

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 Biotxin 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 micromatrices.

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 | TTT |
| 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) | TTTTTTTTTTTTTTCTGTTATTGCCCTCAAACCTTCCCTGC |
| 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) | | TTTTTTTTTTTTTTTCAATACCGTACCGTCGGGAGCTGAT |
| Seq ID No. 19 | Proocentrum planktonic clade | | TTTTTTTTTTTTTTTUUCAAGCGUAAGCCUGCUUGAAAC |
| Seq ID No. 20 | Proocentrum benthic clade | | TTTTTTTTTTTTTTTGAUGCCAGAUCAAGCCAGAUGCUC |
| Seq ID No. 21 | Proocentrum benthic clade | | TTTTTTTTTTTTTTTCCAACUACCCCAUUGACCAUJACC |
| Seq ID No. 22 | Prymnesium | | TTTTTTTTTTTTTTTGGACTTCGGCCGATCCCTAGT |
| Seq ID No. 23 | all Dinophysis and Phalacroma | | TTTTTTTTTTTTTTTGTAGGCCAATACCGTACCGTCGGAA |
| Seq ID No. 24 | clado Prymnesium B1 | | TTTTTTTTTTTTTTTACTCAGCACGCAACCGGCAAGCCGG |
| 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 | | TTTTTTTTTTTTTTTCCUCUUGUCGAGAAUUGGGCAAG |
| Seq ID No. 29 | clado <i>Gambierdiscus carpenteri</i> +caribaeus | | TTTTTTTTTTTTTTTUCCAGAAUUGGGCAAGUUGCGCGCC |
| 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 | | TTTTTTTTTTTTTTTCCUGUUUACCUUCCAGCUCGAG |
| Seq ID No. 33 | <i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri | | TTTTTTTTTTTTTTTCCUCUUGUCGAGAAUUGGGCAAG |
| Seq ID No. 34 | <i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri | | TTTTTTTTTTTTTTTTCUGUCGUCUCCAUUGGAGUUCU |
| Seq ID No. 35 | <i>Gambierdiscus carolinianus</i> +carpenteri | | TTTTTTTTTTTTTTTCCUGUUUACCUUCCAGCUCGAG |
| Seq ID No. 36 | <i>Gambierdiscus toxicus</i> and <i>pacificus</i> | | TTTTTTTTTTTTTTTGGCGGACAGGCAUCCCGAGAGAG |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTCGGTTCGGTGCAGATATCCCCAG |
| Seq ID No. 62 | Azadinium Genus | TTTTTTTTTTTTTTTCAATCTCATCAAGAACAACACTGGTTCCAT |
| Seq ID No. 63 | Azadinium Genus | TTTTTTTTTTTTTTTAAAGACAAGAAACACCACGGCACATCT |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTTCUCCUUGCGAAAGCCGACC GAUCACU |
| Seq ID No. 68 | Chattonella genus | TTTTTTTTTTTTTTTUGCAGACUCCUUGCGAAGCCGACCCG |
| Seq ID No. 69 | Chattonella genus | TTTTTTTTTTTTTTTAAAGGCCUUCUCCCCAAGGAUGGCAAG |
| Grupo G | | |
| Seq ID No. 70 | Alexandrium NA, WE, TA, | TTTTTTTTTTTTTTTGTATTC AAGGCCAAACACCTGCTTG |
| Seq ID No. 71 | Alexandrium minutum | TTTTTTTTTTTTTTTCTCCAGGCAAGGTTGCCAAACTC |
| Seq ID No. 72 | Alexandrium tamarense (NA) | TTTTTTTTTTTTTTTCAAGTGCACACTCCCACCAAGCAA |
| Seq ID No. 73 | Alexandrium tamarense (NA) | TTTTTTTTTTTTTTTAGTGCACACTCCCACCAAGCAAAT |
| Seq ID No. 74 | Alexandrium tamarense (TA) | TTTTTTTTTTTTTTTTCGAAGCACTACAACTCTCACTGAGGA |
| Seq ID No. 75 | Alexandrium ostenfeldii | TTTTTTTTTTTTTTTTCATTC CAATGCCACAGGCCAAATTA |

| | | |
|---------------|---|--|
| Seq ID No. 76 | Alexandrium ostenfeldii | TTTTTTTTTTTTTTGAAATCACCAAGGTTCCAAAGCAGAGC |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTCTCATGCAGAGCAGAAAGATCGCAG |
| Seq ID No. 85 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTAAATCAAGCCAGAGGGGCCCAATTT |
| Seq ID No. 86 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTGGAAATCAGTTTAGACATGAGTTCT |
| Seq ID No. 87 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTAGAGTTTCTCAAAATCTGAACCG |
| Seq ID No. 88 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTTCAGAGGGCCCAATTTCCAAGCTGAG |
| Seq ID No. 89 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTTCGACGAGTAACAGAAAGCTACAAAGC |
| Seq ID No. 90 | Karlodinium veneficium | TTTTTTTTTTTTTTTGAAGACTACAATTCAGGCCAGAG |
| Seq ID No. 91 | Karenia brevis | TTTTTTTTTTTTTTTTCGTCAGGATCTGAACACTGGGGCA |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTTUGGUGCCCUUUUAUCCAAGAGGCCCGCACC UGC |
| Seq ID No. 102 | Prorocentrum rathymum and P. mexicanum | TTTTTTTTTTTTTTTTTGACAAGAAGCGCUGCAACCAGACAC |
| Seq ID No. 103 | Prorocentrum rathymum and P. mexicanum | TTTTTTTTTTTTTTTTUGUGUCAGGGAAGCGCCACAGUCACC |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTGGACTGGCTTCCAAAAGGATTCAA |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGCTTAAACAGCGCAGATTTACA |
| Seq ID No. 118 | P. manni | TTTTTTTTTTTTTTTAAACGCCAAAGTCTTCAGACCACAA |
| Seq ID No. 119 | P. manni+P. australis | TTTTTTTTTTTTTTTCTCAGACCACAATTCGGCGCTTAAA |
| Seq ID No. 120 | P. manni | TTTTTTTTTTTTTTTATTTCTGCTGCTCGAGTCAAACCCAG |

| | | |
|----------------|--|--|
| 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 TTTTTTTTTTTTTTGATTGGCAAAATATCCAACCACACTGT |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTCCAAAGGAATCAACCAAAGCAAACC |
| 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> | TTTTTTTTTTTTTTTCCAAAGGGATCAACCAAAGACAAA |
| 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. multiseriata</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> | TTTTTTTTTTTTTTCGACCGAAAGTCGATTCGCACAGTT |
| 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> | TTTTTTTTTTTTTGGAGCAAAGGTCCTCCGTCCTAACC |
| 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> | TTTTTTTTTTTTTAAAGCAACTCGACTCCACTAGGACGG |
| Seq ID No. 162 | <i>Pseudochattonella farcimen</i> | TTTTTTTTTTTTTAAAGCAACTCGACTCCACTAGGACGG |

| | | |
|----------------|--|--|
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTTUUGUCACCGUCCACGAUGCCCGUUU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUUGUCACUGCCAC |
| Seq ID No. 175 | Gambierdiscus toxicus y pacificus, belizeanus | TTTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUUGUCACAGCCAC |
| Seq ID No. 176 | Alexandrium spp. | TTTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUUGUCAUUGCCAC |
| Seq ID No. 177 | Gambierdiscus polynesiensis a usar con sonda de clado | TTTTTTTTTTTTTTTTAUCCUCCGUCACCUUGUACUGCCAC |
| Seq ID No. 178 | Gambierdiscus polynesiensis | TTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGGCAUUGCCUGCAUUGGUU |
| Seq ID No. 179 | Gambierdiscus polynesiensis | TTTTTTTTTTTTTTTTACCAGCUGAUGCACCACAAGCCGUU |
| Seq ID No. 180 | Gambierdiscus polynesiensis | TTTTTTTTTTTTTTTTAGGUUAGCCAGAUUGCCAGCCUUU |
| Seq ID No. 181 | Gambierdiscus clade2 cor caribaeus, carpenteri, australis, polynesiensis | TTTTTTTTTTTTTTTGC AUUGAUCCA UCCCCAUACGAC |

| | | |
|----------------|--------------------------------------|---|
| 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 | TTTTTTTTTTTTTCCGACAGCAAUUCCAGCAGAAAU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTACCACUCCCUUUGGACACUCUGUCUACU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTGGACCAGCCAACCCAGCAGAAAUU |
| Seq ID No. 196 | Gambierdiscus carolinianus | TTTTTTTTTTTTTGAACACAUAUCCACAGCUGAACUGCU |
| 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> | TTTTTTTTTTTTUUUAGGAAAUUUGCUAGGCUGCACCAG |
| Seq ID No. 206 | <i>Gambierdiscus caribaeus</i> | TTTTTTTTTTTTUUUCUGUAGUCACAGCACACACACUUGC |
| Seq ID No. 207 | <i>Gambierdiscus toxicus</i> | TTTTTTTTTTTTUCCAUUGUGCAUCAACCAUCCACCU |
| Seq ID No. 208 | <i>Gambierdiscus toxicus</i> | TTTTTTTTTTTTTCUACGACGAAGUUUGCCAGCCAU |
| Seq ID No. 209 | <i>Gambierdiscus toxicus</i> | TTTTTTTTTTTTTTCUUCUGCAUUAAGGCAAAGCCUIGC |
| 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> | TTTTTTTTTTTTTTCAGUGCCACACAUUGGAGCACACCAAU |
| Seq ID No. 213 | <i>Ostreopsis lenticularis</i> | TTTTTTTTTTTTTTCAGUUGGAUUGCAGCUCUCUGCUU |
| Seq ID No. 214 | <i>Ostreopsis lenticularis</i> | TTTTTTTTTTTTTTCUGUCUAUUGGUAGCAGCAUGCCAU |
| Seq ID No. 215 | <i>Ostreopsis lenticularis</i> | TTTTTTTTTTTTTTCACUCUCACAUUCCAUGCUCUCUG |
| Seq ID No. 216 | <i>Ostreopsis sp. cf. Ovata</i> | TTTTTTTTTTTTTTCGCAAUAGCCUGCCAAAGAACGCUUU |
| 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> | TTTTTTTTTTTTTTCUUGGUGGAGAUUGCACCAGUGUGU |
| Seq ID No. 220 | <i>Ostreopsis sp. 24</i> | TTTTTTTTTTTTTTCACAUUGGUGGAGAUUGCACCAGUG |
| Seq ID No. 221 | <i>Ostreopsis sp. 24</i> | TTTTTTTTTTTTTTCAGUAGUCUGCCACACAGAAGUG |
| Seq ID No. 222 | <i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i> | TTTTTTTTTTTTTTCAGUAGUCAAAGGACAAGCUUCACAG |
| Seq ID No. 223 | <i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i> | TTTTTTTTTTTTTTCUCCCAACCUGACGCAGUAUUCAC |
| Seq ID No. 224 | <i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i> | TTTTTTTTTTTTTTCGGAUUCCCCUUUUGCGCUUCAGUU |
| Seq ID No. 225 | <i>Ostreopsis sp. clado medio en Ost. Ovata</i> COMPITOR | TTTTTTTTTTTTTTCGGAUUCCCCUUUUGCGCUUCAGUU |
| Seq ID No. 226 | <i>Ostreopsis sp. clado medio fondo</i> | TTTTTTTTTTTTTTCUACGGUGUUUCCACACAGAUGAA |

| | | |
|----------------|---|--|
| Seq ID No. 227 | Ostreopsis sp. clado fondo medio | TTTTTTTTTTTTTAAACAACUGUUGUUGCAGGCCCGGA |
| Seq ID No. 228 | Ostreopsis sp. clado medio ausente | TTTTTTTTTTTTTAAAGUUGCCACAGCAAGCACCCAGCAU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTGACUCUUUGCUAUGCAAGAGAGCC |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTCAAACAUAACACAUAGACACAUUGGGAUU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTAUCCAAUCACAAGACACAGAUUGCCCA |
| Seq ID No. 244 | Gonyaulaux spinifera 3 spp | TTTTTTTTTTTTTAGGUACACACCCCAUUGGGCAGACCA |
| Seq ID No. 245 | Gonyaulaux spinifera 3 spp | TTTTTTTTTTTTTGAACCUUGGCAAUGCCAGGAUUGGUU |
| 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 | TTTTTTTTTTTTTTTAUACACCCGCUUCCUCUUCAGCAAU |
| Seq ID No. 252 | Protoceratium reticulatum | TTTTTTTTTTTTTTCUUCUCAAACUACAUAUUAAGGCCAGA |

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.

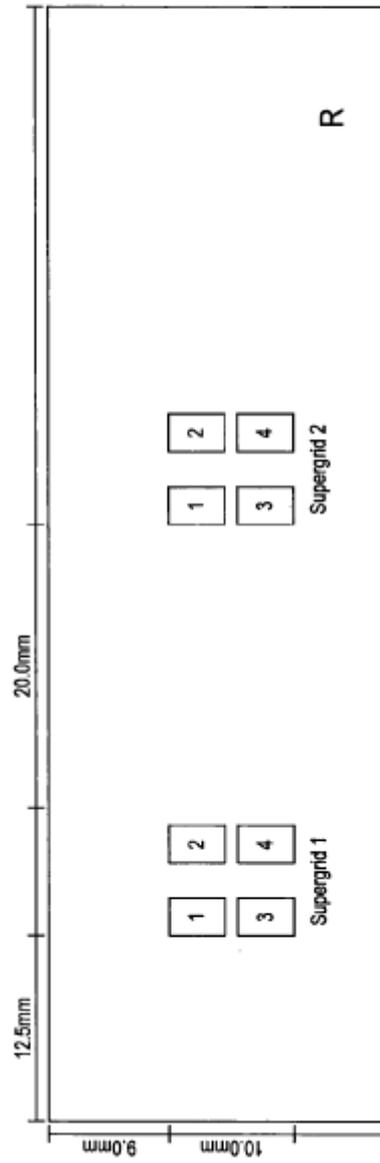
Después se lavó el portaobjetos tres veces por encima de 30 grados C, por ejemplo hasta 70 grados C, más típicamente a 50 grados C.

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:
 - 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;
 - 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;
 - 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;
 - 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
 - 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.
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
 - 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
 - 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

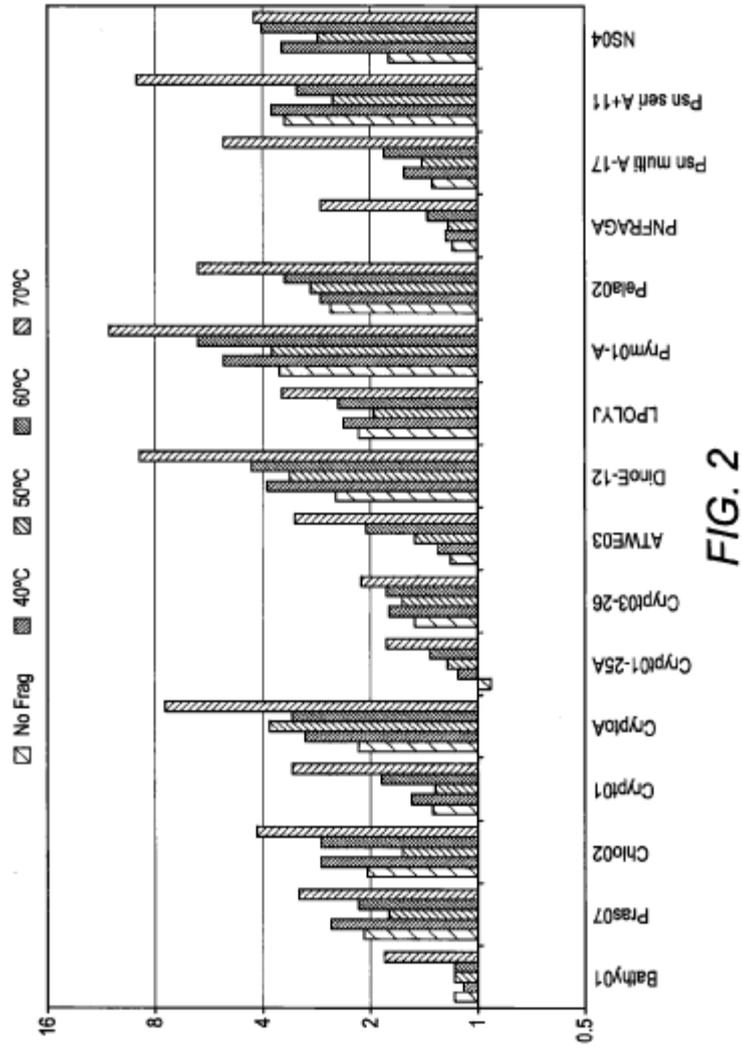
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|
| A | M002 | M002 | M001 | M001 | M003 | M003 | M022 | M022 | M024 | M024 | M026 | M026 |
| B | M002 | M002 | M001 | M001 | M003 | M003 | M022 | M022 | M024 | 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



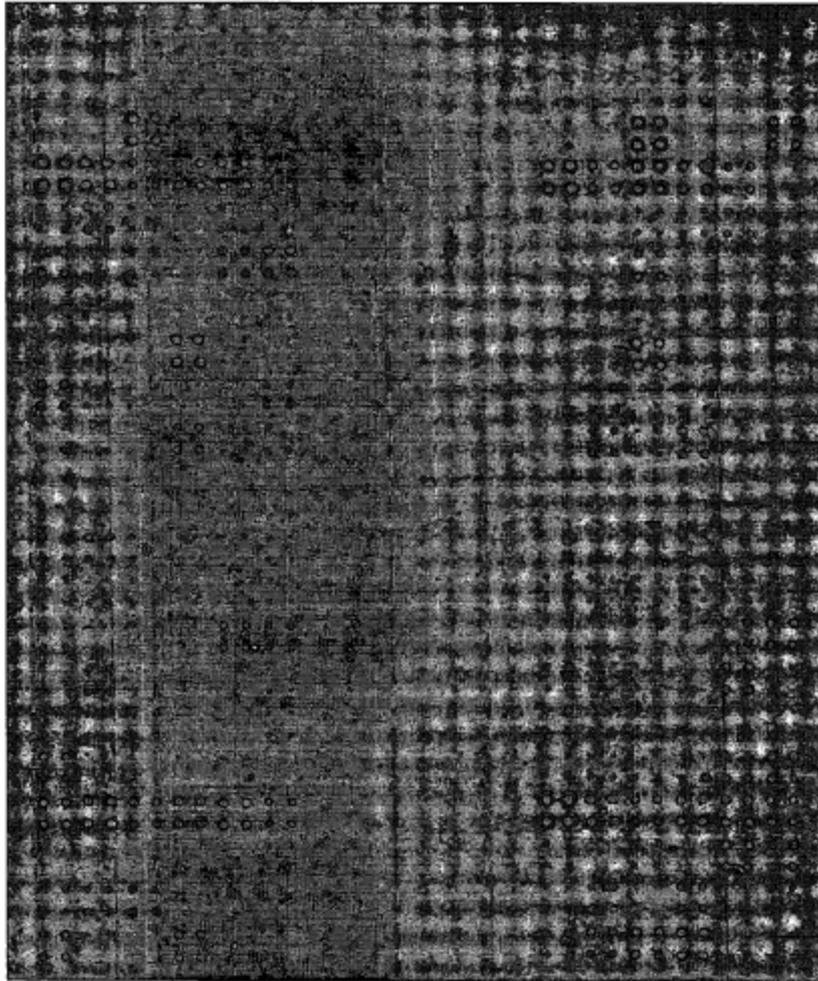


FIG. 3

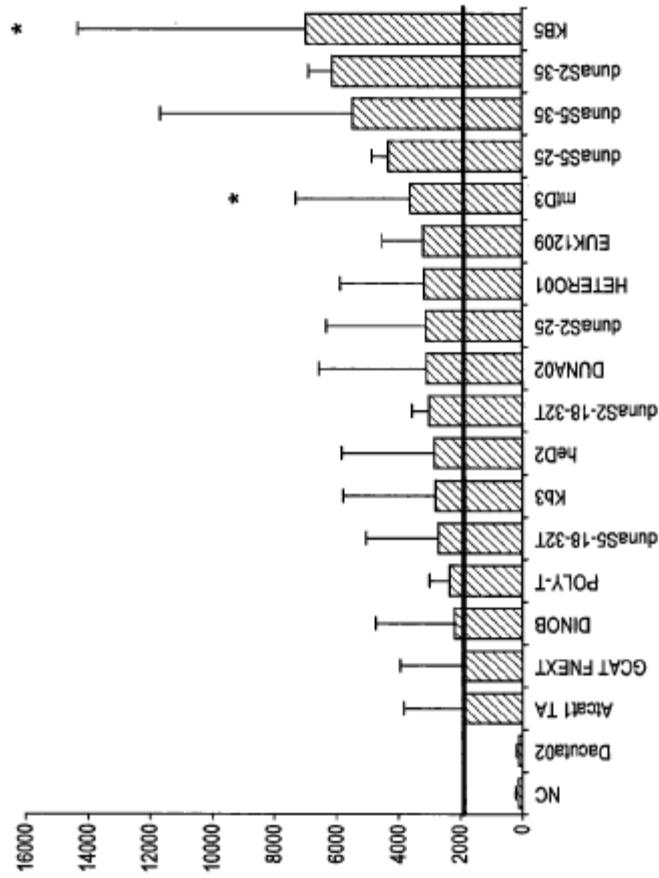


FIG. 4

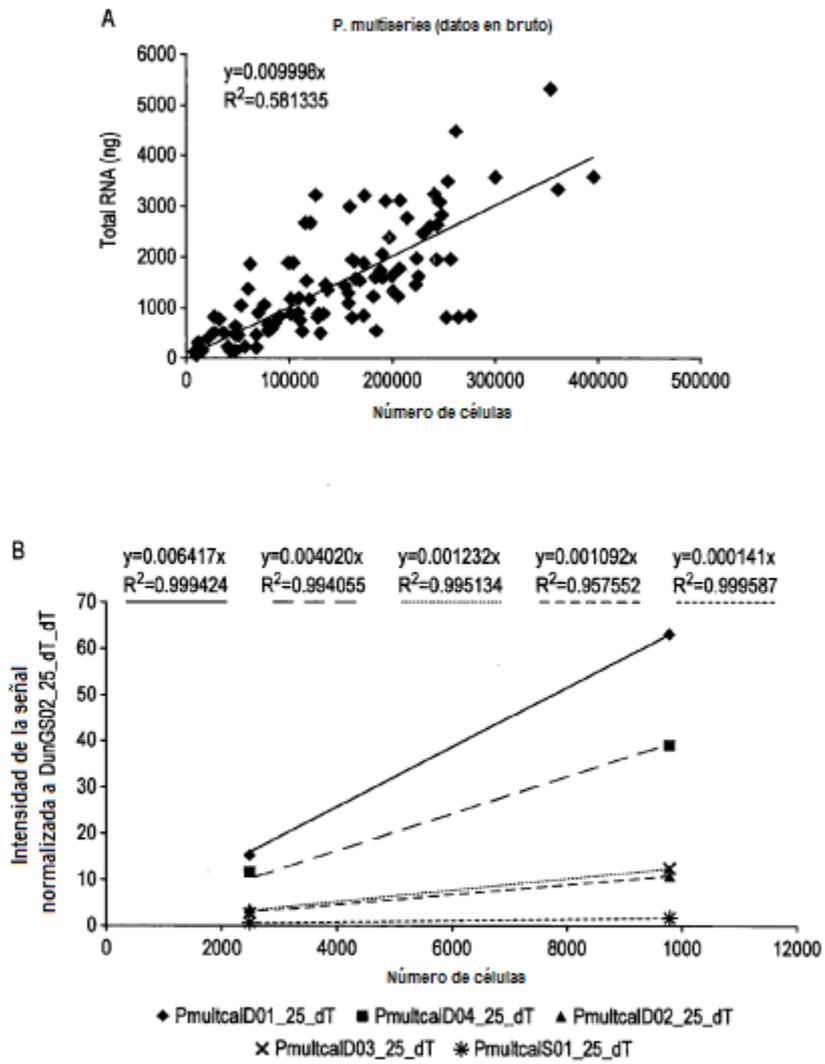


FIG. 5

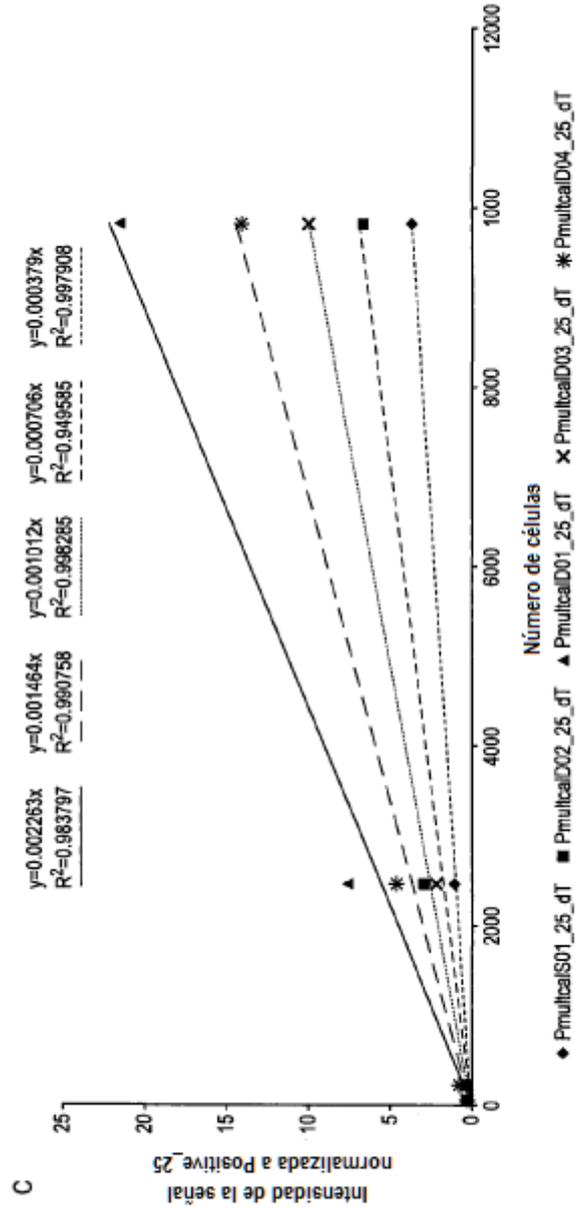


FIG. 5 Cont.

| 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.