en los cultivos no axénicos, mientras que el mayor contenido de carotenoides fue en los cultivos axénicos. La eficiencia fotosintética (α), la tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax) y rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) fueron mayores en los cultivos no axénicos. La irradiancia de saturación lumínica (Ek) fue similar entre cultivos axénicos y no axénicos. Se obtuvo un protocolo exitoso de extracción de ADN para las tres especies de Chaetoceros. A partir de la extracción de ADN de las muestras de los cultivos axénicos y no axénicos se obtuvieron concentraciones mayores a 50 ng μ l⁻¹. Todas las muestras registraron valores de pureza (260/280) e integridad de banda dentro de las condiciones óptimas, mientras que solo el 33 % de las muestras obtuvieron valores de pureza (260/230) aceptables. Se mandaron a secuenciar las muestras de ADN obtenidas por medio de la plataforma MiSeg Benchtop Seguencer (Ilumina) a la Universidad de Georgia, Georgia, E.U.A., las cuales quedarán para su análisis posterior y corroboración de lo encontrado en el presente trabajo.

Palabras clave: Chaetoceros, bioinformática, cultivos axénicos, desempeño, análisis genómico.

Abstract of the thesis **presented by Yira Diamanda Tapia Gallardo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Genomic analysis and performance of axenic cultures of three species of the Chaetoceros microalgae

Abstract approved by:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla Codirector de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra Codirectora de tesis

Genomics is a discipline that has largely contributed to biological research of DNA from, probably, thousands of organisms integrally and simultaneously. Chaetoceros is one of the most used diatom genus in aquaculture. The main goals of this work were to investigate the similarity degree at the genomic level among Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans and Chaetoceros sp. by bioinformatic methods and to characterize the axenic and non-axenic culture of these *Chaetoceros* species. The bioinformatic analysis of the sequences previously obtained for the three Chaetoceros species was performed and their mitochondrial and chloroplastic genomes were obtained and annotated. However, most of the contigs were related with bacterial sequencies. Therefore, a protocol based on the use of antibiotics to axenize cultures of the three Chaetoceros species was standardized. Axenic and non-axenic cultures of the three Chaetoceros species were carried out to characterize growth, photosynthesis and obtain sequences for bioinformatic analysis. A DNA extraction protocol was standardized for the three *Chaetoceros* species. DNA extraction was performed and its quality, purity and integrity in the samples of axenic and non-axenic cultures were evaluated. The mitochondrial and chloroplast genomes of each of the three Chaetoceros species were formed and annotated. For C. muelleri and C. calcitrans, a mitochondrial genome (GM) of 36,059 bp was obtained, while the GM of Chaetoceros sp. had 39,733 bp. The chloroplast genome (GP) of C. muelleri, had 116,284 bp, while the GP of C. calcitrans had 116,556 bp and the GP of Chaetoceros sp. Had 116,176 bp. The molecular markers COI, rbcL, psbA and 18S of the three Chaetoceros species were identified and the phylogenetic trees were built based on these molecular markers as an approximation for the identification and characterization of the three Chaetoceros species. From these results, Chaetoceros sp. may be considered as Chaetoceros gracilis. The growth rate and chlorophyll content of the three Chaetoceros species was similar between axenic and non-axenic cultures. The cultures of the three species of Chaetoceros remained axenic for four days. In C. muelleri, the highest chlorophyll c content in non-axenic cultures was evaluated, while the highest carotenoid content was in axenic cultures. Photosynthetic efficiency (α), maximum electron transport rate (ETRmax) and maximum photosynthetic yield (Fv/Fm) were higher in non-axenic cultures. The irradiance of light saturation (Ek) was similar between axenic and non-axenic cultures. A successful DNA extraction protocol was obtained for the three *Chaetoceros* species. From the extraction of DNA from the samples of the axenic and non-axenic cultures, concentrations greater than 50 ng μ ¹ were obtained. All samples recorded purity values (260/280) within the acceptable range and integrity of the DNA band, while only 33 % of the samples obtained acceptable purity values (260/230). The DNA samples obtained through the MiSeq Benchtop Sequencer (Illuminates) platform was sent to sequence to the University of Georgia, Georgia, USA, these results will remain for their posterior analisis and corroboration of the results obtained in this thesis.

Keywords: Chaetoceros, bioinformatics, axenic cultures, performance, genomic analysis.

A mi madre

A mis abuelos

Ahora puedo decir que me he descubierto y soy muy feliz de ser quién soy, el comienzo no dio pista a un final tan inesperado, sin embargo, no cambiaría ni un instante de estos 767 días.

"GAME OVER"

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido a través de la beca de manutención para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura, por brindarme la oportunidad de formar parte de su plantilla de estudiantes de maestría.

A CICESE por los recursos económicos obtenidos a partir de la cuenta de los proyectos con recursos fiscales 623108 y 623115.

A los recursos obtenidos por medio del proyecto de fideicomiso de CICESE a partir de la cuenta 623801.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por haberme brindado la oportunidad de ser su estudiante y por estos cuatro años de trabajo en conjunto, y por compartirme todos sus conocimientos de la bioinformática.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por haberme apoyado desde un principio y haber aceptado ser la codirectora de este proyecto, por enseñarme a ser paciente y organizada.

A la Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz por sus observaciones constructivas y apoyo académico durante la realización de la tesis.

A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez por sus observaciones constructivas y su empatía y comprensión en momentos difíciles.

A la Dra. Ceres A. Molina Cárdenas por su asesoría en el proceso de axenización de los cultivos y por su disposición a la resolución de cualquier duda académica.

A la M. en C. Fátima Y. Castro Ochoa por su apoyo y asesoría técnica dentro del laboratorio de microalgas.

A la M. en C. Carmen E. Vargas Peralta por su asesoramiento en toda la fase de análisis molecular.

A la Dra. Carmen G. Paniagua Chávez especialmente por su apoyo desde el inicio de mi estancia en el posgrado.

A la Dra. Asucnción Lago Lestón por su asesoría en el proceso de extracción de ADN de las muestras.

A la Psic. Yahaira Castañeda Sidón por su apoyo y asesoría psicológica durante mi estancia en el posgrado.

A mis compañeros de generación de maestría: Doris, Gabo, Eliasid, Rosy, Leonardo.

A Melina por ser una amiga incondicional en cada momento oportuno e inoportuno.

A Patricio por todos los momentos que compartimos, tu compañía y consejos precisos.

A Pablo, mi persona favorita, por ser tan paciente conmigo, tu apoyo incondicional y tu perfecta compañía.

A mis "amiwis" Suleyka y Paola por apoyarme a distancia y siempre estar para mí.

A mis "beivis" Karen y Perla por hacerme reír en momentos tristes

A cada persona que ha coincidido en mi camino en algún momento de mi vida, contribuyendo de alguna u otra manera.

GRACIAS TOTALES

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xv

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Análisis genómico	2
1.2 Genómica en microalgas	3
1.3 Diatomeas	4
1.4 Chaetoceros	4
1.5 Justificación	6
1.6 Hipótesis	6
1.7 Objetivos	6
1.7.1 Objetivo general	6
1.7.2 Objetivos específicos	6

Capítulo 2. Metodología	7
2.1 Análisis bioinformático	7
2.1.1 Origen de secuencias	7
2.1.2 Verificación de calidad de las secuencias	7
2.1.3 Ensamblaja De Novo	7
2.1.4 Análisis funcional	8
2.1.5 Conformación y anotación de genomas mitocondriales y de cloroplasto	8
2.1.6 Análisis filogenético	8

2.1.7 Identificación de grupos bacterianos	9
2.2 Cultivo de microalgas	9
2.2.1 Obtención de cepas	9
2.2.2 Mantenimiento de cepas	9
2.2.3 Caracterización del crecimiento de los cultivos	9
2.2.3.1 Evaluación de la concentración de células	10
2.2.3.2 Conteo de bacterias	10
2.2.4 Pruebas de axenidad	10
2.2.5 Cultivos axénicos	11
2.2.6 Cultivos masivos	12
2.2.7 Crecimiento y pigmentos	13
2.2.8 Crecimiento y pigmentos	13
2.2.8 Fotosíntesis	13
2.2.9 Análisis estadístico	14
2.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos	14
2.3.1 Estandarización de extracción de ADN	14
2.3.2 Extracción de ADN	15
2.3.3 Calidad y pureza de ADN	15
2.3.4 Integridad de banda de ADN	15
2.3.5 Secuenciación masiva	15
Capítulo 3. Resultados	16
3.1 Análisis bioinformático	16
3.1.1 Verificación de calidad de las secuencias	16
3.1.2 Ensamblaje <i>De Novo</i>	16
3.1.3 Analisis funcional	17
3.1.4 Conformación y anotación de genomas mitocondriales y del cloroplasto	19
3.1.4.1 Genomas mitocondriales	19
3.1.4.2 Genomas del cloroplasto	23

viii

3.1.5 Marcadores moleculaes para la identificación de Chaetoceros	27
3.1.6 Análisis filogenético	27
3.1.6.1 Gen COI	27
3.1.6.2 Gen rbcL	28
3.1.6.3 Gen psbA	29
3.1.6.4 Gen 18S	30
3.1.7 Identificación de grupos bacterianos	31
3.2 Cultivo de microalgas	35
3.2.1 Caracterización del crecimiento de los cultivos	35
3.2.2 Pruebas de axenidad	38
3.2.3 Ensayos de axenidad	39
3.2.4 Crecimiento y pigmentos	45
3.2.5 Fotosíntesis	47
3.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos	49
3.3.1 Estandarización de extracción de ADN	49
3.3.2 Extracción de ADN	50
3.3.2 Extracción de ADN 3.3.3 Integridad de banda de ADN	50 51
3.3.2 Extracción de ADN	50 51
3.3.2 Extracción de ADN3.3.3 Integridad de banda de ADNCapítulo 4. Discusión	50 51 52
 3.3.2 Extracción de ADN 3.3.3 Integridad de banda de ADN Capítulo 4. Discusión 4.1 Análisis bioinformático 	50 51 52 52
 3.3.2 Extracción de ADN 3.3.3 Integridad de banda de ADN Capítulo 4. Discusión	50 51 52 52 52
 3.3.2 Extracción de ADN 3.3.3 Integridad de banda de ADN Capítulo 4. Discusión	50 51 52 52 52 52 53
 3.3.2 Extracción de ADN 3.3.3 Integridad de banda de ADN Capítulo 4. Discusión	50 51 52 52 52 53 53
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 52 53 53 53 56
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 53 53 53 56 58
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 53 53 53 56 58 59
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 53 53 53 56 58 59 59
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 53 53 53 56 58 59 59 59
 3.3.2 Extracción de ADN	50 51 52 52 53 53 53 53 53 59 59 59 59 60

4.2.4 Crecimiento y pigmentos de cultivos axénicos y no axénicos				
4.2.5 Fotosíntesis	63			
4.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos	63			
4.3.1 Estandarización de extracción de ADN	63			
4.3.2 Extracción de ADN	64			
Capítulo 5. Conclusiones	65			
Capítulo 6. Recomendaciones	66			
Literatura citada	67			
Anexos	73			

Lista de figuras

Figura

Página

1	Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de <i>Chaetoceros muelleri</i>	18
2	Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de <i>Chaetoceros calcitrans</i>	18
3	Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de <i>Chaetoceros</i> sp	18
4	Mapa genético del genoma mitocondrial de <i>Chaetoceros muelleri</i> . Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores coo muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris	20
5	Mapa genético del genoma mitocondrial de <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores como muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris	21
6	Mapa genético del genoma mitocondrial de <i>Chaetoceros</i> sp. Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores como muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris	22
7	Mapa genético del genoma de cloroplasto de <i>Chaetoceros muelleri</i> . Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris	24
8	Mapa genético del genoma de cloroplasto de <i>Chaetoceros calcitrans.</i> Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris	25

9	Mapa genético del genoma de cloroplasto de <i>Chaetoceros</i> sp. Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris			
10	Árbol filogenético basado en las secuencias COI de 18 especies de Bacillarioficeas, todas las especies de <i>Chaetoceros</i> son de este estudio y se resaltan en un recuadro rojo	28		
11	Árbol filogenético basado en las secuencias rbcL de 17 especies de Bacillarioficeas, las especies de <i>Chaetoceros</i> de este estudio se indican con flechas rojas	29		
12	Árbol filogenético basado en las secuencias psbA de 15 especies de Bacillarioficeas, las especies de <i>Chaetoceros</i> de este estudio se indican con flechas rojas	30		
13	Árbol filogenético basado en las secuencias 18S de 23 especies de Bacillarioficeas, las especies de <i>Chaetoceros</i> de este estudio se indican con flechas rojas	31		
14	Filos bacterianos representados en un diagrama de Venn que se comparten las tres especies de <i>Chaetoceros</i>	34		
15	Géneros bacterianos representados en un diagrama de Venn que se comparten las tres especies de <i>Chaetoceros</i>	34		
16	Especies bacterianas representadas en un diagrama de Venn que se comparten las tres especies de <i>Chaetoceros</i>	34		
17	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml ⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivado durante 7 días	35		
18	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml ⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml ⁻¹) de <i>Chaetoceros calcitrans</i> cultivado durante 7 días	36		
19	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml ⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml ⁻¹) de <i>Chaetoceros</i> sp. cultivado durante 7 días	37		
20	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml ⁻¹) de cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 μ g ml ⁻¹ , Kanamicina 200 μ g ml ⁻¹ , Neomicina 50 μ g ml ⁻¹ y Estreptomicina 100 μ g ml ⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, <i>p</i> <0.05: a>b>c	40		

xii

- Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros muelleri* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c......
- Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros calcitrans* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c......
- Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros calcitrans* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c......
- Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, *p*<0.05: a>b>c......
- Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c......
- 26 Curvas de fotosíntesis en base al transporte relativo de electrones (ETR) e irradiancia (PAR) para los cultivos de tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en forma axénica (CA: ▲) y no axénica (CNA: ●).....

41

42

43

44

48

45

27	Integridad de banda de ADN de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de tres especies de <i>Chaetoceros</i> visualizado en gel de agarosa al 1.2 % en SB 1X teñidos en gel red. Escalera de peso molecular de 1 Kb (Promega G5711). Cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> axénicos (1 y 2) y no axénicos (3 y 4). Cultivos de <i>Chaetoceros calcitrans</i> axénicos (5 y 6) y no axénicos (7 y 8). Cultivos de <i>Chaetoceros</i> sp. axénicos (9 y 10) y no axénicos (11 y 12)	51
28	Comparación de la estructura nucleótidica (CDS, tRNA y rRNA) de los genomas mitocondriales de <i>C. mulleri</i> (CHM), <i>C. calcitrans</i> (CHC) y <i>Chaetoceros</i> sp. (CHX) con respecto al genoma mitocondrial de <i>B. fennica</i> (BEF)	55
29	Comparación de la estructura nucleótidica (RNA) de los genomas del cloroplasto de <i>C. mulleri</i> (CHM), <i>C. calcitrans</i> (CHC) y <i>Chaetoceros</i> sp. (CHX) con respecto al genoma cloroplástico de <i>C. simplex</i> (CHS)	57
30	Comparación de la estructura nucleótidica (CDS) de los genomas del cloroplasto de <i>C. mulleri</i> (CHM), <i>C. calcitrans</i> (CHC) y <i>Chaetoceros</i> sp. (CHX) con respecto al genoma cloroplástico de <i>C. simplex</i> (CHS)	57

Lista de tablas

Tabla

1	Valores de parámetros de calidad de las secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de Chaetoceros	16
2	Estadística básica del ensamblaje <i>De Novo</i> de secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de <i>Chaetoceros</i>	17
3	Identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de <i>Chaetoceros</i>	19
4	Marcadores moleculares para la identificación de Chaetoceros	27
5	Géneros de bacterias identificados en los cultivos no axénicos de tres especies de <i>Chaetoceros</i> , solo se indican los 10 géneros con mayor número de contigs obtenidos mediante Blastn	33
6	Valores promedio de la densidad celular máxima (Dc _{max} x 10 ⁶ células ml ⁻¹), tasa de crecimiento microalgal (μ_m), concentración de bacterias heterotróficas máxima (CBH _{max} x 10 ⁶ UFC ml ⁻¹) y tasa de crecimiento bacteriano (μ_b) de cultivos monoespecíficos, no axénicos de tres especies de <i>Chaetoceros</i>	38
7	Valores promedio y desviación estándar de tasa de crecimiento (µ), clorofila <i>a</i> (fg cell ⁻¹), clorofila <i>c</i> (fg cell ⁻¹) y carotenoides (fg cell ⁻¹) de cultivos monoespecíficos de tres especies de <i>Chaetoceros</i> mantenidos en forma axénica (CA) y no axénica (CNA)	39
8	Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fotosintéticos, eficiencia fotosintética (α), tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax), irradiancia de saturación lumínica (Ek) y rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) de los cultivos de tres especies de <i>Chaetoceros</i> mantenidos en forma axénica (CA) y no axénica (CNA).	46
9	Modificaciones de las condiciones establecidas en el protocolo comercial <i>DNeasy</i> [®] <i>Blood y Tissue</i> para la obtención de un protocolo de extracción de ADN de <i>Chaetoceros</i>	47
10	Valores de concentración y pureza de ADN de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de tres especies de <i>Chaetoceros</i>	49
11	Valores de concentración y pureza de ADN de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de tres especies de <i>Chaetoceros</i>	50

Capítulo 1. Introducción

La genómica ha contribuido en la generación de importante información biológica en las últimas décadas, reflejando un impacto en la historia de la ciencia (Saroglia *et al.*, 2012). Dentro de las principales aportaciones de esta disciplina, es el estudio del contenido de ADN de uno o múltiples organismos de forma integral y simultánea. Algunas de las herramientas de esta tecnología son el mapeo, secuenciación de genomas y con ello su interpretación y aplicación. La investigación genómica se divide en tres principales ramas, la genómica estructural, genómica funcional y genómica comparativa; en conjunto, permiten la comprensión de la estructura, organización, así como la evolución de todos los organismos, incluyendo una gran número de especies acuícolas.

La acuicultura es un sector de producción de alimentos con alto potencial de crecimiento y que representa más del 50 % del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial (FAO, 2018). La actividad acuícola es susceptible a pérdidas económicas, por causa de distintos factores como enfermedades y poca calidad de alimento para los organismos acuáticos. Para poder abastecer las necesidades alimentarias de las especies acuáticas, se ha implementado la producción de microalgas por medio de diferentes métodos para su cultivo y técnicas que optimicen la obtención de estas (Nieves *et al.*, 1996).

Las microalgas son microorganismos acuáticos, fotosintéticos que tienen la capacidad de transformar la energía luminosa en energía química. Conforman la parte vegetal del plancton y son la base de la cadena trófica (Cembella, 2003). Son ampliamente utilizadas como alimento vivo para diferentes etapas de ciclo de vida de moluscos y algunos crustáceos como el camarón dado a que son potenciales fuentes de componentes esenciales como los ácidos poliinsaturados (Spolaore *et al.*, 2006). Dentro de las microalgas se encuentran las diatomeas que son un grupo de organismos unicelulares de color dorado que contienen aproximadamente 200,000 especies existentes (Mann *et al.*, 1996), se dividen en dos grupos: las de simetría radial (céntricas) y las de simetría bilateral (pennadas). De las diatomeas hay diferentes géneros y uno de ellos *Chaetoceros* el cual ha sido estudiado para la optimización de su producción debido a su importancia biotecnológica. El género *Chaetoceros* considera a organismos planctónicos marinos con alta diversidad de especies y amplia distribución (Rines *et al.*, 1988). En la acuicultura, se ha demostrado que especies del género *Chaetoceros* son uno de los más aptos para suministrar el aporte nutricional de larvas de bivalvos y crustáceos (Napolitano *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993, Mallo *et al.*, 2004).

Dada la importancia de la alimentación de organismos acuáticos, el estudio de las microalgas permite la optimización de los cultivos para mayores obtenciones de biomasa, así como de mejores concentraciones

de su composición bioquímica y debido al crecimiento exponencial de la genómica como una herramienta que facilita el conocimiento de la funcionalidad de los genes, en el presente estudio, a partir de la genómica comparativa de las especies *Chaetoceros calcitrans, Chaetoceros muelleri* y *Chaetoceros* sp. se pretende sentar las bases genéticas para diversos estudios de fisiología u optimización de cultivo de estas especies de diatomea, entre otros.

1.1 Análisis genómico

A partir de los estudios del genoma humano, el interés por el área fue en incremento dado a las aportaciones para investigaciones posteriores que aportaron el descubrimiento de enfermedades (Collins *et al.*, 2003). A lo largo de los años se han secuenciado importantes genomas para distintas áreas de la ciencia, los cuales han contribuido a la identificación de genes funcionales por medio de la genómica funcional que permite la descripción de la función de los elementos codificados en los genomas y el rol que estos desempeñan en procesos biológicos (Fernández *et al.*, 2007).

Dentro de los genomas secuenciados existen organismos modelos que son aquellas especies que han sido altamente estudiadas y por ello generalmente se utilizan para la investigación de distintos aspectos de la biología como un análogo si es cercanamente similar para investigaciones extrapolables (González *et al.*, 2008). Algunos de los organismos modelos han sido la secuenciación de genomas como el del maíz (Schnable *et al.*, 2009), ratón (Dietrich *et al.*, 1996), planta herbácea *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), las cuales han permitido la optimización de sus procesos para la obtención de mejor calidad en sus productos y subproductos, así como la descripción de genoma comenzaron a principios de la década de 2000 en EE. UU., algunos países de la Unión Europea (UE), China y otros. Las alternativas genómicas han facilitado sentar las bases genéticas de los caracteres cuantitativos y con ello la detección de efectos genéticos a través de la descripción de los genomas (Martínez *et al.*, 2009). Entre los genomas de importancia acuícola se encuentra el del ostión *Crassostrea gigas* (Meng *et al.*, 2013), pez globo (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 1997), pez cebra (Freeman *et al.*, 2007), las diatomeas planctónicas *Phaeodactylum tricornutum* (Kroth *et al.*, 2008) y *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust *et al.*, 2004).

1.2 Genómica en microalgas

Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos (Lee, 1989; Keeling, 2004) y debido a su potencial biotecnológico, la investigación dirigida hacia estos organismos ha incrementado. La mayoría de las microalgas conforman el fitoplancton teniendo aportaciones geoquímicas y ecológicas importantes. Por otro lado, la diversidad filogenética es de interés, debido a cambios evolutivos en su biología celular, morfología entre otras. A partir de estudios genéticos se han descrito aspectos importantes de la biología de las microalgas (Richmond, 2008). La investigación genética de las microalgas comenzó a tomar mayor importancia a partir de la primera secuenciación de una especie de microalga marina que fue la diatomea Thalassiosira pseudonana, en esta especie se descubrieron características procariontes y eucariontes, resultó ser de gran interés (Armbrust et al., 2004). A partir de la descripción y caracterización del genoma de esta microalga, se ha utilizado como modelo para la investigación de genes funcionales atribuidos a características de otras diatomeas como lo es la formación de pared de sílice (Mock et al., 2008). Otro de los modelos genómicos de las diatomeas es Phaeodactylum tricornutum (Bowler et al., 2008) y a través de análisis genómicos comparativos, se ha logrado una mayor descripción de características metabólicas importantes de las diatomeas como lo son el ciclo de nitrógeno y carbono (Allen et al., 2006, Coesel et al., 2008, Kroth et al., 2008; Richmond, 2008). El origen de la secuenciación de Phaeodactylum tricornutum se basó en la vulnerabilidad de cultivo a nivel laboratorio (Zaslavskaia et al., 2000). Por medio de los análisis genéticos en estos dos modelos genómicos con especies de microalgas, se ha desarrollado mayor investigación para realizar estudios que permitan la optimización de cultivos de diatomeas.

Por otro lado, se han realizado estudios en otras microalgas pertenecientes a otros grupos taxonómicos como lo son *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki *et al.*, 2004), *Ostreococcus tauri* (Derelle *et al.* 2006), *Micromonas pusilla* (Worden *et al.*, 2006), *Dunaliella salina* (Smith *et al.*, 2010) entre otros. Con estos trabajos se han aportado bases genéticas para identificación de genes de interés y con ello aumentar su potencial biotecnológico y acuícola.

Otra de las aplicaciones de los análisis genéticos en las microalgas es la identificación de especies a través de herramientas moléculas, una de las más utilizadas para una interpretación más amplia es la técnica de códigos de barras de ADN. Esta técnica se basa en el uso de las comparaciones de secuencias de una región corta de ADN para diferenciar especies (Hamsher *et al.*, 2011). Algunos de los trabajos de código de barras se han centrado en las diatomeas, principalmente en la diferenciación de sus características en su biología, debido a que son relativamente desconocidos y por consiguiente pluripotenciales (Evans *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2010). Dentro de las secuencias que permiten una identificación dentro de especies se

encuentran gen 18S rRNA, ITS, COI, y rbcL de los cuales los que dan mayor información son COI y rbcL debido a que pertenecen a mitocondria y cloroplasto, el primero por ser un gen conservado y el segundo por estar presente en el cloroplasto, compartiendo características con organismos fotosintéticos (Hebert *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007; Hamsher *et al.*, 2011; Zimermmann *et al.*, 2011).

Para la obtención de secuencias genómicas más completas en estudios genéticos de microalgas, se ha recomendado el uso de cultivos libres de bacterias o axénicos, debido a que, si se utilizan cultivos no axénicos, puede haber una mayor cantidad de ruido y con ello una mayor complejidad de obtención de secuencias completas en estos estudios. A pesar de que existen herramientas bioinformáticas que permiten discriminar con cierto grado de incertidumbre secuencias de origen procariota y eucariota, es preferible el uso de cultivos axénicos (Vu *et al.*, 2017).

1.3 Diatomeas

Las diatomeas son un gran grupo de fotocotrópicos unicelulares eucariotas, de las cuales hay 200 000 especies (Mann y Droop, 1996) y están ampliamente distribuidas en los océanos, agua dulce, suelos y en superficies húmedas. Estos organismos son especialmente importantes en los ecosistemas marinos y son responsables de alrededor de un 45 % de la producción primaria oceánica total (Yool y Tyrrell, 2003).

Las especies de diatomeas se han distinguido previamente según la forma, el tamaño, los patrones y la ultraestructura de su exoesqueleto de sílice, con poca o ninguna comprensión de la base genética de estas características. La evidencia reciente de datos moleculares y experimentos de apareamiento ha demostrado que las clasificaciones tradicionales son demasiado burdas y con ello contener varios taxones pseudo o semicrípticos, tal es el caso en *Pseudo-nitzschia* (Lundholm *et al.*, 2006).

1.4 Chaetoceros

Chaetoceros es un género de microalgas perteneciente al grupo de diatomeas planctónicas, cuentan con aproximadamente 400 especies descritas, generalmente es difícil distinguir entre diferentes especies. Los estudios sugieren que las colonias de *Chaetoceros* sirven como una importante fuente de alimento dentro de la columna de agua y un importante contribuyente de carbono en el ambiente bentónico (Booth *et al.,* 2002). En este género se destacan por sus aplicaciones las especies *Chaetoceros calcitrans, Chaetoceros mueller*i y *Chaetoceros* sp.

La microalga *Chaetoceros calcitrans* fue aislada por Umebayashi en 1960 siendo desconocido el sitio, pero se distribuye en el mar báltico (Hallfors, 2004) y el mar negro (BSPC Editorial Board, 2014). Una de sus características principales es presentar plastos marrones o amarillos y estar envueltas en cubiertas de sílice. Por otro lado, su composición bioquímica presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados eicosapentaenoíco (EPA) y araquidónico) AA, pocas cantidades de docosaexahenoíco (DHA), alta vitamina C y E, una tasa de crecimiento de 1.8 div.dia⁻¹ (Sánchez-Saavedra *et al.*, 1994). Debido a esto, la microalga *C. calcitrans* ha sido utilizada en acuicultura como alimento vivo dado su valor nutritivo, principalmente para moluscos y crustáceos, además, en cultivos tiene la capacidad de generar altas densidades celulares (Wikfors *et al.*, 2001), lo cual la hace una especie ideal para futuras investigaciones, principalmente en la potencialización y eficiencia de su producción.

Por otro lado, *Chaetoceros muelleri* fue colectada en Hawaii por J. Johansen, además su distribución abarca el mar Báltico (Hallfors, 2004), el mar negro (BSPC Editorial Board, 2014), Gran Bretaña (Hartley 1986; Whitton *et al.* 2003), Francia (Anon, 2017), Alemania (Ludwig *et al.*, 1996; Täuscher, 2014,; Täuscher, 2016), Netherlands (Veen *et al.* 2015). Se caracteriza por tener formas unicelulares, un tamaño promedio de 4 a 9 μm, presentan cuatro setas en sus extremos, se divide en salinidades de 35 ‰, su crecimiento es posible a temperaturas de 15 a 30 °C, y se identifica por tener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Allen *et al.*, 2006). Su uso se destaca en el Noroeste de México en la alimentación de larvas de crustáceos y de peces (López-Elías *et al.*, 2005).

Chaetoceros sp. es una microalga aislada por Trujillo-Valle en 1988 en Bahía de Todos Santos, B.C. (Trujillo-Valle, 1993). Actualmente esta especie no ha sido identificada pero su enfoque comercial es similar al de *Chaetoceros muelleri*. De estas tres especies, no existen estudios publicados acerca de sus genomas, por lo cual es necesario analizarlos y posteriormente compararlos para enfatizar diferencias y similitudes que contribuirían en mejoras continuas.

1.5 Justificación

La aportación de este trabajo permitirá la caracterización e identificación de las especies *Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros* sp. Además, sentará las bases para estudios genéticos y fisiológicos para la evaluación de los cultivos, debido a que *Chaetoceros calcitrans* es mayormente susceptible a cambios ambientales que otras especies de *Chaetoceros*, por lo tanto, podría promover una mayor adaptabilidad de las especies.

1.6 Hipótesis

Chaetoceros muelleri y *Chaetoceros* sp. tendrán mayor similitud genética que *Chaetoceros calcitrans* debido a la zona en que fueron aisladas, en el Noreste del océano Pacífico.

1.7 Objetivo general

Analizar el grado de similitud a nivel genómico y de desempeño entre *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros* sp. a través de métodos bioinformáticos y fisiológicos.

1.8 Objetivos específicos

- Obtener el genoma parcial mitocondrial y del cloroplasto de las tres especies de la microalga *Chaetoceros*.
- Caracterizar y comparar los genomas mitocondriales y del cloroplasto de cada una de las tres especies de la microalga *Chaetoceros*.
- Caracterizar la respuesta fisiológica (crecimiento, fotosíntesis y pigmentos) de los cultivos axénicos y no axénicos de las tres cepas de *Chaetoceros*.

2.1 Análisis bioinformático

2.1.1 Origen de secuencias

La colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE, proporcionó tres cepas de microalgas: *Chaetoceros muelleri* (CHM1), *Chaetoceros calcitrans* (CHC1) y *Chaetoceros* sp. (CHX1). Las tres especies fueron cultivadas en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) de forma monoespecífica. Se realizó un escalamiento del volumen del cultivo desde tubo de 15 ml con 10 ml de medio hasta matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml⁻¹ de medio por duplicado. Las condiciones de mantenimiento de los cultivos fueron iluminación continua a 50 µmol m⁻² s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes de luz fría, temperatura de 21 \pm 1 °C y salinidad de 35 ups.

Se realizó la cosecha de los cultivos en la fase estacionaria y posteriormente se extrajo el ADN por medio de protocolo comercial *DNeasy*[®] *Blood y Tissue* (QIAGEN[®], Valencia, CA). Se realizó la cuantificación y evaluación de la calidad e integridad de la banda de ADN para finalmente enviar a secuenciar las muestras con la plataforma MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina) a la Universidad de Georgia, Georgia, E.U.A.

2.1.2 Verificación de calidad de las secuencias

Se revisó la calidad de las lecturas recibidas mediante CLC-Genomics Workbench (10.0) y FastqC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Los parámetros de calidad evaluados fueron contenidos de GC, calidad, contenido y distribución de bases en las secuencias. Se eliminaron los adaptadores y secuencias de baja calidad (trimming). Posteriormente se reevaluó la calidad de las secuencias.

2.1.3 Ensamblaje De Novo

Para el ensamblaje se utilizó el programa CLC-Genomics Workbench (10.0). Se obtuvo la formación de contigs y se mapearon las lecturas a los contigs obtenidos con la opción de actualización de los contigs. Se

seleccionaron los contigs que tuvieron más de tres lecturas y una cobertura (profundidad) mayor a 1.5. La longitud mínima de contigs se estableció en mayor igual a 300 pb. Al finalizar el ensamblaje, se generó un archivo en formato FASTA para posteriores análisis de anotación.

2.1.4 Análisis funcional

Con los contigs resultantes, se hizo un blastn a la base de datos de nucleótidos (nt) del NCBI (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>) con el fin de separar secuencias bacterianas de eucariotas. Asimismo, se anotaron aquellos contigs que codifican a proteínas mediante Blastx (Camacho *et al.*, 2009) utilizando la base de datos Uniprot-Swiss Prot (<u>http://www.uniprot.org</u>) con un valor de E = 1E-06.

2.1.5 Conformación y anotación de genomas mitocondriales y de cloroplasto

Por medio de la identificación de los contigs relacionados a los organelos mitocondria y cloroplasto, se conformaron y anotaron los genomas completos mitocondriales y los genomas parciales del cloroplasto utilizando programas como CLC-Genomics Workbench (10.0), tRNAScan, CHLOROBOX (https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/) CGView Server, GeSeq (Tillich et al., 2017) entre otros.

2.1.6 Análisis filogenético

A partir de la identificación de los genes: COI (citocromo oxidasa I), rbcL (ribulosa 1-5-bifosfatasa carboxilasa/oxiginasa), psbA (fotosistema II precursor proteína D1) y 18S rRNA. Se realizaron análisis filogenéticos por medio del programa MEGA X (10.1) (Kumar *et al.*, 2018) para la obtención de árboles de filogenia de las tres especies de *Chaetoceros* y su relación entre ellas y con otras especies del filo Bacillariophyta existentes en el GenBank.

2.1.7 Identificación de grupos bacterianos

Con los contigs relacionados a bacterias se realizó una identificación de filos, géneros y especies agrupándolos en diagramas de Venn a través del programa en línea Bioinformatics & Systems Biology https://masters.vu.nl/en/programmes/bioinformatics-systems-biology/index.aspx.

2.2 Cultivo de microalgas

2.2.1 Obtención de cepas

Las cepas de las microalgas *C. calcitrans* (CHC1), *C. muelleri* (CHM1) y *Chaetoceros* sp. (CHX1) fueron proporcionadas por la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE.

2.2.2 Mantenimiento de cepas

Se cultivaron las tres especies de microalgas en medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) y se tuvieron los cultivos de forma monoespecífica. Se realizó un escalamiento del volumen del cultivo desde tubo de 15 ml con 10 ml de medio hasta matraz Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron en lote ("batch") o cultivos estáticos sin recambio ni adición de medio nuevo. Las condiciones de mantenimiento de los cultivos fueron iluminación continua a 50 µmol m⁻² s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes de luz fría, temperatura de 21 ± 1 °C y salinidad de 35 ups.

2.2.3 Caracterización del crecimiento de los cultivos

Se realizaron cultivos monoespecíficos, no axénicos, sin recambio de medio y por triplicado para cada una de las tres especies de *Chaetoceros*. Los cultivos se mantuvieron en matraz Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio "f". La densidad de los inóculos para los cultivos de las tres especies fue de 250 000 células ml⁻¹. Los cultivos se tuvieron bajo las mismas condiciones que las descritas para el mantenimiento de las cepas de microalgas (inciso 2.1.2).

2.2.3.1 Evaluación de la concentración de células

La evaluación de la concentración de células se realizó con una submuestra del medio de cultivo de cada condición experimental. Los conteos de células se realizaron cada día en una cámara Neubauer (hematocitómetro) de 0.1 mm de profundidad, marca Hausser Scientific. Los conteos se hicieron usando un microscopio compuesto Zeiss, Primo Star. Para calcular la concentración de células, se siguió el procedimiento descrito por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

2.2.3.2 Conteo de bacterias

Para conocer la concentración de bacterias heterotróficas en los cultivos, se tomó una submuestra del medio de cultivo de cada condición experimental. Para asegurar que la evaluación de la concentración de bacterias en el medio pudiera ser contabilizada, se realizaron para cada caso diluciones de 10⁻³. Las diluciones para el conteo de bacterias se hicieron usando suero fisiológico (9 gr de NaCl L⁻¹). Bajo condiciones de asepsia, se tomó 0.1 ml de cada dilución para realizar la inoculación de la muestra en cajas Petri con 20 ml de medio ZoBell (Zobell, 1941). Las cajas Petri con muestras se incubaron en una mini incubadora VWR a 31 °C por 48 horas. Posteriormente se realizó el conteo de las colonias y que se expresó en unidades formadoras de colonias en 1 ml (UFC ml⁻¹) (Murray *et al.*, 1981).

2.2.4 Pruebas de axenidad

Con el propósito de evaluar distintos tratamientos para la axenización de los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros*, se utilizó un volumen de 5 ml⁻¹ de cultivo proveniente de los ensayos descritos en la sección 2.1.3. El volumen de cultivo se mantuvo en tubos de vidrio de 10 ml⁻¹ para cada uno de los casos y por triplicado. Se implementaron cuatro tratamientos que fueron mantenidos durante 48 horas como se describe a continuación:

1) El tratamiento 1, consistió en lavados del paquete celular de cada cultivo con agua de mar estéril y que fueron concentradas por centrifugación a 2232 g durante 10 minutos a 4 °C en un equipo Eppendorf modelo 5810R.

2) El tratamiento 2, se realizaron lavados del paquete celular de los cultivos con agua de mar estéril y que fueron concentrados por centrifugación con las condiciones descritas en el tratamiento 1 y con la adición de 75 μg ml⁻¹ de Estreptomicina.

3) El tratamiento 3, consistió en lavados del paquete celular de los cultivos con agua de mar estéril y que fueron concentrados por centrifugación con las condiciones descritas en el tratamiento 1 y con la adición de 250 μg ml⁻¹ de Sulfato G41.

4) El tratamiento 4, fue lavados del paquete celular de los cultivos con agua de mar estéril y que fueron concentrados por centrifugación con las condiciones descritas en el tratamiento 1 y con la adición de un coctel de antibióticos compuesto de Ampicilina 250 μg ml⁻¹, Kanamicina 200 μg ml⁻¹, Neomicina 50 μg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 μg ml⁻¹.

Como tratamiento control de los ensayos, se utilizó un volumen de 5 ml⁻¹ de cultivo mantenidos en tubos de vidrio de 10 ml⁻¹ para cada caso y por triplicado, pero sin la aplicación de los tratamientos antes descritos.

El conteo de la concentración de células y del contenido de bacterias heterotróficas se realizó cada día siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.1.3.1 y 2.1.3.2 respectivamente.

2.2.5 Cultivos axénicos

Con el propósito de tener cultivos axénicos y monoespecíficos de las tres especies de *Chaetoceros*, se utilizó para cada caso un volumen de 10 ml de cultivo obtenido de la fase exponencial temprana de crecimiento como ya descrito en la sección 2.1.3.

Para la obtención de cultivos axénicos se utilizó con un coctel de antibióticos constituido por Ampicilina, Kanamicina, Neomicina y Estreptomicina según lo descrito para obtener cultivos axénicos para *Isochrysis* *galbana* (Molina *et al.,* 2014). Se tomó como base el coctel de antibióticos antes descrito, pero adicionado en dos concentraciones:

- El tratamiento 1, estaba compuesto de Ampicilina 250 μg ml⁻¹, Kanamicina 200 μg ml⁻¹, Neomicina 50 μg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 μg ml⁻¹.
- El tratamiento 2, se utilizaron los antibióticos descritos para el tratamiento 1, pero con el doble de la concentración 500 μg ml⁻¹, 400 μg ml⁻¹, 1000 μg ml⁻¹ y 100 μg ml⁻¹ para cada caso.

Para el proceso de axenización de los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros* se colocó un volumen de 10 ml en tubos de 15 ml para cada uno de los cultivos y por triplicado. Para cada caso se adicionó el coctel de antibióticos descrito para el tratamiento 1 y 2, como ya descrito en la sección 2.1.4. Como tratamiento control de los ensayos, se utilizó un volumen de 10 ml de cultivo en tubos de vidrio de 15 ml para cada caso y por triplicado, pero sin la adición del coctel de antibióticos (tratamiento 1 y 2 de la sección 2.1.5).

El conteo de la concentración de células y del contenido de bacterias heterotróficas de los cultivos, se realizó cada día siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.1.3.1 y 2.1.3.2 respectivamente.

2.2.6 Cultivos masivos

Para la obtención de muestras para el análisis genético, se realizaron cultivos monoespecíficos, sin recambio de medio y por duplicado para cada una de las tres especies de *Chaetoceros*. Se utilizaron dos condiciones de cultivo, no axénicos y axénicos. Para ambos caso, se utilizaron inóculos de 250 000 células ml⁻¹ y los cultivos se mantuvieron monoespecíficos en matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio "f" y con condiciones similares de mantenimiento a lo descrito en la sección 2.1.2.

Para la realización de cultivos axénicos, después de la inoculación de las microalgas, se aplicó el tratamiento que mostró los mejores resultados en las pruebas de axenización descritas en la sección 2.1.5. En el caso de los cultivos no axénicos, no se aplicó ningún tratamiento de antibióticos para la axenización.

El conteo de la concentración de células y del contenido de bacterias heterotróficas de cada uno de los tratamientos, se realizó cada día siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.1.3.1 y 2.1.3.2 respectivamente.

Se cosechó la biomasa de las células durante la fase exponencial temprana de los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en las distintas condiciones experimentales (axénicos y no axénicos). Para cada caso, se utilizaron 4 muestras de 20 ml para concentrar la biomasa de células a través de centrifugación a 1139 g durante 20 min y a 4 °C en un equipo Eppendorf modelo 5810R. Las muestras de cada tratamiento (8) fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

2.2.7 Crecimiento y pigmentos

Para la cuantificación de pigmentos, se realizaron cultivos monoespecíficos en dos condiciones axénicas y no axénicas de cada especie de *Chaetoceros*. Los cultivos se realizaron en matraz Fernbach con 2 l de medio "f" para cada caso como ya descrito en la sección 2.1.2. Por cada matraz se tomaron tres submuestras y se concentraron en filtros de fibra de vidrio Osmonics GF/C con abertura de poro de 1 µm. El contenido de pigmentos se cuantificó siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984).

2.2.8 Fotosíntesis

Para la medición de la fotosíntesis se realizaron cultivos como ya descrito en la sección 2.1.7. Las muestras utilizadas para la medición de la actividad fotosintética se mantuvieron en oscuridad durante 15 min. La fotosíntesis se midió con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM) (Walz, Junior PAM). Se obtuvieron las curvas de luz para cada tratamiento y se realizó la determinación de los parámetros fotosintéticos — máxima tasa de transporte de electrones (ETRmáx), eficiencia fotosintética (α) e irradiancia de saturación lumínica (Ik) a partir del cálculo de absortancia con el uso del programa Solver (López-Figueroa, com. pers., 2018).

2.2.9 Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos en cada ensayo experimental (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar las posibles diferencias en la densidad de células, tasa de crecimiento, conteo de bacterias heterotróficas de los cultivos de cada especie de *Chaetoceros* mantenidos en los ensayos experimentales. Para los casos en donde no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se realizó una prueba de Kruskal Wallis.

Para conocer las posibles diferencias en el contenido de pigmentos, máxima tasa de transporte de electrones (ETRmáx), eficiencia fotosintética (α) e irradiancia de saturación lumínica (Ik), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. En el ANOVA de dos vías se consideró como un factor si los cultivos fueron axénicos o no axénicos y el otro factor el tipo de especie de *Chaetoceros*. Para los casos en donde los datos fueron no normales y no homocedásticos, se realizó la prueba no paramétrica de Friedman.

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa STATISTICA[®] versión 8.0 (Stat Soft Inc., 2002) y se consideró un valor de significancia de 0.05.

2.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos

2.3.1 Estandarización de extracción de ADN

El proveedor del servicio de secuenciación (Universidad de Georgia, Georgia, E.U.A.) solicitó una mayor cantidad de ADN del enviado previamente (Sección 2.1.6), por lo que se realizaron modificaciones del protocolo comercial *DNeasy® Blood y Tissue* (QIAGEN®, Valencia, CA) y se implementaron diferentes técnicas de lisis celular. Estas variaciones se efectuaron hasta la obtención de un protocolo óptimo para la extracción de ADN de las especies de *Chaetoceros*.

Se implementó el protocolo obtenido del procedimiento descrito en la sección 2.2.1. para cada una de las muestras descritas en la sección 2.1.6. Las muestras de ADN se diluyeron a la concentración de 50 ng μ l⁻¹ en un volumen de 100 μ l posteriormente fueron almacenadas a -20°C, el ADN concentrado restante se almacenó a -80 °C.

2.3.3 Calidad y pureza de ADN

La cuantificación del ADN extraído (ng µl⁻¹) se realizó por medio de espectrofotometría con un espectrofotómetro marca NanoDrop[™]2000 (ThermoFisher Scientific), mediante la lectura de absorbancias de una longitud de onda específica de 260 nm. Además, se determinó la pureza del ADN, por fenoles con la razón 260/230 en rangos aceptables entre de 2.0 a 2.2 y proteínas en 260/280 con rango de pureza admisible en 1.8 a 2.0 (Thermo Scientific, 2011).

2.3.4 Integridad de banda de ADN

La calidad de los productos de las extracciones de ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % en amortiguador Super buffer 1X (Zhang, *et al.*, 2011) a 100 Volts por 100 min, teñidos con GelRedTM de Biotium (Huang *et al.*, 2010; Crisafuli, *et al.*, 2015). Posteriormente cada gel se observó en el fotodocumentador Gel Doc [™] XR+ Imager (Bio-Rad).

2.3.5 Secuenciación masiva

Se enviaron a secuenciar las muestras de ADN obtenidas del procedimiento descrito en la sección 2.2. se enviaron a secuenciar con la plataforma MiSeq Benchtop Sequencer (Illumina) a la Universidad de Georgia, Georgia, E.U.A.

3.1 Análisis bioinformático

3.1.1 Verificación de calidad de las secuencias

A partir de la recepción de las muestras, se evaluó la calidad de las secuencias obtenidas de cada una de las tres especies de *Chaetoceros*. Para *C. muelleri* se obtuvo un total de 3,103,280 lecturas iniciales y después de la verificación de la calidad se conservaron 3,102,200 lecturas con un 48 % de contenido de guanina-citosina (%GC). En *C. calcitrans* las lecturas recibidas fueron 3,103,280 conservando 3,102,200 y teniendo un 46 % de GC (guanina-citosina). Se obtuvieron 4,095,810 lecturas de *Chaetoceros* sp. conservando 4,094,602 lecturas con un 47 % de contenido de GC (guanina-citosina) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de parámetros de calidad de las secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de Chaetoceros.

Parámetros de calidad				
Especies	Lecturas	Lecturas recortadas	Lecturas después de recorte	%GC
C. muelleri	3,103,280	1,080	3,102,200	48.00
C. calcitrans	3,103,280	1,080	3,102,200	46.00
Chaetoceros sp.	4,095,810	1,208	4,094,602	47.00

3.1.2 Ensamblaje De Novo

A partir de las lecturas de mayor calidad evaluadas en la sección 3.1, se realizó un ensamblaje *De Novo*. Se logró mapear el 97 % de las lecturas de *C. muelleri* obteniendo 24,498 contigs con un tamaño promedio de 2104 pb. Se mapeó el 97 % de las lecturas de *C. calcitrans* conformando 25,542 contigs de un tamaño promedio de 2,167 pb. Para las lecturas de *Chaetoceros* sp. se mapeó el 97 % obteniendo 60,152 contigs con un tamaño promedio de 1386 pb (Tabla2).

3.1.3 Análisis funcional

Se identificaron secuencias nucleotídicas (blastn) a partir de los contigs resultantes del ensamblaje. Se lograron identificar 10, 561 contigs de *C. muelleri* de los cuales 10,138 están relacionados a bacterias y 423 a eucariontes. Dentro de la identificación de eucariontes, sólo 151 contigs, están relacionados a diatomeas. Entre los principales grupos taxónomicos eucariontes identificados son diatomeas, edicotas y ascomicetos. Los grupos taxónomicos asociados a bacterias son en su mayoría alfa y gama proteobacterias (Tabla 3; Figura 1).

De *C. calcitrans* se obtuvo una identificación de 10,553 contigs, de los cuales 10,127 están asociados a bacterias y 426 a eucariotas. Entre los eucariontes sólo 152 contigs se asociaron al grupo de diatomeas. Además de diatomeas se identificaron grupos taxónomicos como los edicotas y ascomicetos. Los grupos bacterianos de mayor relación son alfa y gama proteobacterias (Tabla 3; Figura 2).

Para *Chaetoceros* sp. resultaron 26,613 contigs identificados, 21,806 afines a bacterias y 677 a eucariontes, de los cuales 213 se adjudicaron a diatomeas. Otro de los grupos eucariotas identificados fueron ascomicetos y edicotas. Los grupos bacterianos identificados como mayoría fueron las alfa y gama proteobacterias (Tabla 3; Figura 3).

Tabla 2.	Estadística	básica	del	ensamblaje	De	Novo	de	secuencias	de	cultivos	no	axénicos	de	tres	especies	de
Chaetoce	ros.															

	Parámetros de ensamblaje <i>De Novo</i>										
Especies	Lecturas ensambladas	N75	N50	N25	Mín.	Máx.	Promedio	Contigs			
C. muelleri	3,015,572	1,687	11,135	40,285	175	610,232	2,104	24,498			
C. calcitrans	3,020,461	1,752	12,422	49,447	175	786,127	2,167	25,542			
Chaetoceros sp.	3,966,883	923	2,804	11,931	152	661,402	1,386	60,152			

N: Valores de percentiles



Figura 1. Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de *Chaetoceros muelleri*.



Figura 2. Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de *Chaetoceros calcitrans*.



Figura 3. Distribución de la identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de la secuenciación genómica parcial de cultivos no axénicos de *Chaetoceros* sp.

	Identificación de secuencias nucleotídicas (blastn)											
Especie	Contigs bacterian os	Contigs eucariontes	Contigs diatomeas	Contigs identificados	% Contigs identificados	% Contigs diatomeas						
C. muelleri	10,138	423	151	10,561	42	0.01						
C. calcitrans	10,127	426	152	10,553	56	0.01						
Chaetoceros sp.	21,806	677	213	26,613	44	0.01						

 Tabla 3. Identificación de secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs de secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de Chaetoceros.

3.1.4 Conformación y anotación de genomas mitocondriales y del cloroplasto

3.1.4.1 Genomas mitocondriales

Se conformaron y se anotaron los genomas mitocondriales de las tres especies de *Chaetoceros*. El genoma mitocondrial de *C. muelleri* y *C. calcitrans* se registraron con un tamaño de 36,059 pb (Figura 4 y 5). Se identificaron 29 CDS's (regiones codificantes), 40 tRNA's y se identificó el gen ARNr 16 (Anexo A).

El genoma mitocondrial de *Chaetoceros* sp. se conformó con un tamaño de 39,733 pb (Figura 6). Se anotaron 28 CDS (regiones codificantes), 44 tRNA y se identificaron el gen ARNr 16 y el ARNr 23 (Anexo A).

Las anotaciones de cada genoma mitocondrial están constituidas por 9 grupos: Complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo III Ubiquinol-citocromo-c reductasa, complejo IV citocromo c oxidasa, ATP sintasa, proteínas ribosomales (SSU), proteínas ribosomales (LSU), ORF (Marcos de lectura abierta) tARN y rARN (Figura 4, 5 y 6).



Figura 4. Mapa genético del genoma mitocondrial de *Chaetoceros muelleri*. Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores coo muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.


Figura 5. Mapa genético del genoma mitocondrial de *Chaetoceros calcitrans*. Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores como muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.



Figura 6. Mapa genético del genoma mitocondrial de *Chaetoceros* sp. Los genes que pertenecen a grupos funcionales están codificados por colores. Los genes fuera del circulo se transcriben en sentido horario, mientras que los genes en el interior se transcriben en sentido antihorario. Los bloques de genes estan llenos de diferentes colores como muestra la línea de corte. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.

3.1.4.2 Genomas del cloroplasto

Se conformaron y se anotaron los genomas del cloroplasto de las tres especies de *Chaetoceros*. El genoma del cloroplasto de *C. muelleri* esta formado por 116, 284 pb (Figura 7). Se identificaron 133 CDS (regiones codificantes), 53 tRNA y 8 rRNA (Anexo B).

El genoma del cloroplasto correspondiente a *C. calcitrans* se conformó de 116,556 pb (Figura 8) del cual se identificaron 131 CD (regiones codificantes), 57 tRNA y 7 rRNA (Anexo B).

El genoma del cloroplasto de *Chaetoceros* sp. se conformo con un tamaño de 116, 176 pb (Figura 9). Se anotaron 133 CDS (regiones codificantes), 51 tRNA y 10 rRNA (Anexo B).

Las anotaciones de cada genoma de cloroplasto estan asociadas a 13 grupos: Fotosistema I, fotosistema II, complejo citocromo b/f, ATP sintasa, RubisCO subunidad larga, RNA polimerasa, proteinas ribosomales (SSU), proteínas ribosomales (LSU), clpP matK, marcos hipoteticos de lectura de cloroplasto, RNA de transferencia, RNA ribosomal y otros genes (Figura 7, 8 y 9).

Se observaron diferencias importantes en la región XX – YY de *C. muelleri* y *C. calcitrans* con respecto a *Chaetoceros* sp. (Anexo B)



Figura 7. Mapa genético del genoma de cloroplasto de *Chaetoceros muelleri*. Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.



Figura 8. Mapa genético del genoma de cloroplasto de *Chaetoceros calcitrans*. Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.



Figura 9. Mapa genético del genoma de cloroplasto de *Chaetoceros* sp. Los genes en el exterior se transcriben en sentido horario y los del interior en sentido antihorario. El anillo interior muestra el contenido del GC en gris.

3.1.5 Marcadores moleculares para la identificación de Chaetoceros

Se identificó la secuencia COI en el genoma mitocondrial de cada especie de *Chaetoceros*. El tamaño de la secuencia para *C. muelleri* y *C. calcitrans* fue de 1485 pb. y para *Chaetoceros* sp. fue de 1491 pb (Tabla 4).

Se obtuvo la secuencia rbcL en el genoma del cloroplasto de cada especie de *Chaetoceros*. El tamaño de la secuencia para *C. muelleri* y *C. calcitrans* fue de 1473 pb. y para *Chaetoceros* sp. fue de 1470 pb (Tabla 4).

Se identificó la secuencia pbsA en el genoma del cloroplasto de cada especie de *Chaetoceros*. El tamaño de la secuencia fue el mismo para las tres especies con un tamaño de 1083 pb (Tabla 4).

Se obtuvo la secuencia de la región correspondiente a los genes 18S, 5.8S y 23S de cada especie de *Chaetoceros*. El tamaño de la secuencia para *C. muelleri* y *C. calcitrans* fue de 3594 pb. y para *Chaetoceros* sp. fue de 3741 pb (Tabla 4).

	Marcadores moleculares					
Especie	COI rbcL		psbA	18S *		
	(pb)	(pb)	(pb)	(pb)		
C. muelleri	1,485	1,473	1,083	3,594		
C. calcitrans	1,485	1,473	1,083	3,594		
Chaetoceros sp.	1,492	1,470	1,083	3,741		

Tabla 4. Marcadores moleculares para la identificación de Chaetoceros.

* Incluye la región de 18S, 5.8S y 23S

3.1.6 Análisis filogenético

3.1.6.1 Gen COI

Al hacer el análisis filogenético con los nucleótidos alineados a codones de COI de *Chaetoceros* con otras diatomeas, se observó a las tres especies de *Chaetoceros* en un solo grupo con un soporte del 75 % (soportes de los grupos por arriba de 60 % se consideraron significativos) (Figura 10).



Figura 10. Árbol filogenético basado en las secuencias COI de 18 especies de Bacillarioficeas, todas las especies de *Chaetoceros* son de este estudio y se resaltan en un recuadro rojo.

3.1.6.2 Gen rbcL

En el caso de la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCo o rbcL), se logró obtener un mayor número de microalgas. El análisis filogenético agrupó a todas las especies de *Chaetoceros* en un grupo con un soporte significativo (66 %). Cabe mencionar que *Chaetoceros muelleri* CHM1 de la colección se agrupó con *Chaetoceros calcitrans* CHC1 y HQ656826 del GenBank (Figura 11) y no con *C. muelleri* KM202105.1 ni con CHX1. Esto lo que sugiere que CHM1 pertenece al grupo de *C. calcitrans*.



Figura 11. Árbol filogenético basado en las secuencias rbcL de 17 especies de Bacillarioficeas, las especies de *Chaetoceros* de este estudio se indican con flechas rojas.

3.1.6.3 Gen psbA

En el caso del marcador psbA la agrupación de las especies del grupo de *Chaetoceros* se agruparon en dos subgrupos de *Chaetoceros*, en el primero se agruparon *C. muelleri* y *C. calcitrans* con un soporte significativo de 83 %. El uso de este marcado no permitió una agrupación clara de las especies (Figura 12). Esto sugiere que psbA podría no es un buen marcador para el análisis filogenético de este grupo de especies.



Figura 12. Árbol filogenético basado en las secuencias psbA de 15 especies de Bacillarioficeas, las especies de *Chaetoceros* de este estudio se indican con flechas rojas.

3.1.6.4 Gen 18S

Para el marcador 18S se logró un solo grupo de todas las especies del género *Chaetoceros* con un soporte significativo del 100 %. Este marcador indicó una cercanía filogenética entre *C. calcitrans* y *C. muelleri* con un soporte de 87 %. La especie *Chaetoceros* sp. (CHX1) tiene una relación filogenética cercana con *C. gracilis* JQ217338.1 con un soporte de 77 % (Figura 13). Nuevamente *C. muelleri* (CHM1) se agrupó con *C. calcitrans* (CHC1).



Figura 13. Árbol filogenético basado en las secuencias 18S de 23 especies de Bacillarioficeas, las especies de *Chaetoceros* de este estudio se indican con flechas rojas.

3.1.7 Identificación de grupos bacterianos

Se realizó una discriminación de los procariontes de los cuales se identificaron los filos, géneros y especies de bacterias por separación en las secuencias de cultivos no axénicos de tres especies de *Chaetoceros* (Tabla 5; Figuras 14 a 16).

Se identificaron 25 filos bacterianos, de los cuales 20 se comparten entre las tres especies de *Chaetoceros*, uno entre *C. calcitrans* y *C. muelleri*, y cuatro filos bacterianos se identificaron solo para *Chaetoceros* sp. (Figura 14).

Se identificaron 578 géneros bacterianos, de los cuales 289 se comparten entre las tres especies de *Chaetoceros*, 65 entre *C. calcitrans* y *C. muelleri*, cuatro entre *C. muelleri* y *Chaetoceros* sp., uno entre *C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp., dos solo para *C. calcitrans*, dos solo para *C. muelleri* y 215 géneros bacterianos se identificaron para *Chaetoceros* sp. (Figura 15).

Se identificaron 1228 especies bacterianas, de los cuales 493 se comparten entre las tres especies de *Chaetoceros*, 185 entre *C. calcitrans* y *C. muelleri*, y cuatro para *C. muelleri* y *Chaetoceros* sp., uno para *C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp., seis solo para *C. muelleri*, uno solo para *C. calcitrans* y 538 especies bacterianas se describieron solo para *Chaetoceros* sp. (Figura 16).

Especies	Géneros de bacterias predominantes	Número de contigs
	Alcanivorax	1014
	Erythrobacter*	851
	Roseibacterium	758
	Altererythrobacter	586
	Phaeobacter*	329
C. muelleri	Pseudomonas	321
	Sulfitobacter*	303
	Ruegeria	303
	Rhodobacter	297
	Porphyrobacter	251
	Kordia	1291
	Alcanivorax	1048
	Roseibacterium	937
	Erythrobacter*	894
	Altererythrobacter	628
C. calcitrans	Ruegeria	568
	Phaeobacter*	522
	Octadecabacter	455
	Pseudomonas	398
	Sulfitobacter*	379
	Marinobacter	5096
	Winogradskyella	1308
	Porphyrobacter	1233
	Muricauda	1022
Chastasaras sa	Roseovarius	938
chueloceros sp.	Hyphomonas	876
	Erythrobacter*	815
	Sulfitobacter*	713
	Hoefla	628
	Phaeobacter*	512

Tabla 5. Géneros de bacterias identificados en los cultivos no axénicos de tres especies de *Chaetoceros*, solo se indican los 10 géneros con mayor número de contigs obtenidos mediante Blastn.

Los nombres de los géneros con astérisco (*) indican los grupos de bacterias que se comparten entre las tres especies de *Chaetoceros*.



Figura 14. Filos bacterianos representados en un diagrama de Venn que se comparten las tres especies de *Chaetoceros*.







Chaetoceros sp.

Figura 16. Especies bacterianas representadas en un diagrama de Venn que se comparten las tres especies de *Chaetoceros*.

3.2. Cultivo de microalgas

3.2.1 Caracterización del crecimiento de los cultivos

Los cultivos de *C. muelleri* tuvieron una fase exponencial hasta el día 4 y posterior a esa fecha comenzó la fase estacionaria, y durante el día 7 se evaluó un decremento de la concentración de células (Figura 17). La tasa de crecimiento promedio de los cultivos de *C. muelleri* fue de 0.73 divisiones día⁻¹ (Tabla 6). La máxima densidad celular promedio obtenida en los cultivos de *C. muelleri* fue de 3.15 x10⁶ células ml⁻¹ (Tabla 6).

El contenido de bacterias heterotróficas de los cultivos de *C. muelleri* presentó una tendencia al incremento de forma proporcional al aumento de la concentración celular (Figura 17). El contenido de bacterias durante los dos primeros días no presentó un gran incremento y a partir del día 2 al día 4 se presentó la fase exponencial de crecimiento de las bacterias. La fase estacionaria del crecimiento de las bacterias heterotróficas fue a partir del día 6. La tasa de crecimiento promedio de las bacterias heterotróficas en los cultivos de *C. muelleri* fue de 0.95 divisiones día⁻¹. Las valores máximos de bacterias heterotróficas en los cultivos de *C. muelleri* fue de 16.15 x10⁶ UFC ml⁻¹ (Tabla 6).



Figura 17. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* cultivado durante 7 días.

La caracterización de los cultivos de *C. calcitrans* presentó una fase exponencial hasta el día 4 y a partir del día 5 comenzó la fase estacionaria y en el día 7 se observó un decremento de la densidad celular (Figura 18). La tasa de crecimiento promedio de los cultivos de *C. calcitrans* fue de 0.77 divisiones día⁻¹ (Tabla 6). La máxima densidad celular promedio obtenida en los cultivos de *C. calcitrans* fue de 2.34 x10⁶ células ml⁻¹ (Tabla 6).

En los cultivos de *C. calcitrans* el contenido de bacterias heterotróficas presentó una tendencia al incremento de forma proporcional al incremento de la concentración celular (Figura 18). Sin embargo, el contenido de bacterias durante los dos primeros días no presentó un incremento sustancial y a partir del día 2 al día 4 se presentó la fase exponencial de crecimiento. La fase estacionaria del crecimiento de las bacterias heterotróficas fue a partir del día 6. La tasa de crecimiento promedio de las bacterias heterotróficas en los cultivos de *C. calcitrans* fue de 0.98 divisiones día⁻¹ (Tabla 6). Las valores máximos de bacterias heterotróficas en los cultivos de *C. muelleri* fue de 12.23 x10⁶ UFC ml⁻¹ (Tabla 6).



Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de *Chaetoceros calcitrans* cultivado durante 7 días.

Los cultivos de *Chaetoceros* sp. caracterizados por su concentración celular tuvieron una fase exponencial hasta el día 4 y a posterior a esa fecha comenzó la fase estacionaria y durante el día 7 se evaluó un decremento (Figura 19). La tasa de crecimiento promedio de los cultivos de *Chaetoceros* sp. fue de 0.60 divisiones día⁻¹ (Tabla 7). La máxima densidad celular promedio obtenida en los cultivos de *Chaetoceros* sp. fue de 2.98 x10⁶ células ml⁻¹ (Tabla 6).

En los cultivos de *Chaetoceros* sp. el contenido de bacterias heterotróficas presentó una tendencia al incremento de forma proporcional al incremento de la concentración celular (Figura 19). Sin embargo, el contenido de bacterias presentó un incremento sustancial a partir del día 1 y a partir del día 2 al día 4 se presentó la fase exponencial de crecimiento. La fase estacionaria del crecimiento de las bacterias heterotróficas fue a partir del día 6. La tasa de crecimiento promedio de las bacterias heterotróficas en los cultivos de *Chaetoceros* sp. fue de 0.93 divisiones día⁻¹ (Tabla 6). Las valores máximos de bacterias heterotróficas en los cultivos de *Chaetoceros* sp. fue de 19.96 x10⁶ UFC ml⁻¹ (Tabla 6).



Figura 19. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) y conteo de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de *Chaetoceros* sp. cultivado durante 7 días.

Especies	Parámetros de crecimiento				
	Micr	oalgas	Bacterias		
	DC _{max}	μ_{m}	CBH _{max}	$\mu_{ m b}$	
C. muelleri	3.15 ± 0.04 a	0.73 ± 0.00 b	16.15 ± 0.13 b	0.95 ± 0.01 a	
C. calcitrans	2.34 ± 0.00 c	0.77 ± 0.00 a	12.23 ± 0.20 c	0.98 ± 0.04 a	
Chaetoceros sp.	2.98 ± 0.05 b	0.60 ± 0.00 c	19.96 ± 0.15 a	0.93 ± 0.02 a	

Tabla 6. Valores promedio de la densidad celular máxima ($Dc_{max} \times 10^6$ células ml⁻¹), tasa de crecimiento microalgal (μ_m), concentración de bacterias heterotróficas máxima ($CBH_{max} \times 10^6$ UFC ml⁻¹) y tasa de crecimiento bacteriano (μ_b) de cultivos monoespecíficos, no axénicos de tres especies de *Chaetoceros*.

Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre especies, ANOVA de una vía y prueba de Kruskal Wallis (CBH_{max}), p<0.05: a>b>c

3.2.2 Pruebas de axenidad

A partir de la evaluación de distintos tratamientos para la axenización de los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros*, se logró un significativamente menor contenido final de bacterias heterotróficas (CFBH) con el uso del coctel de antibióticos (Tabla 7). Los significativamente (p<0.05) menores valores de bacterias heterotróficas correspondieron a 0.07 x 10⁶ UFC ml⁻¹ para *C. muelleri* (p<0.05), 0.09 x 10⁶ UFC ml⁻¹ en *C. calcitrans* (p<0.05) y para *Chaetoceros* sp. fue de 0.10 x 10⁶ UFC ml⁻¹.

La densidad celular final (DCF) en cada una de las tres especies, no disminuyó después de la aplicación de los tratamientos, el crecimiento continuo para cada uno de los casos. La mayor densidad celular final (DCF) fue significativamente mayor con el uso de Sulfato G41 (Tabla 7). La densidad celular significativamente mayor (p<0.05) fue de 3.36 x 10⁶ células ml⁻¹ para *C. muelleri* seguido por 2.86 x 10⁶ células ml⁻¹ en *C. calcitrans*. Con el uso del coctel de antibióticos (Tabla 7) se obtuvo una densidad celular final significativamente mayor (DCF) (p<0.05) de 2.91 x 10⁶ células ml⁻¹ para *Chaetoceros* sp.

Tabla 7. Valores promedio de la densidad celular inicial (DCI x 10⁶ células ml⁻¹), densidad celular final (DCF x 10⁶ células ml⁻¹) y contenido final de bacterias heterotróficas (CFBH x 10⁶ UFC ml⁻¹) de cultivos monoespecíficos, no axénicos de tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en 4 tratamientos. Control: Cultivos sin tratamiento, T1: Lavado con agua estéril, T2: lavado con agua estéril + estreptomicina, T3: lavado con agua estéril + Sulfato G41, T4: lavado con agua estéril + coctel de antibióticos.

Especies	Control	T1	T2	Т3	Т4
C. muelleri					
DCI	2.35 ± 0.17 a	2.21 ± 0.04 a	2.17 ± 0.07 a	2.08 ± 0.05 a	2.07 ± 0.07 a
DCF	2.43 ± 0.02 b	2.57 ± 0.67 b	3.06 ± 0.08 a	3.36 ± 0.09 a	2.77 ± 0.03 a
CFBH	11.74 ± 0.48 a	5.58 ± 0.37 b	11.40 ± 0.56 a	9.60 ±0.28 ab	0.08 ± 0.02 c
C. calcitrans					
DCI	2.11 ± 0.01 a	2.03 ± 0.08 a	1.94 ± 0.08 a	2.01 ± 0.01 a	1.98 ± 0.01 a
DCF	2.33 ± 0.01 b	2.41 ± 0.01 b	2.78 ± 0.05 a	2.86 ± 0.01 a	2.78 ± 0.05 a
CFBH	8.60 ± 0.14 a	4.40 ± 0.14 b	7.10 ± 0.14 a	5.70 ± 0.14 ab	0.06 ± 0.00 c
Chaetoceros sp.					
DCI	2.17 ± 0.07 a	2.05 ± 0.07 a	2.07 ± 0.07 a	2.10 ± 0.03 a	2.11 ± 0.01 a
DCF	2.45 ± 0.03 b	2.61 ± 0.01 b	2.81 ± 0.01 a	2.68 ± 0.01 a	2.91 ± 0.02 a
CFBH	15.30 ± 0.14 a	7.57 ± 0.10 b	13.26 ± 0.09 a	11.06 ± 0.09 ab	0.13 ± 0.01 c

Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c>d.

3.2.3 Ensayos de axenidad

Con los tratamientos de axenización se encontró que los cultivos monoespecíficos de *C. muelleri* presentaron una densidad celular significativamente mayor (p<0.05) en los días del 1 al 4 con el tratamiento 1. En los días del 5 al 7 la densidad celular fue significativamente mayor en el tratamiento control (p<0.05) (Figura 20).

El contenido de bacterias heterotróficas en el cultivo de *C. muelleri* fue significativamente menor con el tratamiento 1 (p<0.05). A partir de los días 1 al 3 de cultivo de *C. muelleri* se logró la axenidad hasta la fase exponencial temprana del crecimiento y a partir del día 4 aumentó progresivamente el contenido bacteriano hasta el día 7 (Figura 21).



Figura 20. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros muelleri* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, *p*<0.05: a>b>c.

Con los tratamientos de axenización se encontró que los cultivos monoespecíficos de *C. calcitrans* presentaron una densidad celular significativamente mayor en los días del 1 al 7 con el control experimental. Respecto a la respuesta de la densidad celular a los tratamientos, durante los 7 días de cultivo, el tratamiento 1 (p<0.05) tuvo una respuesta favorable, obteniendo una densidad celular significativamente mayor que el tratamiento 2 (Figura 21).



Figura 21. Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros muelleri* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c.

Con los tratamientos de axenización se encontró que los cultivos monoespecíficos de *C. calcitrans* presentaron una densidad celular significativamente mayor en los días del 1 al 7 con el control experimental. Respecto a la respuesta de la densidad celular a los tratamientos, durante los 7 días de cultivo, el tratamiento 1 (p<0.05) tuvo una respuesta favorable, obteniendo una densidad celular significativamente mayor que el tratamiento 2 (Figura 22).

El contenido de bacterias heterotróficas en el cultivo de *C. calcitrans* fue significativamente menor con el tratamiento 1 y 2 (p<0.05). A partir del día 1 al día 3 de cultivo de *C. calcitrans* se logró la axenidad hasta la fase temprana exponencial de crecimiento y a partir del día 4 aumentó el contenido de bacterias (Figura 23).



Figura 22. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros calcitrans* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c.



Figura 23. Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros calcitrans* mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 µg ml⁻¹, Kanamicina 200 µg ml⁻¹, Neomicina 50 µg ml⁻¹ y Estreptomicina 100 µg ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, p<0.05: a>b>c.

Con los tratamientos de axenización se encontró que los cultivos monoespecíficos de *Chaetoceros* sp. presentó una densidad celular significativamente mayor (p<0.05) en los días del 1 al 2 con el tratamiento 1. En los días del 1 al 7 la densidad celular fue significativamente mayor en el tratamiento control (p<0.05) (Figura 24).

El contenido de bacterias heterotróficas en el cultivo de *Chaetoceros* sp. fue significativamente menor con el tratamiento 1 y 2 (*p*<0.05). A partir de los días 1 al 3 de cultivo de *Chaetoceros* sp. se logró la axenidad

hasta la fase exponencial temprana del crecimiento. A partir del día 4 aumentó progresivamente el contenido bacteriano hasta el día 7 (Figura 25).



Figura 24. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 μ g ml⁻¹, Kanamicina 200 μ g ml⁻¹, Neomicina 50 μ g ml⁻¹ y Estreptomicina 100 μ g ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, *p*<0.05: a>b>c.



Figura 25. Valores promedio y desviación estándar del contenido de bacterias heterotróficas (UFC ml⁻¹) de cultivos de *Chaetoceros* sp. mantenidos en 2 tratamientos durante 7 días. Control experimental: cultivos sin tratamiento, tratamiento 1: coctel de antibióticos (Ampicilina 250 μ g ml⁻¹, Kanamicina 200 μ g ml⁻¹, Neomicina 50 μ g ml⁻¹ y Estreptomicina 100 μ g ml⁻¹), tratamiento 2: concentración doble de coctel de antibióticos del tratamiento 1. Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de una vía, *p*<0.05: a>b>c.

3.2.4 Crecimiento y pigmentos

Para *C. muelleri* la tasa de crecimiento de los cultivos axénicos (0.78 divisiones día⁻¹) fue significativamente mayor (p<0.05) respecto a la obtenida para los cultivos no axénicos (0.65 divisiones día⁻¹) (Tabla 8). Para *C. calcitrans* la tasa de crecimiento de los cultivos axénicos (0.77 divisiones día⁻¹) fue significativamente mayor (p<0.05) a lo evaluado en los cultivos no axénicos (0.61 divisiones día⁻¹) (Tabla 8). Para *Chaetoceros* sp. la tasa de crecimiento de los cultivos axénicos (0.76 divisiones día⁻¹) fue significativamente mayor (p<0.05) respecto a lo obtenido en los cultivos no axénicos (0.75 divisiones día⁻¹) (Tabla 8). La tasa de crecimiento de *Chaetoceros* sp. evaluada en los cultivos axénicos y no axénicos, fueron significativamente mayores (*p*<0.05) respecto a los valores calculados para *C. muelleri* y *C. calcitrans* en las dos condiciones de cultivo (Tabla 8).

Se encontraron valores del contenido de clorofila a (p<0.05) y clorofila c (p<0.05) de C. muelleri significativamente mayores en los cultivos axénicos y no axénicos, respecto a los valores evaluados para C. calcitrans y Chaetoceros sp. (Tabla 8).

El contenido de carotenoides fue significativamente mayor (p<0.05) en el cultivo axénico de *C. muelleri* ⁻¹ (Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio y desviación estándar de tasa de crecimiento (μ), clorofila *a* (fg cell⁻¹), clorofila *c* (fg cell⁻¹) y carotenoides (fg cell⁻¹) de cultivos monoespecíficos de tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en forma axénica (CA) y no axénica (CNA).

		μ	Clorofila a	Clorofila c	Carotenoides	
C. muelleri						
	CA	0.78 ± 0.001 ab	612.66 ± 18.29 a	212.57 ± 1.57 b	204.71 ± 8.46 a	
	CNA	0.65 ± 0.001 ab	680.71 ± 1.44 a	1013.40 ± 72.54 a	69.12 ± 18.91 c	
C. calcitrans						
	CA	0.77 ± 0.001 c	498.94 ± 23.38 bc	208.50 ± 14.16 b	164.10 ± 12.82 b	
	CNA	0.61 ± 0.001 c	448.61 ± 18.22 c	89.47 ± 2.90 c	172.43 ± 13.06 ab	
Chaetoceros sp).					
	CA	0.76 ± 0.001 a	499.54 ± 13.62 bc	129.06 ± 8.52 bc	177.90 ± 7.03 ab	
	CNA	0.75 ± 0.001 a	589.60 ± 90.00 ab	145.56 ± 18.68 bc	182.03 ± 10.60 ab	

Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba de Friedman *p*<0.05: a>b>c.

3.2.5 Fotosíntesis

Los cultivos no axénicos de *C. muelleri* (p<0.05) y *Chaetoceros* sp. (p<0.05) presentaron una eficiencia fotosintética (α) significativamente mayor respecto a los valores evaluados para *Chaetoceros* sp. (Tabla 9; Figura 26).

La tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax) fue significativamente mayor (p<0.05) en el cultivo no axénico de *C. muelleri* (Tabla 9 ; Figura 26).

La irradiancia de saturación lumínica (Ek) no presentó diferencias significativas (*p*>0.05) entre tratamientos para cada una de las especies estudiadas (Tabla 9; Figura 26).

El rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) fue significativamente mayor en los cultivos no axénicos de *C. muelleri* (*p*<0.05) y *Chaetoceros* sp. (*p*<0.05) (Tabla 9; Figura 26).

Tabla 9. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fotosintéticos, eficiencia fotosintética (α), tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax), irradiancia de saturación lumínica (Ek) y rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) de los cultivos de tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en forma axénica (CA) y no axénica (CNA).

Especies		Parámetros fotosintéticos				
		α	ETRmax	Ek	Fv/Fm	
C. muelleri						
	CA	0.01 ± 0.001 bc	17.12 ± 6.88 b	1223.33 ± 367.55 a	0.50 ± 0.01 b	
	CNA	0.04 ± 0.001 a	51.91 ± 7.48 a	1488.24 ± 267.00 a	0.58 ± 0.01 a	
C. calcitrans						
	CA	0.01 ± 0.001 c	22.48 ± 10.60 ab	1818.48 ± 856.15 a	0.36 ± 0.001 c	
	CNA	0.01 ± 0.001 bc	35.71 ± 21.94 ab	2461.84 ± 1463.99 a	0.46 ± 0.03 b	
Chaetoceros sp).					
	CA	0.02 ± 0.001 b	19.76 ± 5.91 b	1030.30 ± 195.39 a	0.48 ± 0.01 b	
	CNA	0.04 ± 0.001 a	44.16 ± 5.53 ab	1261.61 ± 243.21 a	0.57 ± 0.001 a	

Letras diferentes a lado de las cantidades indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA de dos vías y prueba de Friedman *p*<0.05: a>b>c.



Figura 26. Curvas de fotosíntesis en base al transporte relativo de electrones (ETR) e irradiancia (PAR) para los cultivos de tres especies de *Chaetoceros* mantenidos en forma axénica (CA: ▲) y no axénica (CNA: ●)

3.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos

3.3.1 Estandarización de extracción de ADN

Para la obtención del ADN de las muestras de *Chaetoceros*, se realizaron diferentes modificaciones en el protocolo de Qiagen, las principales variaciones se realizaron en el volumen de muestra, homogeneización de la muestra, pretratamiento de lisis celular, tiempo de incubación de Proteinasa K (20 mg ml⁻¹), elución de ADN y volumen de RNasa (Tabla 10).

A partir de las modificaciones realizadas, la mejor calidad, integridad y mayor concentración de ADN se obtuvo con las siguientes condiciones: volumen de muestra de 20 ml, homogenización con PBS 1X (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2.7 mM KCl; pH 7.4), sin pretratamiento de lisis celular, 15 minutos de incubación de Proteinasa K (20 mg ml⁻¹), elución de ADN con Buffer AE en volumen final de 150 μl y adición de 8 μl de volumen de RNasa (30 mg ml⁻¹). Con ello se obtuvo un protocolo de extracción de ADN de *Chaetoceros* (Anexo T).

Modificación de condiciones						
Volumen de muestra	Homogenización de muestra	Pretratamiento de lisis celular	Tiempo de incubación de Proteinasa K	Elución de ADN	Volumen de RNAsa	
100 ml	Medio "f" y centrifugación	Choque térmico con nitrógeno líquido y calor 100°C	20 minutos	Buffer AE volumen final 150 μl	Adicionar 6μl	
50 ml	PBS (Solución tampón fosfato salino y centrifugación)	Choque térmico con nitrógeno líquido y calor 100°C y Homogeneización con FastPrep	15 minutos		Adicionar 8µl	
30 ml		Homogeneización con FastPrep	10 minutos			
20 ml		Sin pretratamiento	Sin incubación			

Tabla 10. Modificaciones de las condiciones establecidas en el protocolo comercial *DNeasy*[®] *Blood y Tissue* para la obtención de un protocolo de extracción de ADN de *Chaetoceros*.

3.3.2 Extracción de ADN

A partir de la extracción de ADN de las muestras de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros* sp. se obtuvieron concentraciones mayores a 50 ng μ l⁻¹. Para los valores de pureza relacionado con la detección de contaminación de proteínas (260/280), todas las muestras se registraron dentro del valor aceptable de 1.8 a 2.2. Por otro lado, sólo el 33 % de las muestras tuvieron valores de pureza aceptados con relación a la identificación de contaminación de fenoles, sales o carbohidratos (Tabla 11).

	Condición		ADN (ng µl⁻¹)	260/280	260/230
Especie	Condición	Id Muestra		(Pureza)	(Pureza)
C. muelleri	Axénico	1. Chm_ca1	65.90	1.95	2.31
		2. Chm_ca2	61.40	2.00	1.47
	No axénico	3. Chm_cna1	67.90	1.92	1.13
		4. Chm_cna2	63.00	2.07	1.49
C. calcitrans	Axénico	5. Chc_ca1	67.50	1.86	1.30
		6. Chc_ca2	59.20	1.98	1.78
	No axénico	7. Chc_cna1	56.80	2.00	1.82
		8. Chc_cna2	53.20	2.20	2.36
Chaetoceros sp.	Axénico	9. Chx1_ca1	58.20	2.02	2.17
		10. Chx1_ca2	63.80	1.98	1.91
	No axénico	11. Chx1_cna1	79.20	2.04	1.48
		12. Chx1_cna2	77.80	2.03	1.49

Tabla 11. Valores de concentración y pureza de ADN de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de tres especies de *Chaetoceros*.

3.3.3 Integridad de banda de ADN

A partir de la evaluación por medio de gel de agarosa, se obtuvieron bandas íntegras de ADN en las 12 muestras descritas en la sección 3.6. Después de la evaluación las muestras se enviaron para su secuenciación (Figura 27).



Figura 27. Integridad de banda de ADN de cultivos monoespecíficos en condición axénica y no axénica de tres especies de *Chaetoceros* visualizado en gel de agarosa al 1.2 % en SB 1X teñidos en gel red. Escalera de peso molecular de 1 Kb (Promega G5711). Cultivos de *Chaetoceros muelleri* axénicos (1 y 2) y no axénicos (3 y 4). Cultivos de *Chaetoceros calcitrans* axénicos (5 y 6) y no axénicos (7 y 8). Cultivos de *Chaetoceros* sp. axénicos (9 y 10) y no axénicos (11 y 12).

4.1 Análisis bioinformático

4.1.1 Calidad y ensamblaje de las secuencias

La evaluación de la calidad de las secuencias es una fase que se requiere para el inicio de un análisis bioinformático correcto, tiene como propósito eliminar lecturas que puedan limitar un estudio posterior. Al realizar la filtración de lecturas de poca calidad se excluyen o se recortan en la posición limitante a la región de baja calidad (Guo *et al.*, 2014; Aguilar y Falquet; 2015; Illumina, 2015).

Una de las herramientas con mayor eficiencia es FASTQ, su objetivo principal es la confirmación de la calidad de la base, así como de la distribución de los nucleótidos. Una de las paqueterías con mayor contribución es FastQC debido a que puede analizar parámetros de calidad como promedio de calidad de base por lectura, identificación de lecturas duplicadas y contenido de GC (Aguilar y Falquet, 2015).

El contenido de GC es un parámetro de calidad importante para la descripción del genoma, el porcentaje que representa varía según la especie. Generalmente el contenido de GC de organismos eucariotas es en promedio de 30 a 40 %, sin embargo, en microalgas se han registrado valores mayores al 40 % (Weiss *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014).

El contenido de GC en diatomeas como *Phaeodactylum tricornutum* es de un promedio de 48.5 % (Scala *et al.*, 2002), esto coincide con los resultados de esta investigación. Las diatomeas tienen un contenido de GC menor que lo reportado en estudios con microalgas verdes, las cuales pueden llegar a tener en promedio hasta 71 % de contenido de GC (Jarvis *et al.*, 1992; Leon-Banares *et al.*, 2004; Misumi *et al.*, 2008).

Se ha reportado que cuando existe desviación estándar de más del 10 % del promedio reportado, existe la posibilidad de una contaminación de las secuencias del genoma (Guo *et al.*, 2104).

El ensamblaje de las lecturas dependerá del organismo objeto de estudio, además, el ensamblaje de genomas de origen eucariótico es más complicado que el de origen procariótico (Baker 2002; Parra *et al.*, 2008).

4.1.2 Analisis funcional

El uso de herramientas bioinformáticas como Blastn, facilita la identificación nucleotídica utilizando bases de datos y con ello relacionar las secuencias registradas en el banco de genes con la secuencia de estudio (Altschul, 1990; Altschul, 1997). Diferentes investigaciones (Sablok *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018) utilizan Blastn como una herramienta principal para la identificación de nucleótidos relacionados a genes mitocondriales y cloroplásticos.

La identificación mayoritaria de contigs relacionadas a organismos procariontes podría tener origen en la coevolución entre miroalgas y bacterias, en la cual existe una transferencia de genes originada por transducción de señales entre organismos cercanos. Este intercambio de información biológica se origina en la ficosfera, funcionando como intermediario entre estos dos grupos de organismos. Debido a esta interacción, existen genes de las microalgas que se origina a partir de bacterias (Soucy *et al.*, 2015; Ramanan *et al.*, 2016).

Debido a la gran cantidad de bacterias relacionadas a las microalgas, se ha implementado el uso de cultivos axénicos para la obtención de muestras de ADN y analizar por medio de herramientas bioinformáticas para la conformación de genomas de microalgas con potencial acuícola y biotecnológico (Schönknecht *et al.*, 2013, Amin *et* al., 2015; Vu *et al.*, 2018).

4.1.3 Conformación y anotación de genomas mitocondriales

Los genomas mitocondriales tienen variaciones en su estructura nucleotídica y tamaño, por lo tanto, son diferentes entre diferentes organismos, así como entre mismas especies (Bullerwell y Gray, 2004). Principalmente existen diferencias entre los genomas de animales y plantas, estos últimos regularmente presentan un tamaño mayor (Kubo y Newton, 2008).

La presencia de tRNA en cada uno de los genomas de las tres especies, es suficiente para el requerimiento de la traducción. Sin embargo, en los genomas descritos para esta investigación, se encontró la ausencia de tRNA-Thr, esta es una característica recurrente entre organismos heterocontes (Ravin *et al.*, 2010).

Existen variaciones en el tamaño del genoma mitocondrial de diferentes especies del grupo de diatomeas. *T. pseudonana* esta descrito con un tamaño de 43,827 pb, *P. tricornutum* con 77,356 pb y *S. acus* con 46,657 pb. Se ha considerado un rango promedio de tamaño de genoma mitocondrial en algas pardas el cual oscila entre 31,617 – 39,059 pb, coincidiendo con lo descrito para las tres especies de *Chaetoceros*.

Los genomas mitocondriales de *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. tienen un tamaño y estructura nucleotídica similar a la descrita para *Berkeleya fennica* (Figura 28) (An *et al.*, 2016). Sin embargo, la relación taxónomica es lejana, pero, debido a la falta de información genética del género *Chaetoceros*, se encontró a *Berkeleya fennica* como la especie con mayor coincidencia en su genoma mitocondrial.



Figura 28. Comparación de la estructura nucleótidica (CDS, tRNA y rRNA) de los genomas mitocondriales de *C. mulleri* (CHM), *C. calcitrans* (CHC) y *Chaetoceros* sp. (CHX) con respecto al genoma mitocondrial de B. fennica (BEF)

4.1.4 Conformación y anotación de genomas del cloroplasto

La identificación y conformaciónd de genomas del cloroplasto es esencial debido a la importancia del organelo con relación a la producción de energía de lor organismos fotosínteticos. El genoma cloroplástico generalmente es descrito en forma circular y representados en un tamaño desde 115,000 a 165,000 pb (Jansen *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2018).

Se ha descrito que los genomas cloroplásticos codifican para un promedio de 130 genes, su secuencia y orden presentan una conservación, sin embargo, también se han registrado mutaciones en la estructura de sus genes (Ingvarsson *et al.* al., 2003, Lee *et al.*, 2007; Jansen y Ruhlman, 2012).

En diatomeas se ha registrado una susceptibilidad en el genoma cloroplástico respecto a la transferencia horizontal de genes, el plásmido puede funcionar como un vector de material genético entre cloroplasto de diferentes organismos (Brembu *et al.*, 2014).

Se han descrito diferentes tamaños para distintas especies de diatomeas, entre los cuales se destacan *T*. *pseudonana* con un tamaño de 128, 814 pb, *P. tricornutum* con 117,369 pb, *D. baltica* con 116,470 pb entre otros organismos.

El genoma del cloroplasto de las especies de *Chaetoceros* presentan similitudes en la estructura nucleotídica (Figura 29 y 30) así como en el tamaño del genoma de *Chaetoceros simplex* esto podría estar relacionado con la cercanía taxónomica de estas especies.


Figura 29. Comparación de la estructura nucleótidica (tRNA y rRNA) de los genomas del cloroplasto de *C. mulleri* (CHM), *C. calcitrans* (CHC) y *Chaetoceros* sp. (CHX) con respecto al genoma mitocondrial de *C. simplex* (CHS).



Figura 30. Comparación de la estructura nucleótidica (CDS) de los genomas del cloroplasto de *C. mulleri* (CHM), *C. calcitrans* (CHC) y *Chaetoceros* sp. (CHX) con respecto al genoma mitocondrial de *C. simplex* (CHS).

4.1.5 Marcadores moleculares y análisis filogenético

El gen COI tiene como a característica principal una alta tasa de sustitución, es decir, que se presenta en alta variación de la secuencia entre especies de un mismo género (Hebert *et al.*, 2003).

Este marcador molecular contribuye exitosamente en la relación filogenética de grupos de animales, debido a su amplia variación interespecífica (Hebert *et al.*, 2003; Paz *et al.*, 2011).

Por otro lado, el uso de este marcador no ha sido recomendable para plantas y hongos debido a que su tasa de sustitución en su región COI es muy baja comparada a la de los animales (Cowan *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas regiones COI han agrupado especies de algunos géneros dentro de diatomeas, aunque también es necesario desarrollar más cebadores para la viabilidad de un sistema universal de este grupo de *Bacillariophyta* (Evans *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2015).

El marcador rbcL es un gen cloroplástico, existe como factor común entre los organismos fotosintéticos y a partir de su relación determinar similitudes y diferencias filogenéticas (Freeman, 2008). Debido a que es un gen conservado no permite la agrupación de todas las diatomeas, sin embargo, puede diferenciar a taxones inferiores (MacGillivary y Kaczmarska, 2011).

El gen 18S es una subunidad del ARN ribosomal que se utiliza frecuentemente en la filogenina. Generalmente se usan distintos fragmentos, tal es el caso de la región V4, esta región es de fácil amplificación con algunos cebadores universales con el uso de protocolos estándar de laboratorio y teniendo así una ventaja de resolución de taxa a nivel de especie. Sin embargo, el potencial de este fragmento debe seguir evaluándose para poder considerarlo un discriminante de especies crípticas (Zimmermann *et al.*, 2011).

Otra de las ventajas de esta secuencia es su alto grado de estudio, lo que hace que tenga una alta representación en la base de datos teniendo así una alta tasa de recuperación para una correcta identificación.

Debido a que en estudios previos ha demostrado una variación suficiente para una identificación prácticamente exacta a distintos taxones 18S es un marcador óptimo para diatomeas (Evans *et al.*, 2007). Se pudo relacionar a *Chaetoceros* sp. con *Chaetoceros gracilis*, solamente con el gen 18S por que no se encontraron mas secuencias de *Chaetoceros gracilis* en el banco de genes, sin embargo, la identidad de esta especie debe ser corroborada con métodos morfológicos y genéticos.

4.1.6 Identificación de grupos bacterianos

Se ha demostrado que existe una relación endosimbiótica entre cianobacterias, algas bacterias y protistas (Prechtl *et al.*, 2004; Tomitani *et al.*, 2006; Decker y Holde, 2011). Generalmente, en diatomeas la interacción de las bacterias con la microalga ocurre en la ficosfera, es decir, en la capa limitante que se encuentra alrededor de las células microalgales. El aislamiento de bacterias que contribuyen en el crecimiento fotoautotrófico en especies como *T. pseudonana* o *P. tricornutum* producen proteobacterias α , además de Bacteroidetes. Por otro lado, existe influencia de bacterias del género Bacillus en diatomeas marinas, aumentando su crecimiento. La interacción bacteriana en las diatomeas es una característica particular ecológicamente importante, sobre todo en bacterias marinas heterotróficas (Zecher *et al.*, 2015).

Se han reportado que los seis filos más comúnmente identificados en diatomeas son, Firmicutes, Bacteroidetes Proteobacterias, éstos dos últimos predominan, específicamente alfa-proteobacterias y proteobacterias gamma (Amin *et al.*, 2012; Cooper y Smith, 2015).

4.2 Cultivo de microalgas

4.2.1 Caracterización del crecimiento de los cultivos

Con el propósito de conocer la dinámica de crecimiento de las especies de *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. se evaluó la concentración de células y el contenido de bacterias heterotróficas de los cultivos monoespecíficos. La concentración de células de los cultivos de *C. muelleri* fue menor respecto a lo reportado para esta especie en diversos trabajos (López-Elías *et al.*, 2005, Pacheco-Vega *et al.*, 2009, Orozco-Borbón *et al.*, 2014), estas diferencias son debidas a las distintas condiciones y volumen de cultivo utilizadas. El crecimiento de diversas especies de microalgas depende de la magnitud de parámetros ambientales como la temperatura, el pH, la irradiancia, la cantidad y el tipo de nutrientes, las características del sistema de cultivo, la cantidad de inóculo y las características fisiológicas de cada especie (Huang *et al.*, 2017; Nwoba *et al.*, 2019). Para *C. muelleri*, se encontró que la duración de la fase exponencial del cultivo fue de tres días, y que resultó similar a lo descrito para la misma especie en cultivos mantenidos en matraz Erlenmeyer con volúmenes de 100 ml, pero con medio "f/2" (Medina-Reyna y Cordero Esquivel, 1998).

En los cultivos de *C. calcitrans* se evaluó que la tasa de crecimiento fue mayor que lo reportado por Phatarpekar *et al.* (2000). Mientras que para *C. calcitrans* la densidad celular fue en valores similares a lo descrito para la misma especie por Villa *et al.* (2014). Para *C. calcitrans* se ha descrito un contenido de bacterias heterotróficas de alrededor de 10⁴ a 10⁷ UFC ml⁻¹ en producción de cultivos mantenidos en Puerto Peñasco, Sonora, México (Lizárraga-Partida *et al.*, 1997).

La fase exponencial de crecimiento en *Chaetoceros* sp. coincide con lo reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006) teniendo una duración de cuatro días, alcanzando la fase estacionaria después de ocho días de cultivo. Sin embargo, se encontró que la concentración de células de *Chaetoceros* sp. fue 30 % inferior a lo descrito por Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006) quienes usaron una irradiancia de luz blanca 60 % superior a lo utilizado en este trabajo.

El contenido de bacterias heterotróficas en los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros* presentó una tendencia proporcional al incremento de la concentración de células. Se ha descrito que en cultivos de *C. muelleri* la densidad de la población bacteriana, se produce directamente proporcional al incremento en la concentración de células respecto al tiempo de cultivo. Además, a medida que aumenta el volumen del cultivo, se incrementa de forma proporcional el contenido bacteriano (Orozco-Borbón *et al.*, 2014).

4.2.2 Pruebas de axenidad

La existencia de la interacción de especies de bacterias-microalgas en distintos cuerpos de agua es evidente, sin embargo, los estudios que expliquen a profundidad la relación entre estos grupos de organismos aún son muy escasos. Además, se sabe que, en este tipo de asociación, bacteria-microalga, interfieren distintos mecanismos que van desde la producción de compuestos que inhiben o llegan a estimular el crecimiento de las especies de microalgas. Este tipo de relaciones interespecíficas entre especies de bacterias-microalgas, se ha visto que en muchos casos dependerá del mutualismo (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). El control de crecimiento tanto bacteriano como microalgal afecta el crecimiento, composición, producción de metabolitos y puede resultar con grandes beneficios biotecnológicos (Réveillon *et al.*, 2016).

Los antibióticos sulfametoxazol, eritromicina, claritromicina, ciprofloxacina son antibióticos generalmente utilizados en la medicina humana, los cuales se han implementado con éxito como tratamiento para la obtención de cultivos axénicos de microalgas. Sin embargo, ha resultado contraproducente el uso de los cuatro antibióticos antes mencionados ya que afecta negativamente el crecimiento microalgal (Aderemi *et al.*, 2018)

En este estudio, se obtuvo un menor contenido de bacterias heterotróficas en los cultivos monoespecíficos de *Chaetoceros* a partir de la aplicación del coctel de antibióticos (tratamiento 4: Ampicilina 250 μ g ml⁻¹, Kanamicina 200 μ g ml⁻¹, Neomicina 50 μ g ml⁻¹ y Estreptomicina 100 μ g ml⁻¹). Lo anterior, es debido a la interacción entre los antibióticos usados y a los mecanismo de acción de cada antibiótico, dando como resultado la obtención de bajas concentraciones de bacterias y sin daño aparente a las células de las microalga (Molina-Cárdenas *et al.*, 2016).

El uso de lavados por centrifugación, así como la aplicación de antibióticos de manera individual se ha reportado como un tratamiento poco efectivo para lograr cultivos axénicos en cultivos de varias especies de microalgas (Wilkens *et al.*, 2012). La ventaja del uso de lavados por centrifugación es que disminuye por muy corto tiempo la carga bacteriana de los cultivos de microalgas. Se menciona que la implementación del uso de distintos antibióticos debe ser específico para cada especie de microalga y que esto es debido a la comunidad bacteriana característica para cada especie de microalga (Bruckner y Kroth, 2009).

4.2.3 Ensayos de axenidad

De acuerdo con los resultados obtenidos con las tres especies de *Chaetoceros* y con el uso del coctel de antibióticos en las dos concentraciones diferentes, se encontró disminución del contenido de bacterias heterotróficas (a niveles no detectables por 4 días) y resultó en un menor crecimiento de las células de las tres especies de diatomeas que recibieron los antibióticos en mayor concentración. El uso de antibióticos debe ser estricto y cuidadoso debido a que puede incrementar la resistencia en las poblaciones de algunas bacterias, además, puede llegar a afectar a la membrana celular y con ello inhibir el crecimiento microalgal, dando como resultados cultivos axénicos con densidades celulares promedio de 106 células ml⁻¹ (Molina-Cárdenas *et al.*, 2016, González-Pleiter *et al.*, 2013, Berges *et al.*, 2001).

Las clorotetraciclinas y oxitetraciclinas pertenecen a las tetraciclinas son usadas como antibióticos para el control de bacterias Gram + y Gram -, micoplama y virus en la industria ganadera de cerdos. Este

antibiótico actúa en la inhibición de la síntesis de proteínas y evita la asociación de aminoacil-t RNA y el ribosoma de las bacterias. La enrofloxacina es una quinolona de amplio espectro que es ampliamente usado para el control de microorganismos (Guo y Chen, 2002). En microalgas el principal enfoque que se ha dado a los estudios relacionados con el uso de antibióticos están asociados a ß-lactamicos (ampicilia, penicilina, clorotetraciclina, oxytetraciclina), quinolonas (norfloxacina, ciprofloxaxina, enrofloxaxina) y macrólidos (eritromicina). Se ha encontrado que el uso de antibióticos para el control del crecimiento de bacterias en cultivos de microalgas y proporcionados de forma individual, en mezcla binaria o en coctel produce un efecto inhibitorio de diversas especies de bacterias. Sin embargo, el uso de los antibióticos es más efectivo en coctel y hay una relación entre la concentración, la duración del tratamiento y los factores ambientales como la temperatura y la luz (Carusso *et al.*, 2018; Rico *et al.*, 2018).

4.2.4 Crecimiento y pigmentos de cultivos axénicos y no axénicos

Las tasas de crecimiento obtenidas en los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros* en condiciones axénicas y no axénicas, no presentaron diferencias significativas, indicando que no hay un efecto negativo de los antibióticos en el crecimiento celular, como se ha reportado para algunas especies de microalgas en otros estudios (Liu *et al.*, 2012).

La producción de clorofila a en *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. no presentó diferencias significativas entre los cultivos axénicos y no axénicos, por lo que se sugiere que no hay un efecto negativo proveniente de la aplicación de antibióticos como método de axenización para las tres especies de *Chaetoceros* estudiadas.

La síntesis de clorofila c presentó diferencias entre especies y si provenían de cultivos axénicos o no axénicos, para *C. muelleri* se encontró una influencia negativa del coctel de antibióticos en la producción de clorofila *c*. Por el contrario, en *C. calcitrans* existe una mayor concentración de clorofila *c* al exponer al cultivo al coctel de antibióticos. Por otro lado, para los cultivos de *Chaetoceros* sp. no hay diferencia en la producción de clorofila *c* con respecto a condiciones axénicas y no axénicas. El contenido de carotenoides en *C. muelleri* fue mayor en cultivos en condiciones axénicas, indicando una atribución positiva de los antibióticos. Sin embargo, para los cultivos de *C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. la producción de carotenoides es igual con el uso o no del coctel de antibióticos.

La influencia de los antibióticos en la producción de componentes como la clorofila y los carotenoides es muy variante, esto dependerá de la selección y concentración de los antibióticos, así como de la especie de microalga debido a la especificidad y susceptibilidad característica de cada especie de microalga y de las características de las poblaciones de bacterias asociadas (Halfhide *et al.*, 2014). Lo anterior muestra que el coctel de antibióticos usado para las tres especies de *Chaetoceros*, tiene un efecto particular para cada especie y que afecta a la comunidad de bacterias asociadas y que produce cambios en la síntesis de pigmentos de forma específica.

4.2.5 Fotosíntesis

A partir de la evaluación de los parámetros fotosintéticos de los cultivos de *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. en condiciones axénicas y no axénicas, se presentó un menor rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) en cultivos axénicos, indicando una afectación por estrés proveniente de la aplicación de antibióticos a los cultivos. Además, la eficiencia fotosintética (α) y tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax) mostraron valores menores en condiciones axénicas. Esto se debe al mecanismo de acción de los antibióticos utilizados, ya que los aminoglucósidos actuando sobre los ribosomas afectando al cloroplasto y con ello a sus subcomponentes como lo son los fotosistemas (McFadden y Roos, 1999; González-Pleiter *et al.*, 2013; Seoane *et al.*, 2014).

4.3 Protocolo de extracción de ADN de cultivos axénicos y no axénicos

4.3.1 Estandarización de extracción de ADN

Debido a la complejidad en la estructura de la pared celular dada por su composición con moléculas como las glucoproteínas o alto contenido de sílice de las microalgas, es necesario realizar estandarizaciones para obtener el mejor protocolo de extracción de ADN y con ello conseguir un ADN de mayor concentración e integridad (Eland *et al.*, 2012).

Se ha mencionado que existen tres kits de extracción con resultados óptimos de extracción, los cuales son kit Qiagen Blood and Tissue (QBT), el kit Qiagen Plant Mini (QPM) y el kit MoBio de aislamiento de ADN

del suelo Ultra Clean (UC) (Simonelli *et al.*, 2009). A partir del uso del kit "Qiagen Blood and Tissue" (QBT) se han realizado diversas investigaciones en las cuales se requiere de extracción de calidad para la aportación de más información en la genómica de microalgas (Maloy *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Ghosh y Love, 2011). Además, este kit es práctico debido a la simplicidad de su metodología, requiriendo de menor cantidad de equipos de laboratorio, así como de un pretratamiento de lisis celular complejo (Nejstgaard *et al.*, 2008; Eland *et al.*, 2012).

4.3.2 Extracción de ADN

El uso del kit Qiagen Blood and Tissue (QBT) permite la obtención de mayor concentración de ADN con respecto al uso de otros kits. La eficiencia de este método podría ser principalmente por el pretratamiento de la muestra, es decir, la técnica de lisis celular (Eland *et al.*, 2012). Para la evaluación de la concentración y calidad de la muestra de ADN se utilizan principalmente técnicas basadas en la espectrofotometría. Se manejan dos longitudes de absorbancia, 260/280 y 260/230. La relación 260/230, permite identificar químicos residuales de la extracción como el tiocinato de guanidina y biomoléculas como los carbohidratos, estos últimos con mayor presencia en microalgas (Sambrock *et* al., 2001; Maloy *et al.*, 2009).

- Se logró la identificación de grupos taxonómicos de las secuencias nucleotídicas (blastn) de los contigs relacionados con procariotas y eucariotas de las tres especies de *Chaetoceros*.
- Se conformaron y anotaron los genomas mitocondriales de cada una de las tres especies de *Chaetoceros*. Para *C. muelleri* y *C. calcitrans* se obtuvo un genoma mitocondrial (GM) de 36,059 pb. Para *Chaetoceros* sp. se obtuvo un tamaño de GM de 39,733 pb.
- Se anotaron los genomas del cloroplasto de las tres especies de *Chaetoceros*. Para C. *muelleri* se obtuvo un genoma del cloroplasto (GP) de 116,284 pb. Para *C. calcitrans* se obtuvo GP de 116,556 pb. Para *Chaetoceros* sp. se obtuvo un GP de 116,176 pb.
- Se identificaron los marcadores moleculares COI, rbcL, psbA y 18S para la realización de los análisis filogenéticos, con lo que se pudo relacionar a *Chaetoceros* sp. con *Chaetoceros gracilis*. La identidad de *Chaetoceros* sp. debe ser corroborada con métodos morfológicos y genéticos.
- Se identificaron los grupos bacterianos asociados a los cultivos de las tres especies de *Chaetoceros*.
 Se observó una mayor similitud entre los grupos bacterianos encontrados en *C. muelleri* y *C. calcitrans* que con *Chaetoceros* sp.
- Existe un incremento proporcional en la densidad de células de las tres especies de *Chaetoceros*. con respecto al contenido de bacterias heterotróficas.
- Las dos concentraciones de las mezclas de antibióticos utilizados permiten la axenidad de las tres especies de *Chaetoceros* durante cuatro días.
- En *C. muelleri* se evaluó el mayor contenido de clorofila *c* en los cultivos no axénicos, mientras que el mayor contenido de carotenoides fue en los cultivos axénicos.
- La eficiencia fotosintética (α), la tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax) y rendimiento fotosintético máximo (Fv/Fm) fueron mayores en los cultivos no axénicos. La irradiancia de saturación lumínica (Ek) fue similar entre cultivos axénicos y no axénicos.
- Se estableció un protocolo exitoso de extracción de ADN para las tres especies de Chaetoceros.

- Realizar el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de los cultivos de *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. en condiciones axénicas y no axénicas.
- Evaluar la composición proximal de los cultivos de *C. muelleri, C. calcitrans* y *Chaetoceros* sp. en condiciones axénicas y no axénicas.
- Incluir más marcadores moleculares en el estudio filogenético.
- Realizar análisis metagenómico de las bacterias asociadas en los cultivos de *C. muelleri, Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros* sp. en condiciones axénicas y no axénicas.

- Aderemi, A.O., Novais, S.C., Lemos, M.F., Alves, L.M., Hunter, C., Pahl, O. 2018. Oxidative stress responses and cellular energy allocation changes in microalgae following exposure to widely used human antibiotics. Aquatic Toxicology. 203, 130–139.
- Aguilar-Bultet, L., Falquet, L. 2015. Secuenciación y ensamblaje *de novo* de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. Revista de Salud Animal, 37(2), 125-132.
- Altschul, S.F. T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman. 1997. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17):3389–3402.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology Research, 215(1), 403-410.
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., Ingalls, A. E. 2015. Interaction and signaling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. Nature, 522(7554), 98.
- Amin, S. A., Parker, M. S., Armbrust, E. V. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76(3), 667-684.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Biology, 50(1), 601-639.
- Baker, M. 2012. De novo genome assembly: what every biologist should know. Nature Methods, 9(1), 333-337.
- Bruckner, C. G., Kroth, P. G. 2009. Protocols for the removal of bacteria from freshwater benthic diatom cultures. Journal of Phycology, 45(4), 981-986.
- Carusso, S., Juárez, A. B., Moretton, J., Magdaleno, A. 2018. Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green alga species. Chemosphere, 194, 821-827.
- Cowan, R.S., Chase, M.W., Kress, W.J., y Savolainen, V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. Taxon, *55*(3), 611-616.
- Decker, H., van Holde, K. E. 2011. Aerobic Metabolism: Benefits from an Oxygenated World. En: Oxygen and the Evolution of Life (pp. 61-77). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Eland, L. E., Davenport, R., Mota, C. R. 2012. Evaluation of DNA extraction methods for freshwater eukaryotic microalgae. Water Research, 46(16), 5355-5364.

- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G. 2007. An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). Protist, *158*(3), 349-364.
- Fang, L., Leliaert, F., Novis, P. M., Zhang, Z., Zhu, H., Liu, G., Zhong, B. 2018. Improving phylogenetic inference of core Chlorophyta using chloroplast sequences with strong phylogenetic signals and heterogeneous models. Molecular Phylogenetics and Evolution, 127, 248-255.
- Freeman, S., Sharp, J.C., Harrington, M. 2002. Biological Science (Vol. 1). Upper Saddle River, NJ. Prentice Hall, USA. 228-235 pp.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Fernández-Piñas,
 F. 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. Water Research, 47(6), 2050-2064.
- 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 discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(4), 1369-1380.
- Guo, R. X., Chen, J.Q. 2012. Phytoplankton toxicity of the antibiotic chlortetracycline and its UV light degradation products. Chemosphere, 87(11), 1254-1259.
- Guo, Y., Ye, F., Sheng, Q., Clark, T., Samuels, D. 2014. Three-stage quality control strategies for DNA resequencing data. Briefings in Bioinformatics, 15(6), 879–889.
- Halfhide, T., Åkerstrøm, A., Lekang, O. I., Gislerød, H. R., Ergas, S. J. 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. Algal Research, 6, 152-159.
- Hebert, P.D.N, Stoeckle, M.Y, Zemlak, T.S, Francis, C.M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLOS Biology, 2 (10), e312.
- Hernández-Pérez, A., Labbé, J.I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 49(2), 157-173.
- Huang, J., Hankamer, B., Yarnold, J. 2019. Design scenarios of outdoor arrayed cylindrical photobioreactors for microalgae cultivation considering solar radiation and temperature. Algal Research, 41, 101515.
- Illumina. 2015. An introduction to next-generation sequencing technology. Consultado el 18 de septiembre de 2019, de: <u>http://www.ilumina.con/technology/next-generation-sequencing.html</u>
- Jarvis, E. E., Dunahay, T. G., Brown, L. M. 1992. DNA nucleoside composition and methylation in several species of microalgae. Journal of Phycology, 28 (1), 356–62.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547-1549.
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A., Fernández, E. 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. Trends in Biotechnology, 22(1), 45-52.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P. 2012. Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. Plant Physiology and Biochemistry, 60, 165-170.
- Lizárraga-Partida, M. L., Montoya-Rodríguez, L., Gendrop-Funes, V., 1997. The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. Ciencias Marinas. 23, 129–140.
- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Enríquez-Ocaña, F., Gallegos-Simental, G. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a Mexican commercial hatchery. Aquacultural Engineering, 33(3), 181-191.
- López-Figueroa, F.D. 2018. Curso de fotobiología y biotecnología de algas y cianobacterias: Aplicaciones Cosmeceúticas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California. 29 de Octubre al 2 de Noviembre.
- MacGillivary, M.L. y Kaczmarska, I. 2011. Survey of the efficacy of a short fragment of the rbcL gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. J Eukaryot Microbiology 58, 529–536.
- Mayfield, S. P., Yohn, C. B., Cohen, A., Danon, A. 1995. Regulation of chloroplast gene expression. Annual Review of Plant Biology, 46(1), 147-166.
- Medina-Reyna, C. E., Cordero-Esquivel, B. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* (Lemerman), mantenida en cultivo estático con un medio comercial. Ciencia y Mar, 6, 19-26.
- Misumi, O., Yoshida, Y., Nishida, K., Fujiwara, T., Sakajiri, T., Hirooka, S., Kuroiwa, T. 2008. Genome analysis and its significance in four unicellular algae, *Cyanidioshyzon merolae*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Thalassiosira pseudonana*. Journal of Plant Research, 121(1), 3-17.
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A. F. 2016. Decreasing of bacterial content in *Isochrysis galbana* cultures by using some antibiotics. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 51(1), 101-112.
- Nwoba, E. G., Parlevliet, D. A., Laird, D. W., Alameh, K., Moheimani, N. R. 2019. Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. Algal Research, 39, 101433.
- Orozco-Borbón, M. V., Valenzuela-Espinoza, E., García-López, J. C. 2014. Simultaneous Growth of *Chaetoceros muelleri* and Bacteria in Batch Cultures. Advances in Microbiology, 4(15), 1025.

- Pacheco-Vega, J. M., Sánchez-Saavedra, M. D. P. 2009. The biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an agricultural fertilizer. Journal of the World Aquaculture Society, 40(4), 556-560.
- Parra, G., Bradnam, K., Ning, Z., Keane, T., Korf, I. 2008. Assessing the gene space in draft genomes. Nucleic Acids Research, 37(1), 289-297.
- Paz, A., González, M., Crawford, A.J. 2011. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. Acta Biológica Colombiana, *16*(3), 161-176.
- Phatarpekar, P. V., Sreepada, R. A., Pednekar, C., Achuthankutty, C. T. 2000. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. Aquaculture, 181(1-2), 141-155.
- Prechtl, J., Kneip, C., Lockhart, P., Wenderoth, K., Maier, U. G. 2004. Intracellular spheroid bodies of Rhopalodia gibba have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin. Molecular Biology and Evolution, 21(8), 1477-1481.
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. 2016. Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. Biotechnology Advances, 34(1), 14-29.
- Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016. Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricornutum, Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and, *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. Harmful Algae 58, 45–50.
- Rico, A., Zhao, W., Gillissen, F., Lürling, M., Van den Brink, P.J. 2018. Effects of temperature, genetic variation and species competition on the sensitivity of algae populations to the antibiotic enrofloxacin. Ecotoxicology and Environmental Safety, 148, 228-236.
- S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17):3389–3402.
- S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology Research, 215(1), 403-410.
- Sánchez-Saavedra, M. D. P., Voltolina, D. 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. Aquacultural Engineering, 35(2), 161-165.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Schönknecht, G., Chen, W. H., Ternes, C. M., Barbier, G. G., Shrestha, R. P., Stanke, M., Carr, K. 2013. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. Science, 339(6124), 1207-1210.

- Simonelli, P., Troedsson, C., Nejstgaard, J. C., Zech, K., Larsen, J. B., Frischer, M. E. 2009. Evaluation of DNA extraction and handling procedures for PCR-based copepod feeding studies. Journal of Plankton Research, 31(12), 1465-1474.
- Soucy, S. M., Huang, J., Gogarten, J. P. 2015. Horizontal gene transfer: building the web of life. Nature Reviews Genetics, 16(8), 472.
- Su, Y., Huang, L., Wang, Z., Wang, T. 2018. Comparative chloroplast genomics between the invasive weed Mikania micrantha and its indigenous congener Mikania cordata: Structure variation, identification of highly divergent regions, divergence time estimation, and phylogenetic analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution, 126, 181-195.
- Tillich M., P. Lehwark, T. Pellizzer, E.S. Ulbricht-Jones, A. Fischer, R. Bock, S. Greiner. 2017. GeSeq versatile and accurate annotation of organelle genomes. Nucleic Acids Research 45: W6-W11
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M., Ohno, T. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(14), 5442-5447.
- Trujillo-Valle, M.L. 1993. La colección de microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura. CICESE 103 pp.
- Villa, A., Herazo, D., Torregroza, A. C. 2014. Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon c-cal) en cultivos estáticos. Intropica, 111-117.
- Vinogradov, A. E. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 31(2), 100-109.
- Vu, C. H. T., Lee, H. G., Chang, Y. K., Oh, H. M. 2018. Axenic cultures for microalgal biotechnology: establishment, assessment, maintenance, and applications. Biotechnology Advances, 36(2), 380-396.
- Weiss, T. L., Spencer Johnston, J., Fujisawa, K., Sumimoto, K., Okada, S., Chappell, J., Devarenne, T. P. 2010.
 Phylogenetic placement, genome size, and GC content of the liquid-hidrocarboproducing green microalga *Botryococcus braunii* strain Berkeley (showa) (Chlorophyta) 1. Journal of Phycology, 46(3), 534-540.
- Wilkens, S. L., Maas, E. W. 2012. Development of a novel technique for axenic isolation and culture of thraustochytrids from New Zealand marine environments. Journal of Applied Microbiology, 112(2), 346-352.
- Zecher, K., Jagmann, N., Seemann, P., Philipp, B., 2015. An efficient screening method for the isolation of heterotrophic bacteria influencing growth of diatoms under photoautotrophic conditions. Journal of Microbiological Methods, 119(1), 154–162.

Zhu, H., Pan, I., Zhang, D. 2011. Effects of chloramphenicol on pigmentation, proline accumulation and chlorophyll fluorescence of maize (*Zea mays*) seedlings. International Journal of Agriculture and Biology, 13(5).

		C	. muell	eri			C.	. calcitro	ans			Cha	etocero	os sp.		
Gen	Loc.	Long. (pb)	Sentido	Inicio codón	Paro codón	Loc.	Long. (pb)	Sentido	Inicio codón	Paro codón	Loc.	Long. (pb)	Sentido	Inicio codón	Paro codón	
cox1	1-1395	1395	+	TCA	ТСТ	1-1395	1395	+	TCA	тст	1 - 1407	1407	+	TTA	TCA	
nad9	1709- 2143	435	+	GTT	GAA	1709- 2143	435	+	GTT	GAA	1621- 2070	450	+	AAT	GAA	
trnQ-UUG	2167- 2240	74	+			2167- 2240	74	+			2097- 2168	72	+			
trnV-UAC	2249- 2321	73	+			2249- 2321	73	+			2174- 2248	75	+			
nad5	2382- 4061	1806	+	AAT	GGG	2382- 4061	1806	+	AAT	GGG	2382- 4061	1680	+	AAT	GGG	
trnR-UCU	Ν	Ν	N			Ν	Ν	Ν			4305- 4380	76	+			
Orf51- fragment	Ν	Ν	N			Ν	Ν	Ν			4321- 4363	43	-	TTG	TCG	
cox3	4462- 5259	798	+	TAA	GTG	4462- 5259	798	+	ΤΑΑ	GTG	4523- 5317	795	+	GAA	TGG	
trnL-UAG	5290- 5373	84	+	ACC	GTA	5290- 5373	84	+	ACC	GTA	5410- 5493	84	+			

 Tabla 12. Tabla comparativa de la localización de los genes mitocondriales de las tres especies de Chaetoceros.

nad11	6314- 7612	1299	+	TTT	ΤΑΑ	6314- 7612	1299	+	TTT	ΤΑΑ	7148- 7720	573	-	ΑΤΑ	ΤΑΑ
trnD-GUC	7725- 7801	77	+			7725- 7801	77	+			7837- 7912	76	+		
nad4L	7886- 8116	231	-	GCT	TTA	7886- 8116	231	-	GCT	TTA	7993- 8220	228	-	AGC	ТАТ
trnK-UUU	8145- 8216	72	-			8145- 8216	72	-			8246- 8319	74	-		
atp9	8410- 8637	228	-	TTA	CAT	8410- 8637	228	-	TTA	CAT	8349- 8576	228	-	TTA	CAT
rpl16	8807- 9187	381	-	TTA	ттт	8807- 9187	381	-	TTA	ттт	8709- 9032	324	-	TCA	AAG
rps3	9245- 9427	183	-	TTC	AGA	9245- 9427	183	-	TTC	AGA	Ν	Ν	N	Ν	Ν
rps19	Ν	Ν	N	N	Ν	Ν	Ν	N	Ν	Ν	9996- 10058	63	-	TTT	ATA
rpl2	10493- 11215	723	-	TCA	CAT	10493- 11215	723	-	ТСА	CAT	10344- 11066	723	-	ACC	CAT
rps11	11871- 12039	169	+	AGA	AAA	11871- 12039	169	+	AGA	AAA	11727- 11810	84	+	TGA	CAT
trnY-GUA	11872- 11955	84	+			11872- 11955	84	+			11728- 11810	83	+		
trnP-UGG	11963- 12038	76	+			11963- 12038	76	+			11824- 11899	76	+		
trnM-	12534- 12605	72	-			12534- 12605	72	-			12390- 12461	72	+		

trnW-CCA	Ν	Ν	Ν			1283- 12905	73	-			Ν	Ν	Ν		
nad1	13650- 14621	963	-	TTA	TAG	13650- 14621	963	-	TTA	TAG	13426- 14388	963	-	TAA	TTA
trnC-GCA	14701- 14772	72	-			14701- 14772	72	-			14424- 14495	72	-		
trnS-UGA	14786- 14870	85	-			14786- 14870	85	-			14511- 14597	87	-		
trnG-GCC	14893- 14965	73	-			14892- 14966	75	-			14602- 14676	75	-		
rpl5	14996- 15103	108	-	ΤΑΑ	AAT	14996- 15103	108	-	ΤΑΑ	AAT	ND	ND	ND	ND	ND
rpl14	15530- 15910	381	-	TTA	CAT	15530- 15910	381	-	TTA	CAT	15249- 15620	372	-	ACC	CAT
trnR-UCG	15924- 15999	76	+			15924- 15999	76	+			15646- 15719	74	-		
rps12	16468- 16827	360	-	TTT	CAT	15530- 15910	381	-	TTA	CAT	16160- 16546	387	-	TCA	TAT
trnL-UAA	17620- 17705	86	-			17620- 17705	86	-			17316- 17400	85	-		
trnA-UGC	17976- 18050	75	+			17976- 18050	75	+			17670- 17742	73	+		
trnN-GUU	18055- 18128	74	-			18055- 18128	74	-			17766- 17837	72	+		
rps4	18237- 18495	259	-	СТТ	AAA	18237- 18495	259	-	СТТ	AAA	Ν	Ν	ND	Ν	Ν

Tabla 12. Tabla comparativa de la localización de los genes mitocondriales de las tres especies de Chaetoceros.	continuación
---	--------------

rpl6	19450- 19740	291	-	TTA	TTT	19450- 19740	291	-	TTA	TTT	19158- 19376	219	-	TTA	CTT
rps8	20207- 20409	203	-	GTT	ATA	20207- 20409	203	-	GTT	ATA	19969- 20118	150	-	AAC	ТАТ
trnF-GAA	20427- 20502	76	-			20427- 20502	76	-			20137- 20212	76	-		
rps10	20722- 20841	120	-	AAA	TTT	20722- 20841	120	-	AAA	TTT	20474- 20539	66	-	TTC	TTT
atp6	21152- 21751	600	-	СТС	GGA	21152- 21751	600	-	СТС	GGA	20720- 21463	744	-	ΑΤΑ	CAT
cob	21796- 22905	1110	-	TTT	AAA	21796- 22905	1110	-	TTT	AAA	21498- 22623	1126	-	TTT	TTT
rps13	23076- 23222	147	-	TTT	AAG	23076- 23222	147	-	TTT	AAG	22786- 22866	81	-	TGC	ТАТ
nad4	23424- 24788	1365	-	TTA	AGC	23424- 24788	1365	-	TTA	AGC	23129- 24605	1477	-	AGC	ТАТ
trnR-UCU	24925- 24998	74	-			24925- 24998	74	-			Ν	Ν	N		
nad2	25040- 26206	1167	-	СТТ	TTG	25040- 26206	1167	-	СТТ	TTG	24647- 25801	1155	-	ΑΑΑ	TTT
trnl-GAU	26543- 26616	74	-			26543- 26616	74	-			26132- 26205	74	-		
nad6	26707- 27222	516	-	ATT	ATT	26707- 27222	516	-	ATT	ATT	26340- 26744	405	-	TAA	AGA
trnM- fragment	27238- 27306	69	-			27238- 27306	69	-			Ν	Ν	Ν		

trnM- CAU	27238- 27311	74	-			27238- 27311	74	-			26848- 26921	74	-		
rrs	28548- 28620	73	-	AGC	TAA	28548- 28620	73	-	AGC	TAA	28404- 28454	51	-	GCA	ТСА
rrl	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	Ν	31366- 31594	229	-	TTA	ACA
trnH-GUG	31740- 31813	74	-			31740- 31813	74	-			32221- 32294	74	-		
trnM- CAU	31833- 31905	73	-			31833- 31905	73	-			32307- 32379	75	-	TGT	AAC
nad3	31916- 32248	333	-	TTA	TAG	31916- 32248	333	-	TTA	TAG	32399- 32731	333	-	СТА	ΤΑΑ
trnS-GCU	32439- 32528	90	-			32439- 32528	90	-			32827- 32917	91	-		
trnE-UUC	32645- 32716	72	-			32645- 32716	72	-			33017- 33088	72	-		
cox2	33512- 34140	629	+	CAA	GTT	33512- 34140	629	+	CAA	GTT	37239- 37886	648	+	CAA	GTT
nad7	34224- 35420	1197	+	ATG	TAA	34224- 35420	1197	+	ATG	TAA	37968- 39164	1197	+	ATG	ΤΑΑ

Loc: Localización del gen Long: Longitud del gen en pares de bases (pb)

N: No identificado

			C. muell	leri				C. calc	tirans			Ch	aetoce	ros sp.	
Gen	Loc.	Long (pb)	Sentido	Inicio codó n	Paro codó n	Loc.	Long (pb)	Sentido	Inicio codó n	Paro codó n	Loc.	Long (pb)	Sentido	Inicio codó n	Paro codó n
Cytochrome b6	1273 - 1755	483	-	ATG	CAT	1273 - 1755	483	-	ATG	CAT	1273 - 1755	483	-	ATG	CAT
Cytochrome b6	1806 - 2453	648	-	ATG	CAT	1806 - 2453	648	-	ATG	CAT	1806 - 2453	648	-	ATG	CAT
tRNA-Ser Anticodón: TGA	2525 - 2612	88	-			2525 - 2612	88	-			2525 - 2612	88	-		
Photosystem I subunit II	2648 - 3067	420	-	TTA	CAT	2648 - 3067	420	-	TTA	CAT	2648 - 3067	420	-	TTA	CAT
tRNA-Met Anticodon: CAT	2525 - 2612	74	-			2525 - 2612	74	-			2525 - 2612	74	-		
30S Ribosomal protein S2	3352 - 4041	690	-	TTA	CAT	3352 - 4041	690	-	TTA	CAT	3352 - 4041	690	-	TTA	CAT

DNA-directed RNA polymerase subunit beta	4135 - 8407	4273	-	ATT	CAT	4135 - 8407	427 3	-	ATT	САТ	4135 - 8407	427 3	-	ATT	CAT
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	8437 - 10482	2406	-	TTA	CAT	8437 - 10482	240 6	-	TTA	CAT	8437 - 10482	240 6	-	TTA	CAT
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	10861 - 15108	4248	-	TTA	CAT	10861 - 15108	424 8	-	TTA	CAT	10861 - 15108	424 8	-	TTA	CAT
30S Ribosomal protein S20	15240 - 15521	282	-	TTA	CAT	15240 - 15521	282	-	TTA	CAT	15240 - 15521	282	-	TTA	CAT
50S ribosomal protein L33	15728 - 15922	195	+	ATG	ΤΑΑ	15728 - 15922	195	+	ATG	ΤΑΑ	15728 - 15922	195	+	ATG	ΤΑΑ
30S ribosomal protein S18	15926 - 16138	213	+	ATG	ΤΑΑ	15926 - 16138	213	+	ATG	ΤΑΑ	15926 - 16138	213	+	ATG	ΤΑΑ
Photosystem I P700	16291 - 18549	2259	+	ATG	ΤΑΑ	16291 - 18549	225 9	+	ATG	ΤΑΑ	16291 - 18549	225 9	+	ATG	TAA

Photosystem I P700	18633 - 20834	2202	+	ATG	ΤΑΑ	18633 - 20834	220 2	+	ATG	ΤΑΑ	18633 - 20834	220 2	+	ATG	ΤΑΑ
tRNA-Thr Anticodon: TGT	20986 - 21057	72	+			20986 - 21057	72	+			20986 - 21057	72	+		
Photosystem I assembly protein YCF3	21214 - 21744	531	+	ATG	TAA	21214 - 21744	531	+	ATG	ΤΑΑ	21214 - 21744	531	+	ATG	ΤΑΑ
ATP synthase F1	21886 - 23313	1428	+	ATG	ΤΑΑ	21886 - 23313	142 8	+	ATG	ΤΑΑ	21886 - 23313	142 8	+	ATG	TAA
ATP synthase épsilon chain	23328 - 23729	402	+	ATG	TAA	23328 - 23729	402	+	ATG	TAA	23328 - 23729	402	+	ATG	ΤΑΑ
Uncharacterize d tatC protein	23861 - 24601	741	+	ATG	TAA	23861 - 24601	741	+	ATG	TAA	23861 - 24601	741	+	ATG	ΤΑΑ
Cytochrome f	24629 - 25573	945	+	ATG	TAA	24629 - 25573	945	+	ATG	TAA	24629 - 25573	945	+	ATG	ТАА
Ferredoxin	25621 - 25920	300	-	СТА	CAT	25621 - 25920	300	-	СТА	CAT	25621 - 25920	300	-	СТА	CAT
50S ribosomal protein L19	26050 - 26409	360	-	TTA	CAT	26050 - 26409	360	-	TTA	CAT	26050 - 26409	360	-	TTA	САТ

tRNA-Ile Anticodon: CAT	26492	85	-			26492	85	-			26492	85	-		
Anticodon. CAT	26576					26576					26576				
tRNA-Phe	26582	68	-			26582	68	-			26582	68	-		
Anticodon. AAA	- 26649					26649					26649				
tRNA-Arg Anticodon: CCG	26945 -	73	-			26945 -	73	-			26945 -	73	-		
	27017					27017					27017				
Cytochrome c- 550	27207 -	492	-	TTA	CAT	27207 -	492	-	TTA	CAT	27207 -	492	-	TTA	CAT
	27698					27698					27698				
Uncharacterize d protein ycf66	27744 -	294	-	TTA	CAT	27744 -	294	-	TTA	CAT	27744 -	294	-	TTA	CAT
	28037					28037					28037				
tRNA-Phe anticodón: GAA	28581 -	73	+			28581 -	73	+			28581	73	+		
	28653					28653					28653				
Probable helicase	28655 -	1368	-	TTA	CAT	28655 -	136 8	-	TTA	CAT	28655 -	136 8	-	TTA	CAT
	30022					30022					30022				
tRNA-Trp Anticodon: CCA	30106 -	73	+			30106 -	73	+			30106 -	73	+		
	30178					30178					30178				
50S ribosomal protein L11	30351 -	426	+	ATG	ΤΑΑ	30351 -	426	+	ATG	ΤΑΑ	30351 -	426	+	ATG	TAA
	30776					30776					30776				

50S ribosomal protein L1	30810	693	+	ATG	ΤΑΑ	30810	693	+	ATG	TAA	30810	693	+	ATG	TAA
50S ribosomal protein L12	31502 31538 - 31921	384	+	ATG	ΤΑΑ	31502 31538 - 31921	384	+	ATG	TAA	31502 31538 - 31921	384	+	ATG	ΤΑΑ
Photosystem II D2 protein	33055 - 34110	1056	+	ATG	ΤΑΑ	33055 - 34110	105 6	+	ATG	ΤΑΑ	33055 - 34110	105 6	+	ATG	ΤΑΑ
Photosystem II CP43 (psbC)	34058 - 35473	1416	+	ATG	ΤΑΑ	34058 - 35473	141 6	+	ATG	ΤΑΑ	34058 - 35473	141 6	+	ATG	TAA
tRNA-Lys Anticodon: TTT	35592 - 35663	72	-			35592 - 35663	72	-			35592 - 35663	72	-		
Photosystem II (psbZ)	36020 - 36205	186	+	ATG	TAG	36020 - 36205	186	+	ATG	TAG	36020 - 36205	186	+	ATG	TAG
tRNA-Gly Anticodon: GCC	36316 - 36387	72	+			36316 - 36387	72	+			36316 - 36387	72	+		
tRNA-Glu Anticodon: TTC	36424 - 36496	73	+			36424 - 36496	73	+			36424 - 36496	73	+		
ycf41	36798 - 37124	327	-	TTA	CAT	36798 - 37124	327	-	TTA	CAT	36798 - 37124	327	-	TTA	CAT

Uncharacterize d protein ycf39	37218 -	960	-	TTA	CAT	37218 -	960	-	TTA	CAT	37218	960	-	TTA	CAT
. ,	38177					38177					38177				
Protein CfxQ	38211	879	-	TTA	CAT	38211	879	-	TTA	CAT	38211	879	-	TTA	CAT
	- 39089					- 39089					- 39089				
Photosystem I (PSAL)	39160 -	453	-	TTA	CAT	39160 -	453	-	TTA	CAT	39160 -	453	-	TTA	CAT
	39612					39612					39612				
Photosystem I Ycf4	39899 -	546	+	ATG	ΤΑΑ	39899 -	546	+	ATG	ΤΑΑ	39899 -	546	+	ATG	TAA
	40444					40444					40444				
tRNA-Gly	40492	71	+			40492	71	+			40492	71	+		
Anticodon. ree	40562					40562					40562				
Cytochrome	40618	255	+	ATG	TAA	40618	255	+	ATG	TAA	40618	255	+	ATG	TAA
0333	40872					40872					40872				
Uncharacterize	41418	1245	-	TTA	CAT	41418	124	-	TTA	CAT	41418	124	-	TTA	CAT
a protein yci90	- 42662					- 42662	5				- 42662	5			
Photosystem I	43077	558	+	ATG	ΤΑΑ	43077	558	+	ATG	TAA	43077	558	+	ATG	TAA
(PSAF)	- 43634					- 43634					- 43634				
Photosystem II protein H	44199 -	204	-	TTA	CAT	44199	204	-	TTA	CAT	44199	204	-	TTA	CAT
10.000	44402					44402					44402				

Photosystem II CP47	45012 - 46541	1530	-	ΤΤΑ	САТ	45012 - 46541	153 0	-	ΤΤΑ	CAT	45012 - 46541	153 0	-	ΤΤΑ	CAT
ATP synthase subunit alpha	46746 - 48257	1512	-	TTA	САТ	46746 - 48257	151 2	-	TTA	САТ	46746 - 48257	151 2	-	TTA	CAT
ATP synthase subunit delta	48303 - 48785	483	-	СТА	CAT	48303 - 48785	483	-	СТА	CAT	48303 - 48785	483	-	СТА	CAT
ATP synthase subunit b	48863 - 49402	540	-	ТСА	CAT	48863 - 49402	540	-	TCA	CAT	48863 - 49402	540	-	TCA	CAT
ATP synthase subunit a	49465 - 49935	471	-	TTA	САТ	49465 - 49935	471	-	TTA	CAT	49465 - 49935	471	-	TTA	CAT
ATP synthase subunit c	50039 - 50287	249	-	TTA	САТ	50039 - 50287	249	-	TTA	CAT	50039 - 50287	249	-	TTA	CAT
ATP synthase subunit a	50353 - 51081	729	-	TTA	CAT	50353 - 51081	729	-	TTA	CAT	50353 - 51081	729	-	TTA	CAT
Probable ATP (ycf16)	51188 - 51940	753	-	СТА	САТ	51188 - 51940	753	-	СТА	САТ	51188 - 51940	753	-	СТА	CAT
Protein ycf24	51940 - 53400	1461	-	TTA	САТ	51940 - 53400	146 1	-	TTA	САТ	51940 - 53400	146 1	-	TTA	CAT

RuBisCO large subunit	53690 - 55162	1473	+	ATG	ΤΑΑ	53690 - 55162	147 3	+	ATG	ΤΑΑ	53690 - 55162	147 3	+	ATG	ΤΑΑ
RuBisCO small subunit	55296 - 55619	324	+	ATG	ΤΑΑ	55296 - 55619	324	+	ATG	ΤΑΑ	55296 - 55619	324	+	ATG	TAA
tRNA-Arg Anticodon: TCT	55772 - 55844	73	-			55772 - 55844	73	-			55772 - 55844	73	-		
tRNA-Val Anticodon: TAC	55857 - 55928	72	-			55857 - 55928	72	-			55857 - 55928	72	-		
tRNA-Tyr Anticodon: GTA	56053 - 56134	82	-			56053 - 56134	82	-			56053 - 56134	82	-		
Uncharacterize d protein ycf33	56180 - 56374	195	-	ΤΤΑ	CAT	56180 - 56374	195	-	TTA	САТ	56180 - 56374	195	-	TTA	CAT
tRNA-Met Anticodon: CAT	56532 - 56604	73	-			56532 - 56604	73	-			56532 - 56604	73	-		
tRNA-Ser Anticodon: GCT	56642 - 56727	86	+			56642 - 56727	86	+			56642 - 56727	86	+		
tRNA-Asp Anticodon: GTC	56790 - 56863	74	+			56790 - 56863	74	+			56790 - 56863	74	+		

Probable protein export	56904	213	-	TTA	CAT	56904 -	213	-	TTA	САТ	56904	213	-	TTA	CAT
CHLI1	57116 57128 - 58189	1062	-	TTA	CAT	57116 57128 - 58189	106 2	-	TTA	CAT	57116 57128 - 58189	106 2	-	TTA	CAT
30S ribosomal protein S14	58588 - 58890	303	-	TTA	CAT	58588 - 58890	303	-	TTA	CAT	58588 - 58890	303	-	TTA	САТ
ATP (ftsH)	59033 - 60958	1926	-	TTA	CAT	59033 - 60958	192 6	-	TTA	CAT	59033 - 60958	192 6	-	TTA	CAT
Photosystem I (PSAE)	61062 - 61316	255	+	ATG	ΤΑΑ	61062 - 61316	255	+	ATG	ΤΑΑ	61062 - 61316	255	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L35	61577 - 61771	195	+	ATG	ΤΑΑ	61577 - 61771	195	+	ATG	ΤΑΑ	61577 - 61771	195	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L20	61778 - 62122	345	+	ATG	ΤΑΑ	61778 - 62122	345	+	ATG	ΤΑΑ	61778 - 62122	345	+	ATG	ΤΑΑ
Acyl carrier protein	62477 - 62710	234	+	ATG	ΤΑΑ	62477 - 62710	234	+	ATG	ΤΑΑ	62477 - 62710	234	+	ATG	ΤΑΑ
tRNA-Pro Anticodon: TGG	62873 - 62946	74	+			62873 - 62946	74	+			62873 - 62946	74	+		

Uncharacterize d protein ycf89	63200 - 64216	1017	+	ATG	ΤΑΑ	63200 - 64216	101 7	+	ATG	ΤΑΑ	63200 - 64216	101 7	+	ATG	ΤΑΑ
tRNA-Ile Anticodon: GAT	65947 - 66020	74	+			65947 - 66020	74	+			65947 - 66020	74	+		
tRNA-Ala Anticodon: TGC	66023 - 66095	73	+			66023 - 66095	73	+			66023 - 66095	73	+		
Uncharacterize d protein ycf35	69648 - 70022	375	-	TTA	CAT	69648 - 70022	375	-	TTA	CAT	69648 - 70022	375	-	TTA	CAT
30S ribosomal protein S16	70161 - 70400	240	-	TTA	САТ	70161 - 70400	240	-	TTA	CAT	70161 - 70400	240	-	ΤΤΑ	CAT
30S ribosomal protein S4	70482 - 71096	615	-	ΤΤΑ	CAT	70482 - 71096	615	-	TTA	CAT	70482 - 71096	615	-	ΤΤΑ	CAT
tRNA-His Anticodon: GTG	71156 - 71228	73	-			71156 - 71228	73	-			71156 - 71228	73	-		
Uncharacterize d protein yc40	71324 - 71533	210	+	ATG	ΤΑΑ	71324 - 71533	210	+	ATG	ΤΑΑ	71324 - 71533	210	+	ATG	ΤΑΑ
Phenylalanine tRNA ligase	71564 - 73678	2115	-	TTA	CAT	71564 - 73678	211 5	-	TTA	CAT	71564 - 73678	211 5	-	TTA	CAT

Tabla 13. Tabla comparativa d	e la localización de los genes d	le cloroplasto de las tres esp	ecies de Chaetoceros continuación

Photosystem II (Psb28)	73706	369	-	TTA	CAT	73706	369	-	TTA	CAT	73706	369	-	TTA	CAT
	74074					74074					74074				
tRNA-Gln Anticodon: TTG	74143 -	72	-			74143 -	72	-			74143 -	72	-		
	74214					74214					74214				
tRNA-Arg Anticodon: ACG	74245 -	74	-			74245 -	74	-			74245 -	74	-		
	74318					74318					74318				
60 kDa chaperonin (groL)	74484 - 76082	1599	+	ATG	ΤΑΑ	74484 - 76082	159 9	+	ATG	ΤΑΑ	74484 - 76082	159 9	+	ATG	ΤΑΑ
Chaperone protein dnaK	76108 - 77940	1833	-	СТА	САТ	76108 - 77940	183 3	-	СТА	CAT	76108 - 77940	183 3	-	СТА	CAT
50S ribosomal protein L3	78225 - 78815	591	+	ATG	ΤΑΑ	78225 - 78815	591	+	ATG	ΤΑΑ	78225 - 78815	591	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L4	78860 - 79507	648	+	ATG	TGA	78860 - 79507	648	+	ATG	TGA	78860 - 79507	648	+	ATG	TGA
50S ribosomal protein L2	79838 - 80665	828	+	ATG	ΤΑΑ	79838 - 80665	828	+	ATG	ΤΑΑ	79838 - 80665	828	+	ATG	ΤΑΑ
30S ribosomal protein S19	80708 - 80986	279	+	ATG	ΤΑΑ	80708 - 80986	279	+	ATG	ΤΑΑ	80708 - 80986	279	+	ATG	ΤΑΑ

Uncharacterize d protein ycf88	80999 -	396	+	ATG	ΤΑΑ	80999 -	396	+	ATG	ΤΑΑ	80999 -	396	+	ATG	TAA
	81394					81394					81394				
50S ribosomal protein L22	81494 -	348	+	ATG	ΤΑΑ	81494 -	348	+	ATG	ΤΑΑ	81494 -	348	+	ATG	TAA
	81841					81841					81841				
30S ribosomal protein S3	82306	222	+	ATG	ΤΑΑ	82306 -	222	+	ATG	ΤΑΑ	82306	222	+	ATG	ΤΑΑ
	82527					82527					82527				
50S ribosomal protein L16	82561 -	417	+	ATG	ΤΑΑ	82561 -	417	+	ATG	ΤΑΑ	82561 -	417	+	ATG	TAA
	82977					82977					82977				
50S ribosomal protein L29	82981 - 83250	270	+	ATG	ΤΑΑ	82981 - 83250	270	+	ATG	ΤΑΑ	82981 - 83250	270	+	ATG	ΤΑΑ
205 ribocomol	00101	255		ATC	ΤΛΛ	00101	255		ATC	ТАА	0000	255		ATC	тлл
protein S17	-	200	+	AIG	IAA	-	255	+	AIG	IAA	-	255	+	AIG	IAA
•	83536					83536					83536				
50S ribosomal protein L14	83549 -	366	+	ATG	ΤΑΑ	83549 -	366	+	ATG	ΤΑΑ	83549 -	366	+	ATG	TAA
	83914					83914					83914				
50S ribosomal protein L24	83915 -	246	+	ATG	ΤΑΑ	83915 -	246	+	ATG	ΤΑΑ	83915 -	246	+	ATG	TAA
	84160					84160					84160				
50S ribosomal protein L5	84165 -	717	+	ATG	ΤΑΑ	84165 -	717	+	ATG	ΤΑΑ	84165 -	717	+	ATG	TAA
	84881					84881					84881				

30S ribosomal protein S8	84934 - 85308	375	+	ATG	ΤΑΑ	84934 - 85308	375	+	ATG	ΤΑΑ	84934 - 85308	375	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L6	85327	540	+	ATG	ΤΑΑ	85327	540	+	ATG	ΤΑΑ	85327	540	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L18	85866 85922 -	408	+	ATG	ΤΑΑ	85866	408	+	ATG	ΤΑΑ	85866 85922 -	408	+	ATG	ΤΑΑ
30S ribosomal protein S5	86329 86365 - 86901	537	+	ATG	ΤΑΑ	86329 86365 - 86901	537	+	ATG	ΤΑΑ	86329 86365 - 86901	537	+	ATG	ΤΑΑ
Protein translocase SecY	86926 - 88191	1266	+	ATG	ΤΑΑ	86926 - 88191	126 6	+	ATG	ΤΑΑ	86926 - 88191	126 6	+	ATG	TAA
30S ribosomal protein S11	88779 - 89171	393	+	ATG	ΤΑΑ	88779 - 89171	393	+	ATG	ΤΑΑ	88779 - 89171	393	+	ATG	ΤΑΑ
DNA-directed RNA polymerase (rpoA)	89211 - 90152	942	+	ATG	ΤΑΑ	89211 - 90152	942	+	ATG	TAA	89211 - 90152	942	+	ATG	ΤΑΑ
50S ribosomal protein L13	90179 - 90613	435	+	ATG	ΤΑΑ	90179 - 90613	435	+	ATG	ΤΑΑ	90179 - 90613	435	+	ATG	ΤΑΑ
30S ribosomal protein S9	90628 - 91032	405	+	ATG	ΤΑΑ	90628 - 91032	405	+	ATG	ΤΑΑ	90628 - 91032	405	+	ATG	ΤΑΑ

50S ribosomal protein L31	91052 -	216	+	ATG	ΤΑΑ	91052 -	216	+	ATG	ΤΑΑ	91052 -	216	+	ATG	TAA
	91267					91267					91267				
30S ribosomal protein S12	91305 -	381	+	ATG	ΤΑΑ	91305 -	381	+	ATG	ΤΑΑ	91305 -	381	+	ATG	TAA
	91685					91685					91685				
30S ribosomal protein S7	91791 -	471	+	ATG	ΤΑΑ	91791 -	471	+	ATG	ΤΑΑ	91791 -	471	+	ATG	TAA
	92261					92261					92261				
EF-Tu	92346 -	1230	+	ATG	ΤΑΑ	92346 -	123 0	+	ATG	TAA	92346 -	123 0	+	ATG	TAA
	93575					93575					93575				
30S ribosomal protein S10	93588	324	+	ATG	ΤΑΑ	93588	324	+	ATG	TAA	93588	324	+	ATG	TAA
	93911					93911					93911				
tRNA-Leu Anticodon: TAA	94024 -	87	-			94024 -	87	-			94024 -	87	-		
	94110					94110					94110				
tRNA-Cys Anticodon: GCA	94202 -	71	-			94202 -	71	-			94202 -	71	-		
	94272					94272					94272				
ATP-dependent Clp (clpA)	94464 -	2646	+	ATG	ΤΑΑ	94464 -	264 6	+	ATG	TAA	94464 -	264 6	+	ATG	TAA
	97109					97109					97109				
Thiazole synthase (thiG)	97177 -	810	-	TTA	CAT	97177 -	810	-	TTA	CAT	97177 -	810	-	TTA	CAT
	97986					97986					97986				

tRNA-Asn Anticodon: GTT	98003 - 98074	72	-			98003 - 98074	72	-			98003 - 98074	72	-		
30S ribosomal protein S6	98151 - 98462	312	-	TTA	CAT	98151 - 98462	312	-	TTA	CAT	98151 - 98462	312	-	TTA	CAT
Cytochrome c	98675 - 99613	939	+	ATG	ΤΑΑ	98675 - 99613	939	+	ATG	ΤΑΑ	98675 - 99613	939	+	ATG	ΤΑΑ
Photosystem I (psaC)	99668 - 99913	246	-	TTA	CAT	99668 - 99913	246	-	TTA	CAT	99668 - 99913	246	-	TTA	САТ
Photosystem II protein D1 (psbA)	10012 3 - 10120 5	1083	-	TTA	CAT	10012 3 - 10120 5	108 3	-	TTA	CAT	10012 3 - 10120 5	108 3	-	TTA	CAT
Cytochrome c	10129 2 - 10256 0	1269	-	TTA	САТ	10129 2 - 10256 0	126 9	-	TTA	CAT	10129 2 - 10256 0	126 9	-	TTA	CAT
Uncharacterize d protein ycf46	10257 6 - 10406 6	1491	-	TTA	CAT	10257 6 - 10406 6	149 1	-	TTA	CAT	10257 6 - 10406 6	149 1	-	TTA	CAT
Protein translocase	10437 2 - 10702 3	2652	-	TTA	CAT	10437 2 - 10702 3	265 2	-	TTA	CAT	10437 2 - 10702 3	265 2	-	TTA	САТ
Tabla 13. Tabla comi	parativa de la localización c	de los genes de cloroplasto	o de las tres especies de <i>Chaetoceros</i>	continuación											
----------------------	-------------------------------	-----------------------------	--	--------------											

50S ribosomal protein L27	10704 3 - 10729 4	252	-	TTA	CAT	10704 3 - 10729 4	252	-	TTA	САТ	10704 3 - 10729 4	252	-	TTA	CAT
50S ribosomal protein L21	10731 4 - 10763 1	318	-	TTA	CAT	10731 4 - 10763 1	318	-	TTA	CAT	10731 4 - 10763 1	318	-	TTA	CAT
Probable RuBisCO transcriptional regulator	10772 2 - 10865 1	930	-	СТА	CAT	10772 2 - 10865 1	930	-	СТА	CAT	10772 2- 10865 1	930	-	СТА	CAT
tRNA-Leu Anticodon: TAG	10871 3 - 10879 4	82	-			10871 3 - 10879 4	82	-			10871 3 - 10879 4	82	-		
tRNA-Ala Anticodon:TGC	11256 2 - 11263 4	73	-			11256 2 - 11263 4	73	-			11256 2 - 11263 4	73	-		
tRNA-lle Anticodon: GAT	11263 7 - 11271 0	74	-			11263 7 - 11271 0	74	-			11263 7 - 11271 0	74	-		
tRNA-Pro Anticodon: TGG	11576 7 - 11584 0	74	-			11576 7 - 11584 0	74	-			11576 7 - 11584 0	74	-		

Acyl carrier protein	11598 0- 11621 3	234	-	ΤΤΑ	САТ	11598 0- 11621 3	234	-	ΤΤΑ	CAT	11598 0- 11621 3	234	-	ΤΤΑ	CAT
Uncharacterize d protein ycf45	11639 4 - 11643 9		-	ΤΤΑ	ΤΑΑ	11639 4- 11643 9		-	TTA	ΤΑΑ	11639 4 - 11643 9		-	ΤΤΑ	ΤΑΑ

 Tabla 13. Tabla comparativa de la localización de los genes de cloroplasto de las tres especies de Chaetoceros... continuación

Loc: Localización del gen Long: Longitud del gen en pares de bases (pb)

N: No identificado

Anexo C

 Tabla 14. Búsqueda de modelo filogenético de marcador molecular COI basado en nucleótidos.

Table. Max	imum <mark>Likeli</mark> h	ood fits of	24 differen	t nucleotid	e sub	stituti	ion m	odels															
Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
GTR+G	42	9545.000	9222.221	-4568.998	n/a	0.18	1.42	0.225	0.364	0.182	0.229	0.052	0.084	0.119	0.032	0.114	0.026	0.104	0.229	0.044	0.117	0.041	0.035
GTR+G+I	43	9550.956	9220.497	-4567.131	0.30	0.32	1.44	0.225	0.364	0.182	0.229	0.051	0.083	0.119	0.032	0.116	0.025	0.103	0.232	0.045	0.117	0.040	0.036
T92+G	36	9557.587	9280.892	-4604.364	n/a	0.19	1.41	0.295	0.295	0.205	0.205	0.060	0.042	0.122	0.060	0.122	0.042	0.060	0.175	0.042	0.175	0.060	0.042
T92+G+I	37	9560.898	9276.522	-4601.174	0.34	0.37	1.43	0.295	0.295	0.205	0.205	0.060	0.042	0.122	0.060	0.122	0.042	0.060	0.176	0.042	0.176	0.060	0.042
HKY+G	38	9567.015	9274.958	-4599.387	n/a	0.19	1.46	0.225	0.364	0.182	0.229	0.072	0.036	0.139	0.044	0.110	0.045	0.044	0.220	0.045	0.136	0.072	0.036
HKY+G+I	39	9571.078	9271.341	-4596.574	0.32	0.34	1.47	0.225	0.364	0.182	0.229	0.071	0.036	0.139	0.044	0.110	0.045	0.044	0.221	0.045	0.137	0.071	0.036
K2+G	35	9573.159	9304.146	-4616.995	n/a	0.19	1.36	0.250	0.250	0.250	0.250	0.053	0.053	0.144	0.053	0.144	0.053	0.053	0.144	0.053	0.144	0.053	0.053
TN93+G	39	9575.336	9275.598	-4598.702	n/a	0.19	1.47	0.225	0.364	0.182	0.229	0.071	0.036	0.127	0.044	0.118	0.045	0.044	0.237	0.045	0.125	0.071	0.036
K2+G+I	36	9576.925	9300.231	-4614.033	0.35	0.38	1.37	0.250	0.250	0.250	0.250	0.053	0.053	0.145	0.053	0.145	0.053	0.053	0.145	0.053	0.145	0.053	0.053
TN93+G+I	40	9579.441	9272.023	-4595.910	0.35	0.36	1.49	0.225	0.364	0.182	0.229	0.071	0.035	0.127	0.044	0.119	0.045	0.044	0.239	0.045	0.125	0.071	0.035
GTR+I	42	9648.540	9325.761	-4620.769	0.67	n/a	1.37	0.225	0.364	0.182	0.229	0.062	0.079	0.117	0.038	0.115	0.030	0.098	0.230	0.038	0.115	0.048	0.030
T92+I	36	9653.152	9376.458	-4652.146	0.67	n/a	1.33	0.295	0.295	0.205	0.205	0.062	0.043	0.119	0.062	0.119	0.043	0.062	0.170	0.043	0.170	0.062	0.043
K2+I	35	9656.176	9387.163	-4658.503	0.67	n/a	1.31	0.250	0.250	0.250	0.250	0.054	0.054	0.142	0.054	0.142	0.054	0.054	0.142	0.054	0.142	0.054	0.054
HKY+I	38	9665.312	9373.255	-4648.536	0.67	n/a	1.37	0.225	0.364	0.182	0.229	0.075	0.037	0.135	0.046	0.107	0.047	0.046	0.215	0.047	0.133	0.075	0.037
TN93+I	39	9671.499	9371.762	-4646.784	0.67	n/a	1.39	0.225	0.364	0.182	0.229	0.074	0.037	0.120	0.046	0.118	0.047	0.046	0.237	0.047	0.118	0.074	0.037
JC+G	34	9701.702	9440.371	-4686.112	n/a	0.19	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G+I	35	9705.818	9436.806	-4683.325	0.33	0.36	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+I	34	9782.501	9521.171	-4726.512	0.67	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92	35	10390.344	10121.331	-5025.588	n/a	n/a	1.21	0.295	0.295	0.205	0.205	0.065	0.046	0.114	0.065	0.114	0.046	0.065	0.164	0.046	0.164	0.065	0.046
K2	34	10390.592	10129.261	-5030.557	n/a	n/a	1.21	0.250	0.250	0.250	0.250	0.057	0.057	0.137	0.057	0.137	0.057	0.057	0.137	0.057	0.137	0.057	0.057
GTR	41	10399.507	10084.409	-5001.098	n/a	n/a	1.22	0.225	0.364	0.182	0.229	0.071	0.076	0.128	0.044	0.099	0.034	0.094	0.197	0.042	0.126	0.054	0.033
HKY	37	10406,910	10122.534	-5024.180	n/a	n/a	1.22	0.225	0.364	0.182	0.229	0.080	0.040	0.129	0.049	0.102	0.050	0.049	0.205	0.050	0.127	0.080	0.040
TN93	38	10416.500	10124.443	-5024.130	n/a	n/a	1.22	0.225	0.364	0.182	0.229	0.080	0.040	0.131	0.049	0.101	0.050	0.049	0.202	0.050	0.129	0.080	0.040
JC	33	10508.339	10254.690	-5094.275	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083

Abreviaciones: TR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

Anexo D

 Tabla 15. Distancias genéticas basadas en el marcador molecular COI con nucleótidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Chaetoceros muelleri CHM1																		
2. Chaetoceros sp. CHX1	0.037																	
3. Asterionella formosa KY021079.1	0.070	0.076																
4. Berkeleya fennica NC 026126.1	0.112	0.114	0.121															
5. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.000	0.037	0.070	0.112														
6. Didymosphenia geminata KX889125.1	0.086	0.098	0.104	0.085	0.086													
7. Eunotia naegelii MG271846.1	0.094	0.097	0.095	0.114	0.094	0.097												
8. Fistulifera solaris KT363689.1	0.089	0.098	0.100	0.092	0.089	0.068	0.094											
9. Halamphora coffeaeformis MF997420.1	0.107	0.118	0.114	0.110	0.107	0.090	0.122	0.095										
10. Melosira undulata NC 037728.1	0.081	0.094	0.109	0.121	0.081	0.102	0.111	0.104	0.127									
11. Navicula ramosissima C 031848.1	0.115	0.121	0.121	0.105	0.115	0.122	0.127	0.122	0.140	0.140								
12. Nitzschia sp. MG182051.1	0.081	0.082	0.089	0.112	0.081	0.095	0.102	0.105	0.121	0.110	0.100							
13. Nitzschia alba NC 037729.1	0.078	0.073	0.090	0.111	0.078	0.096	0.098	0.099	0.119	0.109	0.109	0.032						
14. Psammoneis japonica MG148339.1	0.048	0.060	0.076	0.109	0.048	0.092	0.097	0.096	0.116	0.099	0.112	0.086	0.088					
15. Skeletonema marinol KT874463.1	0.052	0.056	0.084	0.124	0.052	0.101	0.107	0.106	0.122	0.096	0.127	0.092	0.095	0.065				
16. Thalassiosira pseudonana DQ186202.1	0.049	0.051	0.082	0.118	0.049	0.101	0.104	0.108	0.124	0.095	0.124	0.090	0.087	0.053	0.024			
17. Toxarium undulatum NC 037988.1	0.059	0.065	0.079	0.119	0.059	0.109	0.108	0.095	0.124	0.078	0.116	0.092	0.092	0.069	0.073	0.066		
18. Synedra acus GU002153.1	0.099	0.099	0.089	0.134	0.099	0.114	0.114	0.110	0.131	0.106	0.137	0.115	0.109	0.100	0.101	0.090	0.091	

Anexo E

 Tabla 16. Búsqueda de modelo filogenético basado en el gen COI con aminoácidos.

Table. Maximum Likelihood fits of 56 different amino acid substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	f(A)	f(R)	f(N)	f(D)	f(C)	f(Q)	f(E)	f(G)	f(H)	f(I)	f(L)	f(K)	f(M)	<i>f</i> (F)	f(P)	f(S)	f(T)	f(W)
LG+G	34	8070.383	7832.768	-3882.236	n/a	0.30	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
cpREV+G	34	8070.537	7832.921	-3882.313	n/a	0.28	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
LG+G+I	35	8071.323	7826.727	-3878.207	0.41	0.89	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
cpREV+G+I	35	8073.937	7829.341	-3879.514	0.44	0.87	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
LG+G+I+F	54	8100.658	7723.539	-3807.400	0.39	0.76	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
LG+G+F	53	8101.584	7731.435	-3812.361	n/a	0.31	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
mtREV24+G+I	35	8112.608	7868.012	-3898.850	0.37	0.68	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
mtREV24+G	34	8114.067	7876.452	-3904.078	n/a	0.30	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
cpREV+G+F	53	8127.233	7757.084	-3825.185	n/a	0.29	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
cpREV+G+I+F	54	8131.294	7754.174	-3822.717	0.41	0.80	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
cpREV+I	34	8131.518	7893.902	-3912.803	0.61	n/a	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
WAG+G+F	53	8131.577	7761.428	-3827.357	n/a	0.32	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
WAG+G+I+F	54	8132.390	7755.270	-3823.265	0.42	0.94	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
rtREV+G+I+F	54	8136.074	7758.955	-3825.107	0.39	0.77	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
LG+I	34	8137.179	7899.563	-3915.634	0.57	n/a	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
rtREV+G+F	53	8137.222	7767.073	-3830.180	n/a	0.31	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
WAG+G	34	8138.832	7901.217	-3916.460	n/a	0.31	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
WAG+G+I	35	8139.790	7895.194	-3912.440	0.44	1.06	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
JTT+G	34	8142.315	7904.700	-3918.202	n/a	0.31	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
JTT+G+I	35	8143.105	7898.509	-3914.098	0.41	0.87	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
JTT+G+F	53	8154.100	7783.951	-3838.619	n/a	0.31	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
JTT+G+I+F	54	8154.326	7777.207	-3834.234	0.39	0.80	0.077	0.022	0.033	0.029	0.004	0.007	0.011	0.100	0.037	0.097	0.119	0.016	0.038	0.099	0.049	0.063	0.062	0.025
rtREV+G	34	8173.371	7935.755	-3933.730	n/a	0.31	0.065	0.045	0.038	0.042	0.011	0.061	0.061	0.064	0.027	0.068	0.102	0.075	0.015	0.029	0.068	0.049	0.062	0.025
Abreviaciones	TR' Gene	ral Time	Reversit	ale: ITT:	oneg	-Tav	lor-Th	ornto	n∙rt₽	FV G	enera		arce T	ransci	rintas	e. cub	FV: G	enera		orsible	Chlo	ronlas	t· mt	RF\/24.
General Rever	sible Mitoc	hondrial.	Never Sh	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	ones	, ruy		Sinto	,	20.0	cricia			anse	pros	-, срп	20.0	chera		2131010		opias	, III	12 8 2 7.



Figura 29. Árbol filogenético basado en el gen COI utilizando aminoácidos, las especies de Chaetoceros de este estudio se indican con flechas rojas.

Anexo G

 Tabla 17. Distancias genéticas basadas en el gen COI utilizando aminoácidos .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Chaetoceros muelleri CHM1		0.009	0.016	0.027	0.000	0.022	0.024	0.023	0.025	0.022	0.027	0.022	0.020	0.014	0.013	0.012	0.015	0.021
2. Chaetoceros sp. CHX1	0.034		0.017	0.027	0.009	0.023	0.024	0.024	0.025	0.023	0.026	0.021	0.019	0.015	0.013	0.013	0.016	0.023
3. Asterionella formosa KY021079.1	0.102	0.103		0.029	0.016	0.020	0.023	0.023	0.025	0.025	0.026	0.020	0.020	0.016	0.017	0.017	0.018	0.020
4. Berkeleya fennica NC 026126.1	0.206	0.207	0.226		0.027	0.018	0.028	0.021	0.025	0.030	0.023	0.027	0.026	0.027	0.027	0.027	0.028	0.029
5. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.000	0.034	0.102	0.206		0.022	0.024	0.023	0.025	0.022	0.027	0.022	0.020	0.014	0.013	0.012	0.015	0.021
6. Didymosphenia geminata KX889125.1	0.161	0.169	0.146	0.106	0.161		0.022	0.014	0.020	0.026	0.027	0.020	0.020	0.022	0.024	0.023	0.023	0.023
7. Eunotia naegelii MG271846.1	0.176	0.169	0.170	0.207	0.176	0.142		0.023	0.029	0.028	0.031	0.023	0.022	0.023	0.024	0.023	0.025	0.026
8. Fistulifera solaris KT363689.1	0.168	0.178	0.172	0.135	0.168	0.075	0.164		0.021	0.027	0.027	0.022	0.022	0.022	0.024	0.024	0.021	0.024
9. Halamphora coffeaeformis MF997420.1	0.197	0.199	0.198	0.183	0.197	0.140	0.234	0.146		0.029	0.030	0.025	0.025	0.026	0.024	0.024	0.026	0.028
10. Melosira undulata NC 037728.1	0.163	0.168	0.187	0.242	0.163	0.195	0.228	0.203	0.244		0.034	0.027	0.028	0.025	0.023	0.023	0.020	0.026
11. Navicula ramosissima C 031848.1	0.221	0.211	0.201	0.171	0.221	0.217	0.246	0.207	0.265	0.293		0.023	0.023	0.025	0.027	0.026	0.026	0.030
12. Nitzschia sp. MG182051.1	0.159	0.147	0.150	0.223	0.159	0.163	0.176	0.168	0.204	0.221	0.171		0.010	0.021	0.021	0.022	0.022	0.024
13. Nitzschia alba NC 037729.1	0.137	0.128	0.143	0.199	0.137	0.153	0.163	0.155	0.196	0.216	0.170	0.043		0.020	0.020	0.020	0.021	0.023
14. Psammoneis japonica MG148339.1	0.078	0.081	0.106	0.204	0.078	0.161	0.164	0.164	0.211	0.198	0.203	0.155	0.138		0.015	0.014	0.017	0.022
15. Skeletonema marinol KT874463.1	0.078	0.076	0.106	0.211	0.078	0.177	0.174	0.175	0.187	0.166	0.215	0.152	0.142	0.094		0.005	0.017	0.022
16. Thalassiosira pseudonana DQ186202.1	0.070	0.071	0.100	0.214	0.070	0.173	0.168	0.171	0.194	0.164	0.212	0.153	0.139	0.083	0.009		0.016	0.022
17. Toxarium undulatum NC 037988.1	0.087	0.091	0.118	0.222	0.087	0.179	0.190	0.157	0.215	0.137	0.213	0.174	0.155	0.119	0.109	0.101		0.020
18. Synedra acus GU002153.1	0.162	0.165	0.146	0.251	0.162	0.185	0.210	0.190	0.236	0.196	0.246	0.199	0.189	0.164	0.167	0.161	0.145	

Anexo H

 Tabla 18. Búsqueda de modelo filogenético del marcador rbcL basado en nucleótidos.

Table. Max	imum Likelih	ood fits o	f 24 differ	ent nucleo	tide s	ubstit	tution	mode	ls														
Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
K2+G+I	50	5464.664	5064.957	-2482.362	0.77	0.39	0.83	0.250	0.250	0.250	0.250	0.068	0.068	0.114	0.068	0.114	0.068	0.068	0.114	0.068	0.114	0.068	0.068
JC+G+I	49	5465.892	5074.175	-2487.976	0.77	0.39	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+G+I	51	5468.757	5061.060	-2479.409	0.77	0.39	0.84	0.264	0.264	0.236	0.236	0.072	0.064	0.108	0.072	0.108	0.064	0.072	0.120	0.064	0.120	0.072	0.064
HKY+G+I	53	5469.969	5046.293	-2470.016	0.77	0.39	0.82	0.263	0.264	0.190	0.283	0.073	0.052	0.127	0.073	0.085	0.078	0.073	0.119	0.078	0.118	0.073	0.052
TN93+G+I	54	5479.954	5048.290	-2470.009	0.77	0.39	0.82	0.263	0.264	0.190	0.283	0.073	0.052	0.128	0.073	0.084	0.078	0.073	0.116	0.078	0.119	0.073	0.052
GTR+G+I	57	5508.670	5053.040	-2469.369	0.77	0.39	0.82	0.263	0.264	0.190	0.283	0.083	0.058	0.129	0.083	0.084	0.069	0.080	0.117	0.068	0.120	0.065	0.045
K2+G	49	5525.640	5133.922	-2517.849	n/a	0.05	0.81	0.250	0.250	0.250	0.250	0.069	0.069	0.112	0.069	0.112	0.069	0.069	0.112	0.069	0.112	0.069	0.069
JC+G	48	5526.749	5143.021	-2523.403	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+G	50	5530.135	5130.427	-2515.097	n/a	0.05	0.82	0.264	0.264	0.236	0.236	0.072	0.065	0.106	0.072	0.106	0.065	0.072	0.119	0.065	0.119	0.072	0.065
HKY+G	52	5530.979	5115.293	-2505.521	n/a	0.05	0.81	0.263	0.264	0.190	0.283	0.073	0.052	0.126	0.073	0.085	0.078	0.073	0.118	0.078	0.118	0.073	0.052
TN93+G	53	5540.453	5116.777	-2505.258	n/a	0.05	0.81	0.263	0.264	0.190	0.283	0.073	0.053	0.136	0.073	0.076	0.079	0.073	0.106	0.079	0.126	0.073	0.053
GTR+G	56	5568.187	5120.545	-2504.127	n/a	0.05	0.82	0.263	0.264	0.190	0.283	0.084	0.061	0.136	0.084	0.077	0.067	0.085	0.107	0.066	0.127	0.063	0.044
K2+I	49	5802.167	5410.449	-2656.113	0.45	n/a	0.79	0.250	0.250	0.250	0.250	0.070	0.070	0.110	0.070	0.110	0.070	0.070	0.110	0.070	0.110	0.070	0.070
JC+I	48	5802.611	5418.883	-2661.335	0.45	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
HKY+I	52	5806.973	5391.286	-2643.518	0.45	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.074	0.053	0.125	0.074	0.084	0.079	0.074	0.116	0.079	0.116	0.074	0.053
T92+I	50	5807.301	5407.593	-2653.680	0.45	n/a	0.79	0.264	0.264	0.236	0.236	0.074	0.066	0.104	0.074	0.104	0.066	0.074	0.116	0.066	0.116	0.074	0.066
TN93+I	53	5816.456	5392.781	-2643.260	0.45	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.074	0.053	0.133	0.074	0.076	0.079	0.074	0.106	0.079	0.124	0.074	0.053
GTR+I	56	5842.011	5394.369	-2641.039	0.45	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.089	0.065	0.133	0.088	0.076	0.065	0.090	0.106	0.063	0.124	0.060	0.042
K2	48	5964.325	5580.597	-2742.192	n/a	n/a	0.79	0.250	0.250	0.250	0.250	0.070	0.070	0.111	0.070	0.111	0.070	0.070	0.111	0.070	0.111	0.070	0.070
JC	47	5965.202	5589.464	-2747.629	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
HKY	51	5969.141	5561.444	-2729.601	n/a	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.074	0.053	0.125	0.074	0.084	0.079	0.074	0.117	0.079	0.116	0.074	0.053
T92	49	5969.856	5578.138	-2739.957	n/a	n/a	0.79	0.264	0.264	0.236	0.236	0.074	0.066	0.105	0.074	0.105	0.066	0.074	0.117	0.066	0.117	0.074	0.066
TN93	52	5978.687	5563.001	-2729.375	n/a	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.074	0.053	0.132	0.074	0.077	0.079	0.074	0.107	0.079	0.123	0.074	0.053
GTR	55	6003.912	5564.259	-2726.989	n/a	n/a	0.79	0.263	0.264	0.190	0.283	0.089	0.064	0.132	0.089	0.077	0.066	0.089	0.107	0.061	0.123	0.062	0.041

Abreviaciones: TR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

Anexo I

Tabla 19. Distancias genéticas basadas en el gen rbcL con nucleótidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1. Asterionellopsis glacialis KC509520.1																									
2. Campylosira cymbelliformis HQ912487.1	0.042																								
3. Cerataulina daemon KJ958484.1	0.040	0.037																							
4. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.038	0.026	0.025																						
5. Chaetoceros calcitrans HQ656826.1	0.038	0.026	0.025	0.000																					
6. Chaetoceros muelleri CHM1	0.038	0.026	0.025	0.000	0.000																				
7. Chaetoceros muellerii KM202105.1	0.046	0.041	0.034	0.033	0.033	0.033																			
8. Chaetoceros muellerii strain CCMP 1316 HQ912422.1	0.039	0.037	0.031	0.030	0.030	0.030	0.007																		
9. Chaetoceros neogracile EU090033.1	0.047	0.037	0.035	0.023	0.023	0.023	0.023	0.020																	
10. Chaetoceros radicans AB430666.1	0.039	0.033	0.025	0.023	0.023	0.023	0.022	0.019	0.019																
11. Chaetoceros simplex KJ958479.1	0.042	0.034	0.022	0.021	0.021	0.021	0.022	0.019	0.019	0.016															
12. Chaetoceros sp. CHX1	0.043	0.037	0.031	0.030	0.030	0.030	0.007	0.005	0.021	0.019	0.019														
13. Cymatosira belgica MF001952.1	0.046	0.009	0.046	0.031	0.031	0.031	0.045	0.038	0.037	0.042	0.038	0.042													
14. Fragilaria famelica HQ912452.1	0.039	0.039	0.033	0.039	0.039	0.039	0.042	0.038	0.041	0.042	0.037	0.038	0.047												
15. Guinardia striata NC 037998.1	0.043	0.030	0.027	0.028	0.028	0.028	0.046	0.039	0.037	0.038	0.037	0.042	0.033	0.032											
16. Phaeodactylum tricornutum KY751726.1	0.038	0.039	0.031	0.038	0.038	0.038	0.043	0.038	0.042	0.042	0.041	0.041	0.042	0.046	0.032										
17. Plagiogrammopsis vanheurckii NC 037997.1	0.043	0.015	0.048	0.036	0.036	0.036	0.048	0.042	0.042	0.039	0.043	0.045	0.013	0.046	0.036	0.048									
18. Thalassiosira antarctica DQ514795.1	0.043	0.039	0.030	0.034	0.034	0.034	0.055	0.048	0.045	0.045	0.047	0.052	0.038	0.041	0.026	0.022	0.042								
19. Thalassiosira mediterranea DQ514806.1	0.038	0.043	0.030	0.034	0.034	0.034	0.054	0.047	0.045	0.039	0.042	0.051	0.045	0.045	0.034	0.021	0.045	0.012							
20. Thalassiosira minima DQ514797.1	0.039	0.043	0.023	0.033	0.033	0.033	0.051	0.045	0.046	0.043	0.038	0.048	0.042	0.042	0.027	0.017	0.051	0.013	0.015						
21. Thalassiosira minuscula DQ514809.1	0.045	0.038	0.031	0.041	0.041	0.041	0.054	0.047	0.051	0.051	0.048	0.051	0.039	0.045	0.032	0.017	0.048	0.013	0.020	0.009					
22. Thalassiosira oceanica DQ514799.1	0.037	0.042	0.031	0.036	0.036	0.036	0.046	0.039	0.038	0.036	0.041	0.043	0.041	0.050	0.036	0.017	0.042	0.015	0.015	0.014	0.019				
23. Thalassiosira oceanica GU323224.1	0.038	0.043	0.032	0.037	0.037	0.037	0.047	0.041	0.040	0.037	0.042	0.045	0.042	0.051	0.037	0.019	0.043	0.016	0.016	0.015	0.020	0.001			
24. Thalassiosira pseudonana XM 002297482.1	0.042	0.041	0.028	0.041	0.041	0.041	0.055	0.048	0.048	0.043	0.046	0.052	0.045	0.046	0.034	0.015	0.050	0.015	0.015	0.012	0.014	0.019	0.020		
25. Thalassiosira weissflogii KJ958485.1	0.038	0.039	0.031	0.038	0.038	0.038	0.043	0.038	0.042	0.042	0.041	0.041	0.042	0.046	0.032	0.000	0.048	0.022	0.021	0.017	0.017	0.017	0.019	0.015	

Anexo J

 Tabla 20. Búsqueda de modelo filogenético de marcador rbcL basado en aminoácidos.

Table. Maximum Likelihood fits of 56 different amino acid substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	f(A)	f(R)	f(N)	f(D)	f(C)	f(Q)	f(E)	f(G)	f(H)	<i>f</i> (I)	f(L)	f(K)	f(M)	f(F)	f(P)	f(S)
mtREV24+G+I+F	68	14174.383	13603.178	-6733.446	0.59	0.67	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
mtREV24+G+F	67	14209.529	13646.721	-6756.222	n/a	0.16	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
cpREV+G+I+F	68	14269.447	13698.242	-6780.979	0.64	0.61	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
cpREV+G+F	67	14280.574	13717.765	-6791.744	n/a	0.13	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LG+G+I+F	68	14284.648	13713.443	-6788.579	0.39	0.30	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LG+G+F	67	14288.924	13726.115	-6795.919	n/a	0.15	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
WAG+G+I+F	68	14305.167	13733.962	-6798.839	0.62	0.77	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
WAG+G+F	67	14331.671	13768.862	-6817.293	n/a	0.15	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
mtREV24+I+F	67	14345.617	13782.808	-6824.266	0.70	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LG+I+F	67	14407.661	13844.852	-6855.288	0.72	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
WAG+I+F	67	14456.010	13893.201	-6879.462	0.72	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
rtREV+G+I+F	68	14549.232	13978.027	-6920.871	0.60	0.74	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
JTT+G+I+F	68	14556.684	13985.479	-6924.597	0.59	0.50	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
rtREV+G+F	67	14563.616	14000.807	-6933.265	n/a	0.15	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
JTT+G+F	67	14624.934	14062.125	-6963.924	n/a	0.15	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
rtREV+I+F	67	14711.944	14149.135	-7007.429	0.71	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
JTT+I+F	67	14799.735	14236.926	-7051.325	0.71	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Dayhoff+G+I+F	68	14817.442	14246.237	-7054.976	0.51	0.24	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Dayhoff+G+F	67	14995.332	14432.523	-7149.123	n/a	0.15	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
cpREV+I+F	67	15084.313	14521.504	-7193.614	0.37	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Dayhoff+I+F	67	15247.534	14684.725	-7275.224	0.71	n/a	0.292	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Abreviaciones: TR: General Time Reversible; JTT: Jones-Taylor-Thornton; rtREV: General Reverse Transcriptase; cpREV: General Reversible Chloroplast; mtREV24: General Reversible Mitochondrial.



Figura 30 Árbol filogenético basado en el marcador rbcL con aminoácidos, las especies de Chaetoceros de este estudio se indican con flechas rojas.

Anexo L

 Tabla 21. Distancias genéticas basadas en el marcador rbcL con aminoácidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1. Asterionellopsis glacialis KC509520.1																									
2. Campylosira cymbelliformis HQ912487.1	0.064																								
3. Cerataulina daemon KJ958484.1	0.071	0.052																							
4. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.071	0.033	0.038																						
5. Chaetoceros calcitrans HQ656826.1	0.071	0.033	0.038	0.000																					
6. Chaetoceros muelleri CHM1	0.071	0.033	0.038	0.000	0.000																				
7. Chaetoceros muellerii KM202105.1	0.085	0.061	0.053	0.051	0.051	0.051																			
8. Chaetoceros muellerii strain CCMP 1316 HQ912422.1	0.075	0.056	0.048	0.046	0.046	0.046	0.012																		
9. Chaetoceros neogracile EU090033.1	0.081	0.059	0.053	0.036	0.036	0.036	0.040	0.036																	
10. Chaetoceros radicans AB430666.1	0.071	0.051	0.040	0.033	0.033	0.033	0.040	0.035	0.031																
11. Chaetoceros simplex KJ958479.1	0.082	0.057	0.036	0.031	0.031	0.031	0.041	0.036	0.031	0.033															
12. Chaetoceros sp. CHX1	0.081	0.056	0.048	0.046	0.046	0.046	0.011	0.009	0.038	0.035	0.036														
13. Cymatosira belgica MF001952.1	0.073	0.021	0.066	0.039	0.039	0.039	0.069	0.059	0.054	0.062	0.057	0.067													
14. Fragilaria famelica HQ912452.1	0.059	0.052	0.047	0.057	0.057	0.057	0.074	0.070	0.075	0.072	0.067	0.069	0.071												
15. Guinardia striata NC 037998.1	0.074	0.041	0.042	0.041	0.041	0.041	0.065	0.055	0.054	0.059	0.057	0.057	0.044	0.046											
16. Phaeodactylum tricornutum KY751726.1	0.068	0.057	0.052	0.054	0.054	0.054	0.065	0.057	0.062	0.064	0.063	0.060	0.060	0.069	0.050										
17. Plagiogrammopsis vanheurckii NC 037997.1	0.065	0.031	0.071	0.047	0.047	0.047	0.077	0.067	0.062	0.057	0.070	0.072	0.023	0.068	0.049	0.069									
18. Thalassiosira antarctica DQ514795.1	0.076	0.059	0.050	0.054	0.054	0.054	0.086	0.075	0.068	0.062	0.075	0.080	0.057	0.062	0.041	0.038	0.056								
19. Thalassiosira mediterranea DQ514806.1	0.071	0.064	0.058	0.055	0.055	0.055	0.089	0.079	0.069	0.061	0.074	0.084	0.065	0.072	0.060	0.036	0.062	0.019							
20. Thalassiosira minima DQ514797.1	0.071	0.064	0.042	0.057	0.057	0.057	0.083	0.073	0.073	0.064	0.062	0.077	0.062	0.067	0.046	0.026	0.072	0.023	0.028						
21. Thalassiosira minuscula DQ514809.1	0.076	0.061	0.052	0.064	0.064	0.064	0.083	0.073	0.078	0.075	0.078	0.078	0.064	0.067	0.051	0.026	0.073	0.023	0.033	0.014					
22. Thalassiosira oceanica DQ514799.1	0.063	0.064	0.054	0.058	0.058	0.058	0.074	0.064	0.059	0.051	0.064	0.069	0.062	0.075	0.058	0.031	0.059	0.028	0.021	0.023	0.033				
23. Thalassiosira oceanica GU323224.1	0.066	0.067	0.056	0.061	0.061	0.061	0.077	0.066	0.062	0.053	0.066	0.071	0.065	0.077	0.061	0.033	0.061	0.030	0.023	0.026	0.035	0.002			
24. Thalassiosira pseudonana XM 002297482.1	0.073	0.061	0.049	0.061	0.061	0.061	0.087	0.077	0.072	0.064	0.075	0.082	0.068	0.067	0.054	0.028	0.074	0.024	0.026	0.016	0.021	0.028	0.031		
25. Thalassiosira weissflogii KJ958485.1	0.068	0.057	0.052	0.054	0.054	0.054	0.065	0.057	0.062	0.064	0.063	0.060	0.060	0.069	0.050	0.000	0.069	0.038	0.036	0.026	0.026	0.031	0.033	0.028	

Anexo M

•

 Tabla 22. Búsqueda de árbol filogenético basado en el marcador psbA con nucleótidos.

Table. Max	<u>cimum Likelih</u>	ood fits of	24 differe	nt nucleotid	le sub	stitut	ion m	odels															
Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	R	f(A)	<i>f</i> (T)	f(C)	<i>f</i> (G)	<i>r</i> (AT)	r(AC)	r(AG)	<i>r</i> (TA)	<i>r</i> (TC)	<i>r</i> (TG)	r(CA)	<i>r</i> (CT)	r(CG)	r(GA)	<i>r</i> (GT)	r(GC)
JC+G+I	33	3173.224	2928.982	-1431.398	0.80	0.57	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G+I	34	3182.151	2930.513	-1431.158	0.80	0.57	0.36	0.250	0.250	0.250	0.250	0.092	0.092	0.067	0.092	0.067	0.092	0.092	0.067	0.092	0.067	0.092	0.092
HKY+G+I	37	3182.799	2908.976	-1417.372	0.80	0.57	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.072	0.082	0.053	0.094	0.082	0.089	0.094	0.063	0.117	0.069
T92+G+I	35	3183.171	2924.137	-1426.965	0.80	0.57	0.36	0.275	0.275	0.225	0.225	0.101	0.082	0.060	0.101	0.060	0.082	0.101	0.074	0.082	0.074	0.101	0.082
JC+G	32	3186.231	2949.385	-1442.605	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
TN93+G+	38	3190.325	2909.108	-1416.432	0.80	0.58	0.36	0.228	0.322	0.190	0.260	0.118	0.069	0.097	0.083	0.033	0.095	0.083	0.055	0.095	0.085	0.118	0.069
K2+G	33	3194.365	2950.123	-1441.969	n/a	0.05	0.37	0.250	0.250	0.250	0.250	0.092	0.092	0.067	0.092	0.067	0.092	0.092	0.067	0.092	0.067	0.092	0.092
GTR+G+I	41	3194.406	2891.007	-1404.361	0.80	0.56	0.36	0.228	0.322	0.190	0.260	0.176	0.002	0.097	0.125	0.033	0.047	0.002	0.056	0.183	0.085	0.059	0.134
HKY+G	36	3195.550	2929.122	-1428.451	n/a	0.05	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.072	0.082	0.053	0.094	0.082	0.089	0.094	0.063	0.117	0.069
T92+G	34	3195.994	2944.356	-1438.080	n/a	0.05	0.36	0.275	0.275	0.225	0.225	0.101	0.082	0.060	0.101	0.060	0.082	0.101	0.074	0.082	0.074	0.101	0.082
TN93+G	37	3202.070	2928.247	-1427.008	n/a	0.05	0.36	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.102	0.083	0.030	0.095	0.083	0.051	0.095	0.090	0.117	0.069
GTR+G	40	3206.378	2910.372	-1415.051	n/a	0.05	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.176	0.004	0.103	0.124	0.030	0.049	0.005	0.051	0.177	0.091	0.060	0.129
JC+I	32	3215.764	2978.918	-1457.372	0.47	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+I	33	3223.877	2979.634	-1456.725	0.47	n/a	0.37	0.250	0.250	0.250	0.250	0.091	0.091	0.067	0.091	0.067	0.091	0.091	0.067	0.091	0.067	0.091	0.091
HKY+I	36	3224.922	2958.493	-1443.137	0.47	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.072	0.082	0.052	0.094	0.082	0.089	0.094	0.063	0.117	0.069
T92+I	34	3225.376	2973.738	-1452.771	0.47	n/a	0.37	0.275	0.275	0.225	0.225	0.100	0.082	0.061	0.100	0.061	0.082	0.100	0.074	0.082	0.074	0.100	0.082
TN93+I	37	3230.531	2956.708	-1441.238	0.47	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.105	0.083	0.029	0.094	0.083	0.049	0.094	0.092	0.117	0.069
GTR+I	40	3235.427	2939.422	-1429.576	0.47	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.171	0.007	0.106	0.121	0.029	0.051	0.008	0.049	0.175	0.093	0.063	0.128
JC	31	3239.295	3009.845	-1473.841	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	32	3247.399	3010.553	-1473.189	n/a	n/a	0.37	0.250	0.250	0.250	0.250	0.091	0.091	0.067	0.091	0.067	0.091	0.091	0.067	0.091	0.067	0.091	0.091
HKY	35	3248.412	2989.378	-1459.585	n/a	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.072	0.083	0.052	0.094	0.083	0.089	0.094	0.063	0.117	0.069
T92	33	3248.867	3004.624	-1469.220	n/a	n/a	0.37	0.275	0.275	0.225	0.225	0.100	0.082	0.061	0.100	0.061	0.082	0.100	0.074	0.082	0.074	0.100	0.082
TN93	36	3253.825	2987.396	-1457.588	n/a	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.117	0.069	0.106	0.083	0.029	0.094	0.083	0.048	0.094	0.093	0.117	0.069
GTR	39	3258.835	2970.223	-1445.983	n/a	n/a	0.37	0.228	0.322	0.190	0.260	0.170	0.007	0.106	0.120	0.029	0.051	0.009	0.048	0.175	0.093	0.063	0.128

Abreviaciones: TR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor

Anexo N

 Tabla 23. Distancias genéticas basadas en el marcador psbA con nucleótidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. Chaetoceros muelleri CHM1		0.000	0.003	0.005	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.002	0.004	0.003	0.005	0.003
2. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.000		0.003	0.005	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.002	0.004	0.003	0.005	0.003
3. Thalassiosira pseudonana EF067921.1	0.008	0.008		0.003	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.003	0.005	0.006	0.003	0.004	0.004	0.005	0.000
4. Thalassiosira oceanica GU323224.1	0.019	0.019	0.010		0.006	0.005	0.005	0.005	0.003	0.004	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.006	0.003
5. Asterionellopsis glacialis KC509520.1	0.016	0.016	0.025	0.029		0.004	0.004	0.005	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.004	0.005	0.007	0.006
6. Leptocylindrus danicus KC509524. 1	0.006	0.006	0.011	0.022	0.013		0.003	0.003	0.004	0.005	0.004	0.005	0.004	0.003	0.004	0.005	0.004
7. Lithodesmium undulatum KC509525.1	0.007	0.007	0.010	0.020	0.016	0.006		0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.003	0.003	0.003	0.006	0.004
8. Chaetoceros simplex KJ958479.1	0.003	0.003	0.011	0.022	0.019	0.008	0.010		0.004	0.005	0.005	0.005	0.003	0.004	0.004	0.005	0.004
9. Cydotella sp. KJ958480. 1	0.008	0.008	0.000	0.010	0.025	0.011	0.010	0.011		0.003	0.005	0.006	0.003	0.004	0.004	0.005	0.000
10. Thalassiosira weissflogii KJ958485.1	0.014	0.014	0.006	0.013	0.028	0.017	0.016	0.017	0.006		0.005	0.006	0.004	0.004	0.004	0.006	0.003
11. Phaeodactylum tricornutum KY751725.1	0.013	0.013	0.019	0.026	0.023	0.016	0.019	0.016	0.019	0.022		0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005
12. Nitzschia palea MH113811.1	0.017	0.017	0.023	0.026	0.019	0.017	0.023	0.020	0.023	0.026	0.016		0.005	0.005	0.005	0.006	0.006
13. Rhizosolenia setigera NC 037996.1	0.004	0.004	0.007	0.017	0.020	0.010	0.006	0.007	0.007	0.013	0.017	0.022		0.003	0.002	0.006	0.003
14. Plagiogrammopsis vanheurckii NC 037997	0.011	0.011	0.014	0.019	0.013	0.008	0.006	0.014	0.014	0.017	0.019	0.020	0.010		0.003	0.006	0.004
15. Guinardia striata NC 037998.1	0.007	0.007	0.010	0.020	0.020	0.010	0.007	0.010	0.010	0.013	0.017	0.022	0.003	0.010		0.006	0.004
16. Chaetoceros sp. CHX1	0.022	0.022	0.025	0.029	0.032	0.025	0.029	0.019	0.025	0.025	0.032	0.031	0.026	0.028	0.026		0.005
17. Cyclotella pseudostelligera NC 038005.1	0.008	0.008	0.000	0.010	0.025	0.011	0.010	0.011	0.000	0.006	0.019	0.023	0.007	0.014	0.010	0.025	

Anexo O

 Tabla 24. Búsqueda de árbol filogenético basado en el marcador psbA con aminoácidos.

Table. Maximum	Likelihood fi	ts of 56 di	fferent am	ino acid su	bstitu	tion n	nodels																	
Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	f(A)	f(R)	f(N)	f(D)	f(C)	f(Q)	f(E)	f(G)	f(H)	f(I)	f(L)	f(K)	f(M)	<i>f</i> (F)	f(P)	f(S)	<i>f</i> (T)	f(W)
cpREV+G	32	2894.376	2679.885	-1307.768	n/a	0.08	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
cpREV+G+I	33	2903.364	2682.181	-1307.905	0.66	0.69	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
cpREV	31	2905.684	2697.886	-1317.779	n/a	n/a	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
cpREV+I	32	2906.370	2691.879	- <mark>1313.765</mark>	0.46	n/a	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062	0.054	0.018
mtREV24+G	32	2918.227	2703.736	-1319.693	n/a	0.11	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
mtREV24+G+I	33	2925.586	2704.403	-1319.016	0.62	0.70	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
LG+G	32	2926.501	2712.010	-1323.831	n/a	0.09	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
mtREV24+I	32	2927.708	2713.217	-1324.434	0.46	n/a	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
mtREV24	31	2929.360	2721.561	-1329.617	n/a	n/a	0.072	0.019	0.039	0.019	0.006	0.025	0.024	0.056	0.028	0.087	0.168	0.023	0.053	0.060	0.055	0.072	0.088	0.029
JTT+G	32	2929.812	2715.321	-1325.486	n/a	0.07	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
LG+G+I	33	2932.148	2710.966	-1322.297	0.65	0.71	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
WAG+G	32	2933.212	2718.721	-1327.186	n/a	0.06	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
LG+I	32	2934.912	2720.421	-1328.036	0.46	n/a	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
JTT+G+I	33	2935.170	2713.987	-1323.808	0.66	0.70	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
LG	31	2936.411	2728.612	-1333.142	n/a	n/a	0.079	0.056	0.042	0.053	0.013	0.041	0.072	0.057	0.022	0.062	0.099	0.065	0.023	0.042	0.044	0.061	0.053	0.012
JTT+I	32	2938.992	2724.501	-1330.076	0.46	n/a	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
WAG+G+I	33	2940.111	2718.928	-1326.279	0.67	0.71	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
JTT	31	2941.045	2733.247	-1335.460	n/a	n/a	0.077	0.051	0.043	0.051	0.020	0.041	0.062	0.075	0.023	0.053	0.091	0.060	0.023	0.041	0.051	0.068	0.059	0.014
WAG+I	32	2944.112	2729.621	-1332.636	0.46	n/a	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
WAG	31	2945.878	2738.080	-1337.876	n/a	n/a	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070	0.061	0.014
rtREV+G	32	2966.802	2752.311	-1343.981	n/a	0.08	0.065	0.045	0.038	0.042	0.011	0.061	0.061	0.064	0.027	0.068	0.102	0.075	0.015	0.029	0.068	0.049	0.062	0.025
Dayhoff+G	32	2969.628	2755.137	-1345.394	n/a	0.06	0.087	0.041	0.040	0.047	0.034	0.038	0.050	0.089	0.034	0.037	0.085	0.081	0.015	0.040	0.051	0.070	0.059	0.011
rtREV+G+I	33	2973.923	2752.740	- <mark>134</mark> 3.185	0.65	0.73	0.065	0.045	0.038	0.042	0.011	0.061	0.061	0.064	0.027	0.068	0.102	0.075	0.015	0.029	0.068	0.049	0.062	0.025

Abreviaciones: TR: General Time Reversible; JTT: Jones-Taylor-Thornton; rtREV: General Reverse Transcriptase; cpREV: General Reversible Chloroplast; mtREV24: General Reversible Mitochondrial.



Figura 31. Árbol filogenético basado en el marcador psbA con aminoácidos, las especies de Chaetoceros de este estudio se indican con flechas rojas.

Anexo Q

 Tabla 25. Distancias genéticas basadas en el marcador molecular psbA con aminoácidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. Chaetoceros muelleri CHM1		0.000	0.009	0.000	0.006	0.007	0.004	0.005	0.004	0.006	0.009	0.008	0.007	0.003	0.005	0.005	0.006
2. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.000		0.009	0.000	0.006	0.007	0.004	0.005	0.004	0.006	0.009	0.008	0.007	0.003	0.005	0.005	0.006
3. Chaetoceros sp. CHX1	0.029	0.029		0.009	0.010	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.012	0.011	0.009	0.010	0.010	0.010
4. Chaetoceros simplex KJ958479.1	0.000	0.000	0.029		0.006	0.007	0.004	0.005	0.004	0.006	0.009	0.008	0.007	0.003	0.005	0.005	0.006
5. Thalassiosira pseudonana EF067921.1	0.014	0.014	0.032	0.014		0.004	0.007	0.007	0.007	0.000	0.006	0.009	0.008	0.007	0.008	0.008	0.000
6. Thalassiosira oceanica GU323224.1	0.020	0.020	0.038	0.020	0.006		0.008	0.008	0.008	0.004	0.008	0.010	0.009	0.008	0.009	0.009	0.004
7. Asterionellopsis glacialis KC509520.1	0.006	0.006	0.035	0.006	0.020	0.026		0.003	0.003	0.007	0.010	0.008	0.008	0.005	0.003	0.005	0.007
8. Leptocylindrus danicus KC509524.1	0.009	0.009	0.032	0.009	0.017	0.023	0.003		0.004	0.007	0.009	0.009	0.007	0.006	0.004	0.005	0.007
9. Lithodesmium undulatum KC509525.1	0.006	0.006	0.035	0.006	0.020	0.026	0.003	0.006		0.007	0.010	0.008	0.008	0.005	0.004	0.005	0.007
10. Cyclotella sp. KJ958480.1	0.014	0.014	0.032	0.014	0.000	0.006	0.020	0.017	0.020		0.006	0.009	0.008	0.007	0.008	0.008	0.000
11. Thalassiosira weissflogii KJ958485.1	0.029	0.029	0.034	0.029	0.014	0.020	0.035	0.032	0.035	0.014		0.010	0.011	0.009	0.010	0.009	0.006
12. Phaeodactylum tricornutum KY751725.1	0.023	0.023	0.052	0.023	0.032	0.038	0.023	0.026	0.026	0.032	0.041		0.009	0.008	0.009	0.009	0.009
13. Nitzschia palea MH113811.1	0.020	0.020	0.043	0.020	0.029	0.035	0.020	0.017	0.023	0.029	0.043	0.026		0.008	0.008	0.008	0.008
14. Rhizosolenia setigera NC 037996.1	0.003	0.003	0.031	0.003	0.017	0.023	0.009	0.011	0.009	0.017	0.031	0.026	0.023		0.006	0.004	0.007
15. Plagiogrammopsis vanheurckii NC 037997	0.009	0.009	0.038	0.009	0.023	0.029	0.003	0.006	0.006	0.023	0.038	0.026	0.023	0.011		0.005	0.008
16. Guinardia striata NC 037998.1	0.008	0.008	0.031	0.008	0.023	0.029	0.009	0.011	0.011	0.023	0.031	0.026	0.023	0.006	0.011		0.008
17. Cyclotella pseudostelligera NC 038005.1	0.014	0.014	0.032	0.014	0.000	0.006	0.020	0.017	0.020	0.000	0.014	0.032	0.029	0.017	0.023	0.023	

Anexo R

 Tabla 26. Búsqueda de modelo filogenético del marcador 18S basado en nucleótidos.

Table. Maxi	imum Likelih	ood fits of	24 differen	t nucleotid	e sub	stitut	ion m	odels															
Model	Parameters	BIC	AICc	InL	(+/)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
TN93+G	49	11994.351	11581.532	-5741.693	n/a	0.20	1.43	0.264	0.274	0.194	0.269	0.055	0.039	0.118	0.053	0.149	0.054	0.053	0.211	0.054	0.116	0.055	0.039
T92+G	46	11994.613	11607.061	-5757.466	n/a	0.19	1.42	0.269	0.269	0.231	0.231	0.055	0.048	0.136	0.055	0.136	0.048	0.055	0.158	0.048	0.158	0.055	0.048
K2+G	45	12002.896	11623.766	-5766.822	n/a	0.19	1.41	0.250	0.250	0.250	0.250	0.052	0.052	0.146	0.052	0.146	0.052	0.052	0.146	0.052	0.146	0.052	0.052
TN93+G+I	50	12003.443	11582.202	-5741.026	0.23	0.32	1.44	0.264	0.274	0.194	0.269	0.055	0.039	0.117	0.053	0.151	0.054	0.053	0.214	0.054	0.115	0.055	0.039
T92+G+I	47	12004.610	11608.635	-5757.251	0.12	0.24	1.42	0.269	0.269	0.231	0.231	0.055	0.048	0.136	0.055	0.136	0.048	0.055	0.158	0.048	0.158	0.055	0.048
HKY+G	48	12004.836	11600.439	-5752.150	n/a	0.19	1.45	0.264	0.274	0.194	0.269	0.056	0.039	0.160	0.054	0.115	0.055	0.054	0.162	0.055	0.156	0.056	0.039
HKY+G+I	49	12012.604	11599.786	-5750.820	0.15	0.26	1.46	0.264	0.274	0.194	0.269	0.056	0.039	0.160	0.054	0.115	0.055	0.054	0.163	0.055	0.157	0.056	0.039
K2+G+I	46	12012.716	11625.164	-5766.518	0.15	0.26	1.42	0.250	0.250	0.250	0.250	0.052	0.052	0.147	0.052	0.147	0.052	0.052	0.147	0.052	0.147	0.052	0.052
GTR+G	52	12024.506	11586.422	-5741.129	n/a	0.20	1.43	0.264	0.274	0.194	0.269	0.065	0.035	0.119	0.062	0.150	0.057	0.048	0.212	0.045	0.117	0.058	0.033
GTR+G+I	53	12031.604	11585.098	-5739.464	0.26	0.34	1.44	0.264	0.274	0.194	0.269	0.065	0.035	0.118	0.063	0.151	0.056	0.048	0.214	0.045	0.116	0.057	0.032
JC+G	44	12150.991	11780.284	-5846.083	n/a	0.20	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G+I	45	12161.182	11782.052	-5845.965	0.09	0.24	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
TN93+I	49	12243.468	11830.650	-5866.252	0.37	n/a	1.33	0.264	0.274	0.194	0.269	0.058	0.041	0.111	0.056	0.148	0.057	0.056	0.210	0.057	0.109	0.058	0.041
T92+I	46	12250.100	11862.548	-5885.210	0.37	n/a	1.32	0.269	0.269	0.231	0.231	0.058	0.050	0.132	0.058	0.132	0.050	0.058	0.153	0.050	0.153	0.058	0.050
K2+I	45	12257.317	11878.188	-5894.032	0.37	n/a	1.31	0.250	0.250	0.250	0.250	0.054	0.054	0.142	0.054	0.142	0.054	0.054	0.142	0.054	0.142	0.054	0.054
HKY+I	48	12261.659	11857.263	-5880.562	0.37	n/a	1.33	0.264	0.274	0.194	0.269	0.059	0.041	0.154	0.057	0.111	0.058	0.057	0.156	0.058	0.151	0.059	0.041
GTR+I	52	12270.723	11832.639	-5864.238	0.37	n/a	1.33	0.264	0.274	0.194	0.269	0.067	0.036	0.112	0.065	0.149	0.060	0.049	0.210	0.048	0.109	0.061	0.034
JC+I	44	12395.683	12024.975	-5968.429	0.37	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
TN93	48	12535.224	12130.827	-6017.344	n/a	n/a	1.28	0.264	0.274	0.194	0.269	0.059	0.042	0.112	0.057	0.144	0.058	0.057	0.203	0.058	0.110	0.059	0.042
T92	45	12543.023	12163.893	-6036.885	n/a	n/a	1.28	0.269	0.269	0.231	0.231	0.059	0.051	0.130	0.059	0.130	0.051	0.059	0.151	0.051	0.151	0.059	0.051
K2	44	12548.907	12178.200	-6045.041	n/a	n/a	1.28	0.250	0.250	0.250	0.250	0.055	0.055	0.140	0.055	0.140	0.055	0.055	0.140	0.055	0.140	0.055	0.055
HKY	47	12556.179	12160.205	-6033.036	n/a	n/a	1.28	0.264	0.274	0.194	0.269	0.060	0.042	0.151	0.058	0.109	0.059	0.058	0.154	0.059	0.148	0.060	0.042
GTR	51	12560.992	12131.330	-6014.586	n/a	n/a	1.28	0.264	0.274	0.194	0.269	0.069	0.036	0.113	0.067	0.144	0.062	0.049	0.204	0.048	0.110	0.063	0.034
JC	43	12683.834	12321.549	-6117.719	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083

Abreviacion: TR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor

Anexo S

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	2
1. Asterionellopsis glacialis HQ912646.1																							
2. Chaetoceros curvisetus AY229895.1	0.105																						
3. Chaetoceros debilis AY229896.1	0.105	0.001																					
4. Chaetoceros calcitrans AY485449.1	0.125	0.098	0.098																				
5. Chaetoceros calcitrans f. pumilus strain CCMP1315 AY625894.1	0.125	0.098	0.098	0.000																			
6. Chaetoceros muelleri AY625896.1	0.104	0.006	0.005	0.099	0.099																		
7. Chaetoceros calcitrans CHC1	0.126	0.097	0.097	0.001	0.001	0.098																	
8. Chaetoceros muelleri CHM1	0.126	0.097	0.097	0.001	0.001	0.098	0.000																
9. Chaetoceros sp. CHX1	0.106	0.006	0.006	0.100	0.100	0.008	0.099	0.099															
10. Cyclotella cryptica FR865514.1	0.096	0.135	0.135	0.145	0.145	0.135	0.146	0.146	0.134														
11. Cyclotella pseudostelligera KP137419.1	0.087	0.115	0.115	0.137	0.137	0.117	0.138	0.138	0.117	0.045													
12. Cydotella sp. KP137420.1	0.087	0.116	0.116	0.137	0.137	0.118	0.138	0.138	0.118	0.047	0.001												
13. Chaetoceros sp. DQ830988.1	0.124	0.099	0.099	0.005	0.005	0.100	0.006	0.006	0.101	0.144	0.136	0.136											
14. Chaetoceros sp. EF473734.1	0.125	0.098	0.098	0.000	0.000	0.099	0.001	0.001	0.100	0.145	0.137	0.137	0.005										
15. Chaetoceros neogracile EU090012.1	0.119	0.042	0.042	0.109	0.109	0.041	0.108	0.108	0.041	0.144	0.127	0.128	0.112	0.109									
16. Guinardia striata KT861015.1	0.110	0.122	0.121	0.137	0.137	0.120	0.138	0.138	0.123	0.114	0.115	0.115	0.136	0.137	0.136								
17. Chaetoceros muellerii strain CCMP1316 HQ912558.1	0.104	0.006	0.005	0.099	0.099	0.000	0.098	0.098	0.008	0.135	0.117	0.118	0.100	0.099	0.041	0.120							
18. Chaetoceros gracilis JQ217338.1	0.108	0.006	0.005	0.100	0.100	0.010	0.099	0.099	0.003	0.136	0.119	0.120	0.101	0.100	0.043	0.125	0.010						
19. Nitzschia palea AJ867002.1	0.055	0.105	0.105	0.122	0.122	0.107	0.123	0.123	0.106	0.105	0.095	0.096	0.123	0.122	0.118	0.115	0.107	0.109					
20. Phaeodactylum tricornutum FR865506.1	0.054	0.116	0.116	0.132	0.132	0.115	0.134	0.134	0.118	0.119	0.113	0.113	0.133	0.132	0.131	0.111	0.115	0.120	0.053				
21. Rhizosolenia setigera FR865516.1	0.146	0.166	0.166	0.172	0.172	0.165	0.173	0.173	0.166	0.141	0.136	0.136	0.174	0.172	0.165	0.095	0.165	0.167	0.148	0.152			
22. Thalassiosira pseudonana HF565127.1	0.085	0.127	0.127	0.142	0.142	0.127	0.143	0.143	0.129	0.020	0.037	0.038	0.143	0.142	0.137	0.115	0.127	0.131	0.101	0.112	0.143		
23. Thalassiosira weissflogii KY399779.1	0.082	0.115	0.115	0.133	0.133	0.115	0.134	0.134	0.115	0.042	0.033	0.034	0.137	0.133	0.121	0.109	0.115	0.117	0.091	0.109	0.135	0.036	

 Tabla 27. Distancias genéticas basadas en el marcador 185 con nucleótidos.

Protocolo de extracción de ADN de microalgas Chaetoceros

- 1. Obtención de muestra
 - 1.1 Agregar 20 ml de cultivo de microalga en fase temprana exponencial (tercer día de cultivo) en un tubo Falcon de 50 ml.
 - 1.2 Centrifugar a 1139 x g (2,500 rpm) durante 20 min a 4 °C.
 - 1.3 Desechar el sobrenadante.
 - 1.4 Depositar la muestra proveniente de tubos Falcon de 50 ml en un tubo Eppendorf de 1.7 ml.
 - 1.5 Centrifugar durante 1 min a 5,900 x g (8,000 rpm).
 - 1.6 Descartar el sobrenadante resultante.
- 2. <u>Pretratamiento de muestra</u>
 - 2.1 Agregar 200 μl de PBS 1X (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2.7 mM KCl; pH 7.4)
 - 2.2 Centrifugar las muestras durante 1 min a 5,900 x g (8,000 rpm).
 - 2.3 Agregar 20 μl de proteinasa K (20 mg ml⁻¹) e incubar las muestras a 56 °C durante 15 min.
- 3. Adicionar 200 μ l de amortiguador AL del kit DNeasy. Mezclar cuidadosamente (no vórtex) e incubar a 56 °C durante 10 minutos.
- 4. Agregar 200 μl de etanol (96-100 %) a la muestra y mezclar cuidadosamente (no vórtex).
- 5. Pipetear la mezcla del paso 3 (~ 620 μ l) en la columna de DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a 5,900 x g 8000 rpm durante 1 min (Desechar tubo de recolección).
- Colocar la columna de centrifugado DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2ml, agregar 500 μl de amortiguador AW1 y centrifugar durante 1 min a 5,900 x g (8,000 rpm). Desechar tubo de recolección).
- Colocar la columna de centrifugado DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2ml, agregar 500 μl de amortiguador AW2 y centrifugar durante 3 min a 13,400 x g (12,000 rpm). (Desechar tubo de recolección).
- 8. Colocar la columna de centrifugado DNeasy Mini en un tubo Eppendorf de 1.7 ml. previamente esterilizado y agregar 75 μl de amortiguador AE a 60 °C directamente sobre la membrana DNeasy. Incubar a temperatura ambiente durante 3-5 min y centrifugar durante 1 min a 5,900 x g (8,000 rpm). Después de centrifugar, nuevamente agregar 75 μl de amortiguador AE a 60 °C directamente sobre la membrana DNeasy. Incubar a temperatura ambiente durante 3-5 min y centrifugar durante 3-5 min y centrifugar durante 1.5 min y centrifugar.
- Finalmente agregar ~8 μl de RNasa (30 mg ml⁻¹) e incubar a 37 °C durante 40 min. Posterior a esto guardar muestras a -20 °C hasta su siguiente uso.

Recomendaciones:

Utilizar solo muestras de cultivo de ~20 ml. El manejo de las muestras debe ser estrictamente cuidadoso (manipular a 4 °C). La centrifugación se realiza a temperatura ambiente.