

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE BACHILLER EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

COMPARACIÓN DE GENES DE ARN RIBOSOMAL 18S DE TRES CEPAS DEL
GÉNERO *EUGLENA*: *E. PAILASENSIS*, *E. MUTABILIS* CPCC293 Y UNA
EUGLENA ENCONTRADA EN UN RIACHUELO ÁCIDO DEL PARQUE
NACIONAL VOLCÁN RINCÓN DE LA VIEJA

JOSE PABLO CRUZ MADRIGAL

CARTAGO, 2012

COMPARACIÓN DE GENES DE ARN RIBOSOMAL 18S DE TRES CEPAS DEL GÉNERO *EUGLENA*: *E. PAILASENSIS*, *E. MUTABILIS* CPCC293 Y UNA EUGLENA ENCONTRADA EN UN RIACHUELO ÁCIDO DEL PARQUE NACIONAL VOLCÁN RINCÓN DE LA VIEJA

Jose Pablo Cruz Madrigal *

RESUMEN

En el Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja se encuentran al menos dos ambientes de extrema acidez colonizados por organismos del género *Euglena*. Este trabajo procura estimar la relación filogenética que existe entre tres cepas de este género, dos aisladas de distintos ambientes ácidos del Parque Nacional (*E. pailasensis* y una cepa proveniente de un riachuelo ácido) y una proveniente de una colección, mediante la comparación de genes de ARN ribosomal 18S. Para ello se realizó una extracción de ADN de cada cepa, seguida de una amplificación por PCR y posterior secuenciación. Las secuencias fueron comparadas contra las de las bases de datos del GenBank y se alinearon aquellas con mayor grado de identidad. A partir del alineamiento se construyeron filogramas que agruparon las cepas según su parentesco. Como resultado se obtuvo ADN genómico de buena calidad, el cual fue amplificado con éxito. Esto permitió obtener secuencias legibles y traslapantes que fueron ensambladas para secuenciar la mayor parte del gen. El alineamiento de las secuencias mostró que *E. pailasensis* y la nueva cepa del riachuelo ácido corresponden a la misma especie. Se construyó un árbol de unión de vecinos y uno de probabilidad máxima con topologías casi idénticas, que parecen indicar que las cepas aisladas del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja no corresponden a una nueva especie como fue descrito en estudios anteriores, pues no se observa una clara distinción con respecto a *E. mutabilis*.

ABSTRACT

At least two extreme acid environments colonized by organisms belonging to the *Euglena* genus can be found in Volcán Rincón de la Vieja National Park. This research makes an attempt to estimate the phylogenetic relationship between three strains from this genus by comparison of the 18S ribosomal RNA genes. Two of this strains were isolated from different acid environments from the National Park (*E. pailasensis* and one strain isolated from an acid stream), and the last one was obtained from a collection. For the purpose, a DNA extraction was performed on each strain, followed by amplification by PCR and sequencing. The sequences were compared against the GenBank databases and the ones with higher identity were used for the alignment, from which phylograms grouping the strains were constructed. As a result, good quality genomic DNA was obtained and successfully amplified. This allowed the production of legible and overlapping sequences, which were assembled up to most part of the gene. The alignment showed that *E. pailasensis* and the new strain from the acid stream belong to the same species. Neighbor joining and maximum likelihood trees with almost identical topologies were constructed, and seem to indicate that the strains isolated from Volcán Rincón de la Vieja National Park do not belong to a new species as described in previous research, since no clear distinction with *E. mutabilis* can be observed.

COMPARACIÓN DE GENES DE ARN RIBOSOMAL 18S DE TRES CEPAS DEL GÉNERO *EUGLENA*: *E. PAILASENSIS*, *E. MUTABILIS* CPCC293 Y UNA EUGLENA ENCONTRADA EN UN RIACHUELO ÁCIDO DEL PARQUE NACIONAL VOLCÁN RINCÓN DE LA VIEJA

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

M.Sc. Alejandro Hernández Soto

Profesor Asesor ITCR

M.Sc. Walter Ismael Hernández Ascencio

Asesor CIBCM

M.Sc. Jhonny Peraza Moraga

Lector

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Marco y Maribell, quienes desinteresadamente se han preocupado por darme todo, sin esperar absolutamente nada a cambio. Así como ustedes depositaron su confianza en mí, yo deposito en ustedes mis más humildes y sinceras gracias. Sin ustedes no sería nada.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Walter Hernández, mi tutor por parte del CIBCM, por compartir su conocimiento y experiencia, y por guiarme a lo largo de este proyecto. Sin su ayuda y dedicación jamás hubiera sido posible. Asimismo, doy gracias al CIBCM por la oportunidad de vivir esta experiencia y por enseñarme que en este país sí existe un gran interés por el desarrollo científico. Agradezco mucho al ITCR por ser fuente de conocimiento y desarrollo, y por brindarme la oportunidad de crecer y superarme como persona, año tras año, para poder ser un miembro activo de la sociedad costarricense. Agradezco a Alejandro, mi tutor por parte del ITCR, por su desinteresada colaboración y a los profesores Ana Abdelnour y William Sánchez, no sólo por brindarme parte esencial de sus conocimientos, sino por demostrar que un educador no es sólo alguien que imparte una lección o un conocimiento, sino es alguien que muestra interés real por el desarrollo personal del estudiante y el bienestar del país, para generar cambio y lograr un mejor futuro.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
ACREDITACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Ambientes extremos y organismos extremófilos.....	4
Extremófilos procariotas y eucariotas	7
Importancia y aplicación de los extremófilos.....	8
Extremófilos y ambientes extremos ácidos	10
Técnicas aplicadas al estudio de extremófilos	12
Análisis filogenético de especies	13
ARN ribosomal 18S.....	15
El género <i>Englena</i>	16
el género <i>englena</i> en ambientes extremos ácidos.....	17
Importancia del género <i>Englena</i>	18
Taxonomía y relaciones evolutivas de los euglénidos	18

OBJETIVOS.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Origen de las cepas.....	21
Extracción de ADN.....	21
Amplificación del ADNr 18S.....	22
Secuenciación.....	22
Alineamiento de secuencias.....	23
Construcción de árboles filogenéticos.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	32
Obtención de ADN genómico y amplificación.....	32
Alineamiento y análisis de las secuencias.....	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Clasificación de los extremófilos que habitan en la Tierra	6
2	Resultados Nanodrop para tres productos de PCR purificados	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Visualización del gel de agarosa de la extracción inicial de ADN	24
2	Visualización del gel de agarosa de los productos de PCR purificados	25
3	Segmentos del alineamiento de <i>E. pailasensis</i> , <i>Euglena sp.</i> de Pailas Frías y <i>Euglena sp.</i> CRRdV	27
4	Filograma de unión de vecinos (<i>neighbor joining</i>)	29
5	Filograma de probabilidad máxima (<i>maximum likelihood</i>)	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Secuencias nucleotídicas de los imprimadores	53
2	Esquema de secuenciación	54
3	Secuencia nucleotídica de <i>E. pailasensis</i>	55
4	Secuencia nucleotídica de <i>Englena sp.</i> de Pailas Frías	56
5	Secuencia nucleotídica de <i>E. mutabilis</i> CPCC293	57
6	Resultados del BLAST para las cepas <i>E. pailasensis</i> y <i>Englena sp.</i> de Pailas Frías	58
7	Resultados del BLAST para la cepa <i>Englena mutabilis</i> CPCC293	59
8	Resultados del BLAST para especies diferentes de <i>E. mutabilis</i>	60
9	Secuencias utilizadas en el alineamiento	62
10	Alineamiento de las secuencias	64
11	Matriz de identidad del alineamiento	69

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de ambientes que se encuentran en el planeta permite hallar organismos que a lo largo del tiempo han logrado adaptarse a condiciones extremas de temperatura, salinidad, acidez, presión, etc. Costa Rica es un país con innumerables ecosistemas de infinita riqueza ecológica, con hábitats de gran interés. Entre ellos destacan ambientes extremadamente ácidos dentro del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja.

Este macizo ubicado al noreste de Liberia, en la provincia de Guanacaste, presenta actividad en forma de fuentes termales, fumarolas, géiseres de vapor, lagos ricos en sulfuros y pozos de lodo hirviendo. Esta actividad da origen a temperaturas cercanas a los 100°C y altas concentraciones iónicas. Además, el escape de dióxido de azufre y ácido sulfúrico hacia la superficie genera ambientes con pH extremadamente bajo (Seckbach, 2006).

En ambientes extremos como los descritos, es muy común encontrar diferentes procariotas. Estos organismos y sus mecanismos de adaptación han sido ampliamente estudiados y han recibido mucha atención por parte de la comunidad científica. Por otra parte, los eucariotas que proliferan en estos ambientes son de poblaciones más escasas y su estudio es limitado. Es por ello que el hallazgo de un eucariota extremófilo despierta especial interés, ya que abre un abanico de nuevos sistemas de adaptación, nuevas rutas metabólicas y la necesidad de replantear los límites de la vida tal como la conocemos (Ackerman *et al.*, 2008).

En el año 2002, Sittenfeld *et al.* ubicaron parches de color verde en la superficie de uno de los pozos de lodo de las faldas del Volcán Rincón de la Vieja; un ambiente con elevadas temperaturas (35-98°C) y bajo pH (2,0-4,0). Estos se encontraban presuntamente conformados por microorganismos fotosintéticos. Un análisis

morfológico, fisiológico y filogenético propuso que se trataba de una especie previamente desconocida a la que denominaron *Euglena pailasensis* (Sittenfeld *et al.*, 2002).

En el año 2004, en un riachuelo ácido (pH de 2,41 y temperatura de 27,3°C) de un lugar conocido como Pailas Frías ubicado en el sector de Santa María de este mismo volcán, se analizaron formaciones filamentosas conformadas por algas, diatomeas y en menor proporción euglenoides morfológicamente similares a *E. pailasensis* (Hernández, 2012).

En el año 2010 se recolectaron muestras de los euglenoides de Pailas Frías para desarrollar cultivos en laboratorio, con el objetivo de estimar la relación filogenética entre esta cepa, *E. pailasensis* y *E. mutabilis* mediante la comparación entre las secuencias del gen de ARN ribosomal 18S. Con este objetivo como meta, el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular logró desarrollar un cultivo viable de la cepa encontrada en Pailas Frías, así como de *E. pailasensis* y la cepa de *E. mutabilis* CPCC293. Una vez establecidos los cultivos de estas euglenas resta lo que conforma este Trabajo Final de Graduación (TFG). En el presente año, a partir de los cultivos se realizaron extracciones de ADN y amplificaciones de los genes de ARNr 18S, los cuales fueron secuenciados y comparados para así determinar el grado de parentesco genético entre las tres cepas de *Euglena sp.*

En un país como Costa Rica, fuente incuestionable de gran riqueza biológica, se debe tomar como uno de los principales intereses el estudio de la diversidad y el potencial que esta puede tener para repercutir positivamente en la sociedad. Por ello uno de los principales aportes que se rescatan del trabajo de investigación que desarrolla el CIBCM es el desarrollo científico que amplía el conocimiento de la biodiversidad costarricense, especialmente la diversidad microbiana en ambientes extremos ácidos. Con ello se contribuye directamente a desarrollar estrategias de conservación de este tipo de ecosistemas, además de sentar base para futuras investigaciones enfocadas a la comprensión de los sistemas de adaptación de los organismos en condiciones ácidas.

Por otra parte, los aportes en materia bioquímica y molecular extraídos del estudio de este tipo de organismos contribuyen enormemente a diversas ramas de la biotecnología. Con ello se pueden rescatar infinidad de moléculas, enzimas, sistemas de transporte,

mecanismos de defensa, genes de resistencia, etc., con numerosas aplicaciones en los campos de la investigación y la industria (Chadha & Patel, 2008).

Por último, como meta principal del trabajo, la información obtenida acerca de las relaciones entre los organismos en estudio brindará a la comunidad científica las herramientas para dilucidar el origen y relación evolutiva de estos, con lo que se podrá comprender mejor la biodiversidad que conforma los distintos ecosistemas presentes en el territorio nacional para así aumentar el aprecio por la riqueza natural del país y el interés por su conservación. Es por ello que se destaca la utilización de técnicas moleculares en este TFG, ya que ofrecen un mecanismo de caracterización muy fiable y específico a la hora de establecer relaciones de filogenia entre dos o más especies.

REVISIÓN DE LITERATURA

AMBIENTES EXTREMOS Y ORGANISMOS EXTREMÓFILOS

La superficie de la corteza terrestre se encuentra formada por un gran conjunto de cuerpos geográficos muy diversos, que en su mayoría se encuentran cubiertos por algún tipo de organismo vivo. Las diversas características geográficas y meteorológicas de cada uno de estos ambientes proporcionan sustento a estos seres, al brindarles una fuente de energía, agua y demás condiciones específicas que cada uno de ellos necesita para desarrollarse y proliferar (Wharton, 2002).

Algunos ambientes son más propicios para que se desarrolle vida en ellos. Estos ambientes son capaces de proveer los elementos necesarios para la subsistencia de los organismos. Por otra parte, ciertos ambientes se caracterizan por la presencia o ausencia de elementos clave necesarios para el desarrollo de la vida. Entre estos elementos pueden encontrarse la escasez de agua, la presencia de un componente tóxico en elevadas concentraciones o la ausencia total de una fuente de energía apropiada, lo que dificulta la proliferación de la vida (Oarga, 2009). Por ello la presencia y desarrollo de algún tipo de organismo adquiere especial interés, ya que la adquisición de mecanismos especializados a través de la evolución les permitieron proliferar donde la mayoría de seres vivos perecería al instante (Seckbach, 2006).

Los ambientes extremos son entornos hostiles para la mayoría de los seres vivos. Muchos organismos ni siquiera serían capaces de soportarlos por cortos períodos de tiempo. En este tipo de ambientes las condiciones de temperatura, pH, concentración de metales, osmolaridad, radiación, etc., se alejan de forma significativa del rango normal en que la mayoría de seres vivos se desarrolla. Esto limita en gran medida la diversidad biológica presente en ellos (Rothchild & Mancinelli, 2001). Por ejemplo, la mayoría de organismos vivos parecen al ser expuestos, de forma prolongada, a una temperatura

superior a los 45°C. Por ello los ambientes con temperaturas superiores a este valor, como fuentes termales, géiseres o fumarolas, se consideran extremos (Madigan *et al.*, 2009).

Los organismos que habitan estos ambientes extremos son conocidos como extremófilos. En su mayoría son organismos unicelulares de los dominios Archaea y Bacteria, aunque también existen en menor proporción extremófilos del dominio Eukarya. A su vez se conoce como extremotolerantes a aquellos que no son capaces de desarrollarse en forma óptima en este tipo de ambientes o sólo son capaces de sobrevivir en estado de latencia. Estos alcanzan pleno desarrollo al retomar sus condiciones normales para prosperar (Hernández, 2012).

Los extremófilos se clasifican de acuerdo con el ambiente en que son capaces de desarrollarse a plenitud (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los extremófilos que habitan en la Tierra

Parámetro ambiental	Tipo	Localización y condiciones	Ejemplos
Temperatura	Psicrófilos	-20°C – < 15°C	<i>Psychrobacter</i>
	Termófilos	50°C – 80°C	Algunos insectos
	Hipertermófilos	80°C – >100°C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
pH	Acidófilos	pH 0 – 4 Aguas termales	<i>Picrophilus oshimae</i> <i>Cyanidium caldarium</i>
	Alcalófilos	pH >9 Lagos carbonatados	<i>Natronobacterium</i> <i>Spirulina</i>
Salinidad	Halófilos	Lagos salados Soluciones salinas hasta saturación	Cyanobacteria <i>Dunaliella</i> Halobacteriaceae
Desecación	Xerófilos	Condiciones anhidrobióticas Baja actividad del agua	Halófilos extremos Líquenes Algunos nemátodos
Presión hidrostática	Barófilos Piezófilos	Alto peso Alta presión	<i>Colwellia piezophila</i> MT41 Tolera >100 MPa
Radiación UV e ionizante		Altos niveles de radiación	Cyanobacteria Plantas desérticas <i>Deinococcus radiodurans</i>
Solventes orgánicos	CO ₂ gaseoso Soluciones orgánicas tóxicas	Sobreviven en gas puro y agentes dañinos	Cyanidiaceae (desarrollo en CO ₂ puro)

Fuente: Oren & Seckbach, 2001

Debido a que la clasificación de los extremófilos se realiza de acuerdo al entorno en que se desarrollan, un organismo que habita un ambiente caracterizado por dos o más condiciones extremas se conoce como poliextremófilo (Chadha & Patel, 2008). Un ejemplo de esto son los microorganismos que habitan la mayoría de fuentes termales de

origen geológico. Ellos son poliextremófilos ya que la temperatura es muy elevada y el pH es muy bajo. Ambos son factores extremos que limitan el desarrollo de la vida en estos ambientes (Rothchild & Mancinelli, 2001).

EXTREMÓFILOS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS

La capacidad metabólica para soportar condiciones adversas se ha desarrollado de forma muy variada en los organismos vivos, quienes han poblado el planeta por aproximadamente 3800 millones de años, tiempo en que han logrado adaptarse continuamente a las condiciones que rigen los entornos en que se desarrollan (Torsvik *et al.*, 2002).

En términos evolutivos, los seres eucariotas han recorrido una distancia mucho menor que los procariotas, quienes les aventajan en unos 2000 millones de años de evolución. Por esta razón los eucariotas se han visto más limitados a través del tiempo para desarrollar mecanismos de adaptación a las diversas condiciones que los rodean (Oren & Seckbach, 2001). Por ejemplo, las diversas especies de microorganismos eucariotas sólo son capaces de metabolizar un rango limitado de fuentes de carbono (componentes fácilmente convertidos en glucosa o acetil-coA). Por el contrario, los procariotas metabolizan un grupo mucho más variado de compuestos carbonados, desde compuestos de un carbono (metano o monóxido de carbono) hasta compuestos policíclicos complejos. Aunado a esto, la capacidad de utilizar compuestos inorgánicos como fuente de energía también se ha mostrado exclusiva de procariotas (Oren & Seckbach, 2001).

Es por todo lo anterior que la gran mayoría de microorganismos extremófilos son seres procarióticos. Debido a ello la ciencia ha mostrado mucho interés en hallar y caracterizar nuevos seres nucleados con capacidad de sobrevivir e inclusive dominar ambientes donde la vida en sí ya es muy escasa (Prasanna *et al.*, 2011). Por otra parte, el rango de aplicaciones relacionadas al descubrimiento de nuevas propiedades de interés en

organismos extremófilos se incrementa al contar con nuevos mecanismos desarrollados por seres eucarióticos como herramientas para adaptarse a entornos hostiles.

IMPORTANCIA Y APLICACIÓN DE LOS EXTREMÓFILOS

El interés por la búsqueda de microorganismos extremófilos se ha intensificado en los últimos años a raíz de la incorporación de técnicas de análisis molecular al estudio de ecosistemas. Esto ha revelado la presencia de vida en lugares que anteriormente se creían asépticos, lo cual ha llevado incluso a redefinir los límites físico-químicos de la vida (Oarga, 2009).

La biología evolutiva no sólo se beneficia al encontrar los organismos más extremos y nuevos taxones, sino al entender la evolución a nivel molecular. Esto hace de los organismos extremófilos algo de gran importancia, ya que logran dar indicios de qué tipo de reacciones dieron origen a la química de la vida, al desarrollarse en condiciones que mimetizan aquellas que dieron origen a la vida en el planeta (Baross & Brazelton, 2008).

La capacidad inherente de los organismos extremófilos para resistir y desarrollarse en condiciones extremas ofrece un inmenso potencial para el ser humano, quien ha encontrado en su fisiología, metabolismo, propiedades bioquímicas y estructura molecular una fuente invaluable de biorecursos, con numerosas aplicaciones en el campo de la biotecnología. Entre ellos se encuentran gran cantidad de proteínas, enzimas, compuestos y procesos bioquímicos y moleculares especializados para desarrollarse en condiciones extremas. Estos son actualmente utilizados para desarrollar novedosos procesos biocatalíticos más precisos, rápidos y ambientalmente amigables (van den Burg, 2003).

Como alternativa a los procesos químicos convencionales, los procesos biocatalíticos han ganado campo en las últimas décadas al ser más específicos y eficientes que sus análogos químicos, además de ser reutilizables. Sin embargo, debido a la limitada

estabilidad que ofrecen, su producción y aplicación también se ven limitadas. Es por ello que las llamadas extremoenzimas han llegado a ser de gran interés a nivel industrial, al proveer de catalizadores biológicos capaces de desarrollar diversos procesos químicos en condiciones muy comunes en los sistemas de producción, pero muy apartados de los límites fisicoquímicos de la vida conocida (Eichler, 2001).

Las extremoenzimas tienen un enorme potencial en la agricultura, síntesis química y procesos farmacéuticos. Al igual que sus enzimas homólogas provenientes de organismos no extremófilos, éstas se caracterizan por su alta actividad, al incrementar la especificidad y la actividad catalítica, empleando mecanismos catalíticos similares. La principal diferencia son las condiciones en que se desempeñan, ya que las extremoenzimas se definen por su inherente estabilidad en condiciones especiales o extremas (Chadha & Patel, 2008).

Actualmente la industria de extremoenzimas es vista con mucho interés y se ha convertido en una interesante fuente de inversión de capital. Por ejemplo, la industria de los detergentes se ha beneficiado con el desarrollo de proteasas y peptidasas capaces de actuar a baja temperatura y a pH elevado (Horikoshi, 1999). Diversas ADN-polimerasas termoestables, como las extraídas de *Thermus aquaticus* o *Pyrococcus furiosus*, hacen posible las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) en ensayos de biología molecular (Chien *et al.*, 1976; Lundberg *et al.*, 1991). Criopreservantes y proteínas anticongelantes son empleados para preservación de tejidos y órganos (Rothchild & Mancinelli, 2001). Además, una enzima proveniente de *Pyrococcus furiosus* es muy utilizada en el reciclaje de neumáticos (Bredberg *et al.*, 2001).

Por ejemplo, en el año 2004 se secuenció el genoma completo del hipertermófilo halotolerante *Thermus thermophilus*, debido al alto potencial que ofrecen las proteínas termoestables que se puedan extraer de éste, debido a que resultan indispensables para el desarrollo de numerosos procesos industriales (Henne *et al.*, 2004).

Los organismos extremófilos también poseen aplicaciones alternativas que no involucran la extracción de enzimas. Por ejemplo el uso de algas unicelulares como herramienta para medir la contaminación por minería ácida. Estas algas fungen como indicadores de

diversidad y abundancia de contaminantes ya que, al igual que otros indicadores biológicos, la distribución y densidad de sus poblaciones se altera tras la presencia de determinadas concentraciones de compuestos contaminantes. Asimismo, este tipo de organismos también pueden ser utilizados como remediadores, al ser capaces de disminuir el efecto nocivo de contaminantes mediante hidrólisis, precipitación, adsorción y bioacumulación (Das *et al.*, 2009).

EXTREMÓFILOS Y AMBIENTES EXTREMOS ÁCIDOS

La acidez se define como la abundancia de iones de hidrógeno de una solución acuosa. Esta se expresa mediante una función logarítmica en términos de pH en una escala donde 7 es neutro. Por tanto un cambio en una unidad de pH representa un cambio de 10 veces la concentración de iones de hidrógeno (Brown *et al.*, 2011).

Los procesos biológicos considerados normales ocurren en un rango de pH cercano a la neutralidad, donde la mayoría de procesos bioquímicos se desarrollan de manera óptima. Una alteración en la concentración de iones hidrógeno tiene un efecto inmediato en la actividad y en la capacidad de los organismos de desarrollarse (Le Romancer *et al.*, 2006).

En el mundo existen numerosos ambientes ácidos y extremadamente ácidos, ya sean de origen natural o consecuencia de acciones del ser humano. Un ejemplo de un ambiente ácido de origen natural son los bosques lluviosos. En ellos la lixiviación de compuestos como el ácido fúmico y fúlvico, provenientes de materia orgánica en descomposición, dan origen a ambientes con niveles de pH extremadamente bajos (Novis & Harding, 2007).

La actividad geotérmica es otra fuente importante de acidez. Sitios como pailas de barro, géiseres y fumarolas se caracterizan por la abundancia de compuestos derivados del azufre, que al ser expuestos al agua y al oxígeno forman ácido sulfúrico. Esto disminuye el nivel de pH de forma significativa, lo que limita la diversidad biológica de los

ambientes volcánicos. Otros factores como la alta concentración de metales pesados y la presencia de especies reactivas del oxígeno, como peróxidos, incrementan la toxicidad de estos entornos y disminuyen la diversidad biológica que habita en ellos (Collier *et al.*, 1990).

Respecto a los ambientes ácidos artificiales, las aguas residuales producto de la minería, uno de los problemas ambientales más persistentes de las regiones mineras en todo el mundo (Druschel *et al.*, 2009; Ledin & Pedersen, 1996), suelen alcanzar niveles de pH extremadamente bajos. Al contacto con el oxígeno, los minerales disueltos provenientes de los estratos rocosos generan ácidos derivados del azufre y del hierro, que son trasladados junto con el agua hasta los cauces receptores. Éstos también sufren un importante incremento de acidez (Prasanna *et al.*, 2011).

En este tipo de ambientes la variedad de especies que se desarrollan es muy reducida, limitándose solamente a los microorganismos acidófilos o hiperacidófilos. Estos son aquellos capaces de desarrollarse a niveles de pH muy bajo o extremadamente bajo (Kubicek *et al.*, 2007). Ejemplos de este tipo de organismos se encuentran en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya; aunque la mayoría son procariotas. Estos pueden ser tanto fotótrofos como heterótrofos (Seckbach, 2006).

Un ejemplo de este tipo de organismos es el alga roja termoacidófila *Cyanidium caldarium*, que sobrevive a temperaturas de hasta 57°C y un nivel de pH entre 0,0 y 3,5. Además tolera ácido sulfúrico 1N (Allen, 1959) y es capaz de soportar una concentración de hasta 10% de salinidad (Pinto *et al.*, 2004). El alga *Dunaliella acidophila* presenta desarrollo óptimo a pH 1,0 (Pick, 1999). Algunas cepas del protozoario acidófilo *Euglena mutabilis* soportan pH de hasta 1,41 (Whitton & Diaz, 1981) y son capaces de tolerar altas concentraciones de metales pesados, como Al, Ni, Fe y Cd (Olaveson & Nalewajko, 2000). Por otra parte, hiperacidófilos como *Picrophilus oshimae* y *Picrophilus torridus* son capaces de crecer a pH de hasta -0,06 (Rothchild & Mancinelli, 2001).

El factor crítico más importante para el carácter acidófilo es la estabilidad de la membrana citoplasmática. Aunque el medio que rodea la célula disponga de un pH extremadamente bajo, el citosol intracelular se mantiene cercano a la neutralidad. Para

prevenir el ingreso de iones hidrógeno al interior de la célula, estos organismos han desarrollado mecanismos de membrana como potentes bombas protónicas o membranas poco permeables a protones. De lo contrario, si la membrana pierde su estabilidad y se da un ingreso masivo de protones al interior de la célula, se producirán daños severos a los constituyentes internos como ADN, ATP y clorofila (Seckbach & Oren, 2007).

TÉCNICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE EXTREMÓFILOS

El interés en organismos extremófilos se deriva principalmente de la estrecha relación que establecen con el medio en que se desarrollan. La capacidad de supervivencia de estos procede de las adaptaciones evolutivas que han producido a lo largo del tiempo para esas condiciones específicas del entorno. Por ello es importante considerar el estudio de un microorganismo extremófilo en forma paralela al estudio del sitio en que crece de forma natural (Hernández, 2012; Sittenfeld *et al.*, 2002).

El estudio de los microorganismos se ha abordado en las últimas décadas mediante cultivos celulares. Estos se basan en la recreación de las condiciones ambientales en que un microorganismo mostraría desarrollo óptimo, aportando los elementos físicos y químicos necesarios para su crecimiento y proliferación. Una vez logradas estas condiciones se aísla el microorganismo en un cultivo axénico y se estudian las propiedades de interés (Kaeberlein *et al.*, 2002). Este procedimiento se dificulta cuando no se conoce la totalidad de factores necesarios para que un organismo crezca o cuando es muy difícil recrear el entorno natural de éste. Por ejemplo *Euglena gracilis var. bacillaris*, al crecer en medio de cultivo a temperatura elevada, tras 10 divisiones en la luz se torna susceptible al blanqueamiento o pérdida irreversible de cloroplastos. (Uzzo & Lyman, 1969). Aunque se cree que la desestabilización térmica de determinados tipos de chaperoninas puede estar asociada a este fenómeno, la razón principal todavía se desconoce. Debido a este fenómeno el establecimiento de cultivos se ve intensamente limitado, así como la cantidad y calidad de información que se pueda extraer de ellos. Por

ejemplo, al verse alterada la morfología del organismo aislado se imposibilita la realización de estudios acerca del mecanismo de fotosíntesis (Geary *et al.*, 1999).

Por las razones mencionadas anteriormente, al realizar estudios de diversidad en sistemas ecológicos microbianos, las técnicas moleculares han mostrado un auge sostenido en los últimos años. Los cultivos, aunque aportan gran cantidad de información morfológica y fisiológica de los microorganismos, difícilmente proveerán información relevante acerca de las relaciones evolutivas entre las especies y cepas que conforman un ecosistema determinado. Además, la característica extremófila de ciertos microorganismos limita aún más el desarrollo de sistemas de cultivo, lo que conlleva a subestimar la diversidad microbiológica de los ambientes en que estos se desarrollan. Esto explica que se estime que sólo se haya logrado cultivar el 1% de la totalidad de especies observables en la naturaleza (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Las técnicas moleculares o técnicas independientes de cultivo se basan en el aislamiento directo del ADN genómico. Así los estudios se reducen al análisis y comparación de las secuencias nucleotídicas, lo cual evita las limitaciones inherentes de los sistemas de cultivo. Aunado a esto, la necesidad de los cultivos también se reduce, ya que es posible clonar el ADN de organismos extremófilos en organismos fácilmente cultivables (Hernández, 2012).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ESPECIES

La filogenia es la determinación de la historia evolutiva de organismos, que inició en 1859 con la publicación de “El origen de la especies” por Charles Darwin. Esta se encarga de clasificar a los diferentes organismos de acuerdo con las relaciones de proximidad evolutiva, mediante el uso de caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares. En las últimas décadas, con el desarrollo de la biología molecular, se ha intensificado el uso de los métodos cladísticos que definen las relaciones filogenéticas

analizando cambios nucleotídicos en posiciones específicas de una secuencia (Phillips, 2000).

La filogenia moderna ha sido posible gracias al desarrollo de herramientas y técnicas que han permitido manipular y analizar con detalle las secuencias de ADN: enzimas de restricción, PCR, electroforesis, sondas de hibridación, secuenciación de ADN, etc. (Klug *et al.*, 2006).

Para el desarrollo de un análisis filogenético que emplee secuencias de ADN es necesario el uso intensivo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica utiliza oligonucleótidos diseñados con una secuencia específica, proveniente de una muestra de ADN genómico purificado de una cepa específica en estudio. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores, por lo que se unen a los extremos de un gen determinado, y permiten a una ADN polimerasa acoplarse al gen. Esta enzima se encargará de duplicar la secuencia de interés, al incorporar desoxinucleótidos trifosfato a la cadena madre, formando una cadena complementaria idéntica a la anterior. Con ello la secuencia de ADN se replica de forma exponencial y se obtiene una solución de ADN con alta concentración y pureza. Luego se visualiza el producto por electroforesis en gel de agarosa (Madigan *et al.*, 2009). Finalmente se secuencia el gen de forma automatizada. Para ello usualmente se emplean los mismos oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Una vez que se obtiene la secuencia de un gen, el siguiente paso para desarrollar una filogenia es alinearla con la secuencia de genes homólogos de otras especies. Con ello se pueden identificar las diferencias y obtener información filogenética significativa que permita plantear una hipótesis sobre cómo han divergido las secuencias a partir de una única secuencia ancestral (Madigan *et al.*, 2009).

A partir del alineamiento de estas secuencias se construye un árbol filogenético que ilustra las relaciones entre las secuencias de los organismos. Éste se compone por ramas y nodos. Las ramas representan las distintas cepas de las especies existentes en la actualidad. Los nodos representan los ancestros comunes de distintos organismos, así como los puntos en el curso de la evolución donde se produjo la divergencia del ancestro en dos nuevas entidades. Posteriormente, estas nuevas entidades comenzaron a

acumular diferencias de forma independiente en el transcurso de su evolución. La longitud de cada rama corresponde al número de cambios (Klug *et al.*, 2006).

Existen muchos criterios para el diseño de los árboles filogenéticos. Uno de los primeros métodos cladísticos que surgieron es el análisis de parsimonia. Éste se encuentra basado en el supuesto de que la evolución probablemente haya progresado por la vía que implique el menor número de cambios, por lo que los árboles se construyen de modo que se incluya el número mínimo de cambios de caracteres. Sin embargo, análisis posteriores revelaron otros caminos más probables, los cuales dieron origen a nuevos modelos evolutivos, como el análisis de unión de vecinos (*neighbor joining*) y probabilidad máxima (*maximum likelihood*) (Saitou & Nei, 1987; Spiess, 1987).

ARN RIBOSOMAL 18S

El ARN ribosomal (ARNr) es un tipo de ácido ribonucleico no codificante que se constituye como un componente principal y permanente de los ribosomas. Cada ribosoma se descompone en dos subunidades, denominadas subunidad grande y subunidad pequeña. Cada una posee diferentes tipos de ARNr (Klug *et al.*, 2006).

El ARNr 18S es un componente básico exclusivo de la subunidad pequeña de los ribosomas de células eucariotas. Se denomina 18S ya que este número corresponde a su coeficiente de centrifugación en unidades Svedberg (Klug *et al.*, 2006).

Los genes que se transcriben en este ARN se conocen como ADN ribosomal 18S, abreviado a ADNr 18S. La secuencia de este componente genético es ampliamente utilizada en diversos estudios filogenéticos cuyo fin es la elucidación del árbol evolutivo de los organismos (Olsen & Woese, 1993).

Aunque se pueden establecer relaciones evolutivas básicamente con cualquier secuencia del genoma de un organismo, el uso de ADNr presenta numerosas ventajas sobre otras secuencias o regiones del ADN. Por ejemplo, los genes de ADNr 18S son universales

para todos los organismos eucariotas y presentan una velocidad evolutiva muy baja, lo que hace posible dilucidar las divergencias más antiguas. Por otra parte, las regiones que flanquean la secuencia de ADNr 18S se encuentran muy conservadas en los distintos organismos, lo que permite el uso de cebadores universales. Además, cabe resaltar que estas secuencias se encuentran repetidas una gran cantidad de veces en el genoma, lo que facilita la extracción, amplificación y secuenciación del material genético (Fayet-Lebaron *et al.*, 2009). Es por ello que desde sus inicios el análisis filogenético de ADNr 18S contribuyó de forma importante a la comprensión de la evolución temprana de los eucariotas, particularmente de los protistas fotosintéticos (Pawlowski *et al.*, 1994).

EL GÉNERO *EUGLENA*

El género *Euglena*, del filo Euglenophyta, constituye un vasto grupo de microorganismos unicelulares de vida libre, que suelen habitar ambientes acuáticos con abundancia de materia orgánica. Se han descrito más de 800 especies pertenecientes a este género (John *et al.*, 2002).

Los organismos pertenecientes a este género se caracterizan por su forma alargada, ovoide o cilíndrica. Presentan un núcleo conspicuo con cromosomas y nucléolo permanentemente condensados, además de cloroplastos pigmentados o incoloros en forma de lente. También poseen gránulos rojos, aparatos de Golgi complejos, vacuolas contráctiles y un estigma o mancha ocular (van der Hoek *et al.*, 1995).

Muchas especies poseen capacidad de movimiento, y presentan una envoltura debajo de la membrana celular constituida por una película superficial flexible compuesta por bandas proteicas dispuestas sobre microtúbulos conocidas como mionemas (Vismara *et al.*, 2000). Este movimiento se denomina movimiento euglenoide o metabolia y consiste en la expansión y contracción del cuerpo celular que provoca una drástica translocación de las organelas a lo largo de la célula y una alteración de la forma global. Muchas

especies también disponen de estructuras flagelares para su locomoción (Sánchez *et al.*, 2004).

La nutrición de estos seres se da tanto por fotosíntesis como por asimilación heterótrofa oxidativa. La mayoría utilizan ambos mecanismos como fuente de carbono y energía, de forma intercambiable y equivalente (Colman & Balkos, 2005).

EL GÉNERO *EUGLENA* EN AMBIENTES EXTREMOS ÁCIDOS

Los organismos del género *Euglena* se caracterizan por una alta capacidad de adaptación a diversos ambientes. Son capaces de desarrollarse en rangos muy variados de temperatura, que oscilan desde 1°C hasta 38°C; así como en diversos niveles de pH, desde 0,9 hasta cerca de 11. Además, poseen la capacidad de formar quistes como forma de resistencia ante condiciones ambientales adversas (Hindák *et al.*, 2000).

Muchas especies de este género han sido consistentemente reportadas no sólo como habitantes de ambientes ácidos con altas concentraciones de metales, sino como especies dominantes de estos ambientes, con notables ventajas competitivas (Prasanna *et al.*, 2011).

Algunas cepas de *Euglena sp.* poseen proteínas especializadas en su membrana, que les permiten expulsar o transformar los compuestos tóxicos que hacen contacto con la superficie de la célula. Gracias a esto son capaces de resistir altas concentraciones de sulfatos (<4,9g/l) (Casiot *et al.*, 2003). Éstas también son capaces de soportar altas concentraciones de hierro (<1,7g/l), mediante la formación, acumulación y oxidación de microcristales de lepidocrita, un mineral formado químicamente por hidróxido de hierro (Mann *et al.*, 1987). Estos organismos son incluso capaces de resistir altas concentraciones de arsénico inorgánico (<0,35g/l), al modificar su toxicidad y movilidad mediante la producción de especies de metilarsénico, mucho menos tóxicas que el arsénico inorgánico (Casiot *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2001; LeBlanc, 1996).

IMPORTANCIA DEL GÉNERO *EUGLENA*

Desde hace varias décadas, el ser humano ha aprovechado las utilidades que los organismos del género *Euglena* son capaces de aportar.

Las propiedades para colonizar y desarrollarse en ambientes ácidos convierten a las diferentes especies de *Euglena* en buenos indicadores biológicos. Esto debido a que su presencia o ausencia, abundancia y distribución revelan características propias del entorno. Por ejemplo, en regiones contaminadas con drenajes ácidos provenientes de minería, la distribución espacial de *E. mutabilis* puede servir para evaluar cuantitativamente las mejoras en la calidad del agua a lo largo del canal receptor (Valente & Gomes, 2007).

Los euglénidos de este género también exhiben propiedades remediadoras, al intervenir mediante procesos de biomineralización, bioacumulación y precipitación de minerales que les permiten controlar la acidez y la concentración de minerales de su entorno, lo que puede llevar a la atenuación de los efectos nocivos de ambientes contaminados con drenajes ácidos de minería (Lawrence *et al.*, 1998).

TAXONOMÍA Y RELACIONES EVOLUTIVAS DE LOS EUGLÉNIDOS

La descripción histórica de lo que hoy se conoce como el género *Euglena* comenzó desde 1674, cuando el científico neerlandés Anton Van Leeuwenhoek describió por primera vez lo que hoy se cree corresponde a *Euglena viridis*. Posteriormente, en la década de 1830, el microscopista alemán Christian Gottfried Ehrenberg estableció el género *Euglena* y describió las primeras especies (Buetow, 2005).

La clasificación de los euglénidos ha significado un reto desde hace más de dos siglos, ya que la taxonomía basada en características morfológicas ha resultado muy variable y consecuentemente insuficiente para un género tan vasto y diverso (Triemer *et al.*, 2006).

Muchos euglenoides fueron descritos y asignados a este género, el cual creció con gran variedad de formas taxonómicas: fotosintéticos, osmotróficos, fusiformes, ovoides, rígidos, etc. Esto condujo al desarrollo de nuevos géneros como *Phacus*, *Lepocinclis*, *Astasia* y *Khawkinia*, basados estrictamente en características morfológicas. Los euglénidos fueron agrupándose y reagrupándose de acuerdo con la presencia o ausencia de alguna característica en particular (Shin & Triemer, 2004).

Durante los últimos años, tecnologías como la microscopía electrónica han permitido recopilar mucha información morfológica. Sin embargo, la era moderna de la filogenia comenzó con el desarrollo de técnicas de análisis molecular. Esto permitió el comienzo de las primeras filogenias moleculares de euglenoides, la mayoría basadas en estudios de ARN ribosomal 16S de cloroplasto y 18S. Gracias a esto, los taxones pasaron de cuatro a más de 100. Los estudios concuerdan en que las líneas fagotróficas y osmotróficas son basales a las líneas fotosintéticas (Triemer *et al.*, 2006).

Mediante la nueva filogenética molecular, muchos de los géneros monofiléticos anteriormente erigidos se han ido derrumbando y las especies que contenían han ido retornando al género *Euglena*, considerado ahora un género parafilético. Por ejemplo, los antiguos géneros *Phacus*, *Lepocinclis*, *Astasia* y *Khawkinia* ya han sido desintegrados (Linton *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estimar el parentesco entre *Euglena pailasensis*, *Euglena mutabilis* CPCC293 y una euglena encontrada en un riachuelo ácido del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja comparando secuencias provenientes del gen de ARNr 18S.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener ADN genómico de buena calidad a partir de las tres cepas de *Euglena* en estudio.
2. Amplificar mediante PCR y obtener secuencias provenientes del gen de ARN ribosomal 18S.
3. Alinear las secuencias y construir filogramas que agrupen las cepas según su parentesco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las cepas: Las tres cepas de *Euglena sp.* utilizadas en este trabajo se encontraban cultivadas previamente en el CIBCM. *Euglena pailasensis* fue recolectada entre 1998 y 2000 en el área de Pailas de Barro en el Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja (Sittenfeld *et al.*, 2002). *E. mutabilis* CPCC293 fue adquirida a través del CPCC (*Canadian Phycological Culture Centre*) y había sido obtenida a partir de un muestreo realizado por M. Olaveson en 1980 (CPCC, 2011) en una planta de ácido sulfúrico en el Río Serpiente, Ontario, Canadá. La cepa *Euglena sp.* de Pailas Frías fue recolectada en el año 2010 en un riachuelo ácido del sector Santa María, también del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja (Hernández, 2012).

Extracción de ADN: Se extrajo el material genético de cada una de las tres cepas mediante una adaptación del método de Porebski *et al.* (1997): de cada cultivo se tomaron aproximadamente 50 μL de biomasa y se suspendieron en 450 μL de agua desionizada. Se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 500 μL de agua desionizada, más un lavado con 500 μL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Para cada lavado se centrifugó a 500 rpm durante 2,5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se suspendieron en 150 μL de TE y 28,7 μL de *buffer* CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0). Se agregaron 10 μL de solución de proteinasa K (21,4 mg/mL, Fermentas) y se incubó a 37°C durante 30 min. Se agregó SDS para una concentración final de 2% m/v y mercaptoetanol para una concentración final de 1% v/v. Se incubó a 60°C durante 1,5 horas. Se realizó una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y dos extracciones con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Para cada extracción se homogenizó y se centrifugó a 13200 rpm. Se precipitó el ADN con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol (95%) a -20°C. Se centrifugó a 13200 rpm durante 30 min. Tras la centrifugación se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol (70%) frío. Se agitó y se centrifugó a 13200 rpm durante 5 min. El etanol se retiró con una micropipeta y el

remanente se evaporó a 70°C. El ADN fue disuelto en 40 µL de TE. Se agregó 0,8 µL de solución de ARNasa (1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche.

Se evidenció la presencia de ADN y se determinó su tamaño aproximado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con *DNA Ladder 1KB* (Promega) como marcador de peso molecular. Los resultados se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotium) y observación en un transiluminador de luz ultravioleta.

Amplificación del ADNr 18S: Segmentos de los genes ADNr 18S fueron amplificados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los imprimadores 1F(A) y 2280R (Anexo 1).

Se utilizaron mezclas de reacción de 50 µL compuestas por *Buffer Pfu 1X* (Fermentas), 1,25 U de *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas), 200 µM de cada dNTP (Fermentas), 0,4 µM de cada imprimador (Invitrogen) y 3,0 µL de ADN blanco. Las reacciones se incubaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Se inició con 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C y 2 min a 72°C, y un paso final de 10 min a 72°C. Se confirmó la presencia de productos de PCR mediante electroforesis en gel. El ADN amplificado se purificó con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) y se cuantificó mediante electroforesis en gel y con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Las electroforesis se realizaron en agarosa al 1%, utilizando *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas) como marcador de peso molecular y como patrón de cuantificación de ADN, y los resultados se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotium) y observación en un transiluminador de luz ultravioleta.

Secuenciación: Los productos de PCR purificados y cuantificados de cada una de las cepas fueron secuenciados utilizando el kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) de acuerdo con la siguiente receta: 40 ng de ADN, 0,17 µM del imprimador correspondiente, *Sequencing Buffer 1X*, 4 µL del reactivo *BigDye Terminator v3.1* y agua hasta completar 20 µL. Los imprimadores empleados fueron los siguientes: 18S-3', 18S-5', 1F(A), 467F, 557R, 653R, 1141F, 1292R, 1677R y 2280R (Anexo 1). La dirección y posición de cada uno de los imprimadores utilizados aseguró la

obtención de zonas traslapantes y duplicados para varias regiones, como se observa en el esquema de secuenciación (Anexo 2). Para la lectura de las secuencias se utilizó un secuenciador automático *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems).

Alineamiento de secuencias: Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, revisadas y corregidas con el software *BioEdit Sequence Alignment Editor* v7.1.3.0 (Hall, 1999). Cada una de las secuencias ensambladas fue comparada con las bases de datos del *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC) con el uso de la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). Además, se buscaron secuencias provenientes de las especies *Euglena deses*, *Euglena gracilis*, *Euglena viridis* y *Eutreptiella sp.*, esta última para utilizarla como grupo externo. Las secuencias obtenidas, en conjunto con aquellas con alto grado de parentesco, fueron alineadas con el programa CLUSTALX2 (Larkin *et al.*, 2007). Para ello se utilizó una penalización de 8 para la apertura de nuevos *gaps* y una penalización de 4 para la extensión de los *gaps* existentes. Posteriormente se recortaron los extremos de algunas secuencias para homogenizar sus longitudes en el alineamiento.

Construcción de árboles filogenéticos: Se construyeron filogramas a partir del alineamiento con los paquetes informáticos PHYLIP v3.69 (Felsenstein, 1989) y MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Se asumió una tasa de transición/transversión de 2,0 y se utilizaron dos métodos: el método de unión de vecinos (*neighbor-joining*) (Saitou & Nei, 1987) aplicando el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y el de probabilidad máxima (*maximum likelihood*). La robustez y confiabilidad de las topologías inferidas fue determinada a partir de 1000 seudorréplicas del alineamiento.

RESULTADOS

Extracción de ADN: Se obtuvo ADN de alto peso molecular ($>10\ 000\text{pb}$) con mínima degradación. No se observó un barrido significativo por debajo de la banda principal que evidenciara fragmentación del ADN (Fig. 1).

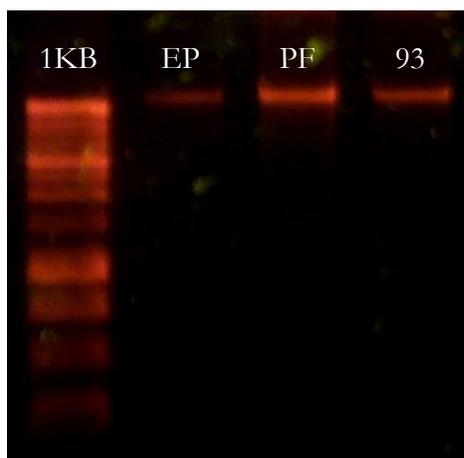


Figura 1. Visualización del gel de agarosa de la extracción de ADN. (1KB) Marcador de peso molecular *DNA Ladder* 1KB (Promega). (EP) *Euglena pailasensis*. (PF) *Euglena sp.* de Pailas Frías. (93) *Euglena mutabilis* CPCC293.

Amplificación de ADNr 18S: Las reacciones de PCR generaron un producto que, al realizar la comparación con el marcador de peso molecular, mostró un tamaño de aproximadamente 3000 pares de bases para las tres muestras. Después de purificar los productos de la PCR se estimó, utilizando el marcador de peso molecular como referencia, la concentración de ADN en $20\ \text{ng}/\mu\text{l}$ para *E. pailasensis* y en $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$ para *Euglena sp.* de Pailas Frías y para *E. mutabilis* CPCC293 (Fig. 2).

La cuantificación del producto amplificado y purificado, realizada mediante espectrofotometría, mostró concentraciones de ADN concordantes con las estimadas mediante electroforesis. Por otra, parte las razones 260/280 y 260/230 para las tres

cepas tuvieron un valor cercano a 2, lo que indica alta pureza en las soluciones de ADN (NanoDrop Technologies, 2007) (Cuadro 2).

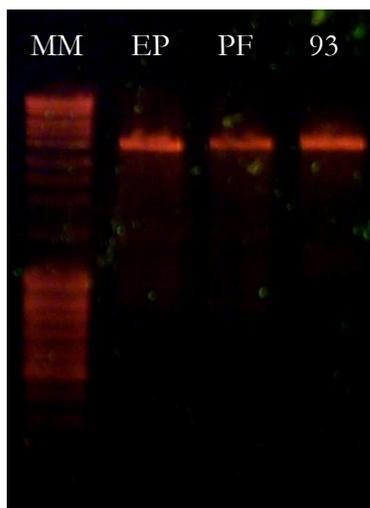


Figura 2. Visualización del gel de agarosa de los productos de PCR purificados. (MM) Marcador de peso molecular *MassRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas). (EP) *Euglena pailasensis*. (PF) *Euglena sp.* de Pailas Frías. (93) *Euglena mutabilis* CPCC293.

Cuadro 2. Resultados Nanodrop para tres productos de PCR purificados.

Muestra	[ADN] (ng/ μ L)	A260	A280	Razón 260/280	Razón 260/230
Blanco	0,5	0,01	0,005	2,03	0,66
<i>Euglena pailasensis</i>	16,9	0,339	0,169	2,01	2
<i>Euglena sp.</i> de Pailas Frías	11,8	0,236	0,118	2	1,99
<i>E. mutabilis</i> CPCC293	10,1	0,203	0,102	1,98	2,09

Secuenciación: Se obtuvo una secuencia de 2397 pb para *E. pailasensis*, una de 2389 pb para *Euglena sp.* de Pailas Frías y una secuencia de 2463 pb para *E. mutabilis* CPCC293 (Anexos 3, 4 y 5). En los tres casos se logró abarcar gran parte del gen.

Análisis de secuencias: Las secuencias provenientes de organismos aislados del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja presentaron un alto porcentaje de identidad entre ellas. El alineamiento mostró una identidad del 100,00% entre las cepas *E. pailasensis* y *Euglena sp.* de Pailas Frías. Estas secuencias, con respecto a *Euglena sp.* CRRdV (secuencia de *E. pailasensis* que había sido depositada previamente en GenBank en 2002 por Sittenfeld *et al.*), presentaron una identidad del 99,4%, con diferencias en 12 nucleótidos, del total de 2418 nucleótidos que conforman la longitud del alineamiento.

En comparación con *E. pailasensis* y *Euglena sp.* de Pailas Frías; *Euglena sp.* CRRdV presentó deleciones (Fig. 3a), inserciones (Fig. 3b) y transiciones puntuales (Fig. 3c). Además, se observó una inserción de tres nucleótidos en la posición 909 del alineamiento realizado (Fig. 3d).

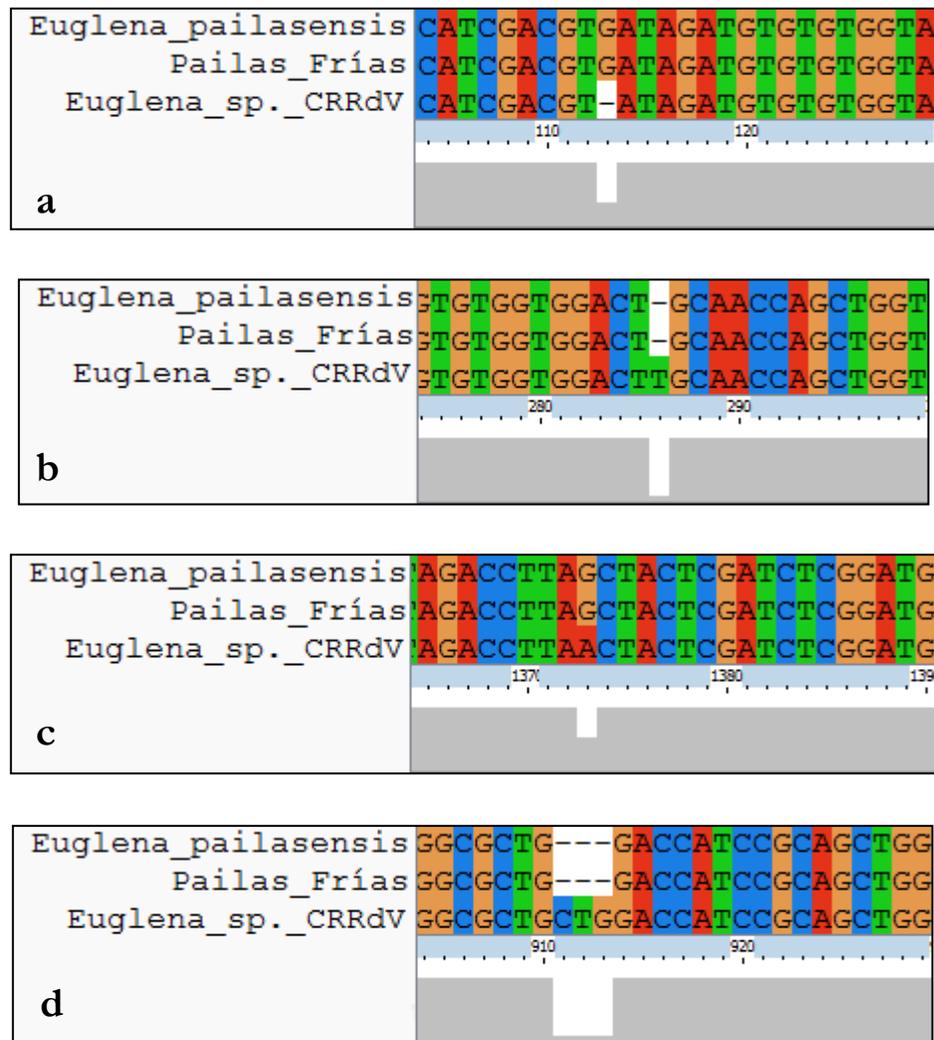


Figura 3. Segmentos del alineamiento de *E. pailasensis*, *Euglena sp.* de Pailas Frías y *Euglena sp.* CRRdV. (a) Delección puntual en *Euglena sp.* CRRdV en la posición 113. (b) Inserción puntual en *Euglena sp.* CRRdV en la posición 286. (c) Transición puntual en *Euglena sp.* CRRdV en la posición 1373. (d) Inserción de tres nucleótidos en *Euglena sp.* CRRdV de la posición 911 hasta la 913.

En la selección de las secuencias con mayor grado de parentesco para las tres cepas en estudio, se escogieron los resultados que presentaran un valor E de 0,0. Esto arrojó 12

resultados en el BLAST idénticos tanto para *E. pailasensis* como para *Euglena sp.* de Pailas Frías (Anexo 6). El BLAST realizado para *E. mutabilis* CPCC293 (Anexo 7) presentó los mismos resultados, pero con diferentes puntuaciones y en diferente orden. No se utilizó la secuencia del gen de ARNr 18S de la cepa *E. mutabilis* PM1 debido a que presentó un tamaño muy corto. Por lo anterior se seleccionaron 10 de estas secuencias para el alineamiento. Tampoco se utilizó la secuencia del gen de ARNr 18S de *E. mutabilis* cepa SAG 1224-9a (AJ532404) debido a que es idéntica a la cepa *E. mutabilis* M1857 (AJ532403).

Entre las secuencias que mostraron un mayor grado de parentesco se observó que varias pertenecen a organismos aislados originalmente de ambientes extremos ácidos y ambientes con altas concentraciones de metales pesados, como ríos y lagos ácidos o drenajes ácidos de minería. El origen del resto de las secuencias utilizadas no pudo ser rastreado con claridad debido a la escasa información depositada en GenBank.

Para obtener secuencias provenientes de *E. deses*, *E. gracilis*, *E. viridis* y *Eutreptiella sp.* se empleó un algoritmo de MegaBLAST dicontinuo, específico para cada una de las cuatro especies, con criterios de búsqueda flexibles (Anexo 8). MegaBLAST es un programa de alineamiento de secuencias nucleotídicas que emplea un algoritmo muy efectivo para secuencias de gran tamaño con diferencias mínimas (Fassler & Cooper, 2011). De cada MegaBLAST se seleccionó el primer resultado. Las secuencias seleccionadas de ADNr 18S de especies distintas a *E. mutabilis* mostraron un valor de identidad >80% con las secuencias en estudio.

Se realizó el alineamiento con un total de 17 secuencias (Anexo 9). Para el alineamiento con el programa ClustalX2, los parámetros por defecto de alineamiento por pares y alineamiento múltiple no lograron producir un alineamiento óptimo. Este se definió como aquel alineamiento que logre agrupar, en cada posición, la mayor cantidad de secuencias con un residuo idéntico. Las penalizaciones tanto para la apertura de nuevos *gaps* como para la extensión de los existentes fueron muy altas (15 y 6,66 respectivamente). Para corregir este problema se redujeron las penalizaciones a 8 y 4

respectivamente, con lo que el programa contó con más libertad para acomodar los residuos (Anexo 10).

Con el alineamiento se generó una matriz de identidad (Anexo 11) y se produjeron dos árboles filogenéticos: uno de unión de vecinos (Fig. 4) y otro de probabilidad máxima (Fig. 5). Ambos árboles presentaron topologías muy similares, con diferencias de robustez y agrupación de algunos nodos interiores. También presentaron diferencias en cuanto a la longitud (cambios de nucleótido por posición) de las ramas.

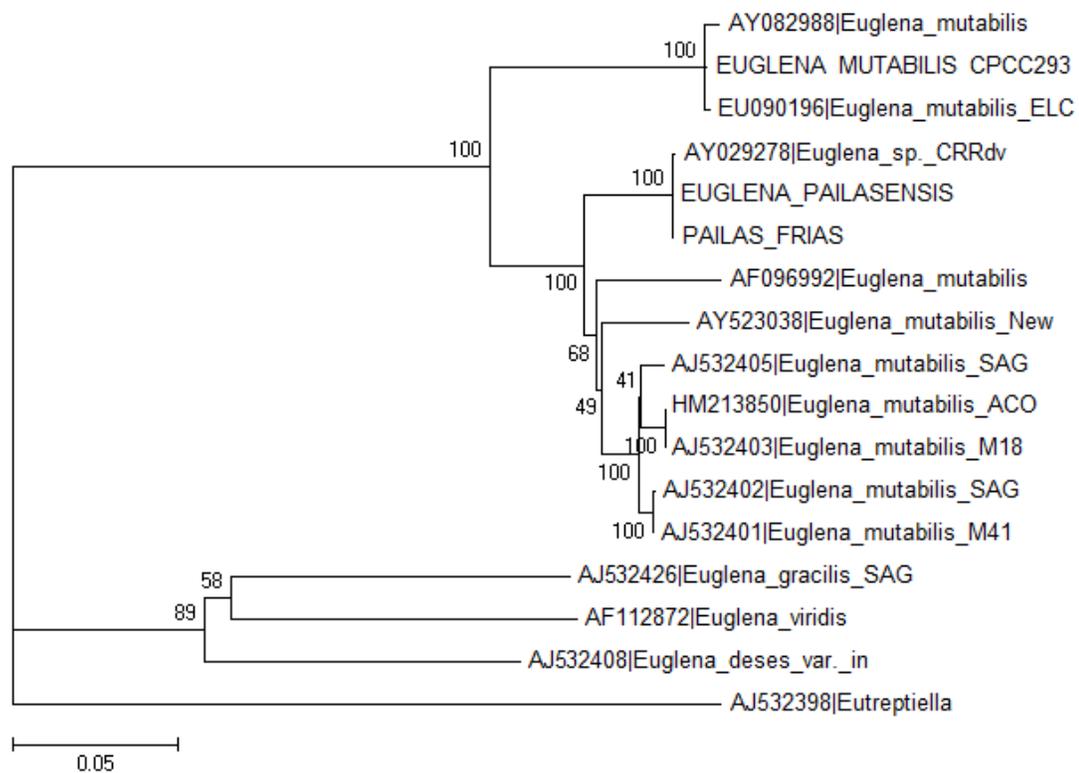


Figura 4. Filograma de unión de vecinos (*neighbor joining*), agrupando las secuencias parciales de ADN ribosomal 18S de *E. pailasensis*, *E. mutabilis* CPCC293, *Euglena* sp. de Pailas Frías y las secuencias de GenBank más cercanas según los resultados de BLAST, cada una representada por un número de accesoión, seguido por el nombre. Se utilizó el alga *Eutreptiella pomquetensis* como

grupo externo. Los números de cada nodo representan el porcentaje de pseudorréplicas concordantes y la escala representa el número estimado de cambios por posición.

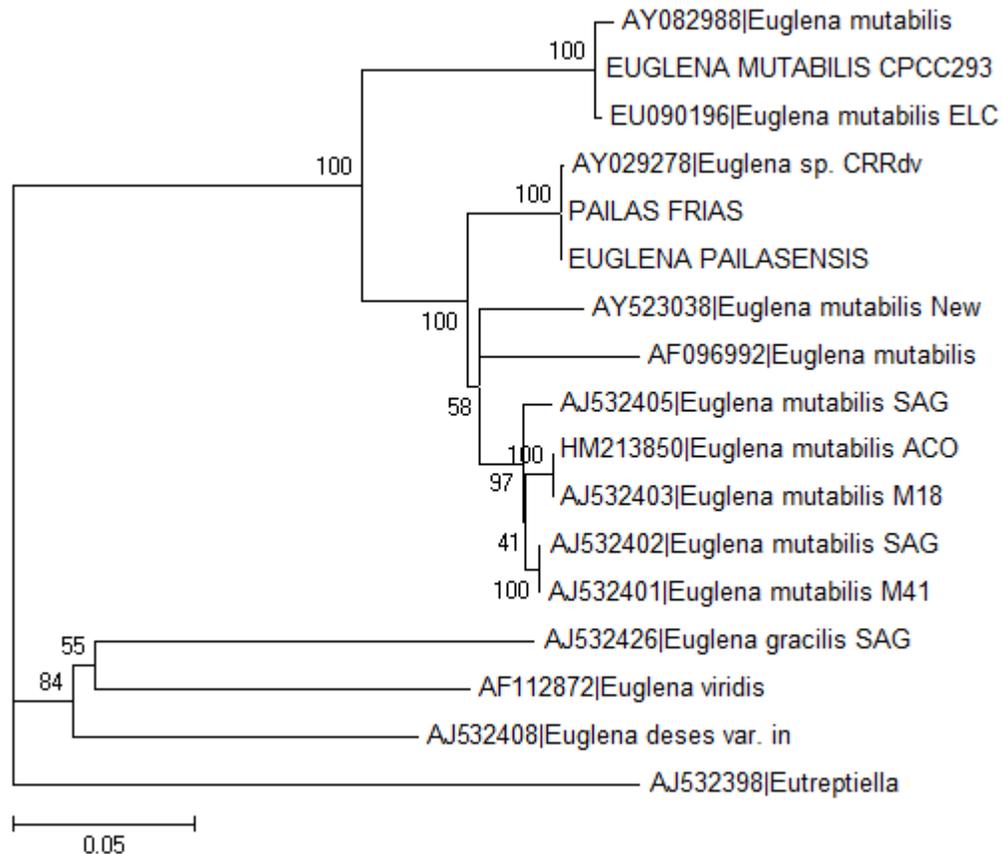


Figura 5. Filograma de probabilidad máxima (*maximum likelihood*), agrupando las secuencias parciales de ADN ribosomal 18S de *E. pailasensis*, *E. mutabilis* CPCC293, *Euglena* sp. de Pailas Frías y las secuencias de GenBank más cercanas según los resultados de BLAST, cada una representada por un número de acceso, seguido por el nombre. Se utilizó el alga *Eutreptiella pomquetensis* como grupo externo. Los números de cada nodo representan el porcentaje de pseudorréplicas concordantes y la escala representa el número estimado de cambios por posición.

Ambos árboles, provenientes de metodologías distintas, presentaron topologías casi idénticas. La principal diferencia entre ambos es la ubicación de la secuencia de *E.*

mutabilis (AF096992). El árbol de unión de vecinos la coloca fuera del clado de *E. mutabilis* formado por la cepa New Jersey (AY523038) y las cepas SAG 1224-9b (AJ532405), SAG 1224-9d (AJ532402), M415/4 (AJ532401), M1857 (AJ532403) y ACOI 377 (HM213850). El árbol de probabilidad máxima lo coloca dentro de este clado. Esta diferencia no afecta de forma directa la posición taxonómica de las secuencias en estudio, por lo que ambos árboles se tomarán como fiables y válidos para el análisis filogenético de estas cepas. Asimismo, sólo se profundizará en el árbol de probabilidad máxima por ser hecho con base en un algoritmo más robusto y ligeramente más eficiente que el de unión de vecinos (Tateno *et al.*, 1994).

Este árbol presentó una tricotomía, formada por dos divergencias principales y el grupo externo: *Entreptiella pomquetensis*. El primero de los nodos principales estuvo compuesto por la divergencia de secuencias provenientes de *E. mutabilis* y *E. pailasensis*. Este presentó gran robustez al mostrar 100% de seudorréplicas. Dentro de este mismo, se presentaron dos clados secundarios. El primero de ellos (100% de seudorréplicas) presentó una tricotomía que incorpora las secuencias de ADN ribosomal de *E. mutabilis* CPCC293, *Englena mutabilis* cepa ELC 1 (EU090196) y *Englena cf. mutabilis* (AY082988). El segundo clado secundario (100% de seudorréplicas) a su vez se dividió en dos nodos terciarios. Uno de ellos (100% de seudorréplicas) con las secuencias de *E. pailasensis*, *Englena sp.* de Pailas Frías y *Englena sp.* CRRdV (AY029278). El resto de clados derivados del segundo nodo terciario presentaron seudorréplicas con valores de entre 41 y 100%. Sin embargo, todas pertenecen a secuencias aisladas de la misma especie (*E. mutabilis*).

El segundo de los nodos principales presentó un clado secundario (84% de seudorréplicas) con *E. deses* (AJ532408) y uno terciario (55% de seudorréplicas) con *E. gracilis* (AJ532426) y *E. viridis* (AF112872).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Obtención de ADN genómico y amplificación

Los análisis filogenéticos modernos utilizan las secuencias de ADN como base para establecer las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Por ello, para realizar cualquier análisis filogenético basado en biología molecular es imprescindible la extracción de ADN de buena calidad.

En el presente trabajo se realizó una extracción inicial de ADN genómico. Este tiene un peso superior a los 10 000 pb y contiene la mayor parte de la información genética, incluyendo las secuencias de las que se transcriben los genes de ARN ribosomal 18S.

Como se muestra en los resultados, se obtuvo ADN de alto peso molecular ($>10\ 000\text{pb}$) y con mínima degradación (Fig. 1). Esto demuestra que la adaptación del método de Porebski *et al.* (1997) fue eficiente para extraer ADN genómico de buena calidad.

Mayor evidencia del éxito de la extracción inicial de ADN genómico se presentó con la amplificación por PCR. La electroforesis en gel de agarosa (Fig. 2) mostró la presencia de una única banda bien definida y con poco barrido para cada cepa. Esto revela la correcta amplificación de un único segmento del ADN genómico total de la cepa. Por otra parte, tanto la electroforesis en gel de agarosa como la espectrofotometría mostraron congruencia en cuanto a tamaño y concentración de los fragmentos amplificados (Fig. 2 y Cuadro 2).

En cuanto al análisis espectrofotométrico, se evidenció alta pureza de los productos amplificados. La razón 260/280 corresponde a un indicador de pureza en los oligonucleótidos. Una razón inferior a 1,8 indica contaminación por proteínas o fenoles. Por otra parte, la razón 260/230 corresponde a una medida secundaria de pureza (NanoDrop Technologies, 2007). Las tres cepas mostraron una relación cercana o superior a estos valores (Cuadro 2). Además, este análisis mostró concentraciones

suficientes para desarrollar la totalidad de reacciones de secuenciación necesarias, con el fin de abarcar la región de ADNr 18S amplificada.

La secuenciación realizada generó electroferogramas legibles y traslapantes, que permitieron ensamblar una secuencia completa y clara de los segmentos de los genes de ARN ribosomal 18S amplificados para cada una de las cepas estudiadas. Estas secuencias revelaron tamaños similares a los presentes en las bases de datos de GenBank, las cuales oscilan alrededor de las 2500 pb. Con ello queda demostrado que se logró amplificar el ADN genómico mediante PCR y que se logró obtener secuencias provenientes del gen de ARN ribosomal 18S, logrando abarcar la mayor parte del gen.

Alineamiento y análisis de las secuencias

El Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja comprende numerosos ambientes ácidos de origen geotérmico, que comprenden una enorme diversidad microbiológica (Hernández, 2012). Profundizar en el estudio de los organismos acidófilos que habitan estos ambientes es de gran importancia y permitirá el aporte de grandes recursos para incrementar el conocimiento científico y de valiosas herramientas en el campo de la biotecnología.

En el pasado se demostró la presencia del organismo acidófilo *E. pailasensis* en este parque nacional (Sittenfeld *et al.*, 2002). Establecer la novedad de la cepa *Euglena sp.* de Pailas Frías con base en los genes de ARN ribosomal 18S permitirá definir un referente para futuras pruebas con respecto a la diversidad de euglenoides presentes en la región.

Al comparar cada una de las secuencias obtenidas contra las bases de datos del GenBank se presentó un primer indicio de la posibilidad de que *E. pailasensis* y *Euglena sp.* de Pailas Frías se traten de la misma especie. Los resultados obtenidos en ambas cepas mostraron un conjunto idéntico de 12 secuencias con similitud significativa, que presentaron los mismos porcentajes de identidad y valores E de 0,0 (Anexo 6). El valor E, o valor esperado, representa el número de alineamientos diferentes esperados con puntuaciones

equivalentes o mejores que la secuencia obtenida en una búsqueda en la base de datos. Entre menor el valor E, más significativos la puntuación y el alineamiento (NCBI, 2006).

Para ambas cepas, la secuencia con mayor similitud en las bases de datos correspondió a la secuencia parcial de ADN ribosomal 18S de *Euglena sp.* CRRdV; definida como *Euglena pailasensis* (Sánchez *et al.*, 2004; Sittenfeld *et al.*, 2002). Todas las demás secuencias con valores E de 0,0 e identidad superior al 85% pertenecieron a secuencias provenientes de distintas cepas de *E. mutabilis*.

El nombre *E. pailasensis* fue sugerido por Sittenfeld *et al.* (2002) con base en análisis morfológicos, fisiológicos y moleculares que según los autores mostraron suficiente evidencia para clasificar esta cepa como una especie. Dentro de los últimos se desarrolló un análisis con el gen de ARN ribosomal 18S y otro con el gen de la proteína GAPDH. Cabe resaltar que en estos estudios la caracterización filogenética con ARN ribosomal 18S no mostró una clara división a nivel de clado entre esta cepa y *E. mutabilis*.

E. pailasensis es una especie de morfología similar a *E. mutabilis*: ambas se componen por una única célula cuya membrana posee una película proteica flexible formada por mionemas. Carecen de pared celular y flagelos emergentes visibles al microscopio óptico. Poseen movimiento generado mediante metabolia y se caracterizan por la presencia de una mancha ocular roja. Ambas miden entre 30 - 45 μm de longitud y 6-10 μm de ancho y presentan numerosos cloroplastos discoidales de color verde. En algunas cepas presentan pirenoides atravesados por varios tilacoides (Häder & Melkonian, 1983; Sánchez *et al.*, 2004).

La principal característica distintiva de la cepa *E. pailasensis* es su capacidad demostrada de crecer a temperaturas de 50°C, con una viabilidad confirmada de hasta 2 horas en su ambiente natural. En segundo lugar, se tomó la ausencia de flagelo emergente como propiedad característica de esta cepa. Con ello se sugirió la posibilidad de una nueva especie anteriormente desconocida.

A niveles morfológico y fisiológico, la capacidad de tolerancia a altas temperaturas exhibida por *E. pailasensis* es la única propiedad que la separa de *E. mutabilis*, ya que ésta

última también carece de flagelo emergente (Häder & Melkonian, 1983). Comprobar si la termotolerancia es determinada genéticamente o si es producto de plasticidad inducida por el ambiente es determinante para definir la confiabilidad de la resolución tomada por Sittenfeld y colaboradores (2002).

Al realizar la comparación entre las secuencias provenientes de organismos aislados en el Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja se observó que en efecto las secuencias provenientes de *E. pailasensis* y *Euglena sp.* de Pailas Frías son idénticas. También se observó un porcentaje de identidad muy alto de estas secuencias con *Euglena sp.* CRRdV; con diferencias únicamente en el 0,51% de la secuencia (12 de 2418 nucleótidos). Las diferencias puntuales entre las secuencias se atribuyen principalmente al tipo de ADN polimerasa utilizado para secuenciar las regiones de ADNr 18S. El estudio realizado por Sittenfeld *et al.* (2002) utilizó Taq ADN polimerasa como polimerizador de ADN durante la amplificación, mientras que el estudio actual utilizó Pfu ADN polimerasa. A pesar del gran uso dado a la enzima Taq ADN polimerasa, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, esta presenta una fidelidad de replicación relativamente baja, ya que carece de capacidad exonucleasa de corrección de 3' a 5' y posee un error estimado de 1 en 9000 pares de bases (Tindall & Kunkel, 1988). Por otra parte, la enzima Pfu ADN polimerasa, proveniente de la archaea *Pyrococcus furiosus*, sí posee capacidad de corrección y posee un error estimado de 1 en 1 300 000 pares de bases (Lundberg *et al.*, 1991).

En *Euglena sp.* CRRdV se presenta una región de tres nucleótidos (CTG) ausente en las otras dos secuencias (Fig. 3d). Se desconoce con exactitud la razón de esta diferencia; sin embargo, es muy probable que se trate de un error de secuenciación, ya que el resto de secuencias utilizadas en el alineamiento tampoco presentaron esta región o ninguna similar.

Por esta razón se puede asegurar, con base en la comparación de genes de ARN ribosomal 18S, que las secuencias de *E. pailasensis*, *Euglena sp.* de Pailas Frías y *Euglena sp.* CRRdV pertenecen a la misma especie.

Con respecto a la cepa *E. mutabilis* CPCC293, la comparación con esta cepa ayudó a determinar si en efecto *E. pailasensis* corresponde a una nueva especie como afirman Sittenfeld *et al.* (2002), o si se trata de alguna variedad termotolerante desconocida de *E. mutabilis*.

El alineamiento realizado utilizó un total de 17 secuencias, de las cuales 3 provienen del ADN secuenciado de las cepas en estudio y 10 son el resultado del BLAST realizado sobre estas primeras cepas. De las secuencias restantes, 3 son secuencias provenientes de especies del género *Euglena* diferentes a *E. mutabilis*. La última secuencia corresponde al grupo externo.

Se seleccionó *E. deses* ya que es una especie filogenéticamente muy emparentada con *E. mutabilis*. Ambas han sido clasificadas en estudios anteriores como especies hermanas y como miembros del mismo clado (Milanowski *et al.*, 2006). Se seleccionó la especie *E. gracilis* ya que anteriormente ha sido utilizada como guía para el alineamiento de secuencias de euglénidos (Brosnan *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2000). Además la mayoría de cebadores utilizados para amplificar y secuenciar el ADN en este trabajo fueron diseñados originalmente para esta especie (Zakryś *et al.*, 2002). *E. viridis* corresponde a la cepa tipo del género *Euglena* (Shin & Triemer, 2004), por lo que se consideró importante incluirla en el alineamiento.

Se seleccionó una especie del género *Eutreptiella* como grupo externo ya que en estudios anteriores se ha evidenciado la lejanía con el género *Euglena* (Triemer *et al.*, 2006). Además, ha sido utilizado con éxito para definir las raíces de árboles filogenéticos de este género (Milanowski *et al.*, 2006; Sittenfeld *et al.*, 2002; Triemer *et al.*, 2006). La secuencia seleccionada del género *Eutreptiella* proviene de *E. pomquetensis*.

En este alineamiento es posible observar con claridad la presencia de diferentes regiones conservadas y regiones variables entre los diferentes organismos (Anexo 10). Por ejemplo, fue posible observar bloques completos idénticos en las secuencias provenientes de las diferentes cepas de *E. mutabilis*. Ejemplo de ello es la secuencia CATGAACGAACA, en la posición 626 del alineamiento. Asimismo, se observaron numerosos bloques idénticos para todas las secuencias, incluyendo el grupo externo.

Estos se observan claramente en el alineamiento (Anexo 10), demarcados con un asterisco en la parte superior.

Por otra parte se observaron secuencias exclusivas de un solo organismo, ausentes en todos los demás. Por ejemplo, la secuencia GGTTGCGCCGTCGGG en la posición 1417 y la secuencia GTGGAGCATCCCCCGTCCGCGGGG en la posición 2512. Ambas se encuentran únicamente en *E. deses* (Anexo 10).

En especies que poseen una larga historia evolutiva, como las pertenecientes al género *Euglena*, no existe un único método ideal para analizar filogenia (Linton *et al.*, 2000). Por ello se realizaron tanto análisis de unión de vecinos como de probabilidad máxima. Dentro del primer nodo del árbol de probabilidad máxima (Fig. 5) se evidencia la presencia de secuencias provenientes tanto de *E. mutabilis* como *E. pailasensis*, sin división a nivel de clado. Esto concuerda con lo reportado por Sittenfeld *et al.* (2002); sin embargo, no se ofrece suficiente evidencia a nivel de ADNr 18S para asegurar que *E. pailasensis* es una especie diferente de *E. mutabilis*. De tratarse de especies filogenéticamente distintas habría una división visible entre las secuencias provenientes de *E. mutabilis* y las procedentes de *E. pailasensis*, planteándose un ancestro común para ambos cercano a la raíz del árbol.

Por otra parte, se destaca la importancia de realizar una nueva revisión de la taxonomía de *E. mutabilis*, ya que dentro del clado respectivo hay mucha variabilidad en cuanto al gen de ARN ribosomal 18S. Esto se evidencia dentro de la matriz de identidad (Anexo 11), que muestra porcentajes desde 98,8% (AY082988 y *E. mutabilis* CPCC293) hasta 74,0% (HM213850 y AY082988). Esto representa un porcentaje muy grande de variabilidad para un solo género taxonómico, más aún para una sola especie (Fawley *et al.*, 2004).

Cabe recalcar que, a nivel de protistas, la increíblemente limitada información genética disponible impide delinear con exactitud las especies con base únicamente en su huella genética (Caron *et al.*, 2009; Fawley *et al.*, 2004). Por ello se evidencia la necesidad de complementar los análisis moleculares con análisis morfológicos y fisiológicos.

En el árbol filogenético desarrollado, *E. pailasensis* se encuentra más emparentada a ciertas cepas de *E. mutabilis* (AF096992, AY523038, AJ532405, AJ532402, AJ532401, AJ532403 y HM213850) que a otras cepas de *E. mutabilis* (AY082988, EU090196 y *E. mutabilis* CPCC293).

En el estudio de Sittenfeld *et al.* (2002), el análisis filogenético compara la cepa *Euglena* sp. CRRdV (AY029278) con numerosas secuencias de especies de distintos géneros, pero sólo una secuencia proveniente de *E. mutabilis* (AF096992); la cual fue empleada en el presente análisis como parte del alineamiento y que muestra un porcentaje de identidad del 88% con las secuencias de las cepas del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja.

La mayoría de las secuencias utilizadas en el alineamiento actual fueron incorporadas a GenBank en fecha posterior a la publicación del estudio realizado por Sittenfeld *et al.* (2002). Es por ello que, a diferencia del análisis anterior, el presente trabajo provee una mayor resolución a nivel del clado al que pertenecen los euglenoides aislados en el Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja. Con esto se logró observar con mayor claridad la estrecha relación que guardan *E. pailasensis* y *E. mutabilis*.

La cepa *E. mutabilis* CPCC293 se encontró muy emparentada con las cepas *Euglena* cf. *mutabilis* (AY082988) y ELC 1 (EU090196). Entre ellas no presentaron variación mayor a 4,1% (Fig. 5 y Anexo 11). Estas tres provienen de ambientes extremadamente ácidos y geográficamente distintos: el Río Tinto en la Península Ibérica (*Euglena* cf. *mutabilis*, AY082988), el Lago Caviahue en la Patagonia (*Euglena mutabilis* cepa ELC 1, EU090196) y el Río Serpiente en Norteamérica (*Euglena mutabilis* CPCC293). Con ello se puede observar que estas cepas corresponden a una subespecie acidófila diferente de *E. pailasensis*.

Con respecto al segundo clado principal del filograma, se vio que *E. deses* guarda mayor relación con *E. mutabilis* que con *E. gracilis* y *E. viridis*, y por consiguiente con las cepas de *Euglena* aisladas del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja. Esto concuerda con el análisis realizado por Milanowski *et al.* (2006), donde se muestran *E. deses* y *E. mutabilis* como especies de un mismo clado tanto en un análisis de genes de ARNr 16S como en un análisis de mayor precisión que combina genes de ARNr 16S y 18S. En ese estudio

también se realizó un análisis con el gen de ARNr 18S que muestra una incongruencia, ya que emparenta a *E. mutabilis* con *E. gracilis*. La justificación de esto se atribuye a la rápida evolución del ARNr 18S de *E. mutabilis* (Milanowski *et al.*, 2006).

La posición relativa de *E. viridis* y *E. gracilis* también concuerda con el análisis realizado por Milanowski *et al.* (2006), ya que se muestra al primero más cercano a *E. mutabilis* que el segundo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de los cultivos desarrollados en el CIBCM fue posible la extracción de ADN de buena calidad mediante una adaptación del método de Porebski *et al.* (1997). El ADN extraído fue amplificado mediante PCR y secuenciado con éxito, lo que permitió obtener gran parte de la secuencia nucleotídica del gen de ARN ribosomal 18S.

El alineamiento de las secuencias pareciera revelar que, de acuerdo con los genes de ARN ribosomal 18S, las cepas *E. pailasensis*, así como *Euglena sp.* de Pailas Frías y *Euglena sp.* CRRdV son probablemente la misma especie.

La construcción de filogramas a partir del alineamiento produjo un árbol de unión de vecinos y un árbol de probabilidad máxima de topología casi idéntica, con alto porcentaje de robustez en todos los nodos importantes para esclarecer la relación filogenética entre las tres cepas de *Euglena* en estudio. Además no hubo incongruencia con las filogenias desarrolladas en estudios anteriores para el género *Euglena*, lo que indica fiabilidad de los análisis realizados. Además permitieron definir que *E. mutabilis* CPC293 corresponde a una subespecie acidófila diferente de *E. pailasensis*.

De acuerdo con estos árboles de genes de ARN ribosomal 18S, las cepas de *Euglena sp.* aisladas del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja pertenecen al clado de *E. mutabilis*, y no hacen una clara distinción a nivel de especie. Basándose únicamente en este gen se podrían vislumbrar dos posibilidades: la primera es que la denominada especie *E. pailasensis* no fuera una nueva especie, sino que se trate de una variedad termotolerante de *E. mutabilis*. La segunda es que sí se trate de distintas especies, pero para ello sería necesario redefinir taxonómicamente la especie *E. mutabilis*.

Lejos de desacreditar el estudio realizado por Sittenfeld *et al.* (2002), este análisis pretende reforzar la clasificación de los protistas del linaje de los Euglénidos aislados del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja. Con ello se busca brindar una visualización de mayor resolución dentro del árbol filogenético. Sería imprudente pretender resolver la filogenia de una especie basándose únicamente en la información proporcionada por un

solo gen. Asimismo, sería igual de imprudente ignorar cualquier nueva información que pretendiese dar luz a áreas oscuras en los diferentes campos de la ciencia, aunque su naturaleza intrínseca advirtiese el derrumbe del trabajo de científicos anteriores.

El éxito de la metodología de extracción de ADN permite recomendar su uso para el desarrollo de futuras extracciones de ADN de cultivos de organismos acidófilos del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja. Con ello se podrá elaborar un protocolo normalizado que facilite la investigación científica de la diversidad microbiológica en el área.

Con respecto a la cepa *Euglena sp.* de Pailas Frías, se recomienda realizar pruebas de termotolerancia y observaciones al microscopio electrónico. Esto con el fin de sentar una base morfológica y fisiológica que permita determinar de forma definitiva si esta cepa y *E. pailasensis* son la misma especie.

Finalmente, ante la incertidumbre acerca de si *E. pailasensis* corresponde a una nueva especie o una variedad termotolerante de *E. mutabilis*, se recomienda realizar un análisis filogenético de mayor profundidad, empleando los genes de ARN ribosomal 16S de cloroplasto y los genes *par1* y *par2*. Estos dos últimos son genes que codifican para el bastón paraxonemal: una estructura proteica altamente organizada asociada a los flagelos de los euglenoides y de función desconocida. Estos genes presentan fuerte diversidad genética a nivel de taxón y se ha demostrado su concordancia con las filogenias establecidas a partir de ARN ribosomal (Talke & Preisfeld, 2002). Se estima que con esto se podrá determinar de forma definitiva la identidad de la cepa en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERMAN, C., ANDERSON, S. & ANDERSON, C. 2008. Extremophilic eukaryote life in hawaiian fumaroles. American Geophysical Union, B51D-0422.
- ALLEN, M. 1959. Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. Archives of Microbiology, 32(3):270-277.
- ALTSHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17): 3389-3402.
- AMARAL ZETTLER, L. A., GÓMEZ, F., ZETTLER, E., KEENAN, B. G., AMILS, R. & SOGIN, M. L. 2002. Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. Nature, 417(6885): 137.
- BAROSS, J. & BRAZELTON, W. 2008. Submarine hydrothermal vents: microbial biofilms, limits of life and early evolution. Complex Systems and Changes: Water and Life. Taormina, Sicilia, 29-31.
- BRANKATSCHK, R., DIAZ, M. M. & GROBEN, R. 2007. *Euglena mutabilis* strain ELC 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. Obtenido de National Center for Biology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU090196
- BREDBERG, K., STENBERG, B. & HOLST, O. 2001. Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* - a new method for rubber recycling. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(1): 43-48.
- BROSNAN, S., SHIN, W., KJER, K. M., & TRIEMER, R. E. 2003. Phylogeny of the photosynthetic euglenophytes inferred from the nuclear SSU and partial LSU rDNA. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53(4): 1175-1186.

- BROWN, T., LEMAY JR., H., BURSTEN, B., MURPHY, C. & WOODWARD, P. 2011. Chemistry: The Central Science. Prentice Hall.
- BUETOW, D. E. 2005. *Euglena*. Encyclopedia of Life Sciences, p. 1-3.
- CARON, D. A., COUNTWAY, P. D., SAVAI, P., GAST, R. J., SCHNETZER, A., MOORTHI, S. D., DENNET, M. R., MORAN, D. M. & JONES, A. C. 2009. Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. Applied and Environmental Microbiology, 75(18): 5797-5808.
- CASIOT, C., BRUNEEL, O., PERSONNÉ, J. C., LEBLANC, M. & ELBAZ-POULICHET, F. 2003. Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoule's, France). Science of the Total Environment, 320(2): 259-267.
- CEPICKA, I., HAMPL, V., KULDA, J. & FLEGR, J. 2006. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 39(2): 542-551.
- CHADHA, V. & PATEL, B. 2008. Glycosyl hydrolase enzymes of *Halothermothrix orenii* (an extremophilic bacterium). New Vistas in Microbial Extremes, 17-22.
- CHIEN, A., EDGAR, D. B. & TRELIA, J. M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology, 127(3): 1550-1557.
- COLLIER, K. J., BALL, O. J., GRAESSER, A. K., MAIN, M. R. & WINTERBOURN, M. J. 1990. Do organic and anthropogenic acidity have similar effects on aquatic fauna? Oikos, 59: 33-38.
- COLMAN, B. & BALKOS, K. D. 2005. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in two *Euglena* species. Canadian Journal of Botany, 83(7): 865-871.
- CPCC. 2011. Canadian Phycological Culture Centre - List of Cultures. Waterloo, Ontario, Canada.

- DAS, B. K., ROY, A., KOSCHORRECK, M., WENDT-POTTHOFF, K. & BHATTACHARYA, J. 2009. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Research*, 43(4): 883-894.
- DIEZ, B., PEDRÓS-ALIÓ, C., MARSH, T. L. & MASSANA, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2942-2951.
- DRUSCHEL, G. K., BAKER, B. J., GIHRING, T. M. & BANFIELD, J. F. 2009. Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical Transactions*, 5(2): 13-32.
- EICHLER, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19(4): 261-278.
- ELWOOD, H. J., OLSEN, G. J. & SOGIN, M. L. 1985. The small-subunit ribosomal sRNA gene Sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution*, 2(5): 399-410.
- FASSLER, J. & COOPER, P. 2011. BLAST Glossary. Obtenido de The NCBI Handbook: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>
- FAWLEY, M. W., FAWLEY, K. P. & BUCHHEIM, M. A. 2004. Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology*, 48(4): 489-499.
- FAYET-LEBARON, E., ATZORN, V., HENRY, Y. & KISS, T. 2009. 18S rRNA processing requires base pairings of snR30 H/ACA snoRNA to eukaryote-specific 18S sequences. *The EMBO Journal*, 28(9): 1260-1270.
- FELSENTEIN, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5:164-166.

- GEARY, J. A., BOEDEKER, D. J. & ORTIZ, W. 1999. endogenous substrates of the *Euglena* chloroplast chaperonin 60 at permissive and bleaching temperatures. *Journal of Plant Physiology*, 154(2): 231-239.
- HÄDER, D. P. & MELKONIAN, M. 1983. Phototaxis in the gliding flagellate, *Euglena mutabilis*. *Archives of Microbiology*, 135:25-29.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95-98.
- HASEGAWA, H., SOHRIN, Y., SEKI, K., SATO, M., NORISUYE, K., NAITO, K. & MATSUI, M. 2001. Biosynthesis and release of methylarsenic compounds during the growth of freshwater algae. *Chemosphere*, 43(3): 265-272.
- HENNE, A., BRÜGGERMANN, H., RAASCH, C., WIEZER, A., HARTSCH, T., LIESEGANG, H., JOHANN, A., LIENARD, T., GOHL, O., MARTÍNEZ-ARIAS, R., JACOBI, C., STARKUVIENE, V., SCHLENCZECK, S., DENCKER, S., HUBER, R., KLENK, H., KRAMER, W., MERKL, R., GOTTSCHALK, G. & FRITZ, H.. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22(5): 547-553.
- HERNÁNDEZ ASCENCIO, W. 2012. Caracterización de dos comunidades microbianas de ambientes extremos ácidos del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja. Costa Rica: Ciudad Universitaria Rodrigo Facio.
- HINDÁK, F., WOLOWSKI, K. & HINDÁKOVÁ, A. 2000. Cysts and their Formation in some neustonic *Euglena* species. *International Journal of Limnology*, 36(2): 83-93.
- HORIKOSHI, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 735-750.
- HUGENHOLTZ, P., PITULLE, C., HERSHBERGER, K. L. & PACE, N. R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology*, 180(2): 366-376.

- HWANG, C. Y. & BOO, S. M. 1998. *Euglena mutabilis* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF096992>
- JOHN, D. M., WHITTON, B. A. & BROOK, A. J. 2002. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae. London: Cambridge University Press.
- KAEBERLEIN, T., LEWIS, K. & EPSTEIN, S. S. 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570): 1127-1129.
- KARNKOWSKA-ISHIKAWA, A., MILANOWSKI, R. & ZAKRYS, B. 2010. *Euglena mutabilis* strain ACOI 377 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Obtenido de National Center for Biology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM213850>
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(29): 111-120.
- KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R. & SPENCER, C. A. 2006. Concepts of genetics. New Jersey: Prentice Hall.
- KUBICEK, C., DRUZHININA, I. & ESSER, K. 2007. Fungi in extreme environments. En K. Esser, *The Mycota* (págs. 85-103). Heidelberg: Springer Berlin.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., VALENTIN, H., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- LAWRENCE, J., SWERHONE, G. & KWONG, Y. 1998. Natural attenuation of aqueous metal contamination by an algal mat. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 825-832.

- LE ROMANCER, M., GAILLARD, M., GESLIN, C. & PRIEUR, D. 2006. Viruses in extreme environments. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(3): 17-31.
- LEBLANC, M., ACHARD, B., BEN OTHMAN, D., LUCK, J. M., BERTRAND-SARFATI, J. & PERSONNÉ, J. C. 1996. Accumulation of arsenic from acidic mine waters by ferruginous bacterial accretions (stromatolites). *Applied Geochemistry*, 11(4): 541-554.
- LEDIN, M. & PEDERSEN, K. 1996. The environmental impact of mine wastes - Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews*, 41: 67-108.
- LINTON, E. W., HITTNER, D., LEWANDOWSKI, C., AULD, T. & TRIEMER, R. E. 1999. A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(2): 217-223.
- LINTON, E. W., NUDELMAN, M. A., CONFORTI, V. & TRIEMER, R. E. 2000. A molecular analysis of the Euglenophytes using SSU rDNA. *Journal of Phycology*, 36(4): 740-746.
- LUNDBERG, K. S., SHOEMAKER, D. D., ADAMS, M. W., SHORT, J. M., SORGE, J. A. & MATHUR, E. J. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108(1): 1-6.
- MADIGAN, M. T., MARTINK, J. M., DUNLAP, P. V. & CLARK, D. P. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. Illinois: Pearson Education.
- MANN, H., TAZAKI, K., FYFE, W. S., BEVERIDGE, T. J. & HUMPHREY, R. 1987. Cellular lepidocrocite precipitation and heavy-metal sorption in *Euglena sp.* (unicellular alga): Implications for biomineralization. *Chemical Geology*, 63(2): 39-43.
- MARIN, B., PALM, A., KLINGBERG, M. & MELKONIAN, M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA

- sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, 154(1): 99-145.
- MEDLIN, L., ELWOOD, H. J., STICKEL, S. & SOGIN, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2): 491-499.
- MILANOWSKI, R., KOSMALA, S., ZAKRYŚ, B. & KWIATOWSKI, J. 2006. Phylogeny of the photosynthetic euglenophytes based on combined chloroplast and cytoplasmic SSU rDNA sequence analysis. *Journal of Phycology*, 42(3): 721-730.
- MONTEGUT-FELKNER, A. E. & TRIEMER, R. E. 1997. Phylogenetic relationships of selected euglenoid genera based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, 33(3): 512-519.
- NANODROP TECHNOLOGIES. 2007. 260/280 and 260/230 ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-sample spectrophotometers. Obtenido de Batzer Lab - Laboratory of Comparative Genomics: http://batzerlab.lsu.edu/genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf
- NCBI. 2006. New database and view options for nucleotide BLAST services. NCBI News, 15(2). Obtenido de www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html.
- NOVIS, P. M. & HARDING, J. S. 2007. Extreme acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. En J. Seckbach, *Algae and cyanobacteria in extreme environments* (págs. 445-463). Springer.
- OARGA, A. 2009. Life in extreme environments. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 1-10.
- OLAVESON, M. M. & NALEWAJKO, C. 2000. Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia*, 433(1): 39-56.

- OLSEN, G. J. & WOESE, C. R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. The FASEB journal, 7(1): 113-123.
- OREN, A. & SECKBACH, J. 2001. Oxygenic photosynthesis microorganisms in extreme environments. En J. Elster, S. J., W. Vincent, & O. Lhotsky, Algae and Extreme Environments (págs. 13-31). Beiheft: Nova Hedwigia.
- PAWLOWSKI, J., BOLIVAR, I., GUIARD-MAFFIA, J. & GOUY, M. 1994. Phylogenetic position of foraminifera inferred from LSU rRNA gene sequences. Molecular Biology and Evolution, 11(6): 929-938.
- PHILLIPS, B. 2000. Natural History Collections: Cladistics. Edinburgh: University of Edinburgh.
- PICK, U. 1999. *Dunaliella acidophila* – a most extreme acidophilic alga. En J. Seckbach, Enigmatic microorganisms and life in extreme environments (págs. 467-478). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- PINTO, G., ALBERTANO, P. & POLLIO, A. 2004. Italy's contribution to the systematics of *Cyanidium caldarium* “sensu lato”,. En J. Seckbach, Evolutionary pathways and enigmatic algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and related cells (págs. 157-166). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- POREBSKI, S., BAILEY, L. & BAUM, B. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15(1): 8-15.
- PRASANNA, R., KUMAR RATHA, S., ROJAS, C. & BRUNS, M. 2011. Algal diversity in flowing waters at an acidic mine drainage “barrens” in central Pennsylvania, USA. Folia Microbiologica, 56(6): 491-496.
- ROTHCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. 2001. Life in extreme environments. Nature, 409: 1092-1101.

- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- SÁNCHEZ, E., VARGAS, M., MORA, M., ORTEGA, J., SERRANO, A., FREER, E. & SITTENFELD, A. 2004. Descripción ultraestructural de *Euglena pailasensis* (Euglenozoa) del Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(1): 31-40.
- SECKBACH, J. 2006. The Extremophiles: diversity of life environments. En J. Seckbach, *Life as we know it* (págs. 5-20). Dordrecht: Springer.
- SECKBACH, J. & OREN, A. 2007. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Israel: Springer.
- SHIN, W. & TRIEMER, R. E. 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Euglena* (Euglenophyceae) with particular reference to the type species *Euglena viridis*. *Journal of Phycology*, 40(4): 759-771.
- SITTENFELD, A., MORA, M., ORTEGA, J. M., ALBERTAZZI, F., CORDERO, A., RONCEL, M., SÁNCHEZ, E., VARGAS, M., FERNÁNDEZ, M., WECKESSER, J. & SERRANO, A. 2002. Characterization of a photosynthetic *Euglena* strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 151-161.
- SPIESS, H. 1987. A maximum likelihood model for estimating origin-destination matrices. *Transportation Research Part B: Methodological*, 21(5): 395-412.
- TALKE, S. & PREISFELD, A. 2002. Molecular evolution of euglenozoan paraxonemal rod genes *par1* and *par2* coincides with phylogenetic reconstruction based on small subunit rDNA data. *Journal of Phycology*, 98: 995-1003.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.

- TATENO, Y., TAKEZAKI, N. & NEI, M. 1994. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Molecular Biology and Evolution*, 11(2): 261-277.
- TINDALL, K. R. & KUNKEL, T. A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27(16): 6008-6013.
- TORSVIK, V., ØVREÅS, L. & THINGSTAD, T. 2002. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570): 1064-1066.
- TRIEMER, R. E., LINTON, E., SHIN, W., NUDELMAN, A., MONFILS, A., BENNET, M. & BROSNAN, S. 2006. Phylogeny of the Euglenales based upon combined SSU and LSU rDNA sequence comparisons and description of *Discoplastis* Gen. Nov. (Euglenophyta). *Journal of Phycology*, 42(3): 731-740.
- UZZO, A. & LYMAN, H. 1969. Light dependence of temperature-induced bleaching in *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 180(3): 573-575.
- VALENTE, T. M. & GOMES, C. L. 2007. The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology*, 33: 283-294.
- VAN DEN BURG, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3): 213-218.
- VAN DEN HOEK, C., MANN, D. & JAHNS, H. M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University.
- VISMARA, R., BARSANTI, L., LUPE'TTI, P., PASSARELLI, V., MERCATI, D., DALLAI, R. & GUALTIERI, P. 2000. Ultrastructure of the pellicle of *Euglena gracilis*. *Tissue & Cell*, 32(6): 451-456.
- WHARTON, D. A. 2002. *Life at the limits: organisms in extreme environments*. Cambridge: Cambridge University Press.

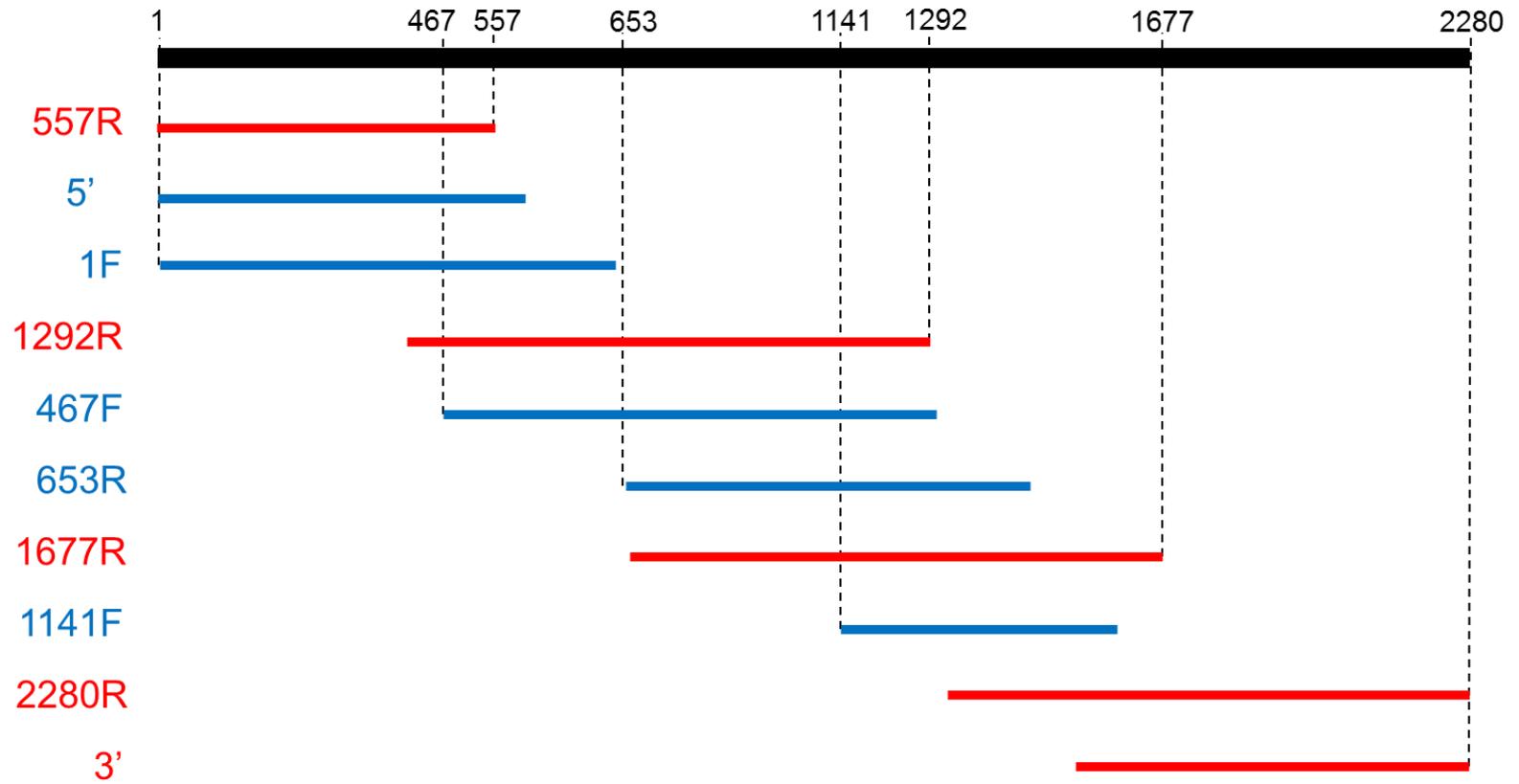
WHITTON, B. A. & DIAZ, B. M. 1981. Influence of environmental factors on photosynthetic species composition in highly acidic waters. Verh Internat Verein Limnol, 21: 1459-1465.

ZAKRYŚ, B., MILANOWSKI, R., EMPEL, J., PIOTR, B., GROMADKA, R. & KWIATOWSKI, J. 2002. Two different species of *Euglena*, *E. geniculata* and *E. myxocylindracea* (Euglenophyceae), are virtually genetically and morphologically identical. Journal of Phycology, 38: 1190-1199.

ANEXO 1. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS IMPRIMADORES

IMPRIMADOR	SECUENCIA (5' → 3')	REFERENCIA
18S-3'	CGACGGGCGGTGTGTACAAGT	Montegut-Felkner & Triemer, 1997
18S-5'	CAGTGGGTCTGTGAATGGCTCC	Montegut-Felkner & Triemer, 1997
1F(A)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin <i>et al.</i> , 1988
467F	AGGGTTCGATTCCGGAG	Elwood <i>et al.</i> , 1985
557R	TTACCGCAGCTGCTGGC	Zakryś <i>et al.</i> , 2002
653R	ACCAGACTTGCCCTCC	Diez <i>et al.</i> , 2001
1141F	CAAACCTAAAGGAATTG	Zakryś <i>et al.</i> , 2002
1292R	TCTAAGAATTTACCTCTG	Zakryś <i>et al.</i> , 2002
1677R	CGGCCATGCACCACC	Cepicka <i>et al.</i> , 2006
2280R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Medlin <i>et al.</i> , 1988

ANEXO 2. ESQUEMA DE SECUENCIACIÓN



ANEXO 3. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE *E. PAILASENSIS*

>EUGLENA_PAILASENSIS

GCTGCAGAACCATAATGCTTCGTTCAAGGGCTAAGCCATGCAAGTGTGAGAGGACTGACTCCAATA
GTTGATCTGTGAATGGCTCCTTAGACCAGTAACCATCGACGTGATAGATGTGTGGTACCAGCCTCT
CGCCTGAAGGTGCTCAGTTGGATATCTCTCAAACCTGGTGGCTAATACACGATCAAGAGGTGAGCCA
TTGTTGCAAGGCAATGTGGCTCAAAGGATACATCTCCAGAGAAGGCGTCCCCTCCACACAGGCCTAG
TGTGGTGGACTGCAACCAGCTGGTGAACAAGACCAGTGCCAGCAATGGGCAGCGTTGGCTCAGCGTT
GAACCAGGCTGGATCCCAATGGCGTATCATCGAAGGCAAGGGACAGTCAGCTCTGGCGTATGGTCTCT
GCTTGGTCTCGGCCAGGCAAGATCAATATCACTCGTGTGCTTGGGCTCAGCCCTCACTCAGCTTGATC
ATGCGAACTTCTGACCTATCAGCTCTGTGGTGTGATTGGATCACTGTGGCCTCGACGGGTAACGGA
GAATGAGGGTCTGATTCCGGAGAGGGAGCCTCAGAGACGGCTACCACTGCTACGGTGGGCAGCAGGCA
CGCAAATTGCCCATGAAAGAACACTCCATTGAGGCAGCAACGAACTGCAGCAACTGTGCATGACCTC
ACCGGTGGTACAGCTTGGAAATGGATGCAACCCAAACACAGTGATGAGTAGCCACTGGAGAGCAAGTC
TGGTGCCAGCAGTCGCGGTAATTCCAGCTCCAAGTGTGTATGCTGTCAATTGCTGCTGTTAAAACGCTC
GTAGTCAGACCATGGGATGCAGGACCACTCAGTGTGTGGACCCGGTTGTCTGGCTGCTGGCTGGGGC
AATCCCACCAGGGTCAAGCGCTGGACCATCCGCAGCTGGTTGGCCTGACGGTTCGCAAGGGGCCGTCA
TCCTGCTCCCACAGCTCAGGCCTCTGTCTGGGCCCTCGGGCCCTGGCAGAAGCCTGGATGGCATGATG
TGCTCTTGCTGTAAGTATCCTCTACTGGACCCTGAGGCGGTATTGCTCCCAACACTAGCCATTGGCAC
CGACGGTGGTTCAAGCCCCGTGCCTGAAAGACCAGACCCACCTCATGCCAGCCATCGGAGTCTGCCA
TCGTTGTACCCTGGTGAAGCAGTGTGCTCCAAGCATCCAACCGTGTCCCTTCGGGGACTCCAAGTC
ATGGCTGAATGTGCAACCAGTGAATGCCAATCAAACGACCTCGTACGGCAATGCTTGTGCTGGTCTTG
AGGCCTACGAACGGGCAATGTGGCAGGGGGAACCATTAGGAAGCTTGCTTCATGCGATGGGTCTTAG
ACCTTAGCTACTCGATCTCGGATGAGAGGCAGCCCAGGGGTGAAGGGACCTTAGTGTGAGAGGTG
AAATTCTTAGATCGCCATGAGACCAGCTGAGGCGAAGGCTCTTCTGTCTACTAGCCTGCCTCTCTCGA
TCAAGAATGGCAGTTTGGGGAGCCAAGATGATCAGACACCGTCTGATGCCGTAAACGGTACC
ACCCGAGTCTGTAGTTGATGCGCGCCTCCCATGGCTTCAGGAGTCACCCCCTGACCGAGAGAAATCC
CAAGCGGGTTCAAGGGGGAGTACCGCCGCAAGGCAGAACTTAAAGGAATTGACGGAGTGGCACCACA
AGGCGTGGAGTATGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGGAATGTTACCAGGCCAGGACATGGCAAGGA
TGGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCCCGTGGACGGTGGTGCATGGCCGCTACTGATTGGTGGAGT
GATTTGTCTGGCTGATCCCGATAACGAGTGAGATCTCTGCTTCTGAATAGACTCTGGCTCGCATCTGT
AGGGCTGGAGCCAGTGAACAGCATCGGACCTGGCCCTGCCCTCGGGTGGGAATCTCCAACCGGTGGCT
GCCTGGCTCCCCGAGAGCCAACAAGGAAGTCTTCTGAGGTGCTGCTTTACCGACAAGAAGGCTGA
GCATGCGAGAGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCAGATGTCCTGGGCCGCACGCGCACGACTGT
TTCAGTGAAGGAGCCACCAAGAAGGCAAGGGTCTCCCCTGCCCCATGGCCTGAAGAGGCTGGGAAA
CCTTGCAAGCCTGAAACGTGATGGGGATAGATGATTGCAACTGTGTCTTTGAACGAGGAATGCCTAG
TATGCCCAGGTATCAGCCTGGATCGACTGAGTCCCTGCCAGTTTGTACACACCCGCCGTGGTTGCTA
CCGATGGCATTGGGATAGTAGCATGTGGAGAATGGACACTGAGCCGATCGAAGCTGGGTGATGTCTCT
TGCTAGAGGAAGCAAAAGTTGTTAAAATGC

ANEXO 4. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE *EUGLENA SP.* DE PAILAS
FRÍAS

>PAILAS_FRIAS

TGCCAGAAGCCATATGCTTCGTTCAAGGGCTAAGCCATGCAAGTGTGAGAGGACACTGACTCCAATAG
TTGATCTGTGAATGGCTCCTTAGACCAGTAACCATCGACGTGATAGATGTGTGGTACCAGCCTCTC
GCCTGAAGGTGCTCAGTTGGATATCTCTCAAAACCTGGTGGCTAATACACGATCAAGAGGTCAGCCAT
TGTTGCAAGGCAATGTGGCTCAAAGGATACATCTCCAGAGAAGGCGTCCCACTCCACACAGGCCTAGT
GTGGTGGACTGCAACCAGCTGGTGAACAAGACCAGTGCCAGCAATGGGCGAGCGTTGGCTCAGCGTTG
AACCAGGCTGGATCCCAATGGCGTATCATCGAAGGCAAGGGACAGTCAGCTCTGGCGTATGGTCTCTG
CTTGGTCTCGGCCAGGCAAGATCAATATCACTCGTGTGCTTGGGCTCAGCCCTCACTCAGCTTGATCA
TGCGAACTTCTGACCTATCAGCTCTGTGGTGTATTGGATCACTGTGGCCTCGACGGGTAACGGAG
AATGAGGGTCTGATTCGGGAGAGGGAGCCTCAGAGACGGCTACCACTGCTACGGTGGGCGAGGAC
GCAAATTGCCCCATGAAAGAACAACCTCCATTGAGGCAGCAACGAAGTGCAGCAACTGTGCATGACCTCA
CCGGTCCGTACAGCTTGAATGGATGCAACCCAAACACAGTGATGAGTAGCCACTGGAGAGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGTCGCGGTAATCCAGCTCCAAGTGTGTATGCTGTCTATTGCTGCTGTTAAAACGCTCG
TAGTCAGACCATGGGATGCAGGACCACTCAGTGTTGTGGACCCGGTGTCTGGCTGCTGGCTGGGGCA
ATCCCACCAGGGTCAAGGCGCTGGACCATCCGCGAGCTGGTTGGCCTGACGGTTGCGAAGGGGGCCGTCAT
CCTGCTCCCACAGCTCAGGCCTCTGTCTGGGCCCTCGGGCCCTGGCAGAAGCCTGGATGGCATGATGT
GCTCTTGCTGTAAGTATCCTCTACTGGACCCTGAGGCGGTATTGCTCCCAACACTAGCCATTGGCACC
GACGGTGGGTTCAGGCCCGTGCCTGAAAGACCAGACCCACCTCATGCCAGCCATCGGAGTCTGCCAT
CGTTGTACCCTGGTGAAGCAGTGTGCTCCAAGCATCCAACCGTGTCCCTTCGGGGACTCCAAGTCA
TGGCTGAATGTGCAACCAGTGAATGCCAATCAAACGACCTCGTACGGCAATGCTTGTGCTGGTCTTGA
GGCCTACGAACGGGCAATGTGGCAGGGGGAACCAATTAGGAAGCTTGTTCATGCGATGGGTCTTAGA
CCTTAGCTACTCGATCTCGGATGAGAGGCAGCCGACGGGGTGAAGGGGACCTTAGTGTGAGAGGTGA
AATTCTTAGATCGCCATGAGACCAGCTGAGGCGAAGGCTCTTCTGTCTACTAGCCTGCCTCTCTCGAT
CAAGAATGGCAGTTTGGGGAGCCAAGATGATCAGACACCGTCGTAGTCCAGTCCGTAACCGGTACCA
CCCGAGTCTGTAGTTGATGCGCGCCTCCCATGGTTTTAGGAGTCAACCCCTGACCGAGAGAAATCCC
AAGCGGGTTCAGGGGGGAGTACCGCCGCAAGGCAGAACTTAAAGGAATTGACGGAGTGGCACCACAA
GGCGTGGAGTATGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGGAATGTTACCAGGCCAGGACATGGCAAGGAT
GGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCCCGTGGACGGTGGTGCATGGCCGCTACTGATTGGTGGAGTG
ATTTGTCTGGCTGATCCCGATAACGAGTGAGATCTCTGCTTCTGAATAGACTCTGGCTCGCATCTGTA
GGGCTGGAGCCAGTGAACAGCATCGGACCTGGCCCTGCCCTCGGGTGGGAATCTCCAACCGGTGGCTG
CCTGGCTCCCCGAGAGCCAACAAGGAAGTCTTCTCTGAGGTGCTGCTTTACCGACAAGAAGGCTGAG
CATGCGAGAGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCAGATGTCCTGGGCCGCACGCGCACGACTGTT
TCAGTGAAGGAGCCACCAAGAAGGCAAGGGTTCTCCCACTGCCCCATGGCCTGAAGAGGCTGGGAAAC
CTTGCAAGCCTGAAACGTGATGGGGATAGATGATTGCAACTGTGTCTCTTGAACGAGGAATGCCTAGT
ATGCCAGGTGATCAGCCTGGATCGACTGAGTCCCTGCCAGTTTGTACACACCGCCCGTGGTTGCTAC
CGATGGCATTGGGATAGTAGCATGTGGAGAATGGACACTGAGCCGATCGAAGCTGGGTGATGTCCTCT
GCTAGAGG

ANEXO 5. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE *E. MUTABILIS* CPCC293

>EUGLENA_MUTABILIS_CPCC293

GCCTGCCAGAAGCCATATGCTTCGTTCAAGGACTAAGCCATGCAAGTGTGAGAGGACACTGTGAATCG
AGAGTTGATCTGTGAATGGCTCCTTAGACCAGTTGCCATCGACGTGATAGACCGTGTGTGGCACCAGC
CTCTCGCCCAAGGCGCTCAGTTGGACATCCCTCAAACCTGGTGGCTAATACACGATCAAGAGGTGAG
CCAAAGGACCTGTGGTGTGCAACAACCCTCAAAGTCGCTTCGCGTCTCACCTCAGTGGTAGACTGC
AACCAGCTGGTGTGCAAGACCTGTGCTCCGCAACTCGGAGCAGCGTTGACCCCGCGATGAACCAAGCT
GGATCTCAATGGCGTATCGAAACGAAAGGCAAGGGACAGTCAGCTCTGGCGATTTGATCTCGGCTGTG
GCTCAGGCCTCAGCTGGATCTACACGACATGTGTCTCGTGGTCTCACCGAGGCCTCGTTCACCTCAGC
TTGATCATGCGAACTTCTGACCTATCAGCTCGATGGTGTGCAATGGATCACACTGGCCTCGACGGGT
AACGGGAATGAGGGTCTGATTCCGGAGAGGGAGCCTTAGAGACGGCTACCACTGCTACGGCGGGCAG
CAGGCACGCAAATTGCCCATGAACGAACACCCATTGAGGCAGCAACGAAGTGCAGCAACCGTGCATG
ACCTCATTGGTGGTACGGCTTGAATGGATGCAACCCAAACACAGTTATGAGTAGCCACTGGAGAGC
AAGTCTGGTGCCAGCAGTCGCGGTAATTCCAGCTCCGAGTGCATGCTGTATTGCTGCTGTTAAAG
CGCTCGTAGTCAGACAATGGGTTGCAGGGACCGTGTAGCCACGCAGGCCAGTGGGCTCCCAGATGCC
CCGTGCAGATGGTCCCATCGGACAACCCAGCAGCTGCACGTGACCCACGTCCCTCGGCAACGAGGACG
TCTCTGCTTCCCACAGCTCAGGCTGCTGCATCGGCTCACCCGTGGCCCGGTGCACGCAGTCTGGAT
GGCATGATGTGCTCTTGCTGCAAGCGCCCTTTACTGGACCCTGAGGCGGTGATGCTCACAACGCTAGT
CATTGGCAACAGTCCGTGTGGAACCACGACCCCGTGTCTGGAAGCCAGATCCACACCAGCCAGCCCT
CAGAGCCTGCCATCATTGTCACTCTGGTCAAAGCAGTGTGCTCCAAGCGTCCAACCGAAGTCCCCCGC
TCGACGGGGGACCCTCAGTCAAGGCTGAATGTGCAACCAGTGAATGCCAACCACACGACCCGCTGAGG
CAATGCTTGTGCCGCTTTGAGACCCACGACTTGGGTAGTGTGGCTGGGGGGAACCGGGGACTGGGT
GCTCCTCGCAGAGGACGAGCCTGACGCGTCTTCCCTGTCCCAGCCACTCGATCCCGGATGGGATGCA
GCCTCACGGGGTGAAGGGAACCTTTGTGTGAGAGGTGAAATTTAGACCGCAATGAGACCACCTGAG
GCGAAGGCTCTTCGACCAACTAGCCTGTCTCTCGATCTAAGAATGGCAGTTTGGGGAGCCAAGATG
ATCAGACACCGTCTGATCCAGCGCCGTAAACCGTACCATCCGAGTCTGCAGCTATGCGTGTCTTCCC
ATTGCCCCAGGACTCACACCCCTGACCGAGAGAAATCCCAAGCGGGTCCAGGGGGGAGTACAGTCGCA
AGGCAGAAACTTAAAGGAATTGACGGAGTGGCACCACAAGGCGTGGAGTATGCGGCTTAATTTGACTC
AACGCGGGGAATGTTACTAGGCCAGCACATGGCAAGGATGGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATCCC
GTGGACGGTGGTGCATGGCCGCTACTGATTGGTGGAGTATTTGTCTGGCTGATCCCGATAACGAGTG
AGATCTCTGCTTCTGACTAGGCTCTGGCTCGCATCTGTAGGGTCTGAGTCCCAGCACCGATCGGA
CCCAGGTGCCCCCGTGGTGCCTGGGAGCCATCCGCTCGGTTGTCTGGCTGTTTACCCGAGAGCCAA
CGAGGAAGTCTTCTGAGGTGCTGCTTGACGACCAGAAGGCTGAGCATGCGAGAGGCAACAGCAGGT
CTGTGATGCTCCCAGATGTTCTAGGCTGCACGCGCACGACACTGATTCAGTGAAGGAGTCACTTGA
GGCAATGGTTACCCACTGCCCCGTGGCCTGAAGAGGCTGGGAAACCTTGCAAACCTGAGACGTGATG
GGGATAGACGATTGCAACTGTGTCTTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCGCAGGTCATCAGCCTGGA
CCGATTGAGTCCCTGCCATTTGTAGCACACCCCGCTCGTTGCTACCGATGGCATTGTGATAGAAGCA
CTGTGGAGTGGTCCCCCGTGGGTCCCTGCGAAGCTGGTTGATGTCACTCTGCTAGAGGAAGCAAA
AGTCGGAACAAGGCC

ANEXO 6. RESULTADOS DEL BLAST PARA LAS CEPAS *E. PAILASENSIS* Y *EUGLENA SP.* DE PAILAS FRÍAS

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY029278.1	Euglena sp. CRRdV 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	4340	4340	99%	0.0	99%
AJ532401.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain M415/4	3328	3328	97%	0.0	92%
AJ532402.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9d	3325	3325	97%	0.0	92%
AJ532404.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9a	3247	3247	97%	0.0	92%
AJ532405.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9b	3241	3241	97%	0.0	92%
AJ532403.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain M1857	3240	3240	97%	0.0	92%
AY523038.1	Euglena mutabilis strain New Jersey (NJ) small subunit ribosomal RNA	3193	3193	99%	0.0	91%
HM213850.1	Euglena mutabilis strain ACOI 377 small subunit ribosomal RNA gene	2970	2970	89%	0.0	92%
AF096992.1	Euglena mutabilis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	2964	2964	99%	0.0	89%
AY082988.1	Euglena cf. mutabilis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1461	2310	95%	0.0	85%
EU090196.1	Euglena mutabilis strain ELC 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	1459	2314	90%	0.0	86%
JF694007.1	Euglena mutabilis strain PM1 18S ribosomal RNA gene, partial seque	797	1566	64%	0.0	86%
EU750713.1	Euglena adhaerens strain ASW 08138 18S ribosomal RNA gene, part	584	892	53%	1e-162	82%
AY523032.1	Euglena stellata strain Michigan (MI) 09 small subunit ribosomal RNA	579	655	44%	5e-161	79%
FJ719611.1	Euglena sp. Jilnal030207I 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	577	577	37%	2e-160	79%
AY029408.1	Euglena intermedia var. acidophila 18S ribosomal RNA gene, comple	577	577	37%	2e-160	79%
AJ532426.1	Euglena gracilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-5/25	573	864	52%	2e-159	82%
AF112873.2	Euglena UTEX364 small subunit ribosomal RNA gene, complete sequ	573	860	52%	2e-159	81%
AF081593.1	Euglena anabaena 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; mi	569	860	52%	3e-158	82%
AY029409.1	Euglena gracilis var. bacillaris 18S ribosomal RNA gene, complete se	568	568	37%	1e-157	79%
DQ140158.1	Euglena sp. MI32 small subunit ribosomal RNA gene, complete sequ	556	628	40%	2e-154	83%
AF403157.1	Lepocinclis helicoideus small subunit ribosomal RNA gene, partial seq	553	553	38%	3e-153	78%
DQ140148.1	Euglena gymnodinioides small subunit ribosomal RNA gene, complete	544	544	37%	2e-150	78%
FJ719612.1	Euglena sp. MI67 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	38%	1e-147	78%
AJ532454.1	Euglena spathirhyncha partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-42	532	532	37%	4e-147	78%
AY523035.1	Euglena geniculata strain Michigan (MI) 61 small subunit ribosomal f	531	531	37%	1e-146	78%
AJ532416.1	Euglena sp. M1858 partial 18S rRNA gene, strain M1858	531	531	37%	1e-146	78%
DQ140144.1	Trachelomonas volvocinopsis small subunit ribosomal RNA gene, cor	527	527	37%	2e-145	78%
AJ532448.1	Trachelomonas sp. M1352 partial 18S rRNA gene, strain M1352	527	527	37%	2e-145	78%
EF999898.1	Trachelomonas sp. T101 small subunit ribosomal RNA gene, complet	525	525	34%	6e-145	79%
FJ719606.1	Discoplastis sp. Gungnamji052507K 18S ribosomal RNA gene, partial	520	646	44%	3e-143	80%
AY626064.1	Euglena viridis strain ACOI 2951 18S small subunit ribosomal RNA ge	520	520	34%	3e-143	79%
FJ719610.1	Euglena sp. Bibong100404-2 18S ribosomal RNA gene, partial seque	518	518	38%	1e-142	78%
AY523039.1	Euglena stellata strain New Jersey (NJ) sandy small subunit ribosom	514	622	44%	1e-141	79%
AJ532436.1	Euglena polymorpha partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-32	512	512	37%	5e-141	78%

ANEXO 7. RESULTADOS DE BLAST PARA LA CEPA *E. MUTABILIS* CPCC293

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY082988.1	Euglena cf. mutabilis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	4379	4379	99%	0.0	99%
EU090196.1	Euglena mutabilis strain ELC 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	4353	4353	97%	0.0	99%
JF694007.1	Euglena mutabilis strain PM1 18S ribosomal RNA gene, partial seque	3249	3249	72%	0.0	99%
AY029278.1	Euglena sp. CRRdV 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2218	2218	99%	0.0	84%
AJ532405.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9b	1552	2347	91%	0.0	87%
AJ532404.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9a	1552	2347	91%	0.0	87%
AJ532402.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-9d	1548	2377	88%	0.0	88%
AJ532401.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain M415/4	1548	2377	88%	0.0	88%
AJ532403.1	Euglena mutabilis partial 18S rRNA gene, strain M1857	1530	2338	88%	0.0	87%
AY523038.1	Euglena mutabilis strain New Jersey (NJ) small subunit ribosomal RN	1495	2314	92%	0.0	86%
AF096992.1	Euglena mutabilis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1428	2227	92%	0.0	85%
HM213850.1	Euglena mutabilis strain ACOI 377 small subunit ribosomal RNA gene	1417	2149	82%	0.0	87%
DQ140151.1	Euglena tristella small subunit ribosomal RNA gene, complete sequer	586	586	40%	3e-163	78%
AJ532408.1	Euglena deses var. intermedia partial 18S rRNA gene, strain ASW 08	575	575	36%	6e-160	79%
AJ532409.1	Euglena deses partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-19b	560	560	36%	2e-155	79%
AJ532411.1	Euglena tristella partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-35	558	558	40%	6e-155	78%
FJ719611.1	Euglena sp. Jilnal030207I 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	40%	8e-154	78%
AF150936.1	Euglena stellata 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ	538	538	34%	8e-149	79%
AJ532419.1	Euglena stellata partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-14	536	536	34%	3e-148	79%
DQ140158.1	Euglena sp. MI32 small subunit ribosomal RNA gene, complete sequ	531	531	36%	1e-146	78%
HQ287920.1	Lepocinclis oxyuris 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial se	525	525	36%	6e-145	78%
DQ140156.1	Euglena sp. MI17 small subunit ribosomal RNA gene, complete sequ	520	520	36%	3e-143	78%
HM213846.1	Euglena deses strain ASW 08076 small subunit ribosomal RNA gene,	516	516	35%	4e-142	78%
EU750713.1	Euglena adhaerens strain ASW 08138 18S ribosomal RNA gene, part	508	508	37%	6e-140	78%
AY523032.1	Euglena stellata strain Michigan (MI) 09 small subunit ribosomal RNA	508	508	40%	6e-140	77%
AJ532418.1	Euglena geniculata var. terricola partial 18S rRNA gene, strain SAG	508	508	36%	6e-140	78%
AF403157.1	Lepocinclis helicoideus small subunit ribosomal RNA gene, partial sec	507	507	36%	2e-139	78%
DQ140148.1	Euglena gymnodinioides small subunit ribosomal RNA gene, complete	501	501	36%	1e-137	77%
AY070247.1	Euglena tristella SAG 1224-35 small subunit ribosomal RNA gene, pa	499	499	35%	4e-137	78%
EU370490.1	Euglena sp. pseudostellata strain ACOI 2956 18S small subunit ribos	494	494	35%	2e-135	78%
AY626064.1	Euglena viridis strain ACOI 2951 18S small subunit ribosomal RNA ge	494	494	35%	2e-135	78%
HM213845.1	Euglena deses strain ASW 08075 small subunit ribosomal RNA gene,	490	490	34%	2e-134	78%
AJ532482.1	Phacus caudatus partial 18S rRNA gene, strain ASW 08020	488	488	36%	8e-134	78%
FJ719628.1	Phacus hamelii strain ACOI1088 18S ribosomal RNA gene, partial sec	484	484	40%	1e-132	76%
AY626061.1	Euglena viridis strain SAG 1224-17b 18S small subunit ribosomal RN	484	484	32%	1e-132	78%
FJ719634.1	Phacus raciborskii strain ACOI1758 18S ribosomal RNA gene, partial	477	477	36%	2e-130	77%

ANEXO 8. RESULTADOS DEL BLAST PARA ESPECIES DIFERENTES DE *E. MUTABILIS*

Euglena gracilis

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ532426.1	Euglena gracilis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-5/25	573	864	52%	4e-164	82%
M12677.1	Euglena gracilis small subunit rRNA, complete	573	864	52%	4e-164	82%
AY029409.1	Euglena gracilis var. bacillaris 18S ribosomal RNA gene, complete se	568	568	37%	2e-162	79%
AF283309.1	Euglena gracilis 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ	556	866	52%	4e-159	83%
AJ532425.1	Euglena gracilis var. bacillaris partial 18S rRNA gene, strain SAG 122	556	848	52%	4e-159	82%
AF283308.1	Euglena gracilis 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequ	532	848	52%	7e-152	84%
EU263909.1	Euglena gracilis strain G46 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	279	279	14%	1e-75	81%

Euglena deses

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ532408.1	Euglena deses var. intermedia partial 18S rRNA gene, strain ASW 0807	650	989	54%	0.0	80%
AJ532409.1	Euglena deses partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-19b	636	996	54%	0.0	82%
AJ532407.1	Euglena deses partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-23	623	974	54%	2e-180	81%
HM213846.1	Euglena deses strain ASW 08076 small subunit ribosomal RNA gene,	596	934	53%	2e-172	80%
HM213845.1	Euglena deses strain ASW 08075 small subunit ribosomal RNA gene,	578	904	52%	6e-167	80%
AJ532410.1	Euglena deses var. mesnili partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-	426	1019	50%	2e-121	81%
HM213844.1	Euglena deses strain ASW 08074 small subunit ribosomal RNA gene,	273	273	12%	3e-75	81%
HM213849.1	Euglena deses strain CCAP 1224/44 small subunit ribosomal RNA ge	260	260	12%	2e-71	81%
HM213847.1	Euglena deses strain ASW 08137 small subunit ribosomal RNA gene,	242	242	12%	5e-66	79%
HM213848.1	Euglena deses strain CCAC 0092 small subunit ribosomal RNA gene,	241	241	11%	2e-65	81%
HM213843.1	Euglena deses strain ASW 08044 small subunit ribosomal RNA gene,	219	219	11%	6e-59	78%

Euglena viridis

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF112872.1	Euglena viridis small subunit ribosomal RNA gene, complete sequenc	654	1116	61%	0.0	82%
AY523036.1	Euglena viridis strain New Jersey (NJ) 001 small subunit ribosomal R	650	1127	62%	0.0	81%
AF090868.1	Euglena viridis 18S ribosomal RNA, complete sequence	650	1098	61%	0.0	82%
AJ532417.1	Euglena viridis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-17d	632	994	54%	0.0	82%
AF445460.1	Euglena viridis 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequer	628	1055	61%	0.0	80%
AY626064.1	Euglena viridis strain ACOI 2951 18S small subunit ribosomal RNA ge	614	990	52%	2e-177	83%
AY070246.1	Euglena viridis SAG 1224-17D small subunit ribosomal RNA gene, pa	581	943	51%	9e-168	82%
AY523037.1	Euglena viridis strain SAG1224-17c small subunit ribosomal RNA gen	576	1048	61%	4e-166	82%
AY626061.1	Euglena viridis strain SAG 1224-17b 18S small subunit ribosomal RN	554	859	52%	1e-159	79%
AJ532415.1	Euglena viridis partial 18S rRNA gene, strain SAG 1224-21	448	1082	51%	1e-127	82%

Eutreptiella sp.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ532398.1	Eutreptiella pomquetensis partial 18S rRNA gene, strain CCMP 1491	466	466	28%	1e-132	80%
AJ532397.1	Eutreptiella braarudii partial 18S rRNA gene, strain SCCAP K-0026	466	466	28%	1e-132	80%
AJ532399.1	Eutreptiella eupharyngea partial 18S rRNA gene, strain SCCAP K-00	357	576	33%	7e-100	80%
FJ719618.1	Eutreptiella gymnastica strain Masan 18S ribosomal RNA gene, parti	346	534	31%	1e-96	80%
AJ532400.1	Eutreptiella gymnastica partial 18S rRNA gene, strain SCCAP K-033	346	534	31%	1e-96	80%
AF081590.1	Eutreptiella gymnastica 18S ribosomal RNA gene, complete sequenc	346	535	31%	1e-96	80%
JQ337867.1	Eutreptiella sp. LIS 2000 18S ribosomal RNA, partial sequence	333	333	20%	1e-92	80%
DQ249879.1	Eutreptiella braarudii strain CCMP-1594 18S small subunit ribosomal	333	333	20%	1e-92	80%
AF112875.1	Eutreptiella CCMP389 small subunit ribosomal RNA gene, complete s	322	322	20%	2e-89	79%

ANEXO 9. SECUENCIAS UTILIZADAS EN EL ALINEAMIENTO

Accesión GenBank	Descripción	Origen
AY082988	<i>Euglena cf. mutabilis</i> gen de ARN ribosomal 18S, secuencia completa	Aislada en el Río Tinto: pH 2 con altas concentraciones de metales pesados (Amaral Zettler <i>et al.</i> , 2002)
EU090196	<i>Euglena mutabilis</i> cepa ELC 1 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Aislada en el Lago Caviahue, conocido como Lago Agrio (Brankatschk <i>et al.</i> , 2007)
AY029278	<i>Euglena sp.</i> CRRdV 18S gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Aislada de una paila de barro hirviendo en el Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja (Sittenfeld <i>et al.</i> , 2002)
AJ532401	<i>Euglena mutabilis</i> cepa M415/4 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Origen desconocido (Marin <i>et al.</i> , 2003)
AJ532402	<i>Euglena mutabilis</i> cepa SAG 1224-9d gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección SAG Aislada en Harz, Alemania, por E. G. Pringsheim, 1958 (Marin <i>et al.</i> , 2003)
AJ532405	<i>Euglena mutabilis</i> cepa SAG 1224-9b gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección SAG Aislada en Bohemia, República Checa, por F. Mainx en 1924 (Marin <i>et al.</i> , 2003)
AJ532403	<i>Euglena mutabilis</i> cepa M1857 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Origen desconocido (Marin <i>et al.</i> , 2003)
AY523038	<i>Euglena mutabilis</i> cepa New Jersey	Aislada de pequeños pozos en New

	(NJ) gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Jersey, E.E.U.U. (Shin & Triemer, 2004)
HM213850	<i>Euglena mutabilis</i> cepa ACOI 377 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección ACOI, origen desconocido (Karnkowska-Ishikawa <i>et al.</i> , 2010)
AF096992	<i>Euglena mutabilis</i> gen de ARN ribosomal 18S, secuencia completa	Origen desconocido (Hwang & Boo, 1998)
AJ532426	<i>Euglena gracilis</i> cepa SAG 1224-5/25 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección SAG Aislada por E. G. Pringsheim en 1950
AJ532408	<i>Euglena deses</i> var. intermedia cepa ASW 08044 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección ASW Aislada en Austria por E. Kusel en 1986 (Marin <i>et al.</i> , 2003)
AF112872	<i>Euglena viridis</i> gen de ARN ribosomal 18S, secuencia completa	Origen desconocido (Linton <i>et al.</i> , 1999)
AJ532398	<i>Eutreptiella pomquetensis</i> cepa CCMP 1491 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial	Colección NCMA Aislada en Puerto Pomquet, Nueva Escocia, Canadá por McLachlan, Seguel y Fritz en 1992 (Marin <i>et al.</i> , 2003)


```

KUGLENA_PAILASKN919
PAILAS_FRIAS
AY029278 [Kuglena sp. CR9dv
KUGLENA_MTPABIL19_CPCC293
AY082988 [Kuglena_mutab119
XU090196 [Kuglena_mutab119_XLC
AJ532401 [Kuglena_mutab119_M41
AJ532402 [Kuglena_mutab119_9AG
AJ532403 [Kuglena_mutab119_M18
NM213850 [Kuglena_mutab119_ACO
AJ532405 [Kuglena_mutab119_9AG
AF096992 [Kuglena_mutab119
AY523038 [Kuglena_mutab119_New
AJ532408 [Kuglena_dsees_var._in
AJ112872 [Kuglena_vitidis
AJ532426 [Kuglena_gzac119_9AG
AJ532398 [Rutzschellia_pomquetensis
.....1810.....1820.....1830.....1840.....1850.....1860.....1870.....1880.....1890.....1900.....1910.....1920.....1930.....1940.....1950

A
KUGLENA_PAILASKN919
PAILAS_FRIAS
AY029278 [Kuglena sp. CR9dv
KUGLENA_MTPABIL19_CPCC293
AY082988 [Kuglena_mutab119
XU090196 [Kuglena_mutab119_XLC
AJ532401 [Kuglena_mutab119_M41
AJ532402 [Kuglena_mutab119_9AG
AJ532403 [Kuglena_mutab119_M18
NM213850 [Kuglena_mutab119_ACO
AJ532405 [Kuglena_mutab119_9AG
AF096992 [Kuglena_mutab119
AY523038 [Kuglena_mutab119_New
AJ532408 [Kuglena_dsees_var._in
AJ112872 [Kuglena_vitidis
AJ532426 [Kuglena_gzac119_9AG
AJ532398 [Rutzschellia_pomquetensis
.....1960.....1970.....1980.....1990.....2000.....2010.....2020.....2030.....2040.....2050.....2060.....2070.....2080.....2090.....2100

A
KUGLENA_PAILASKN919
PAILAS_FRIAS
AY029278 [Kuglena sp. CR9dv
KUGLENA_MTPABIL19_CPCC293
AY082988 [Kuglena_mutab119
XU090196 [Kuglena_mutab119_XLC
AJ532401 [Kuglena_mutab119_M41
AJ532402 [Kuglena_mutab119_9AG
AJ532403 [Kuglena_mutab119_M18
NM213850 [Kuglena_mutab119_ACO
AJ532405 [Kuglena_mutab119_9AG
AF096992 [Kuglena_mutab119
AY523038 [Kuglena_mutab119_New
AJ532408 [Kuglena_dsees_var._in
AJ112872 [Kuglena_vitidis
AJ532426 [Kuglena_gzac119_9AG
AJ532398 [Rutzschellia_pomquetensis
.....2110.....2120.....2130.....2140.....2150.....2160.....2170.....2180.....2190.....2200.....2210.....2220.....2230.....2240.....2250

AA
KUGLENA_PAILASKN919
PAILAS_FRIAS
AY029278 [Kuglena sp. CR9dv
KUGLENA_MTPABIL19_CPCC293
AY082988 [Kuglena_mutab119
XU090196 [Kuglena_mutab119_XLC
AJ532401 [Kuglena_mutab119_M41
AJ532402 [Kuglena_mutab119_9AG
AJ532403 [Kuglena_mutab119_M18
NM213850 [Kuglena_mutab119_ACO
AJ532405 [Kuglena_mutab119_9AG
AF096992 [Kuglena_mutab119
AY523038 [Kuglena_mutab119_New
AJ532408 [Kuglena_dsees_var._in
AJ112872 [Kuglena_vitidis
AJ532426 [Kuglena_gzac119_9AG
AJ532398 [Rutzschellia_pomquetensis
.....2260.....2270.....2280.....2290.....2300.....2310.....2320.....2330.....2340.....2350.....2360.....2370.....2380.....2390.....2400

```

```

**** **
EUGLENA FAILLASENSIS          CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2321
FAILLAS FRIAS                CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2321
AY029278|Euglena sp. CFRndv  CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2323
EUGLENA MUTABILIS CPC293     CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2370
AY082988|Euglena mutabilis   CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2372
XU090196|Euglena mutabilis_ILC CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2364
AJ532401|Euglena mutabilis_M41 CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2296
AJ532402|Euglena mutabilis_BAG CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2297
AJ532403|Euglena mutabilis_M18 CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2283
HM213850|Euglena mutabilis_ACC CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2127
AJ532405|Euglena mutabilis_BAG CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2292
AF096992|Euglena mutabilis   CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2336
AY523038|Euglena mutabilis_New CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2318
AJ532408|Euglena deses var. in CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2352
AF112872|Euglena viridis     CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2125
AJ532426|Euglena gracilis_BAG CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2167
AJ532398|Xutroptiella pomquetensis CCTCATGACCTCTGCATCCAGTCAGTCCCTGCGCCCTTTCTA-CACACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2067
.....2410.....2420.....2430.....2440.....2450.....2460.....2470.....2480.....2490.....2500.....2510.....2520.....2530.....2540.....2550

EUGLENA FAILLASENSIS          -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACC----- 2352
FAILLAS FRIAS                -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACC----- 2352
AY029278|Euglena sp. CFRndv  -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACC----- 2355
EUGLENA MUTABILIS CPC293     -----TCCAGCTCTGCTTCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2410
AY082988|Euglena mutabilis   -----TCCAGCTCTGCTTCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2412
XU090196|Euglena mutabilis_ILC -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2364
AJ532401|Euglena mutabilis_M41 -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2336
AJ532402|Euglena mutabilis_BAG -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2337
AJ532403|Euglena mutabilis_M18 -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2323
HM213850|Euglena mutabilis_ACC -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2127
AJ532405|Euglena mutabilis_BAG -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2332
AF096992|Euglena mutabilis   -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2376
AY523038|Euglena mutabilis_New -----ATCCAGCTCGGCTATCT-CCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2357
AJ532408|Euglena deses var. in TGCACCCGCGGCTCTTGTACCGATCCGATTGGGATGATCC-ATCTCGGACAAAC-CA-----C-----AATCAGCCG- 2401
AF112872|Euglena viridis     CCACT-----CCTCAATTCGCGCATCTCCCTCTCTCTAGACCAGCAAAA 2170
AJ532426|Euglena gracilis_BAG TCCCA-----CCTCAATTCGCGCATCTCCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2212
AJ532398|Xutroptiella pomquetensis CCTCT-----CCTCAATTCGCGCATCTCCCTCTCTAGACCAGCAAAA 2112
.....2560.....2570.....2580.....2590.....

```

ANEXO 11. MATRIZ DE IDENTIDAD DEL ALINEAMIENTO

	CPCC 293	EU090 196	AY082 988	AJ532 401	AJ532 402	AJ532 403	HM213 850	AJ532 405	AF096 992	AY523 038	E._PAILAS ENSIS	P._FRI AS	AY029 278	AJ532 408	AF112 872	AJ532 426	AJ532 398
CPCC293	ID	0.976	0.988	0.817	0.817	0.811	0.743	0.817	0.799	0.803	0.806	0.806	0.803	0.599	0.588	0.584	0.556
EU090196	0.976	ID	0.969	0.802	0.802	0.798	0.758	0.802	0.784	0.788	0.796	0.796	0.794	0.588	0.576	0.572	0.544
AY082988	0.988	0.969	ID	0.813	0.813	0.808	0.740	0.813	0.797	0.801	0.803	0.803	0.800	0.599	0.588	0.585	0.557
AJ532401	0.817	0.802	0.813	ID	0.998	0.971	0.888	0.969	0.906	0.917	0.905	0.905	0.904	0.600	0.597	0.602	0.564
AJ532402	0.817	0.802	0.813	0.998	ID	0.971	0.888	0.968	0.906	0.917	0.905	0.905	0.904	0.599	0.596	0.602	0.564
AJ532403	0.811	0.798	0.808	0.971	0.971	ID	0.909	0.964	0.895	0.913	0.900	0.900	0.898	0.595	0.595	0.599	0.565
HM213850	0.743	0.758	0.740	0.888	0.888	0.909	ID	0.883	0.820	0.837	0.828	0.828	0.825	0.538	0.537	0.540	0.506
AJ532405	0.817	0.802	0.813	0.969	0.968	0.964	0.883	ID	0.897	0.921	0.901	0.901	0.899	0.597	0.597	0.600	0.564
AF096992	0.799	0.784	0.797	0.906	0.906	0.895	0.820	0.897	ID	0.885	0.872	0.872	0.871	0.587	0.587	0.586	0.555
AY523038	0.803	0.788	0.801	0.917	0.917	0.913	0.837	0.921	0.885	ID	0.891	0.891	0.889	0.594	0.591	0.592	0.556
E._PAILAS ENSIS	0.806	0.796	0.803	0.905	0.905	0.900	0.828	0.901	0.872	0.891	ID	1.000	0.994	0.596	0.588	0.599	0.561
P._FRIAS	0.806	0.796	0.803	0.905	0.905	0.900	0.828	0.901	0.872	0.891	1.000	ID	0.994	0.596	0.588	0.599	0.561
AY029278	0.803	0.794	0.800	0.904	0.904	0.898	0.825	0.899	0.871	0.889	0.994	0.994	ID	0.597	0.587	0.598	0.560
AJ532408	0.599	0.588	0.599	0.600	0.599	0.595	0.538	0.597	0.587	0.594	0.596	0.596	0.597	ID	0.722	0.711	0.650
AF112872	0.588	0.576	0.588	0.597	0.596	0.595	0.537	0.597	0.587	0.591	0.588	0.588	0.587	0.722	ID	0.745	0.678
AJ532426	0.584	0.572	0.585	0.602	0.602	0.599	0.540	0.600	0.586	0.592	0.599	0.599	0.598	0.711	0.745	ID	0.688
AJ532398	0.556	0.544	0.557	0.564	0.564	0.565	0.506	0.564	0.555	0.556	0.561	0.561	0.560	0.650	0.678	0.688	ID