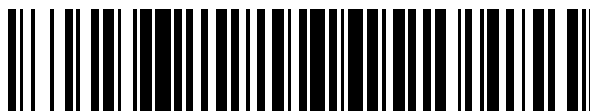


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 900**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/GB2013/051938**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15008011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13773308 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3022317**

54 Título: **Portaobjetos para micromatrices y método para detectar algas tóxicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.08.2019

73 Titular/es:
**MICROBIA ENVIRONNEMENT (100.0%)
4 Rue Etienne Terrus
66300 Saint Jean de Lasseille, FR**

72 Inventor/es:
**MEDLIN, LINDA;
MONTRESOR, MARINA;
GRANELI, EDNA;
REGUERA, BEATRIZ;
RAINE, ROBIN;
EDVARDBSEN, BENTE y
LEWIS, JANE**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 722 900 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Portaobjetos para micromatrices y método para detectar algas tóxicas

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un portaobjetos para micromatrices para detectar, identificar y cuantificar algas tóxicas. Más específicamente, la micromatriz, que comprende códigos de barras de ADN para cada alga tóxica, está configurada para detectar y cuantificar un conjunto de algas tóxicas de muestras del entorno marino con un alto nivel de confianza para cumplir con la Directiva de la UE 2002/225/EC para la cuantificación de algas tóxicas en las aguas costeras marinas como medio para determinar el cierre de una pesquería. Proporciona una alternativa al bioensayo del ratón para el cierre de pesquerías, que ha sido suspendido por la UE por razones éticas desde 2012. La necesidad de invocar el método de HPLC más costoso para la determinación de toxinas puede reducirse con un método molecular fiable que puede identificar y cuantificar algas tóxicas.

Descripción de la técnica relacionada.

15 Los océanos del mundo cubren el 70 por ciento de la superficie de la Tierra, y sus poblaciones dominantes, tanto numéricamente como en el modo de biomasa, pertenecen a objeciones microscópicas (incluyendo microalgas) y procariontas. Las microalgas en las aguas marinas y salobres de Europa causan regularmente efectos nocivos, considerados desde el punto de vista humano, en la medida en que causan daños económicos a la pesca y al turismo, y problemas sanitarios. Estos episodios abarcan una amplia gama de fenómenos denominados colectivamente como «floraciones de algas nocivas» (Harmful Algal Blooms: HAB) o mareas rojas. Para el manejo adecuado de estos fenómenos, la monitorización de las microalgas es esencial y es requerida por la directiva de la UE 2002/225/EC para todos los países de Europa con línea costera marina.

25 La escala global de microalgas productoras de toxinas no debe subestimarse. Por ejemplo, lo más grave sería el número de intoxicaciones humanas con ciguatera, causadas por el dinoflagelado *Gambierdiscus*, que se estima actualmente en aproximadamente 50.000 al año. Cada año, 1 o 2 muertes humanas están relacionadas con la ingestión de toxinas PSP causadas por *Alexandrium*. Aun cuando estos problemas se reducen a la esfera de temperatura tropical/cálida del globo, se demuestra la necesidad urgente de monitorizar y prevenir eventos de HAB tóxicos. Con el calentamiento global, las especies de agua caliente se están moviendo ahora hacia las aguas templadas del norte de Europa. En Europa, esto se ve afectado a través de una serie de directivas que requieren que los estados miembro costeros controlen el agua en los mariscos para detectar especies productoras de toxinas, y sus toxinas. A partir de la Directiva de Higiene de los Mariscos de la UE 91/492/CEE, se emitieron una serie de Directivas para incluir las toxinas recién descubiertas, y se estipulan los métodos de análisis y los niveles máximos permitidos en los mariscos. Los más importantes de estos son 2002/225/EC y 2074/2005 (pertenecientes a los niveles de toxinas y a análisis y métodos) y, más recientemente, 15/2011 (métodos de análisis). La aparición natural de algas productoras de toxinas y la continua demanda humana de consumo de mariscos, significan que la necesidad de su control es ya algo permanente.

35 El coste de este control de plancton y toxinas es enorme. Si bien hay información limitada y “dura” sobre el impacto económico de las HAB, un estudio relativamente reciente en los Estados Unidos (Anderson et al., 2000) ha estimado, sobre una base nacional, que:

- el coste del control es equivalente al 5% del volumen de ventas anual de la industria de mariscos
- 40 • el coste de la cosecha perdida y del producto dañado, causados por la contaminación con biotoxinas, es un 5% del volumen de ventas de la industria;
- los costes de la salud pública causados por jornadas de trabajo perdidas, hospitalizaciones, etc. añaden otro 5% del volumen de ventas anual.

45 En Europa, también es difícil descubrir una información similar, pero el contexto está bien establecido si se toma el caso de Irlanda, donde la producción acuícola de marisco llega actualmente a 47 millones de libras anuales (Bowne et al., 2007) y la estimación para el programa de control Irish National Biototoxin and Toxic Phytoplankton, llevado a cabo bajo los auspicios de la Food Safety Authority of Ireland y operado a través del Irish Marine Institute, es de 1,7 millones de libras, lo que representa ~ 3,5% del volumen anual de ventas de la industria. De manera similar, la producción escocesa de mariscos se estima en 20 millones de libras, la mayor parte de los cuales se realiza a través del cultivo del mejillón comestible *Mytilus edulis*, y los programas de control, administrados por la Food Standards Agency Scotland, tienen un presupuesto de poco menos de 2 millones de libras.

55 Claramente, el desarrollo de una industria que sea tanto natural como sostenible, pero que tiene una carga financiera tan pesada, requiere toda la asistencia posible para superar "riesgos naturales" tales como las HAB tóxicas, porque los problemas (naturales) causados por la toxicidad nunca se eliminarán. Aproximadamente se analizan anualmente 2000 muestras de agua en Irlanda como parte del National Monitoring Programme (NMP). Esto requiere un equipo de

- 4 personas, ligeramente reforzado durante los meses de verano. La mayoría de las muestras se analizan en busca de especies tóxicas/nocivas, pero muestras de 10 sitios (de un total de ~60) son analizadas para determinar su comunidad total de fitoplancton. La microscopía óptica es el método de análisis de rutina, requiriendo cada muestra un promedio de unas 2 horas para su examen. Las cifras comparables para otros programas de control son la producción anual de 1000 muestras (Escocia), 5000 muestras (REPHY, Francia) y 6000 muestras (Galicia, España). Estas cifras reflejan una tasa de trabajo de procesamiento de unas 20 muestras por semana y por persona. La cantidad de hombres-hora implicados en el proceso de monitorización es sin duda enorme. A menudo, los resultados están disponibles hasta 5 días después de tomar la muestra, lo que hace que las estrategias de mitigación sean casi imposibles. Entre otras cosas, esta invención pretende hallar una solución a este problema.
- El control actual requiere mucho tiempo y, basándose en la morfología que se determina por microscopía óptica, es insuficiente para dar una atribución definitiva de especies y toxinas. Las técnicas moleculares, que son más rápidas y más fiables, reducirían el número de errores inevitables causados por errores humanos, que es una faceta siempre presente de este tipo de trabajo. De particular relevancia son las situaciones con respecto a *Pseudo-nitzschia*, que no pueden identificarse a nivel de especie utilizando microscopía óptica, y *Alexandrium*, otro género con el que también es prácticamente imposible identificar con precisión a especies que utilizan esta técnica. La identificación y cuantificación a un nivel de precisión es esencial si se desea pronosticar con precisión floraciones tóxicas para permitir su mitigación y el cierre de la pesquería forzado solo cuando sea necesario para evitar pérdidas económicas innecesarias y porque las cepas tóxicas y no tóxicas de la misma especie, es decir, el *Alexandrium*, se superponen en su distribución.
- La llegada de técnicas de biología molecular ha mejorado en gran medida nuestra capacidad para analizar todos los organismos. Estas técnicas están haciendo lentamente incursiones en el control de algas tóxicas en términos de monitorizar la presencia de una especie y las toxinas que producen. Una aproximación que se usa ampliamente en tales estudios es identificar especies por medio de sondas moleculares específicas o códigos de barras. Por consiguiente, estas sondas se pueden usar en experimentos de hibridación para identificar especies de interés uniéndose a la secuencia del objetivo y la posterior detección mediante una etiqueta adherida a la sonda. Se pueden generar curvas de calibración basadas en material de cultivo para convertir en números de células la intensidad de la señal de la sonda de su etiqueta, cumpliendo así los requisitos de la UE para el control de algas tóxicas utilizando números de células como el nivel desencadenante para el cierre de las pesquerías, o antes de iniciar las pruebas de toxinas. La micromatriz presentada aquí puede aplicarse universalmente para monitorizar las algas tóxicas en cualquier país con floraciones de algas tóxicas. En aguas japonesas, las algas tóxicas que causan la mayoría de los problemas no serán las mismas que las que hay a lo largo de las costas occidental y oriental de Australia y América del Norte, o las costas occidentales de Europa, por lo que es ventajoso tener códigos de barras universales que detecten específicamente todas las variaciones de cada especie de alga tóxica.

Sumario de la invención

- De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un sistema de matriz que comprende un portaobjetos para micromatrices configurado para detectar simultáneamente una diversidad de organismos en una muestra, en donde el portaobjetos para micromatrices comprende sondas de ácido nucleico que tienen fragmentos de secuencias de ARN 18S o 28S únicas para cada organismo o grupo taxonómico del mismo.
- De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de detección de algas tóxicas en una muestra que comprende las etapas de:
- a) obtener una muestra ambiental
 - b) extraer el ARN de las células de las algas presentes en la muestra
 - c) fragmentar el ARN
 - d) marcar los fragmentos de ARN con un marcador fluorescente
 - e) permitir que los fragmentos de ARN marcado se hibriden en un portaobjetos para micromatrices según el primer aspecto de la invención
 - f) separar por lavado los fragmentos de ARN marcados sin hibridar
 - g) escanear el portaobjetos para micromatrices para detectar fragmentos de ARN marcados unidos a la sonda.

- También se describe en el presente texto un método para fabricar un portaobjetos para micromatrices, que comprende los pasos para identificar secuencias de ARN 18S o 28S correspondientes a una diversidad de algas tóxicas de interés; seleccionar fragmentos de secuencia de ARN 18S o 28S únicos para cada alga y crear sondas de ácido nucleico correspondientes a dichas secuencias; crear fragmentos de ARN variantes que corresponden a los fragmentos de ARN 18S o 28S únicos para cada no-diana con un desajuste de un nucleótido con el fin de capturar un desajuste de un nucleótido; crear sondas que tienen dichas secuencias; e inmovilizar dichas sondas en un portaobjetos para micromatrices.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema de manchado para la primera generación de micromatrices MIDTAL. Cada posición en el *grid* (cuadrícula) representa una mancha de c. 50 µm de diámetro donde está inmovilizada una sonda dada (código de barras). Cada sonda (códigos de barras) se aplica cuatro veces en un *grid* y el *grid* completo se repite 3 veces para dar una pseudo replicación de $n = 16$. Esta generación de micromatrices tiene 960 manchas, cubriendo 112 sondas (códigos de barras) para especies de algas tóxicas y niveles más altos de taxones, y varias sondas de control positivo y negativo. Las generaciones posteriores de la micromatriz, que forman la invención descrita en el presente texto, tienen 252 sondas (códigos de barras), cuando se manchan con 4 replicados producirá una matriz de más de 1000 puntos.

La Figura 2 es la hibridación del ARN fragmentado en temperatura de incubación creciente a la micromatriz. Las sondas (códigos de barras) con señales más bajas se potencian mediante la fragmentación del ARN en trozos más pequeños para permitir una mejor unión del código de barras a su secuencia diana.

La Figura 3 es una de los *supergrids* en la primera generación de micromatrices MIDTAL después de la hibridación con el ARN marcado con Cy5 extraído de una muestra de campo recogida en la costa de Skagerrak (Gullmarnfjord, Suecia) a principios de agosto de 2009.

La Figura 4 proporciona el análisis de la hibridación en la fig. 3 se realizó con el programa Phylochip, y una parte de este análisis se presenta en la figura de excel debajo del escan desde la señal más alta a la más baja. Las estrellas indican una señal significativa para las especies tóxicas *Karenia brevis* (KB5) y *Pseudo-nitzschia multistriata* (mD3) presentes en la muestra, observadas tanto con la micromatriz como con los recuentos tradicionales. Otras señales altas son las sondas para el control positivo *Dunaliella*. La línea roja marca el umbral sobre el cual se registra una señal positiva.

La Figura 5 muestra la relación del ARN con el número de células y las señales de la micromatriz para *P. multiseriis*. A) Regresión lineal del ARN total extraído de cada replicado en cada experimento de estrés frente a números de células en el momento del muestreo. B) Curva de calibración que relaciona los números de células con la señal de la micromatriz hibridada con cuatro cantidades diferentes de ARN en la matriz de la generación 2 para cada sonda que dirige a *P. multiseriis*. C) Curva de calibración que relaciona los números de células con la señal de la micromatriz con dos cantidades diferentes de ARN en la matriz de generación 3 para cada sonda que dirige a *P. multiseriis*.

La Figura 6 ilustra la salida del programa analizador GPR (Dittami y Edvardsen 2012) que muestra las pruebas de jerarquía para una hibridación. *Pseudo-nitzschia calliantha* pasó la prueba de jerarquía y la señal se convirtió en números de célula para fines de monitorización.

Definiciones.

Para describir la materia sujeta descrita, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se presentan a continuación.

Las "algas" se refieren a cualquier célula fotosintética sin diferenciación tisular en raíces, tallos y hojas. Las "algas tóxicas" se refieren a las microalgas pertenecientes a las clases de algas dinoflagelados, diatomeas, haptofitos, dictiofitos, cloromonofitos o rafdofitos que producen compuestos de toxinas que afectan a los vertebrados, incluidos los seres humanos, ya sea causando la muerte o causando graves efectos gastrointestinales o neurológicos. El "ADN" y el "ARN" se refieren a los ácidos nucleicos (2 combinaciones base-azúcar-fosfato o más = "oligonucleótidos"). Los ARN a los que se hace aquí referencia son ARN ribosómico, las subunidades pequeñas y grandes de organismos eucarióticos (SSU/18S o LSU/28S) y "excluye específicamente" los de organismos procarióticos (bacterias y arqueas). Las matrices creadas para la detección de organismos procarióticos pueden medir solamente bacterias y arqueas de crecimiento activo, pero este no es el caso de los organismos eucarióticos, que retienen una alta proporción de ARNr a lo largo de su ciclo de crecimiento y por tanto las matrices para organismos eucarióticos pueden ser cuantitativas, mientras que las de los organismos procarióticos no pueden serlo. Las "sondas o códigos de barras" son oligonucleótidos cortos de una longitud normalmente de 16-25 pb que son 100% homólogos solamente a una secuencia complementaria en un gen de la especie de interés y difieren en al menos una posición con respecto a todos los demás organismos. Una "micromatriz de ADN" para la detección de especies (también conocida comúnmente como filochip) y no para la expresión génica es una colección de manchas (*spots*) de ADN microscópicas adheridas a una superficie sólida, como vidrio, plástico o chips de silicio formando una matriz. Los oligonucleótidos de ADN adheridos se conocen como sondas o códigos de barras (aunque algunas fuentes usarán una nomenclatura diferente), miles de los cuales se pueden usar en una única micromatriz de ADN. Los códigos de barras se inmovilizan mediante un enlace químico de la sonda con la superficie de un portaobjetos de vidrio de microscopio recubierto especialmente y, en la presente invención, los códigos de barras se elevan por encima de la superficie de la micromatriz mediante una "región espaciadora" que consiste en múltiples bases de timina antes de que comience el código de barras. La "hibridación" se refiere a la unión del código de barras monocatenario inmovilizado en la micromatriz, con el ARNr monocatenario, marcado con fluorescencia, extraído de la muestra ambiental para formar una doble hélice a lo largo del corto tramo de la región diana del ARNr. Las concentraciones altas de sal y de tampón específico proporcionan un entorno químico adecuado para que la hibridación tenga lugar solo entre la diana y el

código de barras unido a la micromatriz de vidrio y para evitar la unión al código de barras de una no-diana con uno o más desajustes. Si hay un único desajuste de base entre la diana y la no-diana, el desajuste se pone en medio del código de barras y un "código de barras competidor" está diseñado para hibridar al ARNr con el desajuste de una sola base. También se pueden llamar "sondas de desajuste" (MM). Las "sondas jerárquicas" se refieren a una serie de sondas que siguen la jerarquía taxonómica de una especie dada. El uso de sondas jerárquicas evita falsos positivos en muestras ambientales, porque para que una especie tóxica esté presente, la sonda del género, la familia, el orden o clado, la clase, el phylum y el reino también tienen que hibridar con el ARN de la especie. Si no está presente toda la jerarquía, el paquete de análisis utilizado para analizar la micromatriz (por ejemplo, el analizador GPR, Simon and Edvardsen 2012) rechazará la presencia de cualquier especie de alga tóxica que no pase la prueba de jerarquía. El "contenido de GC" se refiere a la cantidad de bases de ribonucleótido guanina y citosina que están en el código de barras, un contenido de GC del 50% o más garantiza una "temperatura de fusión" de aproximadamente 60 °C a la cual el código de barras no podrá unirse a la diana debido al impedimento térmico.

Descripción detallada de la invención.

Un primer aspecto de la invención proporciona un sistema de matriz como se define en las reivindicaciones que comprende un portaobjetos para micromatrices configurado para detectar simultáneamente una diversidad de organismos en una muestra, en donde el portaobjetos para micromatrices comprende sondas de ácido nucleico que tienen fragmentos de secuencia de ARN 18S o 28S únicos para cada organismo o grupo taxonómico del mismo. Preferiblemente, la diversidad de organismos comprende organismos de algas tóxicas.

Portaobjetos para micromatrics.

Puede usarse cualquier formato de portaobjetos adecuado, junto con cualquier aspecto de la invención. Por ejemplo, las sondas aplicarse sobre portaobjetos Genetix o Schott recubiertos con epoxi, utilizando una impresora de agujas VersArray ChipWriter Pro (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) y pasadores (Point Technologies. Inc., CO) con un tamaño de mancha de ca. 80 µm.

Sondas de ácido nucleico.

Las sondas de oligonucleótidos que incluyen los controles positivos y negativos pueden sintetizarse usando técnicas químicas estándar. Preferiblemente, se sintetizan de forma que sean capaces de unirse covalentemente en el extremo 5' al portaobjetos para micromatrices. Por ejemplo, pueden sintetizarse con un enlace amino MMT o DMS(O)MT (preferiblemente un enlace amino 6C). El enlace amino permite que la sonda se una covalentemente al portaobjetos de vidrio recubierto en el extremo 5'.

Como se discute aquí, un portaobjetos para micromatrices comprende:

- a. al menos una sonda seleccionada entre el grupo que consiste en controles positivos y negativos,
- b. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente en organismos eucarióticos
- c. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente el filum taxonómico del organismo
- d. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente la clase taxonómica del organismo

e. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente un clado taxonómico del organismo a un nivel taxonómico intermedio entre clase y género

- f. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente el género taxonómico del organismo, y
- g. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente la especie taxonómica del organismo
- h. al menos una sonda capaz de detectar selectivamente la cepa taxonómica del organismo.

Las sondas citadas en el punto h. anterior se aplican especialmente a la detección de cepas de organismos que tienen una cepa tanto tóxica como no tóxica.

El uso de sondas que son específicas para niveles taxonómicos múltiples permite que todos los aspectos de la invención sean dispuestos de modo que una identificación positiva de una especie de algas específica, o cuando sea el caso, una identificación positiva de una cepa de algas específica, se consiga solamente cuando la sonda específica de la especie o, cuando sea apropiado, la sonda específica de la cepa, está unida por la secuencia diana junto con la unión de las sondas que representan todos los taxones de orden superior.

Controles positivos y negativos.

Opcionalmente se incluyen controles positivos y comprenden la secuencia de la caja TATA, por ejemplo la secuencia de SEC ID NO: 1. Otros controles que pueden estar opcionalmente presentes incluyen controles negativos (por ejemplo, los que tienen las secuencias de SEC ID NO: 2, 3 o 4).

Pueden incluirse también controles de manchado de poli-T (por ejemplo, que tienen la secuencia de SEC ID NO: 5, sondas de bloqueo de poli-A, y controles internos (por ejemplo, uno de ellos o ambos controles internos del género *Dunaliella* que tienen las secuencias de SEC ID NO: 7 y 8).

Características de la sonda.

- 5 Preferiblemente las sondas son todas de longitud similar, por ejemplo de 20 a 30 restos de longitud. Más preferiblemente, todas tienen una longitud de 22 a 28, de 23 a 27 o de 24 a 26 restos (es decir, aproximadamente 25 restos de longitud). Preferiblemente, todas las sondas tienen un contenido de G/C aproximadamente igual. Preferiblemente, el contenido de G/C es de 40 a 60, más preferiblemente de 41 a 59, 42 a 58, 43 a 57, 44 a 56, 45 a 55, 46 a 54, 47 a 53, 48 a 52 o 49 a 51 por ciento. Proporcionando sondas de longitud y contenido de G/C similares, el resultado es que todas las sondas tienen una temperatura de hibridación similar.

Colas de poli-T.

- 15 Preferiblemente, las sondas tienen una cola de poli-T 5' antes de la secuencia del código de barras y después de un enlazador de seis carbonos. Esta cola tiene preferiblemente una longitud de al menos 10 o más, preferiblemente al menos 15 restos (por ejemplo, entre 10 y 25 o entre 15 y 30 restos o entre 15 y 20 restos de longitud). La hipótesis es que la provisión de esta cola permite un mejor acceso de las sondas al ARN diana porque son capaces de "flotar" por encima de la superficie del portaobjetos para micromatrices y de interactuar con las dianas. Si se usan sondas que tienen colas de poli-T, los oligonucleótidos poli-A han de agregarse a la solución de hibridación para unirse a las colas de poli-T y evitar la unión a la cola de falsos positivos.

- 20 La invención también abarca en todos sus aspectos cualquiera o todas las sondas descritas en el presente documento, en donde la cola de poli-T se reemplaza por un enlazador alternativo o elemento espaciador que realiza esencialmente la misma función que la cola de poli-T.

Sondas competidoras.

- 25 Las sondas competidoras con desajuste de una sola base para cada una de las sondas específicas incluidas en la micromatriz se incluyen preferiblemente en la matriz para eliminar estas no-dianas y evitar que se unan a cualquier código de barras con el que tengan un único desajuste de base.

Ambas optimizaciones producen señales superiores y mejoradas en relación con las producidas por el chip ALEX en Gescher et al. (2008) que no incluyen estas optimizaciones (Gescher, G., Metfies K. y Medlin, LK 2008. The ALEX chip – Development of a DNA chip for identification and monitoring of *Alexandrium*. Harmful Algae, 7: 485 - 494).

Preparación de la muestra.

- 30 Preferiblemente, la muestra es una muestra ambiental, por ejemplo, una muestra de agua de mar o de agua estuarina.

La muestra puede prepararse opcionalmente antes de ser utilizada. Por ejemplo, cualquier organismo en ella puede concentrarse (por ejemplo, por filtración) para aumentar su densidad y las células pueden lisarse, extraerse y prepararse el ARN, por ejemplo mediante fragmentación en fragmentos de aproximadamente 500 pb de longitud.

Matriz universal.

- 35 La invención presentada aquí en todos los aspectos es una micromatriz universal para la detección de algas tóxicas. Es universal en el sentido de que se puede usar para detectar todas las algas tóxicas marinas conocidas que actualmente se sabe que se presentan en todos los océanos y estuarios, y en los lagos continentales de alta conductividad de la Tierra. Es universal porque puede detectar 1) todas las especies que causan envenenamiento paralítico por mariscos (PSP), por ejemplo especies del género *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense*, 2) todas las especies que causan envenenamiento amnésico por mariscos (ASP), por ejemplo especies en el género *Pseudo-nitzschia*, 3) todas las especies que causan envenenamiento diarreico por mariscos (DSP), por ejemplo especies de los géneros *Prorocentrum*, *Dinophysis* y *Volcanodinium*, 4) todas las especies que causan envenenamiento por ciguatera (reversión permanente de las sensaciones de calor y frío), por ejemplo *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Ostreopsis*, 5) todas las especies que causan envenenamiento neurotóxico por mariscos (NSP), por ejemplo especies de los géneros *Karenia*, *Karolodinium*, *Chloromorom* y 6) todas las especies que causan la muerte de peces a través de la lisis de las membranas branquiales, por ejemplo *Heterosigma*, *Chatonella*, *Pseudochatonella*, *Fibrocapsa*, *Lingulodinium* y *Gonyaulax spinifera*. Es universal por cuanto todos los códigos de barras/sondas para cada especie tóxica, grupo de especies o jerarquía taxonómica superior han sido diseñados para funcionar en idénticas condiciones de laboratorio. Se pueden encontrar excelentes sinopsis del estado de la técnica de las herramientas moleculares en estudios ambientales para detectar algas tóxicas en:

- Ebenezer, V., Medlin, L. K. y Kei, J-S. 2011. Molecular detection, quantification y diversity evaluation of microalgae. Marine Biotechnology, 14; 129 - 142, y

- Metfies, K., Töbe, K., Scholin, C. y Medlin, LK 2006. Novel Approaches to Study the Ecology of HA *in situ* chapter, en: Ecology of Harmfull Algae. Edna Granéli y Jefferson Turner (eds.) pp. 311 - 325.

De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, la micromatriz consiste en manchas de ADN de síntesis, aplicadas regularmente sobre un portaobjetos de vidrio especialmente recubierto con al menos 4 a 8 replicados (Fig. 1). Los ADN aplicados son oligonucleótidos cortos de al menos 25 bases con una cola de poli T de al menos 15 bases de timina. Estos oligonucleótidos son específicos para una o más especies de algas tóxicas (véase la Tabla 1) y, como tales, pueden considerarse códigos de barras. Los códigos de barras se han diseñado de forma jerárquica taxonómica, de forma que, para que esté presente cualquier especie, los códigos de barras para el género, la familia o el orden, la clase, el filum y el reino también deben estar presentes. Este método asegura que no se registren falsos positivos. Ninguna otra micromatriz en uso para algas tóxicas u otros eucariotas que utilizan este método de control interno.

Se aplican las siguientes características:

- las sondas del grupo a. comprenden al menos una sonda que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID NO: 1 a la SEC ID NO: 4, la SEC ID NO: 7 y la SEC ID NO: 8, y
- las sondas del grupo b. comprenden al menos las dos sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 9 a la SEC ID NO: 10; y
- Las sondas en el grupo c. comprenden al menos todas las sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 11 a la SEC ID NO: 13; y
- las sondas del grupo d. comprenden al menos todas las sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 14 a la SEC ID NO: 16; y
- Las sondas del grupo e. comprenden al menos todas las sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 17 a la SEC ID NO: 41; y
- las sondas del grupo f. comprenden al menos todas las sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 42 a la SEC ID NO: 69; y
- las sondas del grupo g. y h. comprenden al menos todas las sondas que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 70 a la SEC ID NO: 252.

Otras características.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, el portaobjetos para micromatrices comprende fragmentos de ARN 18S o 28S únicos para cada organismo y variantes no coincidentes (por ejemplo, variantes de desajuste de nucleótidos individuales) de dichos fragmentos en los que el nivel de confianza de la detección específica derivada de las coincidencias de fragmentos es superior al 99%.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, la identificación y cuantificación de una especie o cepa de algas tóxicas se basa en la hibridación detectada de la sonda específica de la especie y/o específica de la cepa, y la hibridación de todas las sondas de nivel taxonómico superior. Este sistema jerárquico permite una mayor confianza en los resultados y también proporciona una indicación útil de la presencia de especies tanto conocidas como desconocidas, para las cuales no está incluida una sonda específica de la especie en la matriz.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método para detectar algas tóxicas en una muestra, que comprende las etapas de:

- obtener una muestra ambiental
- extraer el ARN de las células de algas presentes en la muestra
- fragmentar el ARN
- marcar los fragmentos de ARN con un marcador fluorescente
- permitir que los fragmentos de ARN marcados se hibriden en un portaobjetos para micromatrices según el primer aspecto de la invención
- eliminar por lavado fragmentos de ARN marcados no hibridados
- escanear el portaobjetos para microarrays para detectar fragmentos de ARN marcados unidos a la sonda.

La intensidad de la señal obtenida de los fragmentos unidos puede usarse para proporcionar una estimación de la concentración de células de algas en la muestra.

Se pueden extraer de los Ejemplos otras características opcionales de cada etapa del método.

La presente descripción proporciona también un tercer aspecto, un método para fabricar un portaobjetos para micromatrices, que comprende las etapas de identificación de secuencias de ARN 18S o 28S correspondientes a una diversidad de algas tóxicas de interés; seleccionar fragmentos de ARN 18S o 28S de secuencia única para cada alga y crear sondas de ácido nucleico correspondientes a dichas secuencias; crear fragmentos de ARN variantes correspondientes a los fragmentos de ARN 18S o 28S únicos para cada no-diana con un desajuste de un nucleótido con el fin de capturar un desajuste de un nucleótido; crear sondas que tienen dichas secuencias; e inmovilizar dichas sondas en un portaobjetos para micromatrices.

El protocolo de extracción es preferiblemente como se describe en los Ejemplos que se ha optimizado para usar Tri-Reagent (Sigma) para obtener altas cantidades y buena calidad de ARN. La calidad del ARN afecta al grado de marcado y la calidad e intensidad de la señal alcanzada después de la hibridación. La mayoría de las micromatrices existentes para algas tóxicas utilizan una etapa de PCR antes de la hibridación para obtener una diana con una longitud corta de ca. 500 pb. Ejemplos de micromatrices que incluyen una etapa de PCR son:

- Galluzi L, Cegna A, Casabianca S, Penna A., Sunder N, Magnnai, M (2011) Development of an oligonucleotide microarray for the detection and monitoring of marine flagellate. *J Microbiol Meth* 84: 234 - 242 y
- Ki J-S, Han M-S (2006) A low-density oligonucleotide array study for parallel detection of harmful algal species using hybridization of consensus PCR products of LSU rDNA D2. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 1812 - 1821.

La inclusión de una etapa de PCR en el método impide que la señal obtenida sea cuantitativa. Debido a que la micromatriz de la invención utiliza solo ARN, es posible realizar curvas de calibración para convertir la señal de hibridación en números de células. El cierre de las pesquerías actualmente se basa en números de células que exceden un nivel de activación, y el uso de cualquier método de micromatrices que incluya una etapa de PCR imposibilita que el método sea cuantitativo.

Antes de la hibridación, el ARN se fragmenta preferiblemente en longitudes de ca. 500 pb (Fig. 2), similares a las longitudes obtenidas usando una etapa de PCR pero sin el aumento exponencial en el número diana que se obtiene con la PCR, manteniendo así la micromatriz cuantitativa. En la solución de hibridación, preferiblemente se añade un reactivo de bloqueo, por ejemplo Kreablock (Kreatech), que se usa normalmente en micromatrices de expresión génica. Se encontró que la adición de este reactivo de bloqueo no solo mejora la señal hasta 10 veces, sino que también reduce el fondo para que se obtenga una mayor relación señal/ruido.

La señal obtenida de la presente micromatriz es preferiblemente una señal fluorescente (Fig. 3) que se detecta con un escáner de láser y se puede convertir en números de células mediante el uso de curvas de calibración para relacionar señales con números de células (Fig. 4 y 5). La monitorización por algas tóxicas y el posterior cierre de pesquerías se basa en el número de células.

Los autores de la presente invención conocen una micromatriz para algas tóxicas que utiliza el ARN total como diana (Ahn S, Kulis D, Erdne, DD, Anderson, DM, Walt, D 2010. Fibre optic microarrays for the detection and enumeration of harmful algal bloom species. *Afr J Mar Sci* 28: 231 - 235). Este sistema implica un instrumento de fibra óptica, que se utiliza para unir microesferas con una sonda unida. El sistema es muy caro y no es de uso estándar. Esta micromatriz también utiliza un sistema de detección de hibridación de tipo sandwich, lo que significa que, para cada especie, se deben diseñar dos sondas/códigos de barras. Una es una sonda/código de barras de captura y esta es la que está inmovilizada en las microesferas para unirse al ARN diana. Una segunda sonda con un marcador fluorescente se adhiere al ARN unido, y de ahí el nombre de hibridación en sandwich. La unión de esta sonda crea las señales que son registradas por una cámara CCD. Solamente se ha probado con tres especies y, para probar múltiples especies, se debe demostrar *in silico* que ninguna de las sondas de señal se unirá entre ellas eliminándolas de la reacción de hibridación. Así pues, desde un punto de vista práctico y económico, la presente invención es superior.

Los autores de la presente invención están también al tanto de una patente (WO 2003/053855 A2) para el uso de PCR cuantitativa para la detección de algas dañinas en agua de lastre. Las sondas de multiplexación para uso en PCR cuantitativa se limitan a aproximadamente 8 sondas en una mezcla, por lo que esta metodología para detectar algas tóxicas utilizando sondas específicas de la especie está limitada en su capacidad para detectar más de 8 especies a la vez.

Las ventajas particulares de la presente invención proceden de las siguientes características:

- el conjunto único de códigos de barras para cada especie (SEC ID NO: 9 a 252),
- el diseño de 243 códigos de barras de longitud casi idéntica y contenido de G/C con una cola de poli T para que funcionen bajo condiciones idénticas de laboratorio para efectuar la unión del ARN diana y solo diana para los códigos de barras aplicados en el portaobjetos de vidrio
- la adición de poli A y opcionalmente Kreablock a la solución de hibridación para maximizar la intensidad de la señal y minimizar los falsos positivos,

ES 2 722 900 T3

- la construcción de una redistribución jerárquica del código de barras de modo que la presencia de cualquier especie tóxica sea dependiente de un conjunto de sondas anidadas que también deben producir una señal, y
- la conversión de esa señal en una estimación de números de células con fines de monitorización.

Tabla 1. Códigos de barras para algas tóxicas listadas de forma jerárquica y los controles de hibridación

SEC ID No.	Especies señaladas	Código de barras de ADN: secuencia de sonda con espaciador poli T
Grupo A		
	Controles	Secuencias de sonda (5'-3')
Seq ID No. 1	Proteína de la caja TATA, como control positivo	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTATGGCCGATGAGGAACG
Seq ID No. 2	Negativo	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCGGGTATGGCCGC
Seq ID No. 3	Negativo	TTTTTTTTTTTTTTAGGAAGAAAGGAAGGAAGGAAGAA
Seq ID No. 4	Negativo	TTTTTTTTTTTTTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
Seq ID No. 5	Poly-T (30)-CYS, como control de aplicación	TT
Seq ID No. 6	Poly-A como sonda de bloqueo	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Seq ID No. 7	Dumaliella genus, como control interno	TTTTTTTTTTTTTTACCAAAGGCTGACCCGTACAACCCA
Seq ID No. 8	Dumaliella genus, como control interno	TTTTTTTTTTTTTTGATACCCGATCCAAACACTTCACCA
Grupo B		
	Niveles de grupo superior	
Seq ID No. 9	Eukaryotes	TTTTTTTTTTTTTTTGACTACTGGCAGGATCAACCAGGT
Seq ID No. 10	Eukaryotes	TTTTTTTTTTTTTTAACATCTAAGGGCATCACAGACCTG
Grupo C		
	Niveles de filum	
Seq ID No. 11	Prymnesiophyta	TTTTTTTTTTTTTTAAACATCCCTGGCAAATGCTTTCGC
Seq ID No. 12	Dinophyta (incl. Apicomplexa)	TTTTTTTTTTTTTTCTGTTATTGCCCTCAAACCTCCCTGC
Seq ID No. 13	Dinophyta (incl. Apicomplexa)	TTTTTTTTTTTTTTGTCGGAAGCTGATAGGTCAGAAACT
Grupo D		
	Niveles de clase	
Seq ID No. 14	Prymnesiophyceae	TTTTTTTTTTTTTTTGTGTCAGGATTCGGGCAATTTACG
Seq ID No. 15	Raphidophyceae	TTTTTTTTTTTTTTTCGAUUCGCACAGUUCUUAUGAUUCACC
Seq ID No. 16	Raphidophyceae class	TTTTTTTTTTTTTTTGCAAGAACCAGAUUGUCACCCGUCCA

Grupo E		Niveles de clado	
Seq ID No. 17	Dinophysiaceae (Dinophysis + Phalacroma)	not <i>D. acuta</i>	TTTTTTTTTTTTTTAGGCCAATACCGTACCGTCGGG
Seq ID No. 18	Dinophysiaceae (Dinophysis + Phalacroma)		TTTTTTTTTTTTTTCAATACCGTACCGTCGGGAGCTGAT
Seq ID No. 19	Proocentrum planktonic clade		TTTTTTTTTTTTTTUUAAGCGUAAGCCUGCUUGAAAC
Seq ID No. 20	Proocentrum benthic clade		TTTTTTTTTTTTTTGAUGCCAGAUCAAGCCAGAUGCUC
Seq ID No. 21	Proocentrum benthic clade		TTTTTTTTTTTTTTTCCAACUACCCCAUUGACCAUJACC
Seq ID No. 22	Prymnesium		TTTTTTTTTTTTTTGGACTTCGGCCGATCCCTAGT
Seq ID No. 23	all Dinophysis and Phalacroma		TTTTTTTTTTTTTTGTAGGCCAATACCGTACCGTCGGAA
Seq ID No. 24	clado Prymnesium B1		TTTTTTTTTTTTTTTACTCAGCACGCAACCGCAAGCCGG
Seq ID No. 25	clado <i>Chattonella antiqua/marina/ovata</i>		TTTTTTTTTTTTTTTCCGAGAGUUAACUCGGCAUUGGUU
Seq ID No. 26	clado <i>Chattonella antiqua/marina/ovata</i>		TTTTTTTTTTTTTTTAAAGAUAGGGGAGAAUCGCAACCCGU
Seq ID No. 27	clado <i>Chattonella antiqua/marina/ovata</i>		TTTTTTTTTTTTTTTUGGGAGAAUCGCAACCCGUAAGCG
Seq ID No. 28	clado <i>Gambierdiscus carpenteri</i> +caribaeus		TTTTTTTTTTTTTTTCUCUUGUCGACCAGAAUUGGGCAAG
Seq ID No. 29	clado <i>Gambierdiscus carpenteri</i> +caribaeus		TTTTTTTTTTTTTTTCCAGAAUUGGGCAAGUUGCGCGCC
Seq ID No. 30	clado <i>Gambierdiscus carpenteri</i> +caribaeus		TTTTTTTTTTTTTTTGGCAGAUUGCCCAACCCUCCAGGG
Seq ID No. 31	<i>Gambierdiscus carolinianus</i> +polynesiensis		TTTTTTTTTTTTTTTUCCAGAAUUGGGCAAGUUGCGCGCC
Seq ID No. 32	<i>Gambierdiscus carolinianus</i> +polynesiensis		TTTTTTTTTTTTTTTCCUGUUUACCUUCCAGCUCACCAG
Seq ID No. 33	<i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri		TTTTTTTTTTTTTTTCCUCUUGUCGACCAGAAUUGGGCAAG
Seq ID No. 34	<i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri		TTTTTTTTTTTTTTTCUGUCGCUCCAUUGACUGGAUGCU
Seq ID No. 35	<i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri		TTTTTTTTTTTTTTTCCUGUUUACCUUCCAGCUCACCAG
Seq ID No. 36	<i>Gambierdiscus toxicus</i> and <i>pacificus</i>		TTTTTTTTTTTTTTTGGCGGACCAGGCAUCCCCAGCAGAG
Seq ID No. 37	<i>Gambierdiscus toxicus</i> y <i>pacificus</i>		TTTTTTTTTTTTTTTACCUGUCACAGCCACAGCAGGCCAC

Seq ID No. 38	Gambierdiscus toxicus y pacificus	TTTTTTTTTTTTTTGUCAAUCCACUUGUGCCAGGACCU
Seq ID No. 39	Clado Ostreopsis ovata:	TTTTTTTTTTTTTTGCAUGCAGCUUUGAUAGCACUGUGC
Seq ID No. 40	Clado Ostreopsis ovata:	TTTTTTTTTTTTTTGGACAAAGCAGGCACACACACAUGA
Seq ID No. 41	Clado Ostreopsis ovata:	TTTTTTTTTTTTTTGGACAAAGCUGGUGGGUACAUAAAGG
Grupo F		
Niveles de género		
Seq ID No. 42	Pseudo-nitzschia	TTTTTTTTTTTTTTAGTACAGCGCAATCCTCAAAGAGC
Seq ID No. 43	Pseudo-nitzschia + Fragilariopsis	TTTTTTTTTTTTTTTCAGATTCACCCAAACATGGCAGAC
Seq ID No. 44	Pseudo-nitzschia + Fragilariopsis	TTTTTTTTTTTTTTTATCCACCCAAACAUGGCAGACCCAG
Seq ID No. 45	Pseudo-nitzschia no P. pungens	TTTTTTTTTTTTTTTTATGCTGTGCTATTTGCAGGCAGGGG
Seq ID No. 46	Pseudo-nitzschia + some Fragilariopsis	TTTTTTTTTTTTTTTGCAAAGGCCGACTGGACACACACCAC
Seq ID No. 47	P. fraudulenta, P. subfraudulenta, P. calliantha+P. australis+P. delicatissima+P. galaxiae (clade1)+P. multiseris	TTTTTTTTTTTTTTTCTACCAGGCGGACGGGAGTTTCAC
Seq ID No. 48	P. fraudulenta+P. subfraudulenta+P. multistriata+P. galaxiae (clade1)+P. australis+P. multiseris+P. delicatissima	TTTTTTTTTTTTTTTACGGGAGTTTCACCCCTCAGCTGTC
Seq ID No. 49	P. multistriata + P. calliantha+P. australis+P. multiseris+P. fraudulenta+P. cf. delicatissima clade4	TTTTTTTTTTTTTTTACAGGGCCCAAGCCACAAGTGG
Seq ID No. 50	Karenia	TTTTTTTTTTTTTTTCAGTATCGCATCCAGATCAAAAACCTG
Seq ID No. 51	Alexandrium	TTTTTTTTTTTTTTTTACCACCCACTTTGCATTCCAATG
Seq ID No. 52	Dinophysis in part	TTTTTTTTTTTTTTTTACTTGGTGTGGCAGCAACCAAT
Seq ID No. 53	Dinophysis	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGCCAGACAAACACTAAAGCT

Seq ID No. 54	Pseudochattonella (genus)	TTTTTTTTTTTTTTAAATGACCACCCTTTCGAAATCGCTTC
Seq ID No. 55	Pseudochattonella (genus)	TTTTTTTTTTTTTTTCGGTGAAAACGGCCGGCATTGTTATT
Seq ID No. 56	Pseudochattonella (genus)	TTTTTTTTTTTTTTTACGACCACCGTTTCACAGATTACCCA
Seq ID No. 57	Dinophysis genus sensu stricto	TTTTTTTTTTTTTTTCACGATGTGATTTAACACAGATTACCC
Seq ID No. 58	Dinophysis genus sensu stricto	TTTTTTTTTTTTTTTCGGAGTCGGATTGTTGGGCATGTAT
Seq ID No. 59	all Dinophysis	TTTTTTTTTTTTTTTATCGCCAGTTGGTACCATGCAATTC
Seq ID No. 60	Karlodinium genus	TTTTTTTTTTTTTTTGGAAACGGTACTCTTAGAAAGCACAC
Seq ID No. 61	Karenia genus	TTTTTTTTTTTTTTTCGGTTCGGTGCAGATATCCCAG
Seq ID No. 62	Azadinium Genus	TTTTTTTTTTTTTTTCAATCTCATCAAGAACAACACTGGTTCCAT
Seq ID No. 63	Azadinium Genus	TTTTTTTTTTTTTTTAAAGACAAGAAACACCACGCACATCT
Seq ID No. 64	Azadinium Genus	TTTTTTTTTTTTTTTCTCCACAGAGTCGGGTATGG
Seq ID No. 65	Azadinium Genus + Karenia. mikimotoi	TTTTTTTTTTTTTTTAAACCTTCCACAGAGTCGGGTATG
Seq ID No. 66	Prorocentrum	TTTTTTTTTTTTTTTCTCCATTCGGGATGCATCTCGAGAC
Seq ID No. 67	Chattonella genus	TTTTTTTTTTTTTTTTCUCCUUGCGAAAGCCGACCAGUACUCU
Seq ID No. 68	Chattonella genus	TTTTTTTTTTTTTTTUGCAGACUCCUUGCGAAGCCGACCCG
Seq ID No. 69	Chattonella genus	TTTTTTTTTTTTTTTAAAGGCCUUCUCCCCAAGGAUGGCAAG
Grupo G		
Seq ID No. 70	Alexandrium NA, WE, TA,	TTTTTTTTTTTTTTTGTATTCAGGCCAAACACCTGCTTG
Seq ID No. 71	Alexandrium minutum	TTTTTTTTTTTTTTTCTCCAGGCAAGTTGCAAAATC
Seq ID No. 72	Alexandrium tamarense (NA)	TTTTTTTTTTTTTTTCAAGTGAACACTCCCACCAAGCAA
Seq ID No. 73	Alexandrium tamarense (NA)	TTTTTTTTTTTTTTTAGTGAACACTCCCACCAAGCAAAT
Seq ID No. 74	Alexandrium tamarense (TA)	TTTTTTTTTTTTTTTGGCAAGCACTACAACTCTCACTGAGGA
Seq ID No. 75	Alexandrium ostenfeldii	TTTTTTTTTTTTTTTTCATTCCAATGCCACACAGGCAAAATTA

Seq ID No. 76	Alexandrium ostenfeldii	TTTTTTTTTTTTTTGAAATCACCAAGGTTCCAAGCAGAGC
Seq ID No. 77	Pymnesium (= Chrysochromulina) polylepsis	TTTTTTTTTTTTTTTATAGITTCOCATAAGGTGCCGACG
Seq ID No. 78	Pymnesium parvum	TTTTTTTTTTTTTTTCAG CCG ACG CCG AGC GCG
Seq ID No. 79	Pymnesium parvum	TTTTTTTTTTTTTTTAAAGAAAGTGTCCGCCAACGAGGTGTT
Seq ID No. 80	Karenia mikimotoi and some Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTATGCAGAAAGATCGCAGGCAAGCACAC
Seq ID No. 81	Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTAGCAGAAAGATTGCAAGCAAGCACAC
Seq ID No. 82	Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTACATGCTCCTGGCACTAGCAACCTT
Seq ID No. 83	competitor Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTACATGCTCCTGGCACTAGCACCCCT
Seq ID No. 84	Karenia mikimotoi	TTTTTTTTTTTTTTTTCATGCAGAGCAGAAAGATCGCAG
Seq ID No. 85	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTAAATCAAGCCACAGAGGGGCCCAATTT
Seq ID No. 86	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTGGAAATCAGTTTAGACATGAGTTCT
Seq ID No. 87	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTAGAGTTTCTCAAAATCTGAACCG
Seq ID No. 88	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTCAGAGGGCCCAATTTCCAAGCTGAG
Seq ID No. 89	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTGGACGAGTAACAGAAAGCTACAAGC
Seq ID No. 90	Karlodinium veneficium	TTTTTTTTTTTTTTTGAAGACTACAATTCAGGCCAGAG
Seq ID No. 91	Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTCGTCAGGATCTGAACACTGGGGCA
Seq ID No. 92	Karenia brevis	TTTTTTTTTTTTTTTCAACGTTCAAGGATCTGAACACTGCG
Seq ID No. 93	Karenia brevis+ Karenia mikimotoi	TTTTTTTTTTTTTTTTCAGTGGCACCAGACACACAGTGAG
Seq ID No. 94	Karenia brevis+ Karenia mikimotoi	TTTTTTTTTTTTTTTTCGGAGCAGTGGACCAGACACACAG
Seq ID No. 95	Prorocentrum planktonic clade	TTTTTTTTTTTTTTTTCGCAATCAGAAACCCATCCTAGTCT
Seq ID No. 96	Prorocentrum lima	TTTTTTTTTTTTTTTATAGCTCTAGCAATTTCCACGGGTATC
Seq ID No. 97	Prorocentrum lima	TTTTTTTTTTTTTTTACACCCCAATTTGCCCTGTAGGCAG
Seq ID No. 98	Prorocentrum minimum	TTTTTTTTTTTTTTTTCGCAATGAGTTCTGCCAAGGCT
Seq ID No. 99	Prorocentrum belizaneum & P. maculosum	TTTTTTTTTTTTTTTAAUUUAUCGCCAGGGACGCCAUAGC

Seq ID No. 100	Prorocentrum maculosum	TTTTTTTTTTTTTTTTUUCGCCGUUCAUUCGCGCAUUACUG
Seq ID No. 101	Prorocentrum maculosum 2	TTTTTTTTTTTTTTTTUGUGGCCUUUAUCCAAGAGGCCCGCACC UGC
Seq ID No. 102	Prorocentrum rathymum and P. mexicanum	TTTTTTTTTTTTTTTTTGACAAGAAGCGCUGCAACCAGACAC
Seq ID No. 103	Prorocentrum rathymum and P. mexicanum	TTTTTTTTTTTTTTTTUGUGCAGGGAAGCGCCACAGUCACC
Seq ID No. 104	Dinophysis acuminata+ D. dens+D. sacculus	TTTTTTTTTTTTTTTTATGCTCATCGCAACCACAGCAAAGC
Seq ID No. 105	Dinophysis acuta+D.fortii	TTTTTTTTTTTTTTTCATCGCAACCACAAAGTCTGCTTGA
Seq ID No. 106	Dinophysis acuminata	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCACAGACTTCCACGGCAACGC
Seq ID No. 107	Dinophysis acuta	TTTTTTTTTTTTTTTTCAGACTTCCACGGCAACAATTAGG
Seq ID No. 108	Dinophysis norvegica	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCACGGCAACGTTCCAGGAACTAAA
Seq ID No. 109	Phalacroma rotundatum	TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAACGCTCAGGAACCTAAACACTG
Seq ID No. 110	Pseudo-nitzschia australis, P. seriata, P. multiseriata	TTTTTTTTTTTTTTTGCUCUCCAAGGAUUCAACCAACC
Seq ID No. 111	P. australis & P. multiseriata	TTTTTTTTTTTTTTTTTGACAAATGACTCACTCCACCAGG
Seq ID No. 112	P. australis & P. seriata, P. delicatissima, P. calliantha, P. multiseriata	TTTTTTTTTTTTTTTGGCTGCTTCCAAAAGGATTCAA
Seq ID No. 113	P. australis & P. seriata, P. calliantha	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCCCAAACCACAAGTGGCCGGGGA
Seq ID No. 114	P. cacialantha + P. australis	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCTGATAGAGTCAAACCCAGT
Seq ID No. 115	P. calliantha	TTTTTTTTTTTTTTTATTCGGCACCAAAAAGTGCAGATTT
Seq ID No. 116	P. calliantha	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCTACTCAAGTCAAACCCAGTGCT
Seq ID No. 117	P. manni+P. australis	TTTTTTTTTTTTTTTTTGGGCTTAAACAGCGCAGATTTACA
Seq ID No. 118	P. manni	TTTTTTTTTTTTTTTAAACGCCAAAGTCTTCAGACCACAA
Seq ID No. 119	P. manni+P. australis	TTTTTTTTTTTTTTTCTCAGACCACAATTCGGCGCTTAAA
Seq ID No. 120	P. manni	TTTTTTTTTTTTTTTATTTCTGCTGCTCGAGTCAAAAACCAG

Seq ID No. 121	<i>P. delicatissima</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTCCAAACCACACTGTTACTTTTCATTAGG
Seq ID No. 122	<i>P. cf. delicatissima</i> Clade4+ <i>P. galaxiae</i> (clade2)+ <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC TTTTTTTTTTTTTTTGGATTGGCAAAATATCCAAACCACACTGT
Seq ID No. 123	<i>P. cf. delicatissima</i> Clade4	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC
Seq ID No. 124	<i>P. cf. delicatissima</i> Clade4+ <i>P. galaxiae</i> (clade2)+ <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTAAUGUUAAAGUCUAUAGACCACAAA
Seq ID No. 125	<i>P. dolorosa</i> + <i>P. micropora</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC
Seq ID No. 126	<i>P. dolorosa</i> + <i>P. micropora</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC
Seq ID No. 127	competitor <i>P. dolorosa</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC
Seq ID No. 128	<i>P. arenysensis</i> + <i>P. multistriata</i> + <i>P. australis</i> + <i>P. galaxiae</i> (clade2)	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTACCAGGC
Seq ID No. 129	<i>P. delicatissima</i> + <i>P. calliantha</i>	TTTTTTTTTTTTTTTCCACTGTACTTTTCATTACGCACCG
Seq ID No. 130	<i>P. galaxiae</i> , todos clados	TTTTTTTTTTTTTTTCCACATCACAAGTGACAAGGGAAATA
Seq ID No. 131	<i>P. galaxiae</i> , todos clados	TTTTTTTTTTTTTTTCCAAAGGAATCAACCAAGCAAAGCAAACC
Seq ID No. 132	<i>P. galaxiae</i> , todos clados	TTTTTTTTTTTTTTTTCGCTGCTTAAGTCAAAAACCAGT
Seq ID No. 133	<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGTCCGTCGCCGCCCAAAAAGGCAT
Seq ID No. 134	<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGACAACGACTCACTCTGCCAGG
Seq ID No. 135	<i>P. multiseries</i> + <i>P. calliantha</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTACCCAAACTCAGCAAGCCACACAG
Seq ID No. 136	<i>P. multiseries</i> + <i>P. calliantha</i>	TTTTTTTTTTTTTTTGGCCCAAGCCACAAGTGGCTAGG
Seq ID No. 137	<i>P. multiseries</i> + <i>P. calliantha</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTAAATGACTCACTCTGCCAGGCGGAC
Seq ID No. 138	<i>P. multistriata</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTAAACCCAAACTCAGAAAGCTCACAG
Seq ID No. 139	<i>P. pseudodelicatissima</i> + <i>P. cuspidata</i>	TTTTTTTTTTTTTTTCCAAAGGGATCAACCAAGACAAA
Seq ID No. 140	<i>P. pseudodelicatissima</i> + <i>P. cuspidata</i>	TTTTTTTTTTTTTTTCCCGGCAGATAAGTCAAGGTCTAT
Seq ID No. 141	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> + <i>P. calliantha</i>	TTTTTTTTTTTTTTTATGGGCACCCCTCAGTACGACAACCT

Seq ID No. 142	<i>P. pungens</i> + <i>P. calliantha</i> + <i>P. multiseriata</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTCTCACGCAAGTCCACAGCGCCCA
Seq ID No. 143	<i>P. pungens</i> + <i>P. calliantha</i> + <i>P. australis</i>	TTTTTTTTTTTTTACTCACTTTACCAGGGGACCGGA
Seq ID No. 144	<i>P. seriata</i> , <i>P. calliantha</i> , <i>P. multiseriata</i> , <i>P. australis</i> + <i>P. multistriata</i>	TTTTTTTTTTTTTGACAAATGACTCACTTACCAGGGC
Seq ID No. 145	<i>Chloromorrum toxicum</i>	TTTTTTTTTTTTTACGAACAACAATAACACAATCCGCTAGG
Seq ID No. 146	<i>Chloromorrum toxicum</i> , <i>Karenia mikimotoi</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>	TTTTTTTTTTTTTGATGAGGATCGCAACACCAACAACCT
Seq ID No. 147	<i>Chloromorrum toxicum</i>	TTTTTTTTTTTTTCTAGGAAAGGATCGGGGCTCATAC
Seq ID No. 148	<i>Chloromorrum toxicum</i>	TTTTTTTTTTTTTCCACCGAAATGGTCAGGAGTTTATGCA
Seq ID No. 149	<i>Gymnodonium catenatum</i>	TTTTTTTTTTTTTTCGATAGTTAACGGCTCCAATCTCTA
Seq ID No. 150	<i>G. catenatum</i>	TTTTTTTTTTTTTACATCTACGCCCTGCTGGCAG
Seq ID No. 151	<i>G. catenatum</i>	TTTTTTTTTTTTTTCACCGCCCGCTTTCGCTGGAATA
Seq ID No. 152	<i>G. catenatum</i>	TTTTTTTTTTTTTTCGACCGAAGTCGATTCGCACAGTT
Seq ID No. 153	<i>Heterosigma akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTCTTGAATGAACCATCGACCGAAGTC
Seq ID No. 154	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTATGTTGAAACGCTCCAGGCCCCACG
Seq ID No. 155	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTGGACACGACTGAGCACGCACCTTT
Seq ID No. 156	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTGGAGCAAAGGTCCTCCGTCCTAACCC
Seq ID No. 157	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTACCAGCATACCCGAGAGAGGAAACGC
Seq ID No. 158	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTGGACCCAGGCCAAGAACCAGGATTGT
Seq ID No. 159	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTACTCGTCGGAAACGGCTCGTACGC
Seq ID No. 160	<i>H. akashiwo</i>	TTTTTTTTTTTTTAAAGCAACTCGACTCCATTAGCACGG
Seq ID No. 161	<i>Pseudochattonella verruculosa</i>	TTTTTTTTTTTTTAAAGCAACTCGACTCCACTAGGACCGG
Seq ID No. 162	<i>Pseudochattonella farcimen</i>	TTTTTTTTTTTTTAAAGCAACTCGACTCCACTAGGACCGG

Seq ID No. 163	Vulcanodinium rugosum	TTTTTTTTTTTTTTTTUUUACCCACCCCGGAAACUGGCACAU
Seq ID No. 164	Vulcanodinium rugosum	TTTTTTTTTTTTTTTTCAAUUCAGGGCCAAUGGCCCAAUU
Seq ID No. 165	Vulcanodinium rugosum	TTTTTTTTTTTTTTTTGGCAAGCGGGAUUGUCACCCUCGCU
Seq ID No. 166	Fibrocapsa japonica	TTTTTTTTTTTTTTTTGGGUAACGAAACGCCACCCAGAUUU
Seq ID No. 167	Fibrocapsa japonica	TTTTTTTTTTTTTTTTCCGAACACGACAUUGCCACAGGGUU
Seq ID No. 168	Fibrocapsa japonica	TTTTTTTTTTTTTTTTUUGUCACCGUCCACGAUGCCCCGUU
Seq ID No. 169	Dino New Genus	TTTTTTTTTTTTTTTTGUACACACCUAGUCCCUACAAGCACA
Seq ID No. 170	Dino New Genus	TTTTTTTTTTTTTTTTGAGCAACCCCGGGAGAAAGCGUCGU
Seq ID No. 171	Chattonella subsalsa	TTTTTTTTTTTTTTTTGGACGAGGAACCCUCAUCCAGAUUU
Seq ID No. 172	Chattonella subsalsa	TTTTTTTTTTTTTTTTGGGUUAUCACCGUCCAUAGACACUGU
Seq ID No. 173	Chattonella subsalsa	TTTTTTTTTTTTTTTTCAGUCCAAGCCACGACAGAGAAUGU
Seq ID No. 174	Gambierdiscus clado2 con caribaeus, carpenteri, australis	TTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUGUCACUGCCCAC
Seq ID No. 175	Gambierdiscus toxicus y pacificus, belizeanus	TTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUGUCACAGCCCAC
Seq ID No. 176	Alexandrium spp.	TTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUGUCAUUGCCCAC
Seq ID No. 177	Gambierdiscus polynesiensis a usar con sonda de clado	TTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUGUUACUGCCCAC
Seq ID No. 178	Gambierdiscus polynesiensis	TTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGGCAUUGCCUGCAUUGGUU
Seq ID No. 179	Gambierdiscus polynesiensis	TTTTTTTTTTTTTTTACCAGCUGAUGCACCACAAGCCCGUU
Seq ID No. 180	Gambierdiscus polynesiensis	TTTTTTTTTTTTTTTAGGUUAGCCAGAUUGCCCAGCCUUU
Seq ID No. 181	Gambierdiscus clade2 cor caribaeus, carpenteri, australis, polynesiensis	TTTTTTTTTTTTTTTGC AUUGAUCCAUCCCCAUACGAC

Seq ID No. 182	Gambierdiscus belizeanus	TTTTTTTTTTTTTGTCCAUUGCACAGCACCAUUGUGGGAU
Seq ID No. 183	Gambierdiscus belizeanus	TTTTTTTTTTTTTGTCCAUUGCACAGCACCAUUGUGGGAU
Seq ID No. 184	Gambierdiscus belizeanus	TTTTTTTTTTTTTGAAGAUGCUCUCCAAGCAUUGCCUGC
Seq ID No. 185	Gambierdiscus austalis	TTTTTTTTTTTTTCCACGACCCAGGUUGUGGCUGUUUU
Seq ID No. 186	Gambierdiscus austalis	TTTTTTTTTTTTTCCGACAGCAAUUCCAGCAGAAA
Seq ID No. 187	Gambierdiscus austalis	TTTTTTTTTTTTTCAACAACCACAACUCACCACAGGUG
Seq ID No. 188	Gambierdiscus nuevo clado de especie	TTTTTTTTTTTTTAUUGCAACCAGGCAUCCGCUUGCAUU
Seq ID No. 189	Gambierdiscus nuevo clado de especie	TTTTTTTTTTTTTGAUUGCUGCAACAGGGCCAAAACUGU
Seq ID No. 190	Gambierdiscus nuevo clado de especie	TTTTTTTTTTTTTCCCCUCUGGAAAAGAAUGCUUGGGU
Seq ID No. 191	Gambierdiscus pacificus	TTTTTTTTTTTTTACCACUCCCUUUGGACACUCUCUUCACU
Seq ID No. 192	Gambierdiscus pacificus	TTTTTTTTTTTTTGCCUUGGCCUAGUUCUCCUUGAC
Seq ID No. 193	Gambierdiscus pacificus	TTTTTTTTTTTTTCCAUACAGGUGCAGAUUUCAAAAAGAU
Seq ID No. 194	Gambierdiscus carolinianus	TTTTTTTTTTTTTTCUCCAGGCAUAGCCUGCGUUAGUU
Seq ID No. 195	Gambierdiscus carolinianus	TTTTTTTTTTTTTGGACCAGCCAACCCAGCAGAAA
Seq ID No. 196	Gambierdiscus carolinianus	TTTTTTTTTTTTTGAACACAUCACAGCUGAACUGCU
Seq ID No. 197	Gambierdiscus yasumotoi+fuetzleri	TTTTTTTTTTTTTCCUCCAGAAAUAUUGCUCAGGCUGU
Seq ID No. 198	Gambierdiscus yasumotoi+fuetzleri	TTTTTTTTTTTTTCCAGCCAUUCCAGGCAAGAUGGAAU
Seq ID No. 199	Gambierdiscus yasumotoi+fuetzleri	TTTTTTTTTTTTTGTUGUUUCCAAGAACUGAGUGCCACU
Seq ID No. 200	Gambierdiscus yasumotoi+fuetzleri	TTTTTTTTTTTTTAAAGGUGCCGAAGGAGUCAUCCGAGU
Seq ID No. 201	Gambierdiscus carpenteri	TTTTTTTTTTTTTAAUUGCUUAGGGUGCACCCAGAUGCUC
Seq ID No. 202	Gambierdiscus carpenteri	TTTTTTTTTTTTTAGUGGCACUCAGUUCUUGGAUAACAC
Seq ID No. 203	Gambierdiscus carpenteri	TTTTTTTTTTTTTCAUGGGCGGACCCGGCCAUCCUCUGC
Seq ID No. 204	Gambierdiscus caribaeus	TTTTTTTTTTTTTGTGGGACCAGGCAUCCUCUGCAGAAAUCCA

Seq ID No. 205	<i>Gambierdiscus caribaeus</i>	TTTTTTTTTTTTUUUAGGAAAUUUGCUAGGCGUCACCAG
Seq ID No. 206	<i>Gambierdiscus caribaeus</i>	TTTTTTTTTTTTUUUCUGUAGCACAGCACACACUUGC
Seq ID No. 207	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	TTTTTTTTTTTTUCCAUUGUCAUCAACCAUCCACCU
Seq ID No. 208	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	TTTTTTTTTTTTTCUACGACGAAGUUUGCCAGCCAU
Seq ID No. 209	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	TTTTTTTTTTTTTTCUUCUGCAUUAAGGCAAGCCUIGC
Seq ID No. 210	<i>Ostreopsis siamensis</i>	TTTTTTTTTTTTTAAAGCCAGUACGCACACUCAGUGGU
Seq ID No. 211	<i>Ostreopsis siamensis</i>	TTTTTTTTTTTTTCAGUGCAUGAUCACAGUUGGUGCGU
Seq ID No. 212	<i>Ostreopsis siamensis</i>	TTTTTTTTTTTTTTCAGUGCACACAUGGAGCACACCAAU
Seq ID No. 213	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	TTTTTTTTTTTTTTCAGUUGGAUUGCAGCUCUCUGCUU
Seq ID No. 214	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	TTTTTTTTTTTTTGTUGCUCAUUGGUAGCAGCAUGCCAU
Seq ID No. 215	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	TTTTTTTTTTTTTGTGACUCUCACAUUCCAUGCUCUCUG
Seq ID No. 216	<i>Ostreopsis sp. cf. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTGTGGCAUAGCCUGCCAAAGAACGCUUU
Seq ID No. 217	<i>Ostreopsis sp. cf. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCGGGUAGGUCUGGUCUUGGUAUUU
Seq ID No. 218	<i>Ostreopsis sp. cf. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCAGUUUCCAGGUUGCCACACCAAU
Seq ID No. 219	<i>Ostreopsis sp. 24</i>	TTTTTTTTTTTTTAAUUGGUGGAGAUUGCACCAGUGUGU
Seq ID No. 220	<i>Ostreopsis sp. 24</i>	TTTTTTTTTTTTTAAUUGGUGGAGAUUGCACCAGUGUGU
Seq ID No. 221	<i>Ostreopsis sp. 24</i>	TTTTTTTTTTTTTAAUUGGUGGAGAUUGCACCAGUGUGU
Seq ID No. 222	<i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCAGUAGUCCACACAGAAAGUG
Seq ID No. 223	<i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCAGUAGUCCACACAGAAAGUG
Seq ID No. 224	<i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCUCCCAACCUGACGCAGUAUUCAC
Seq ID No. 225	<i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i>	TTTTTTTTTTTTTTCGGAUUCCCCUUUUGCGCUUCAGUU
	COMPITOR	TTTTTTTTTTTTTTCGGAUUCCCCUUUUGCGCUUCAGUU
Seq ID No. 226	<i>Ostreopsis sp. clado medio fondo</i>	TTTTTTTTTTTTTUAACGGUGUUUCCACACAGAUCAA

Seq ID No. 227	Ostreopsis sp. clado fondo medio	TTTTTTTTTTTTTAAACAACUGUUGUUGCAGGCCCGGA
Seq ID No. 228	Ostreopsis sp. clado medio ausente	TTTTTTTTTTTTTAAAGUUGCCACAGCAAGCACCAGCAU
Seq ID No. 229	Ostreopsis sp. clado medio ausente	TTTTTTTTTTTTTCCCGCUGAUCACCCCAAGCCCGUUC
Seq ID No. 230	Ostreopsis sp. clado medio ausente	TTTTTTTTTTTTTCCCGCUGAUCACCCCAAGCCCGGUU
Seq ID No. 231	ostreopsis sp. clado subconjunto arriba-abajo, solo arriba	TTTTTTTTTTTTTGCCACAGCAAACACUAGCAUCACAG
Seq ID No. 232	Ostreopsis sp. clado medio bajo	TTTTTTTTTTTTTGCACUCUUUGCUAUGCAAGAGAGCC
Seq ID No. 233	Ostreopsis sp. clado bajo	TTTTTTTTTTTTTGCCAAACAACUGUUAUCUCUGCAGUC
Seq ID No. 234	Coolia monotis	TTTTTTTTTTTTTTCGCCACGGUAUGCCAAGACCAUACC
Seq ID No. 235	Coolia monotis	TTTTTTTTTTTTTUCACCCGUCACCGCCACGGUAUGCC
Seq ID No. 236	Coolia monotis	TTTTTTTTTTTTTGGUCCAGCAUAAAGCUGGUGAUGGU
Seq ID No. 237	Coolia monotis clade 3 sequenecs	TTTTTTTTTTTTTCAAACAUAACACAUGACACAUGGGAUU
Seq ID No. 238	Gonyaulaux spinifera 2 spp	TTTTTTTTTTTTTTCACUCACAGUAGGUUCAGGGCCUUU
Seq ID No. 239	Gonyaulaux spinifera 2 spp	TTTTTTTTTTTTTACCAUAUCCCCCAAAAAGCAUGCAG
Seq ID No. 240	Gonyaulaux spinifera 2 spp	TTTTTTTTTTTTTUGCAAAGGCACGCAUCAGCAAAACU
Seq ID No. 241	Gonyaulaux spinifera 2 spp + baltica	TTTTTTTTTTTTTUCCAAAGAAAGCACGACUCAGAGGUG
Seq ID No. 242	Gonyaulaux spinifera 2 spp + baltica third spp	TTTTTTTTTTTTTUCCAAAGAAAGCACGACUCAGGGGUG
Seq ID No. 243	Gonyaulaux spinifera 3 spp	TTTTTTTTTTTTTAUCCAAUCACAAGACACAGAUGCCCCA
Seq ID No. 244	Gonyaulaux spinifera 3 spp	TTTTTTTTTTTTTAGGUACACACCCCAUUGGGCAGACCA
Seq ID No. 245	Gonyaulaux spinifera 3 spp	TTTTTTTTTTTTTGAACCUUGGCAUUGCCAGGAUUGGUU
Seq ID No. 246	Gonyaulaux spinifera 4 spp	TTTTTTTTTTTTTAGUUCUGGCAGGGCCAGCAUUGAUU
Seq ID No. 247	Lingulodinium polyhedrum	TTTTTTTTTTTTTGGCAAACAGGACUCUGCACCCUCAU
Seq ID No. 248	Lingulodinium polyhedrum	TTTTTTTTTTTTTGGACUGUCACCCUCAUUAUGGUCUCU

Seq ID No. 249	Lingulodinium polyhedrum	TTTTTTTTTTTTTTCUGACCCCCCAUUGGCAACGCAUCU
Seq ID No. 250	Protoceratium reticulatum	TTTTTTTTTTTTTTCUCACCCUCGUUGAUGCUUUUUCGCAAAAAG
Seq ID No. 251	Protoceratium reticulatum	TTTTTTTTTTTTTTAUACACCCGCUCCUCUCAGCAAU
Seq ID No. 252	Protoceratium reticulatum	TTTTTTTTTTTTTTCUUCUCAAACUACAAUUAAGGCCAGA

Ejemplos

A continuación se describen varios aspectos de la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos. Los autores de la presente invención contemplan la incorporación de una o más características cualesquiera específicas de los ejemplos en la invención reivindicada en sus diversos aspectos.

5 Introducción

Las realizaciones de la presente descripción abarcan códigos de barras para algas tóxicas que se presentan universalmente en todas las aguas marinas y estuarinas. El siguiente ejemplo describe cada paso en el análisis de la micromatriz desde su aplicación hasta la inferencia de los números de células a partir de la señal de la micromatriz.

Materiales y métodos

10 La presente descripción es un portaobjetos para micromatrices para detectar diferentes especies de algas tóxicas, que comprende sondas seleccionadas entre el grupo de códigos de barras de ADN a partir de los códigos de barras listados en la Tabla 1. Las células marcadas en gris claro SEC ID NO: 1 a 8 son los controles en la micromatriz. Los niveles de jerarquía taxonómica se resaltan en gris más oscuro. Las sondas se diseñaron utilizando la función de diseño de sondas en el programa ARB (Ludwig et al. 2004), todas con aproximadamente el mismo contenido de GC y la misma temperatura de fusión.

Básicamente, el procedimiento para usar el dispositivo es el siguiente: para fines de monitorización, se toma un volumen específico de agua y se concentra para realizar una extracción de ARN de la muestra.

- Preferiblemente, la extracción debe tener lugar en Tri-Reagent (Sigma) para optimizar la cantidad y la calidad del ARN.

20 El ARN se fragmenta en partes más pequeñas para tener facilidad de acceso del código de barras al sitio diana y el marcaje con un marcador fluorescente (el marcaje se hizo con el *kit* de etiquetado Platinum Bright, KREAtch). Después de la purificación del ARN marcado del producto no marcado, se hibrida a 60°C con la micromatriz, luego se lava y se escanea con un láser para detectar el ARN con etiquetas unidas a las sondas, y luego se analiza con el programa analizador GPR.

- Preferiblemente, la hibridación incluye una solución que eleva la temperatura de fusión de las sondas. Preferiblemente, el lavado se realiza al menos una vez por encima de 30 grados C, p. ej. hasta 50 grados C.
- Preferiblemente, el lavado incluye 3 lavados utilizando lo siguiente:

Tampón de lavado 1	2x SSC / 10 mM EDTA / 0,05% SDS
Tampón de lavado 2	0,5x SSC / 10 mM EDTA
Tampón de lavado 3	0,2x SSC / 10 mM EDTA

30 La hibridación puede ser proporcionada por una solución como se define a continuación:

- a) al menos un tampón compuesto de una proteína, una sal, un tampón, un jabón y agua,
- b) ADN artificial de control positivo para unirse a una sonda en un portaobjetos para micromatriz,
- c) un componente para evitar la unión a un espaciador de sonda, y
- d) un agente de bloqueo para prevenir reacciones no deseadas.

- Preferiblemente, el tampón de hibridación para uso con la invención contiene al menos una proteína, sal, tampón, jabón y agua. El tampón utilizado en los ejemplos se preparó con lo siguiente:

Componentes	50 mL	Conc. final
BSA	5,0 ml (20 µg/µL de material)	2,0 mg/mL
ADN de esperma de arenque	2 mL (10 µg/µL)	0,4 µg/µL
NaCl (5M)	40 mL	4M

Tris-Cl, pH 8,0 (1M)	2 mL	20 mM
Triton 100 (10%)	100 µL (10%)	0,02%
MilliQ	hasta 50 mL	

- Preferiblemente, el ADN artificial de control positivo es el control positivo de TBP o el producto de PCR del gen TATA Box para el control de la hibridación.
- 5 • Preferiblemente, el componente para evitar la unión es Poli-A (1 µM) para bloquear el espaciador de poli T en las sondas.
- Preferiblemente, el agente de bloqueo es KREAblock, comercializado por KREAtch.

Resultados

Se describirá ahora un ejemplo de la invención y se ilustrarán los resultados de varias hibridaciones y sus análisis.

10 Se hizo pasar una muestra de agua de mar a través de un filtro para concentrar el conjunto de células en una cantidad de agua conocida, por ejemplo un litro. El ARN se extrajo de las células mediante técnicas conocidas y el ARN se fragmentó (Lewis et al 2012). El ARN se extrajo utilizando una solución de extracción de ARN que tiene TriReagent (Sigma), Phase Lock Gel Heavy 2 mL (5Prime), células *Dunaliella tertiolecta* liofilizadas para control de la extracción, BCP (1-bromo-3-cloropropano), isopropanol y acetato amónico (7,5M). El ARN se fragmentó utilizando un tampón de parada de fragmentación de ARN (EDTA 0,5 M pH 8) (Figura 3). El ARN fragmentado se marcó con un marcador fluorescente, utilizando el *kit* KREATECH Platinum Bright 647 de marcado de ácido nucleico.

15 Tampón de fragmentación de ARN (ZnCl₂ 100 mM en Tris-HCl 100 mM, pH 7).

El ARN fragmentado marcado con fluorescencia se mezcló con una solución de hibridación formada por:

1. 4 × Tampón de hibridación *:

Componentes	50 mL	Conc. final
BSA	5,0 mL (20 µg/µL de material)	2,0 mg/mL
ADN de esperma de arenque	2 mL (10 µg/µL)	0,4 µg/µL
NaCl (5M)	40 mL	4M
Tris-Cl, pH 8,0 (1M)	2 mL	20 mM
Triton 100 (10%)	100 µL (10%)	0,02%
MilliQ	hasta 50 mL	

- 20
2. Control positivo de TBP o producto de PCR del gen de Box TATA para control de la hibridación.
 3. Poli-A (1 µM) para bloquear el espaciador de poli T en las sondas.
 4. KREAblock (KREAtch).

25 El ARN marcado fluorescentemente fragmentado se mezcló con una solución de hibridación, se aplicó al portaobjetos y se hibridó a 60 °C. Después se lavó el portaobjetos tres veces por encima de 30 °C, por ejemplo, hasta 70 °C, más típicamente a 50 °C. Después se escaneó el portaobjetos con un láser para detectar ARN con marcadores unidos a las sondas para identificar la presencia de algas tóxicas (Figura 2). Como se muestra en la Figura 1, las sondas se redistribuyeron en grupos de cuatro sondas idénticas en la micromatriz. La intensidad de diferentes colores que representan diferentes especies de algas tóxicas se puede interpretar fácilmente para dar un valor de concentración para un alga tóxica en particular en una muestra de agua como se presenta en las Fig. 4 y 5.

Discusion

30 Los códigos de ADN definidos anteriormente son una secuencia única específica para una especie o un grupo de especies de algas tóxicas como se indica. Cada una de las sondas, con su código de ADN único y la longitud del

espaciador adherido a un portaobjetos, permite que todos los diferentes tipos de algas tóxicas en todas las aguas marinas y estuarinas según se especifique, sean detectados en una operación. La solución utilizada para la hibridación eleva la temperatura de fusión de las sondas permitiendo que se produzca una buena unión entre las partes del ARN y las sondas.

- 5 Las micromatrices son tecnología de estado de la técnica en biología molecular para el procesamiento de masas de muestras para la detección de secuencias de ARN/ADN diana y esta micromatriz desarrollará la primera micromatriz universal comercialmente (filochip), capaz de detectar rápidamente la presencia de especies de algas dañinas específicas, lo que reduce la necesidad del bioensayo del ratón. Se espera que este filochip para especies tóxicas reduzca el riesgo para la salud de los seres humanos que se alimentan de peces y mariscos criados en granjas e incluso aquellos que recolectan mariscos personalmente, porque los avisos para no recolectar pueden publicarse más pronto.

Los principales objetivos sociales de tal micromatriz son:

- 15 • proporcionar una reducción del riesgo para la salud causado por la presencia de biotoxinas de algas tanto en las aguas de baño como en los mariscos mediante la predicción de concentraciones peligrosas de células de algas gracias a la rápida detección *in situ* y la alta sensibilidad de la micromatriz antes de que los números de células alcancen un nivel peligroso,
- promover la salud, la condición física y el bienestar de todos los miembros de la comunidad por la predicción de los niveles de toxinas al margen del número de células presentes,
- 20 • contribuir y apoyar el bienestar económico de las pequeñas comunidades pesqueras costeras, que se encuentran amenazadas debido a las interrupciones en la actividad pesquera, proporcionándoles un medio económico de monitorización personal por los piscicultores individuales para determinar los niveles de toxinas y las especies,
- prevenir posibles pérdidas económicas en la acuicultura y la industria turística, y
- reducir la necesidad del bioensayo del ratón, que es éticamente no deseable, mejorando los actuales sistemas europeos de monitorización.

- 25 El propósito de esta micromatriz es apoyar la política pesquera común y ayudar a las agencias nacionales de control proporcionando nuevas herramientas rápidas para la identificación de algas tóxicas y sus toxinas de forma que puedan cumplir con la directiva 2004/41/EC de la CE, reduciendo la necesidad del bioensayo del ratón, que fue retirado progresivamente por la UE en 2012.

La invención puede adoptar una forma diferente a la descrita específicamente.

- 30 Otras modificaciones adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones.

Referencias

- Anderson DM, Kaoru Y, AW White AM (2000). Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. Woods Hole Oceanographic Institution Technical Report WHOI-2000-11, 97 pp.
- 35 Browne R, Deegan, B, O'Carroll T, Norman M, O'Conneide M (2007) Status of Irish Aquaculture 2006. Marine Institute. Dublín.
- Dittami, SM, Edvardsen, B. (2012). GPR-Analyzer, a simple tool for quantitative analysis of hierarchical multispecies microarrays. Environ. Sci. Pollut. Res. doi , 10.1007/s11356-012-1051-5.
- 40 FAO, 2004. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper 80. Food and Agriculture Organization Of The United Nations, Rome.
- Lewis, J., Medlin, LK, Raine, R. (2012). MIDTAL (Microarrays for the Detection of Toxic Algae), A Protocol for a Successful Microarray Hybridisation and Analysis. Koeltz Publishing.
- 45 Ludwig W. SO, Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart AW, Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüßmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., and Schleifer K.-H. (2004). ARB, a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research 32:1363-71.
- Medlin LK, Kooistra, WHCF (2010). Methods to estimate the diversity in the marine photosynthetic protist community with illustrations from case studies: a review. Special Issue of Diversity "Biological Diversity Assessed by Molecular Methods", 2: 973-1014.

Touzet N, Franco JM, R. Raine R (2008) PSP toxin analysis and discrimination of the naturally co-occurring *Alexandrium tamarense* and *A. minutum* in Cork Harbour, Ireland. *Aq Micro Ecol.* 51: 285-299.

Otros varios aspectos adicionales de la presente invención se describen en los pasajes que siguen:

5 La presente invención se refiere a un portaobjetos para micromatrices para detectar algas tóxicas, códigos de barras de ADN, solución de hibridación y método de detección de algas tóxicas.

10 A menudo es deseable detectar algas tóxicas en el agua de mar para evitar el consumo de peces o mariscos contaminados por tales algas tóxicas. Hasta ahora, esto se ha hecho mediante el examen de muestras naturales de agua de mar, la detección e identificación de las células de algas tóxicas bajo un microscopio, la enumeración de las diferentes especies y después la extrapolación de los resultados para estimar la concentración (como células · L⁻¹) de diferentes especies tóxicas en una muestra de agua. Este es un proceso extremadamente lento y requiere un operador experto. A menudo, los resultados están disponibles hasta 5 días después de tomar la muestra, haciendo que las estrategias de mitigación sean casi imposibles. La invención busca, entre otras cosas, proporcionar una solución a este problema.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un portaobjetos para micromatrices para detectar diferentes especies de algas tóxicas, que comprende al menos una sonda cada una en igual número seleccionado entre el grupo de códigos de barras de ADN descrito en la lista de secuencias presentada en el presente texto.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona uno o más códigos de barras de ADN seleccionados entre el grupo de códigos de barras de ADN descritos en la lista de secuencias presentada en este documento.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de identificación de la presencia de diferentes especies de algas tóxicas, que comprende:

- a) recolectar las células de algas de una muestra de agua,
- b) extraer el ARN de al menos algunas de las células,
- 25 c) fragmentar el ARN,
- d) marcar el ARN con un marcador fluorescente,
- e) hibridar fragmentos de ARN que se han de detectar con sondas en un portaobjetos,
- f) lavar el portaobjetos, y
- e) escanear el portaobjetos con un láser para detectar ARN con marcadores unidos a las sondas.

30 Preferiblemente, la hibridación incluye una solución que eleva la temperatura de fusión de las sondas.

Preferiblemente, el lavado se hace al menos una vez por encima de 30 grados C, p. ej. hasta 50 grados C.

Preferiblemente, el lavado incluye 3 lavados usando lo siguiente:

Tampón de lavado 1	2x SSC / EDTA 10 mM / 0,05% SDS
Tampón de lavado 2	0,5x SSC / EDTA 10 mM
Tampón de lavado 3	0,2x SSC / EDTA 10 mM

La hibridación puede ser proporcionada por una solución como se define a continuación.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una solución de hibridación que comprende:

- a) al menos una proteína, una sal, un tampón, un jabón y agua,
- b) ADN artificial de control positivo para unirse a una sonda en un portaobjetos para micromatrices,
- c) un componente para evitar la unión a un espaciador de sonda,
- d) un agente de bloqueo para prevenir reacciones no deseadas.

40 Preferiblemente, la al menos una proteína, sal, tampón, jabón y agua, se compone de lo siguiente:

ES 2 722 900 T3

Componentes	50 mL	Conc. final
BSA	5,0 mL (20 µg/µL de material)	2,0 mg/mL
ADN de esperma de arenque	2 mL (10 µg/µL)	0,4 µg/µL
NaCl (5M)	40 mL	4M
Tris-Cl, pH 8,0 (1M)	2 mL	20 mM
Triton 100 (10%)	100 µL (10%)	0,02%
MilliQ	hasta 50 mL	

Preferiblemente, el ADN artificial de control positivo es un producto de PCR del gen de Box TATA de control positivo TBP para el control de hibridación.

5 Preferiblemente, el componente para evitar la unión es Poly-dA (1 µM) para bloquear el espaciador de poli T en las sondas.

Preferiblemente, el agente de bloqueo es KREAblock, comercializado por KREAtch.

Ahora se describirá un ejemplo.

Se hizo pasar una muestra de agua de mar a través de un filtro para extraer una masa de células de algas.

10 El ARN se extrajo de las células mediante técnicas conocidas y se fragmentó el ARN. El ARN se extrajo utilizando una solución de extracción de ARN que tiene un TriReagent (Sigma), un Phase Lock Gel Heavy de 2 mL (5Prime), células *Dunaliella tertiolecta* liofilizadas para control de la extracción, BCP (1-bromo-3-cloropropano), isopropanol y acetato amónico (7,5 M). Tampón de fragmentación de ARN (ZnCl₂ 100 mM en Tris-HCl 100 mM, pH 7). El ARN se fragmentó utilizando un tampón de parada de la fragmentación del ARN (EDTA 0,5M pH 8).

15 El ARN fragmentado se marcó con un marcador fluorescente, utilizando el *kit* de marcado de ácido nucleico KREATECH Platinum Bright 647.

Un portaobjetos para micromatrices para detectar diferentes especies de algas tóxicas que comprende diferentes sondas, cada una en igual número seleccionado entre el grupo o códigos de ADN descritos en el listado de secuencias que se presenta aquí.

Las sondas se redistribuyeron en grupos de cuatro sondas idénticas.

20 El ARN fragmentado marcado fluorescentemente se mezcló con una solución de hibridación hecha de:

1. 4 × tampón de hibridación *:

Componentes	50 mL	Conc. final
BSA	5,0 mL (20 µg/µL de material)	2,0 mg/mL
ADN de esperma de arenque	2 mL (10 µg/µL)	0,4 µg/µL
NaCl (5M)	40 mL	4 M
Tris-Cl, pH 8,0 (1M)	2 mL	20 mM
Triton 100 (10%)	100 µL (10%)	0,02%
MilliQ	hasta 50 mL	

2. Producto de PCR del gen TATA Box control positivo TBP para control de hibridación.

3. Poly-dA (1 µM) para bloquear el espaciador de poli T en las sondas

25 4. KREAblock (KREAtch)

El ARN marcado fluorescente fragmentado se mezcló con una solución de hibridación y se aplicó al portaobjetos y se hibridó a 60 grados C.

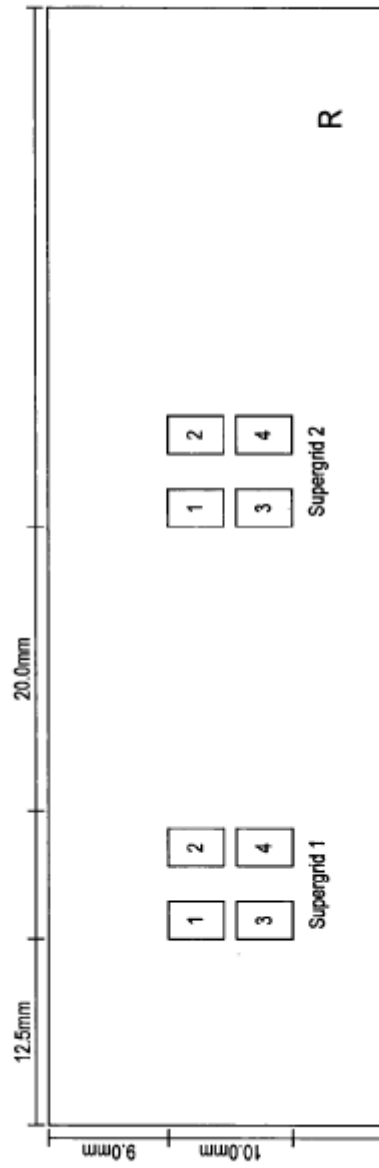
Después se lavó el portaobjetos tres veces por encima de 30 grados C, por ejemplo hasta 70 grados C, más típicamente a 50 grados C.

5 Luego se escaneó el portaobjetos con un láser para detectar el ARN con marcadores unidos a las sondas para identificar la presencia de algas tóxicas. La intensidad de diferentes colores que representan diferentes especies de algas tóxicas puede interpretarse fácilmente para dar un valor de concentración para un alga tóxica en particular en una muestra de agua.

10 Los códigos de ADN definidos anteriormente son una secuencia única específica para una o para un grupo de especies de algas tóxicas como se muestra. Las sondas, cada una con su código de ADN único y longitud de espaciador ligado a un portaobjetos, permiten que todos los diferentes tipos de algas tóxicas como se especifica sean detectados en una sola operación. La solución utilizada para la hibridación eleva la temperatura de fusión de las sondas permitiendo que se produzca una buena unión entre las partes del ARN y las sondas.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de matriz que comprende un portaobjetos para micromatrices configurado para detectar simultáneamente una diversidad de organismos en una muestra, en donde el portaobjetos para micromatrices comprende sondas de ácido nucleico que tienen fragmentos de secuencia de ARN 18S o 28S únicos para cada organismo o grupo taxonómico del mismo, en donde la pluralidad de organismos comprende organismos de algas tóxicas y en donde algunas de las sondas de ácido nucleico son específicas para la detección de la especie de cada organismo a detectar y otras sondas de ácido nucleico son específicas para la detección de al menos un taxón de nivel superior al que pertenece cada organismo a detectar, en donde el portaobjetos para micromatrices comprende:
 - 5 a. al menos una sonda seleccionada entre el grupo que consiste en controles positivos y negativos, que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID NO: 1 a la SEC ID NO: 4, la SEC ID NO: 7 y la SEC ID NO: 8;
 - 10 b. al menos las dos sondas capaces de detectar selectivamente al menos uno de los microorganismos eucarióticos, que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 9 a la SEC ID NO: 10;
 - c. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente el filum taxonómico del organismo, que tiene secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 11 a la SEC ID NO: 13;
 - 15 d. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente la clase taxonómica del organismo, que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 14 a la SEC ID NO: 16;
 - e. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente un clado taxonómico del organismo, a un nivel taxonómico intermedio entre clase y género, que tienen secuencias dadas respectivamente en SEC ID NO: 17 a SEC ID NO: 41;
 - 20 f. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente el género taxonómico del organismo, que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 42 a la SEC ID NO: 69;
 - g. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente la especie taxonómica del organismo, que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 70 a la SEC ID NO: 252, y
 - 25 h. al menos todas las sondas capaces de detectar selectivamente la cepa taxonómica del organismo, en donde existen cepas tanto tóxicas como no tóxicas de la misma especie, que tienen secuencias dadas respectivamente en la SEC ID NO: 70 a la SEC ID NO: 252.
2. Un sistema de matriz según la reivindicación 1, en donde las sondas son todas de 20 a 30 nucleótidos de largas con aproximadamente un 40% a 60% de contenido de C/G y tienen una región espaciadora 5' de cola de poli-T de al menos 10 restos de timina.
- 30 3. Un sistema de matriz según la reivindicación 2, en donde las sondas son todas aproximadamente 25 nucleótidos de largas con aproximadamente un 50% de contenido de C/G y tienen una región espaciadora 5' de cola de poli-T de aproximadamente 15 restos de timina.
4. Un método de detección de algas tóxicas en una muestra que comprende las etapas de:
 - a) obtener una muestra ambiental
 - 35 b) extraer el ARN de las células de algas presentes en la muestra
 - c) fragmentar el ARN
 - d) marcar los fragmentos de ARN con un marcador fluorescente
 - e) permitir que los fragmentos de ARN marcado se hibriden en un portaobjetos para micromatrices según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3
 - 40 f) separar por lavado los fragmentos marcados de ARN sin hibridar.
 - g) escanear el portaobjetos para micromatrices para detectar fragmentos marcados de ARN unidos a la sonda.



Supergrid = 4* grid (12*20)

FIG. 1

Grid 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M004	M004	M006	M006	M008	M008
B	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M004	M004	M006	M006	M008	M008
C	M010	M010	M012	M012	M014	M014	M016	M016	M018	M018	M020	M020
D	M010	M010	M012	M012	M014	M014	M016	M016	M018	M018	M020	M020
E	M040	M040	M042	M042	3XSSC	3XSSC	M046	M046	M048	M048	M050	M050
F	M040	M040	M042	M042	3XSSC	3XSSC	M046	M046	M048	M048	M050	M050
G	M052	M052	M054	M054	M056	M056	M058	M058	M060	M060	M062	M062
H	M052	M052	M054	M054	M056	M056	M058	M058	M060	M060	M062	M062
I	M068	M068	M090	M090	M092	M092	M094	M094	M096	M096	M098	M098
J	M068	M068	M090	M090	M092	M092	M094	M094	M096	M096	M098	M098
K	M100	M100	M102	M102	M104	M104	M106	M106	M108	M108	M110	M110
L	M100	M100	M102	M102	M104	M104	M106	M106	M108	M108	M110	M110
M	M027	M027	M029	M029	M031	M031	M033	M033	M035	M035	M037	M037
N	M027	M027	M029	M029	M031	M031	M033	M033	M035	M035	M037	M037
O	M039	M039	M041	M041	3XSSC	3XSSC	M045	M045	M047	M047	M049	M049
P	M039	M039	M041	M041	3XSSC	3XSSC	M045	M045	M047	M047	M049	M049
Q	M075	M075	M077	M077	M079	M079	M081	M081	M083	M083	M085	M085
R	M075	M075	M077	M077	M079	M079	M081	M081	M083	M083	M085	M085
S	3XSSC	3XSSC	M089	M089	M091	M091	M093	M093	M001	M001	M002	M002
T	3XSSC	3XSSC	M089	M089	M091	M091	M093	M093	M001	M001	M002	M002

FIG. 1 *Cont*

Grid 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M005	M005	M007	M007	M009	M009
B	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M005	M005	M007	M007	M009	M009
C	M011	M011	M013	M013	M015	M015	M017	M017	M019	M019	M021	M021
D	M011	M011	M013	M013	M015	M015	M017	M017	M019	M019	M021	M021
E	M041	M041	3XSSC	3XSSC	M045	M045	M047	M047	M049	M049	M051	M051
F	M041	M041	3XSSC	3XSSC	M045	M045	M047	M047	M049	M049	M051	M051
G	M053	M053	M055	M055	M057	M057	M059	M059	M061	M061	M063	M063
H	M053	M053	M055	M055	M057	M057	M059	M059	M061	M061	M063	M063
I	M089	M089	M091	M091	M093	M093	M095	M095	M097	M097	M099	M099
J	M089	M089	M091	M091	M093	M093	M095	M095	M097	M097	M099	M099
K	M101	M101	M103	M103	M105	M105	M107	M107	M109	M109	M111	M111
L	M101	M101	M103	M103	M105	M105	M107	M107	M109	M109	M111	M111
M	M028	M028	M030	M030	M032	M032	M034	M034	M036	M036	M038	M038
N	M028	M028	M030	M030	M032	M032	M034	M034	M036	M036	M038	M038
O	M040	M040	M042	M042	3XSSC	3XSSC	M046	M046	M048	M048	M050	M050
P	M040	M040	M042	M042	3XSSC	3XSSC	M046	M046	M048	M048	M050	M050
Q	M076	M076	M078	M078	M080	M080	M082	M082	M084	M084	M086	M086
R	M076	M076	M078	M078	M080	M080	M082	M082	M084	M084	M086	M086
S	M088	M088	M090	M090	M092	M092	M094	M094	M001	M001	M002	M002
T	M088	M088	M090	M090	M092	M092	M094	M094	M001	M001	M002	M002

FIG. 1 Cont

Grid 3

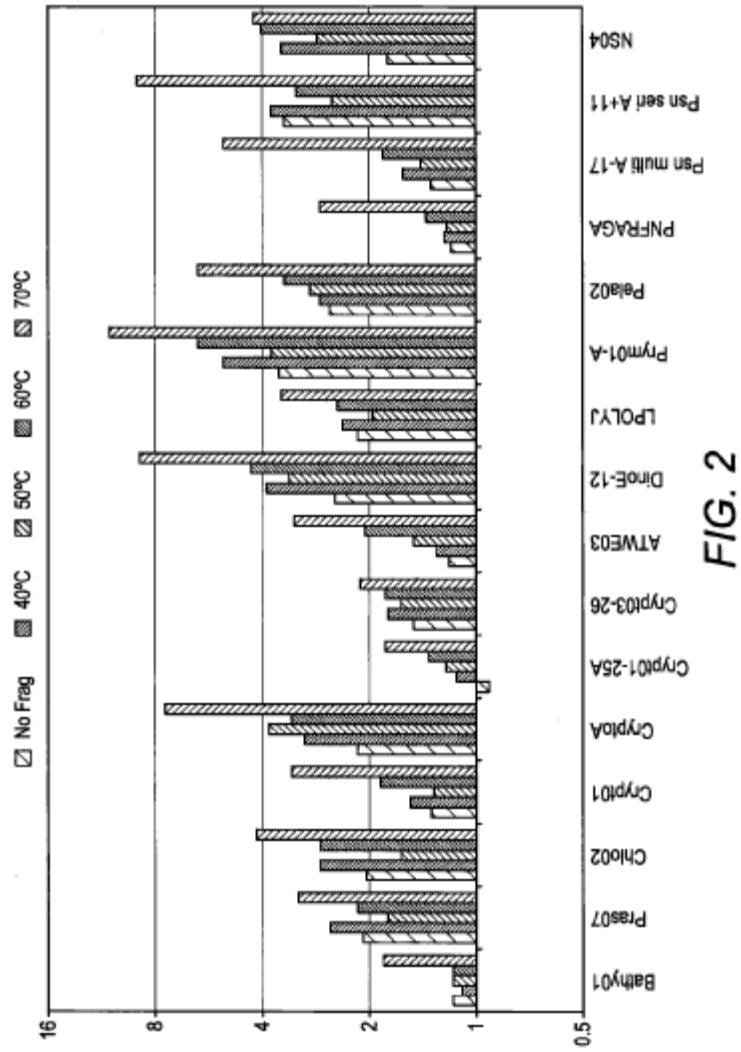
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M022	M022	M024	M024	M026	M026
B	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M022	M022	M024	M024	M026	M026
C	M028	M028	M030	M030	M032	M032	M034	M034	M036	M036	M038	M038
D	M028	M028	M030	M030	M032	M032	M034	M034	M036	M036	M038	M038
E	M064	M064	M066	M066	M068	M068	M070	M070	M072	M072	M074	M074
F	M064	M064	M066	M066	M068	M068	M070	M070	M072	M072	M074	M074
G	M076	M076	M078	M078	M080	M080	M082	M082	M084	M084	M086	M086
H	M076	M076	M078	M078	M080	M080	M082	M082	M084	M084	M086	M086
I	M112	M112	M005	M005	M007	M007	M009	M009	M011	M011	M013	M013
J	M112	M112	M005	M005	M007	M007	M009	M009	M011	M011	M013	M013
K	M015	M015	M017	M017	M019	M019	M021	M021	M023	M023	M025	M025
L	M015	M015	M017	M017	M019	M019	M021	M021	M023	M023	M025	M025
M	M051	M051	M053	M053	M055	M055	M057	M057	M059	M059	M061	M061
N	M051	M051	M053	M053	M055	M055	M057	M057	M059	M059	M061	M061
O	M063	M063	M065	M065	M067	M067	M069	M069	M071	M071	M073	M073
P	M063	M063	M065	M065	M067	M067	M069	M069	M071	M071	M073	M073
Q	M095	M095	M097	M097	M099	M099	M101	M101	M103	M103	M105	M105
R	M095	M095	M097	M097	M099	M099	M101	M101	M103	M103	M105	M105
S	M107	M107	M109	M109	M111	M111	3XSSC	3XSSC	M001	M001	M002	M002
T	M107	M107	M109	M109	M111	M111	3XSSC	3XSSC	M001	M001	M002	M002

FIG. 1 Cont

Grid 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M023	M023	M025	M025	M027	M027
B	M002	M002	M001	M001	M003	M003	M023	M023	M025	M025	M027	M027
C	M029	M029	M031	M031	M033	M033	M035	M035	M037	M037	M039	M039
D	M029	M029	M031	M031	M033	M033	M035	M035	M037	M037	M039	M039
E	M065	M065	M067	M067	M069	M069	M071	M071	M073	M073	M075	M075
F	M065	M065	M067	M067	M069	M069	M071	M071	M073	M073	M075	M075
G	M077	M077	M079	M079	M081	M081	M083	M083	M085	M085	3XSSC	3XSSC
H	M077	M077	M079	M079	M081	M081	M083	M083	M085	M085	3XSSC	3XSSC
I	M004	M004	M006	M006	M008	M008	M010	M010	M012	M012	M014	M014
J	M004	M004	M006	M006	M008	M008	M010	M010	M012	M012	M014	M014
K	M016	M016	M018	M018	M020	M020	M022	M022	M024	M024	M026	M026
L	M016	M016	M018	M018	M020	M020	M022	M022	M024	M024	M026	M026
M	M052	M052	M054	M054	M056	M056	M058	M058	M060	M060	M062	M062
N	M052	M052	M054	M054	M056	M056	M058	M058	M060	M060	M062	M062
O	M064	M064	M066	M066	M068	M068	M070	M070	M072	M072	M074	M074
P	M064	M064	M066	M066	M068	M068	M070	M070	M072	M072	M074	M074
Q	M096	M096	M098	M098	M100	M100	M102	M102	M104	M104	M106	M106
R	M096	M096	M098	M098	M100	M100	M102	M102	M104	M104	M106	M106
S	M108	M108	M110	M110	M112	M112	3XSSC	3XSSC	M001	M001	M002	M002
T	M108	M108	M110	M110	M112	M112	3XSSC	3XSSC	M001	M001	M002	M002

FIG. 1 *Cont*



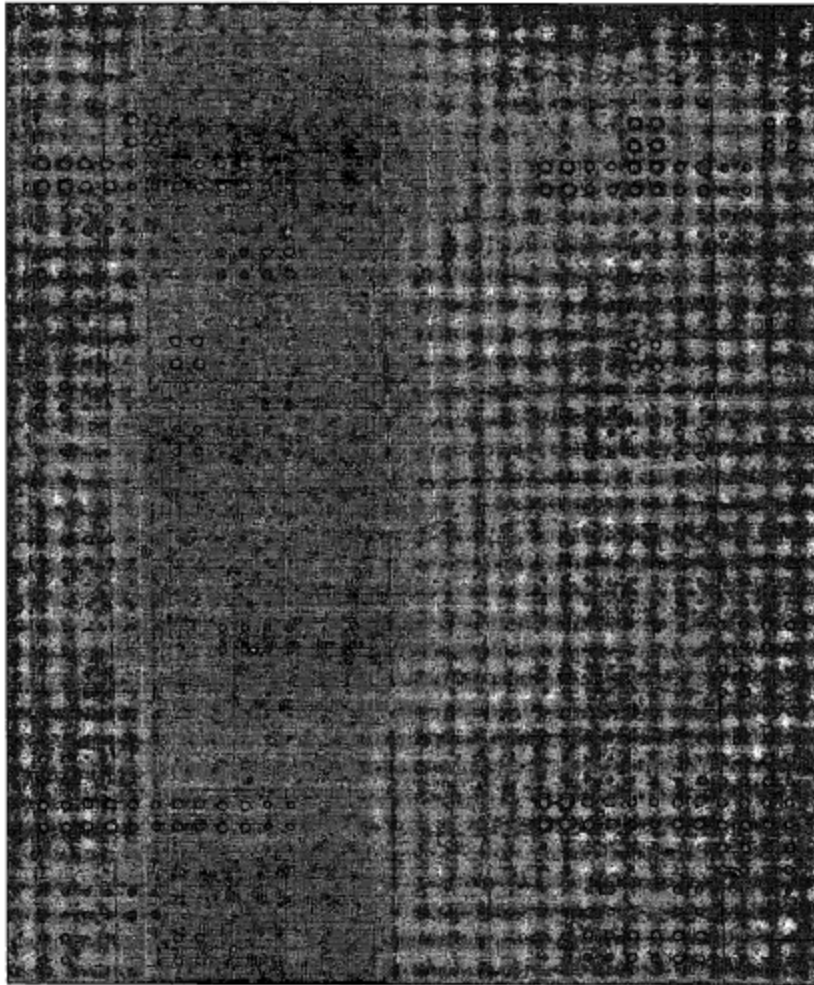


FIG. 3

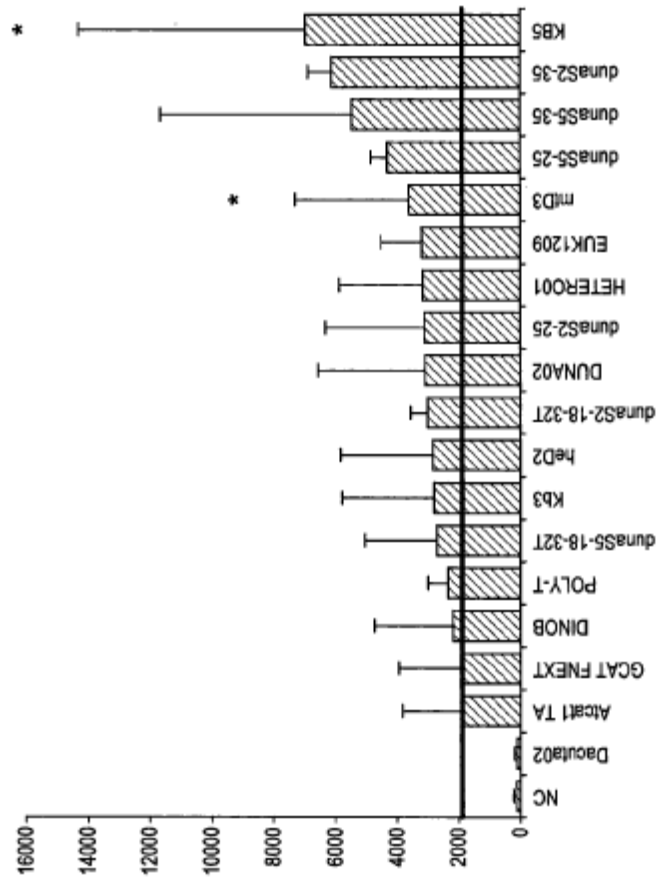


FIG. 4

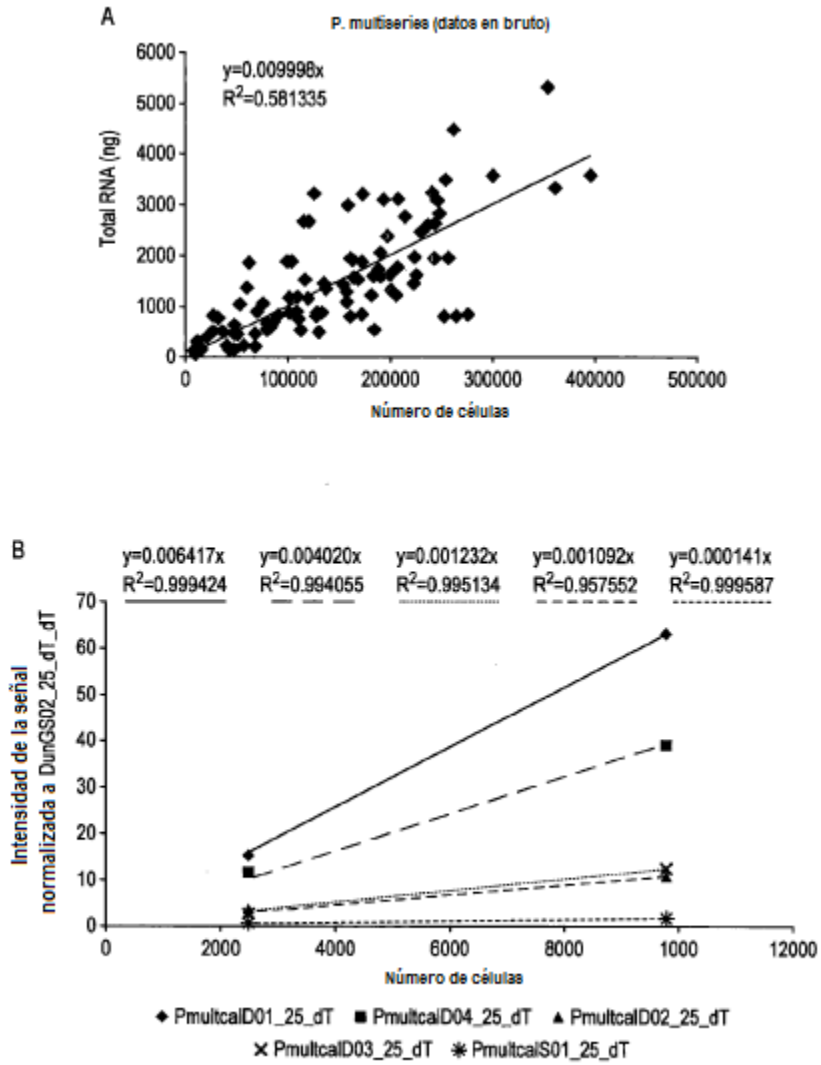


FIG. 5

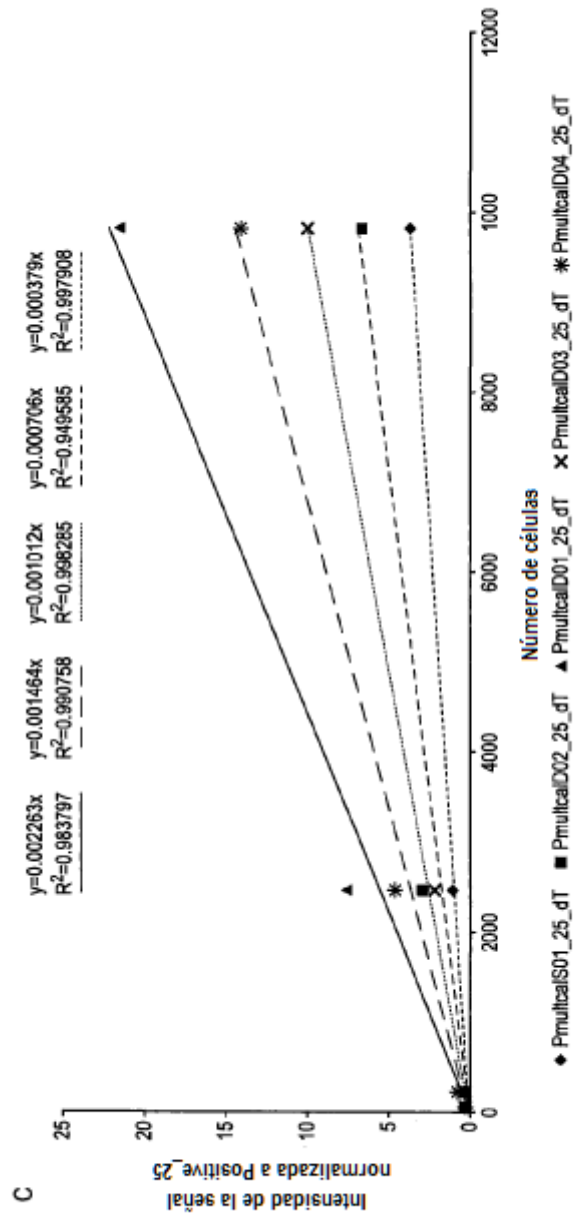


FIG. 5 Cont.

Mostra_60_1_c_2012_05_16_3ªxene.gpr - MIDTAL GPR analyser v1.27				
Archivo Herramientas Aprox.				
Sonda	Especie	S/N	Norm.	
PpungcalS01_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	2.9	0.9053	
Pdel4D03_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	25.03	24.9726	
PgalaD04_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	1.53	0.4064	
PmultcalD01_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	24.99	19.2793	
PmulaD03_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	21.4	8.2144	
PfraucalD02_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	17.16	7.5439	
PcaciD02_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	2.07	0.4526	
PmanD01_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	1.43	0.1557	
PSN_FragS01	Pseudo-nitzschia spp.	42.64	16.4109	
Pman2D05_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	2.37	0.4588	
Pdel4D02_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	4.66	1.7279	
PlimaD01_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	1.29	0.0648	
PdelID02_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	2.23	0.2869	
PmulusD01_25_dT	Pseudo-nitzschia spp.	44.47	17.3773	
PcaserausD03_25_dT	Pseudo-nitzschia seriata/australis (con jerarquia)	42.17	13.7046	
PpdeD02_25_dT	Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima (con jerarquia)	3.63	1.4206	
Pdel3B_25_dT	Pseudo-nitzschia delicatissima Clade3 (con jerarquia)	1.15	0.0493	
Pcal1D01_25_dT	Pseudo-nitzschia calliantha (con jerarquia)	2.44	0.5302	
PcaciD01_25_dT	Pseudo-nitzschia calliantha (con jerarquia)	1.64	0.2107	
PgalaD02_25_dT	Pseudo-nitzschia alaxiae (con jerarquia)	1.19	0.0688	
CompPdel3_25_dT	Pseudo-nitzschia	5.97	2.4677	
PverD01_25_dT	Pseudochattonella verrucosa	1.52	0.1901	
PschGS04_25_dT	Pseudochattonella spp.	10.47	3.5379	
PschGS01_25_dT	Pseudochattonella spp.	1.79	0.2816	
PschGS05_25_dT	Pseudochattonella spp.	1.17	0.0478	
PrymS01_25_dT	Prymnesium spp.	3.34	0.4866	
PrymS02_25_dT	Prymnesium spp.	20.17	7.5218	
PrymS03_25_dT	Prymnesium spp.	1.51	0.1536	
CpolyS01_25_dT	Prymnesium polylepis	1.01	-0.0139	
Manchas:				
Sonda	Bloque	Columna	Fila	Fmedia
Pcal1D01_25_dT	3	5	7	201
Pcal1D01_25_dT	3	6	7	198
Pcal1D01_25_dT	3	5	8	219
Pcal1D01_25_dT	3	6	8	188
Pcal1D01_25_dT	8	1	9	238
Pcal1D01_25_dT	8	2	9	242
Pcal1D01_25_dT	8	1	10	250
Pcal1D01_25_dT	8	2	10	263
MICROMATRICES PARA LA DETECCION DE ALGAS TOXICAS				

FIG. 6

				Copia	
Celular/L	Jerarquia				
5476280					
15087858					
4411648					
7270833		100% (pasado: PsnGS02_25_dT)			
		50% (fallido: PpdeD01_25_dT;(pasado: PsnGS02_25_dT)			
1325569		100% ((pasado: PcaserausD03_25_dT, PmultcalD03_25_dT, PpungcalS...			
<852936					
<212585		0% (fallido: PschGS05_25_dT, PschGS01_25_dT)			
		0% (fallido: PrymS03_25_dT)			
<311299					
Bmedia	S/N	Total	Activo		
77	2.61	1402406		<input checked="" type="checkbox"/>	
77	2.57	1368477		<input checked="" type="checkbox"/>	
78	2.81	1594671		<input checked="" type="checkbox"/>	
83	2.27	1187521		<input checked="" type="checkbox"/>	
76	3.13	1832175		<input checked="" type="checkbox"/>	
126	1.92	1311928		<input checked="" type="checkbox"/>	
103	2.43	1662529		<input checked="" type="checkbox"/>	
147	1.79	1311928		<input checked="" type="checkbox"/>	

FIG. 6 Cont.