

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA DEL ADN AMBIENTAL DE *ALEXANDRIUM*
CATENELLA EN EL LITORAL CENTRO SUR Y AUSTRAL DE CHILE**

CAMILA FERNANDA RODRÍGUEZ ARRIAGADA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

SEPTIEMBRE, 2019



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA DEL ADN AMBIENTAL DE *ALEXANDRIUM*
CATENELLA EN EL LITORAL CENTRO SUR Y AUSTRAL DE CHILE**

Por

CAMILA FERNANDA RODRÍGUEZ ARRIAGADA

Profesor guía

Dr. Rodrigo González Saldía

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

SEPTIEMBRE, 2019

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en la Unidad de Biotecnología Marina,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dr. Rodrigo González Saldía
Departamento de Oceanografía
Copas Sur-Austral
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Evaluadores externos:

Christian Muñoz Saldías
Comercial Itahua
Brasil 905
Concepción

Dr. Marcelo Gutiérrez Astete
Departamento de Oceanografía
Copas Sur-Austral
Universidad de Concepción, Concepción

A Dios y a mis padres Susana y Adrián, por su inconmensurable amor, apoyo, Fe y paciencia, al acompañarme en esta travesía universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Me es indispensable agradecer desde lo más sincero de mí ser a todas aquellas personas que me han apoyado, incentivándome y creyendo en mis capacidades. En primera instancia, soy una infinita agradecida de Dios, de mis padres Susana y Adrián, a mi hermana Javiera y a mi familia, quienes siempre me brindaron su inmenso amor, apoyo y sabiduría durante estos años universitarios, animándome a siempre continuar. Siendo mis sustentos fundamentales en los momentos de angustias, mostrando su amor, ayudándome a levantarme cuando las fuerzas se desgastaban. A mis padres por su inagotable paciencia y llenarme de energía para continuar mi camino sin rendirme.

También quiero agradecer a mi profesor tutor, Dr. Rodrigo González por su paciencia, consejos y consideración al momento de desarrollar el presente seminario. Por su disposición al otorgarme el laboratorio y todo lo que incluye para realizar la tesis.

Agradecer a Constanza, Elizabeth, Gabriel, Héctor, Esteban y Luis por su amistad, por su apoyo, por ser compañeros, por disfrutar juntos estos años académicos, las muecas en clases, las risas, las conversaciones profundas y la no tantas, las noches de estudio, las comilonas, las caminatas infinitas a los cubos o al centro de Biotecnología, por los momentos tomando sol en los pastos atrás de la facultad. Gracias por haber hecho mi estadía en la universidad más amena.

Darles las gracias a mis amigos Valentina, Nicolás, Carla, Clarina, Samuel, Gabriela, Judith, Patricia, Juan Daniel y Eyla por su apoyo, por escucharme, por levantarme el ánimo, por darme palabra de aliento, por creer en mí, por aconsejarme y acompañarme durante todo este proceso de tesis.

Agradecida de las personas que conocí y con quienes compartí en la universidad todos estos años, por las conversaciones alegres en el frente de la facultad, por la buena onda a pesar que algunos eran de otras carreras. Agradecida de poder crear lazos con personas de distintas generaciones de la carrera.

Finalmente, agradecer al Proyecto CONYCIT AUB 180003, COPAS Sur-Austral CONICYT PIA PFB31 y APOYO CTE AFB170006, Universidad de Concepción. Proyecto VRID 218.112.110-1.0 Universidad de Concepción, por financiar la presente tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1.1.- FLORACIONES ALGALES NOCIVAS (FANs)	14
1.2.- DINOFLAGELADOS	15
1.3.- GÉNERO <i>ALEXANDRIUM</i>	15
1.4.- <i>ALEXANDRIUM CATENELLA</i>	17
1.5.- ÁREA DE ESTUDIO	20
1.6.- TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ADN AMBIENTAL (eDNA)	22
HIPÓTESIS	24
HIPÓTESIS GENERAL	24
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1.- TOMA DE MUESTRAS	25
2.2.- EXTRACCIÓN DE ADN	27
2.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28

2.4.-	DISEÑO DE PARTIDORES	28
2.5	PCR CONVENCIONAL Y ELECTROFORESIS EN GEL	28
	RESULTADOS	29
3.1.-	ANÁLISIS NANODROP	29
3.2.-	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
3.3.-	PCR Y ELECTROFORESIS EN GEL	31
	DISCUSIÓN	43
	CONCLUSIONES	49
	LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N°1.- Esquema simplificado del ciclo de vida de las microalgas del género <i>Alexandrium</i> . Se describen los tipos de reproducción, la asexual inicia desde el quiste pasando a los pasos 2 y 3, luego inicia su reproducción sexual de las células vegetativas obteniendo gametos que pasan a cigoto los cuales forman quistes. (Modificado de Lembeye, 2004).	17
Figura N°2.- Mapa de distribución por las costas de Chile a través de los años de <i>Alexandrium catenella</i> .	18
Figura N°3.- Disposición del ADNr eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem. NTS: espaciador no transcribible, ETS: espaciador transcribible externo, ITS: espaciador transcribible interno (modificado de Hillis & Dixon, 1991).	23
Figura N°4.- Mapa de Chile Sur Austral con sus respectivas latitudes. Lugar donde se realizaron los muestreos de los ejemplares. Los puntos rojos indican las estaciones de muestreo externo, los puntos celestes indican las estaciones de muestreo interno, los puntos de azul oscuro indican las estaciones de muestreo del canal Moraleda y por último los puntos verdes indican las estaciones de muestreo de Golfo de Penas.	25
Figura N°5.- Mapa Bahía de Concepción, Región del Bio Bio. En los puntos amarillos se indican las zonas de muestreo de los ejemplares PV donde se obtuvieron muestras a distintas profundidades.	26
Figura N°6.- Mapa Bahía de Coronel, Región del Bio Bio. En los puntos se indican las zonas de muestreos de los ejemplares C donde se obtuvieron muestras a distintas profundidades.	26

Figura N°7.- Gráfico del promedio de las concentraciones de ADN medidas vs áreas de muestreos (*Diferencia significativa, ANOVA $p < 0,05$). 30

Figura N°8.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **C5** 29-1-19, **C7** 29-1-19, **C9** 29-1-19, **TP-1** 25 m 1-11-18, **TP-5** 21 m 1-11-18, **TP-10** 12 m 13-11-18, **TP-23** 12 m 5-11-18, **PV-E2** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 20 m 3-10-18, **PV-E4** 0 m 3-10-18, **PV-E5** 0 m 3-10-18, **PV-E5** 10 m 3-10-18, **PV-E5** 20 m 3-1-18, **PV-E6** 0 m 3-10-18, **PV-E6** 20 m 3-10-18, **Desembocadura Manco**, C- y C+. 31

Figura N°9.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-2** 50 m 1-11-18, **TP-9** 900 m 2-11-18, **TP-9R** 25 m 13-11-18, **TP-4** 12 m 12-11-18, **TP-3** 50 m 1-11-18, **TP-10** 25 m 2-11-18, **TP-10** 2 m 2-11-18, **TP-5** 2 m 1-11-18, **TP-9** 25 m 2-11-18, **TP-9R** 12 m 13-11-18, **TP-17** 900 m 12-11-18, **TP-11** 10 m 2-11-18, **TP-7** 2 m 2-11-18, **TP-14** 50 m 12-11-18, **TP-25** 25 m 6-11-18, **TP-9** 50 m 1-11-18, **TP-10** 50 m 2-11-18, C- y C+. 32

Figura N°10.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-3** 2 m 1-11-18, **TP-3** 25,4 m 8-11-18, **TP-11R** 25 m 13-11-18, **TP-14** 50 m 3-11-18, **TP-14** 25 m 12-11-18, **TP-35** 25 m 3-11-18, **TP-11** 2 m 2-11-18, **TP-23** 25 m 5-11-18, **TP-31** 25 m 8-11-18, **PV-E4** 10 m 3-10-18, **PV-E6** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 0 m 3-10-18, **PV-E1** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 10 m 3-10-18, **PV-E1** 0 m 3-10-18, **PV-E6** 0 m 3-10-18, C- y C+. 33

Figura N°11.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* 34
en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-7** 25 m
2-11-18, **TP-9R** 50 m 13-11-18, **TP-10** 25 m 13-11-18, **TP-10** 50 m 12-11-
18, **TP-17** 500 m 12-11-18, **TP-21** 2 m 5-11-18, **TP-21** 5 m 5-11-18, **TP-21**
25 m 5-1-18, **TP-23** 2 m 5-11-18, **TP-23** 50 m 5-11-18, **TP-25** 2 m 6-11-18,
TP-31 900 m 8-11-18, **TP-35** 50 m 3-11-18, **TP-36** 2 m 3-11-18, **TP-36** 12 m
3-11-18, **TP-36** 25 m 3-11-18, C- y C+.

Figura N°12.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* 35
en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **PV-E1** 0
m 8-1-19, **PV-E1** 10 m 8-1-19, **PV-E2** 0 m 8-1-19, **PV-E2** 10 m 8-1-19, **PV-
E3** 0 m 8-1-19, **PV-E3** 10 m 8-1-19, **PV-E4** 0 m 8-1-19, **PV-E4** 10 m 8-1-19,
PV-E5 0 m 8-1-19, **PV-E5** 10 m 8-1-19, **PV-E5** 20 m 8-1-19, **PV-E6** 0 m 8-
1-19, **PV-E6** 10 m 8-1-19, **PV-E6** 20 m 8-1-19, **PV-E13** 2 m 8-1-19, **TP-37**
50 m 4-11-18, C- y C+.

Figura N°13.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* 36
en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **C9*** 29-1-
19, **TP-5** 25 m 1-1-18, **TP-9** 2m 2-11-18, **TP-10** 13 m 21-11-18, **TP-13** 50 m
12-11-18, **TP-19** 2 m 4-11-18, **TP-19** 25 m 4-11-18, **TP-19** 50 m 4-11-18,
TP-1 20 m 1-11-18, **TP-25** 50 m 6-11-18, **TP-26** 12 m 6-11-18, **TP-27** 2 m 6-
11-18, **TP-27** 23 m 6-11-18, **TP-29** 12 m 6-11-18, **TP-38** 9 m 8-11-18, **PV-60**
9-1-19, C- y C+.

Figura N°14.- Gráfico que muestra la curva de crecimiento de *Alexandrium* 45
catenella a través del tiempo.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N°1.- Promedio de las concentraciones medidas de cada muestra ordenadas por zonas.	29
Tabla N°2.- Número de muestras y sus correspondientes porcentajes ordenados por área de muestreo.	37
Tabla N°3.- Número de muestras positivas por zonas y sus correspondientes porcentajes ordenados por áreas de estudio.	38
Tabla N°3.- Muestras de Coronel ordenadas por profundidades.	38
Tabla N°4.- Muestras de Bahía Concepción ordenadas por profundidades.	39
Tabla N°5.- Muestras de Taitao Penas en la zona externa, ordenadas por profundidades.	39
Tabla N°6.- Muestras de Taitao Penas en la zona interna, ordenadas por profundidades.	40
Tabla N°7.- Muestras de Canal Moraleda ordenadas por profundidades.	41
Tabla N°8.- Muestras del Golfo de Penas ordenadas por profundidades.	42

RESUMEN

Las floraciones algales nocivas generan impactos negativos en la pesca y en la salud pública, entre otros. En Chile se ha observado una expansión de *Alexandrium catenella*, un dinoflagelado causante de este tipo de floraciones, desde la zona sur-austral hacia el norte en los últimos 46 años. El ADN ambiental (eDNA), es una técnica alternativa para detectar la presencia de especies de interés para el funcionamiento del ecosistema, como es el caso de *Alexandrium catenella*, el que es normalmente detectado por microscopía óptica.

En el presente trabajo se analizó un total de 202 muestras de ADN ambiental obtenido desde la columna de agua del litoral chileno, desde el 2018 al 2019. El área de estudio cubre la plataforma continental desde Golfo de Penas hasta Chiloé (expedición Taitao) en la región sur-austral de Chile, y Bahía Coronel y Concepción (Proyecto VRID UdeC) en la zona centro sur. En el 25% de las muestras fue posible obtener una amplificación positiva por PCR convencional para *A. catenella*. Del total de las muestras positivas, el 66% corresponde a la zona sur-austral (abarcando toda la expedición Taitao), el 2% a Bahía Coronel, y el 31% a Bahía de Concepción. Se debe destacar que el mayor porcentaje de muestras positivas obtenidas en la zona sur-austral corresponden a la zona afótica de la columna de agua (19,6%), correspondientes a las estaciones más oceánicas de las muestras. También se debe destacar la presencia molecular de este dinoflagelado en la costa de la región del Bio Bio, donde no se han reportado este tipo de floraciones.

La presencia de *A. catenella* ha sido reportada en la zona sur-austral desde 1972, no obstante la gran mayoría de los reportes corresponde a la zona de fiordos y canales, siendo esta la primera vez en reportar la presencia de su ADN a una profundidad de 900 m. Se discute el efecto de la salinidad y el aporte de agua dulce de los fiordos a la plataforma continental con respecto a este hallazgo. Por su parte, la presencia molecular de este organismo en la Región del Bio Bio, sugiere un proceso de expansión biogeográfica de este dinoflagelado, consistente con reportes anteriores. En todos estos casos, la presencia molecular de *A. catenella* en la costa del Bio Bio presenta un riesgo potencial para las de áreas de manejo existentes y la salud pública, entre otros.

ABSTRACT

Harmful algal blooms have a negative impact on public health and fisheries, among others. An increase of *Alexandrium catenella*, a dinoflagellatus that causes this type of flora, has been observed in Chile in the past 46 years, from the south-austral area to the north. Environmental DNA (eDNA) is an alternative technique to detect the presence of species of interest for the functioning of the ecosystem, as is the case of *Alexandrium catenella*, which is normally detected through optical microscopy.

In the present work, a total of 202 samples of environmental DNA obtained from the water column of the Chilean coast, from 2018 to 2019, were analyzed. The study area covers the continental shelf from Golfo de Penas to Chiloé (Taitao expedition) in the south-austral region of Chile, and Bahía Coronel and Concepción (VRID UdeC Project) in the south-central area. In 25% of the samples it was possible to obtain a positive amplification by conventional PCR for *A. catenella*. Of the total positive samples, 66% corresponded to the south-austral zone (covering the entire Taitao expedition), 2% to Bahía Coronel, and 31% to Bahía de Concepción. It should be noted that the highest percentage of positive samples obtained in the south-austral zone corresponds to the aphotic zone of the water column (19.6%), corresponding to the most oceanic locations of the samples. The molecular presence of this dinoflagellate on the coast of the Bio Bio region, where this type of bloom has not been reported, should also be highlighted.

The presence of *A. catenella* has been reported in the south-austral zone since 1972; however, most of the reports correspond to the zone of fjords and channels, this being the first time the presence of its DNA is reported at a depth of 900 m. The effect of the salinity and freshwater contribution of the fjords to the continental shelf is discussed regarding this finding. On the other hand, the molecular presence of this organism in the Bio Bio Region suggests a biogeographic expansion process of this dinoflagellate, which is consistent with previous reports. In all these cases, the molecular presence of *A. catenella* on the Bio Bio coast poses a potential risk to existing management areas and public health, among others.

INTRODUCCIÓN

1.- Floraciones algales nocivas (FANs)

Se emplea el término “floración” para señalar el crecimiento de algas planctónicas microscópicas de los océanos, cuyos colores varían del rojo (como se indica normalmente para la “marea roja”) a tonalidades de amarillo, verde, marrón y azul, ya sea según sus profundidades, concentraciones y tipo de protista. Estos crecimientos expansivos ocurren a veces al variar las condiciones climáticas, las corrientes verticales, las temperaturas, la transparencia y la turbulencia, la salinidad de las aguas, las concentraciones de nutrientes disueltos, los vientos o la iluminación superficial, aunque aún no está aclarado cuales son las condiciones exactas para la floración. Las FANs han aumentado a lo largo de los océanos costeros del mundo durante el último siglo, principalmente debido a la eutrofización del agua y el cambio climático (Mohamed, 2018).

Estas floraciones a menudo van acompañadas de impactos negativos extensos y extremos a la pesca, los recursos costeros, la salud pública y las economías locales. Son causadas por un grupo de distintas especies fitoplanctónicas como los dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias, produciendo compuestos químicos de alta toxicidad en sus metabolismos siendo estos las toxinas marinas (Mohamed, 2018), relacionadas a la muerte de la vida silvestre. La forma más común de envenenamiento para los humanos es a través de la ingestión de mariscos o peces, conteniendo en su interior acumulamiento de toxinas, siendo extremadamente potentes aun en bajas densidades. Muchas de estas son estables a las temperaturas y no son afectadas por la cocción. Dentro de las floraciones se encuentran fitoplancton no tóxico pero causan daño a través del desarrollo de alta biomasa formando espumas o residuos y destruye el hábitat de diversas especies mediante el sombreado de vegetación sumergida (McGowan, 2016).

Según la FAO (2005), durante las dos últimas décadas, ha aumentado la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de algas perjudiciales, así como la de los compuestos tóxicos presentes en la cadena alimentaria marina. Una posible explicación de la creciente tendencia de aparición es el traslado de quistes en reposo de dinoflagelados, especialmente los productores de toxina paralítica de mariscos, o por la migración de

poblaciones de mariscos e incluso por las aguas de lastre de los barcos. Muchos dinoflagelados son especies dañinas de la floración de algas (Fischer *et al.*, 2018).

1.2.- Dinoflagelados

Los dinoflagelados son parte de un grupo de fitoplancton marino distribuido mundialmente, constituyéndose como uno de los grupos más abundantes y diversos de fitoplancton eucariótico en el medio ambiente acuático. Son especies muy complejas con respecto a su diversidad morfológica dividiéndose en dos subgrupos, tecados y atecados. (Prabowo & Agusti, 2019). Se conocen cerca de 50 especies de este grupo que son productores de toxinas, y estas pueden llegar al ser humano a través de las redes tróficas, al igual que se conocen por formar proliferaciones de algas nocivas convirtiéndolo en uno de los contaminantes biológicos más problemáticos y perjudiciales de muchos ecosistemas costeros en el mundo (Delgado *et al.*, 2002; Prabowo & Agusti, 2019). Aunque ocurren naturalmente, su frecuencia ha aumentado en los últimos 30 a 40 años, posiblemente como consecuencia de la escorrentía de nutrientes que vienen de la agricultura (Carty & Parrow, 2015; Van Dolah, 2000). Las toxinas que liberan en el medio ambiente causan varios tipos de enfermedades humanas como envenenamiento por mariscos (bloqueando el canal de sodio por saxitoxina), intoxicación neurotóxica por mariscos (brevotoxina), intoxicación por peces ciguatera (ciguatoxina) y la intoxicación diarreica por marisco (inhibición de la proteína fosfatasa por ácido okadaico) (Carty & Parrow, 2015; Wang, 2008). Estas toxinas son metabolitos secundarios complejos y se desconoce por qué los dinoflagelados sintetizan una amplia variedad de toxinas potentes (Sheng *et al.*, 2010).

El género *Alexandrium* es un fitoplancton marino dinoflagelado muy estudiado en los fiordos chilenos debido a su producción de toxinas responsables de la intoxicación parálitica por mariscos (PSP) y su alta potencia ictiotóxica (Hatfield *et al.*, 2019; Mardones *et al.*, 2016).

1.3.- Género *Alexandrium*

Los dinoflagelados del género *Alexandrium* son la mayor causa de las floraciones algales nocivas (FAN). Los estudios pretenden comprender los parámetros que controlan las floraciones de *Alexandrium* y su toxicidad como los parámetros fisicoquímicos que consideran

la temperatura, el hidrodinamismo, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de compuestos orgánicos o metales que influyen en el crecimiento. En las últimas décadas, han aumentado en frecuencia, gravedad y distribución geográfica de estas FANs (Long *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2008), afectando los ecosistemas marinos y la seguridad de los productos del mar, decolorando el agua dando origen a las mareas rojas, marrones o verdes, flotando en la superficie oceánicas, cubriendo las playas con biomasa o exudados (espuma) y reducir los niveles de oxígeno mediante la respiración o descomposición excesiva dando como consecuencia problemas ecológicos y económicos, contaminación de mariscos y envenenamiento humano (Long *et al.*, 2019; Sellner *et al.*, 2003).

Una característica única de este género es que se producen tres familias diferentes de toxinas conocidas entre las especies dentro de él: saxitoxinas, espirólidos y goniodomias. De estas tres toxinas, la más significativa en términos de impacto son las saxitoxinas, siendo responsables de los brotes de intoxicación paralítica por mariscos, la cual es la más extendida de los síndromes de envenenamiento por mariscos relacionados con los FANs. Los impactos de los brotes de este veneno paralítico incluyen intoxicaciones humanas y muerte por mariscos o peces contaminados, pérdida de recursos de peces silvestres y cultivados, deterioro del turismo y actividades recreativas, alteraciones de la estructura trófica marina y muerte de mamíferos marinos, peces y aves marinas (Anderson *et al.*, 2012).

El género *Alexandrium* incluye 28 especies descritas, de las cuales 11 son conocidas por causar envenenamiento paralítico por mariscos, las otras son especies no tóxicas (Erdner *et al.*, 2010; Satoshi & Shigeru, 2012).

El género *Alexandrium* posee una compleja estrategia de ciclo de vida, alternando entre hábitats plantónicos y bentónicos. Produce quistes de reposo resistentes como parte de su ciclo de vida (fig. 1). Este se reproduce a través de división celular asexualmente. Para inducir a la sexualidad y la formación de gametos, estos dependen de las condiciones de su entorno como la limitación de nutrientes, periodos de calentamiento y flujos de baja corriente. Al fusionarse estos forman planocigotos convirtiéndose en quistes de reposo o de resistencia depositándose en el bentos. Estas etapas de descanso sexual proporcionan dispersión, recombinación genética y supervivencia a condiciones ambientales adversas permitiendo que un inóculo de células comiencen una floración toxica (Mardones *et al.*, 2016).



Fig. 1.- Esquema simplificado del ciclo de vida del dinoflagelado del género *Alexandrium*. Se describen los tipos de reproducción, la asexual inicia desde el quiste pasando a los pasos 2 y 3, luego inicia su reproducción sexual de las células vegetativas obteniendo gametos que pasan a cigoto los cuales forman quistes. (Modificado de Lembeye, 2004).

Las especies tóxicas del género *Alexandrium* están muy difundidas en muchas regiones del mundo. En Chile, los brotes de envenenamiento parálítico por mariscos se atribuyen principalmente a la especie *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), causando envenenamiento de forma recurrente a los humanos y mortalidad de peces (Guzmán *et al.*, 2016).

1.4.- *Alexandrium catenella*

Pertenece a los dinoflagelados estructurados por poseer placas rígidas o tecas en su superficie y dos flagelos dispuestos en surcos. Mide entre 25-38 μm y tiene una morfología irregular, siendo aplanado antero-posteriormente dándole un aspecto más ancho que alto. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 12-15°C (Aguilera *et al.* 2013).

Chile ha sido golpeado repetidamente por FANs de *A. catenella* desde el año 1972 en la Región de Magallanes y actualmente se detecta desde la Región de Aysén a la Isla de Chiloé (Fig. 2). En la región de Aysén fue hallada en 1992 y en la región de Los Lagos en el 2002 (Montes *et al.*, 2018), lo que demuestra un claro avance hacia el norte en su distribución, causando una variedad de impactos negativos que van desde pérdidas económicas hasta muertes humanas.

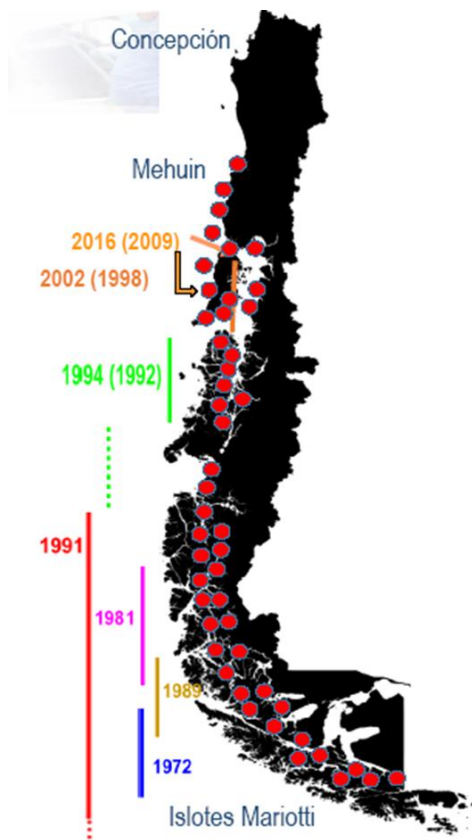


Figura 2.- Mapa de distribución por las costas de Chile a través de los años de *Alexandrium catenella*.

La intensidad y extensión geográfica de los brotes de *A. catenella* en Chile han aumentado en los últimos años. Una de las floraciones más reciente e intensa en términos de abundancia de *A. catenella* ocurrió a fines del verano austral (febrero-marzo de 2009) expandiéndose hacia el norte con una alícuota de 6000 células/mL iniciando en la región de Aysén a fines de marzo, cubriendo una amplia área geográfica hasta el sur de la isla de Chiloé en la región de Los Lagos. Desde entonces ha habido brotes recurrentes de *A. catenella*. Otra de las floraciones excepcionalmente intensas que afectaron la zona costera del sur de Chile fue en el verano austral de 2016. La abundancia de *A. catenella* alcanzó una alícuota de 5000 células/ml. Por primera vez, el brote se extendió a aguas más oceánicas (Guzmán *et al.*, 2016; Mardones *et al.*, 2016; Montes *et al.*, 2018).

Este episodio tóxico causó la mortalidad de los vertebrados, incluidos los leones marinos, las gaviotas y los perros. También se reportaron intoxicaciones humanas (12 personas fueron afectadas), causando dramáticos impactos socioeconómicos para más de mil pescadores en el área afectada debido a la prohibición de la recolección de mariscos en los lechos naturales involucrados (Álvarez *et al.*, 2019).

Se ha analizado como afecta los nutrientes nitrógeno y fósforo en su crecimiento, los cruzamientos y formaciones de quistes en su ciclo de vida (Uribe *et al.*, 2010).

Ante todos los estudios que se han realizado y los resultados que se han obtenido sobre *A. catenella*, se conoció que este dinoflagelado se caracteriza por presentar quistes de resistencia y temporales en su ciclo de vida. Estos cumplen con importantes roles ecológicos, como formar agregaciones dando origen a una nueva floración algal iniciada de la misma agregación, ser constituidos por un mecanismo de dispersión, poder sobrevivir en condiciones ambientales adversas y por último permitir la recombinación genética al momento de su reproducción sexual (Seguel *et al.*, 2010). Los quistes temporales, originarios a partir de una célula vegetativa, ocurren cuando esta se encuentra en condiciones de estrés ambiental (Uribe *et al.*, 2010).

La importancia de los quistes en reposo como inóculo para los brotes de *Alexandrium catenella* ha sido el foco de una considerable investigación global, un estudio reciente realizado en los fiordos del norte de la Patagonia demostró que los quistes en reposo pueden agotarse rápidamente (3 meses) de los sedimentos superficiales incluso después de un evento de floración masiva (Mardones *et al.*, 2016).

Debido a que su distribución y frecuencia ha ido en aumento, ingresa en el Reglamento de Plagas Hidrobiológicas (REPLA) (D.S. MINECON N° 345/2005), declarando como una especie plaga en Chile, que cuenta con varias áreas de estudio donde se realizan muestreos como forma de prevención ante un posible bloom y conocer cómo ha ido avanzando *Alexandrium catenella* por las costas chilenas.

1.5.- Área de estudio

La región de los fiordos chilenos representa un área de transición importante con respecto a las condiciones climáticas, biogeográficas y biológicas desde el área antártica hasta la región

templada del Pacífico. Sus 1600 km de línea costera abarcan un territorio extremadamente grande caracterizado por complicadas condiciones geomorfológicas e hidrográficas. En este contexto, los fiordos de la Patagonia chilena desempeñan un papel clave en la productividad biológica (Betti *et al.*, 2017).

Se han realizado estudios para determinar los factores asociados con el crecimiento y la producción de toxinas de *Alexandrium catenella* para comprender mejor los mecanismos que controlan las floraciones de algas nocivas en los ecosistemas marinos y estuarinos del sur de Chile. Estos estudios han demostrado que el crecimiento de las cepas de *A. catenella* está relacionado con los cambios en la temperatura del agua, el fotoperíodo, las concentraciones de nutrientes y la salinidad (Montes *et al.*, 2018).

Como su distribución ha ido expandiéndose hacia el norte, se realizó un estudio donde se analizaron 166 muestras de agua de la Región del Bio Bio durante los años 2014-2015, en distintas estaciones costeras y *Alexandrium catenella* fue detectada y cuantificada en el 12% de las muestras, las cuales presentaron una similitud genética entre un 99 y 100% de identidad con los genotipos descritos para las Regiones de Los Lagos y de Aysén. Esto sugiere que el origen de *Alexandrium catenella* en la región del Bio Bio podría ser producto de la expansión de la población presente en la zona sur-austral de Chile (Muñoz *et al.*, 2016).

La Bahía de Concepción, Chile es un embalse poco profundo semicerrado (176.4 km²). La bahía está rodeada por una de las zonas más industrializadas y urbanizadas de Chile, recibiendo directa o indirectamente, descargas de residuos domésticos e industriales. Se ha establecido que el enriquecimiento de la bahía se debe al aumento del suministro de nutrientes de las aguas agitadas y de las descargas de aguas residuales (Cárcamo *et al.*, 2017; Seguel *et al.*, 2001).

Los sedimentos de la Bahía de Concepción son lodos blandos, negros, reductores, ricos en materia orgánica y las condiciones anóxicas prevalecen en la interfaz sedimento-agua durante la mayor parte del año. Las aguas residuales domésticas de varios desagües pequeños, se han descargado en diferentes lugares de la Bahía de Concepción, enriqueciendo el sustrato de este lugar (Cárcamo *et al.*, 2017; Seguel *et al.*, 2001).

El golfo de Arauco, donde se ubica la Bahía de Coronel, se encuentra sobre el área más grande de la plataforma continental frente al centro-sur de Chile. La entrada de agua del subsuelo ecuatorial al interior de este golfo debido a la corriente ascendente produce aumentos estacionales en la biomasa de fitoplancton y la productividad primaria, principalmente durante los meses de primavera y verano (Cárcamo *et al.*, 2017).

Las características que comparten la región austral con Bahía de Concepción y Bahía de Coronel, es que las tres zonas cuentan con características aptas para que crezcan y vivan distintas especies, como los dinoflagelados. Independiente que no sean las mismas especies las que estén en estas tres zonas, es posible que una especie ubicada en la Región Sur-Austral sea encontrada en la Región del Bio Bio. Esta acción puede ser realizada a causa del agua de lastre.

El agua de lastre, según Baro-Narbona & Stotz (2018) es esencial para la operación segura y eficaz de los buques, y a la vez un factor de riesgo para la bioseguridad marina. Esta es agua de mar que un buque carga en la costa cuando se encuentra sin o con poca carga para una navegación segura. El agua de lastre se define como el agua, con las materias en suspensión que contenga, cargada a bordo de un buque para controlar el asiento, la escora, el calado, la estabilidad y los esfuerzos de este. No obstante, actúa también como un vector para el traslado accidental de especies entre zonas. Un sólo metro cúbico de agua de lastre puede contener hasta 10 millones de células de fitoplancton.

Para evitar que esto suceda, los navegadores de buques deben cumplir con ciertas normas: La norma D-1 que exige a los buques que lleven a cabo el intercambio del agua de lastre de manera que como mínimo el 95% del volumen se intercambie lejos de la costa (cambio del agua de lastre por lo menos a 200 millas náuticas de la tierra más próxima y en aguas de 200 m de profundidad), donde se liberaría finalmente, y la norma D-2 prescribe que la gestión del agua de lastre restrinja a un máximo especificado la cantidad de organismos viables permitidos que se van a descargar, así como limite la descarga de determinados microbios indicadores perjudiciales para la salud humana. Sin embargo, no hay formas de comprobar que efectivamente estas normas se cumplan, por ello esto provoca traslado de especies invasoras, como son en este caso *Alexandrium catenella* (Directemar – Agua de lastre).

El creciente número de floraciones reportadas hoy es el resultado de un esfuerzo mundial para implementar nuevas técnicas para detectar y prevenir sus efectos negativos (Jedlicki *et al.*, 2012).

Las especies de *Alexandrium* se describieron en base a observaciones microscópicas según sus características morfológicas, incluidos patrones de placas, tamaño y forma de células, y características secundarias como la formación de cadenas. Sin embargo, estos rasgos morfológicos no son suficientes para identificar especies, lo que genera confusión sobre la distribución, la ecología y la toxicidad dentro de este género. Cuando las características morfológicas son cuestionables para la identificación taxonómica, deben combinarse con datos moleculares para una definición precisa de la especie (Jedlicki *et al.*, 2012).

La asignación específica de la especie permite la implementación de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para un monitoreo preciso a lo largo de las costas chilenas con el fin de prevenir riesgos para la salud pública y pérdidas económicas (Jedlicki *et al.*, 2012).

1.6.- Técnicas moleculares para la detección de ADN ambiental (eDNA)

La detección de ADN ambiental o environmental DNA (eDNA), es una nueva y poderosa herramienta molecular que está siendo utilizada para la detección de especies ecológicamente importantes, ya sea por ser especies invasoras (Herder *et al.*, 2014) o bien para la detección de stock pesqueros (Thomsen *et al.*, 2016).

Para realizar la determinación de *Alexandrium catenella* mediante su ADN ambiental, una opción es el uso de técnicas moleculares que incluyan la amplificación y la posterior análisis de sus secuencias nucleotídicas como las secuencias de ADN ribosomal (ADNr). Para ello se utilizan diferentes marcadores moleculares (Guillou *et al.*, 2002; Jedlicki *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares han demostrado ser muy útiles para evaluar la dispersión biogeográfica de estos organismos. Cuando se conoce mejor la diversidad genética, las herramientas moleculares también pueden ayudar a detectar la distribución espacial de un organismo, tanto en el agua de mar como en el sedimento. Debido a su rapidez, los métodos basados en PCR se utilizan cada vez más. Se han empleado con éxito para detectar varios dinoflagelados tóxicos en muestras ambientales. En algunos estudios las filogenias de especies

del género *Alexandrium* han establecido sobre la base de secuencias genómicas de la subunidad mayor (LSU) y la subunidad menor (SSU) del ADNr (Guillou *et al.*, 2002; Jedlicki *et al.*, 2012).

Los genes ribosómicos incluyen tres secuencias codificantes, 18S (SSU), 5.8S y 28S (LSU), separadas por dos espaciadores transcritos internos no codificados, ITS-1 e ITS-2. Las comparaciones en los niveles inter o intraespecies requieren regiones altamente variables, como las proporcionadas por los dominios hipervariables D1-D2 del gen 28S o los espaciadores ribosómicos ITS (Touzet *et al.*, 2008; Jedlicki *et al.*, 2012) (fig. 2).

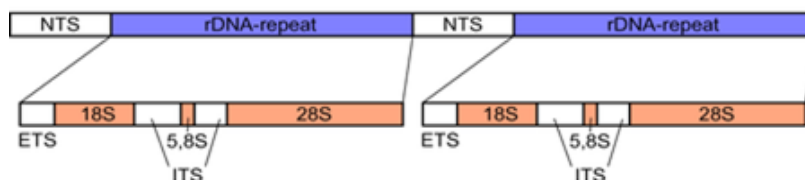


Figura 3.- Disposición del ADNr eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem. NTS: espaciador no transcribible, ETS: espaciador transcribible externo, ITS: espaciador transcribible interno (modificado de Hillis & Dixon, 1991).

Los ITS son marcadores moleculares sensibles, convirtiéndolos en una región de alta diversidad entre y dentro de las especies. Se ha encontrado que la secuencia de ITS-2 junto con la estructura secundaria del ADN es útil para la asignación taxonómica en varios niveles, existiendo cierta presión selectiva que conserva la secuencia de las regiones génicas de ARNr de ITS-1, 5.8S e ITS-2 (Andree *et al.*, 2011)

Gracias a eso, es más factible el poder identificar la presencia o ausencia de una especie mediante su ADN.

En el presente trabajo se estudiará la distribución biogeográfica que ha adquirido *Alexandrium catenella* con muestras ambientales obtenidas en la región de Sur-Austral (Taitao Penas) y región del Bio Bio (Bahía de Concepción y Coronel) en distintas fechas y a distintas profundidades, con ayuda de técnicas moleculares para conocer si está presente o ausente dentro de estas localidades estudiadas.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

Existe un proceso de expansión biogeográfica de *Alexandrium catenella* en el litoral centro sur y austral de Chile.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar la distribución biogeográfica del ADN ambiental de *Alexandrium catenella* en el litoral centro sur y austral de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de ADN extraíble desde muestras ambientales obtenidas desde la columna de agua del ecosistema marino centro sur y sur austral de Chile.
2. Determinar la presencia de *Alexandrium catenella* mediante PCR convencional en las muestras extraídas.
3. Determinar la distribución biogeográfica del ADN ambiental de *Alexandrium catenella* en distintos estratos de la columna de agua del ecosistema marino centro sur y sur austral de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Toma de muestras

Las muestras de agua fueron tomadas con una botella Niskin en tres zonas de la costa de Chile, comprendiendo el sur austral Taitao Penas y la región del Bío Bío Coronel y Bahía de Concepción. Estas corresponden a distintas profundidades y distintas fechas abarcando las estaciones primavera, verano y otoño en los años 2018 y 2019.

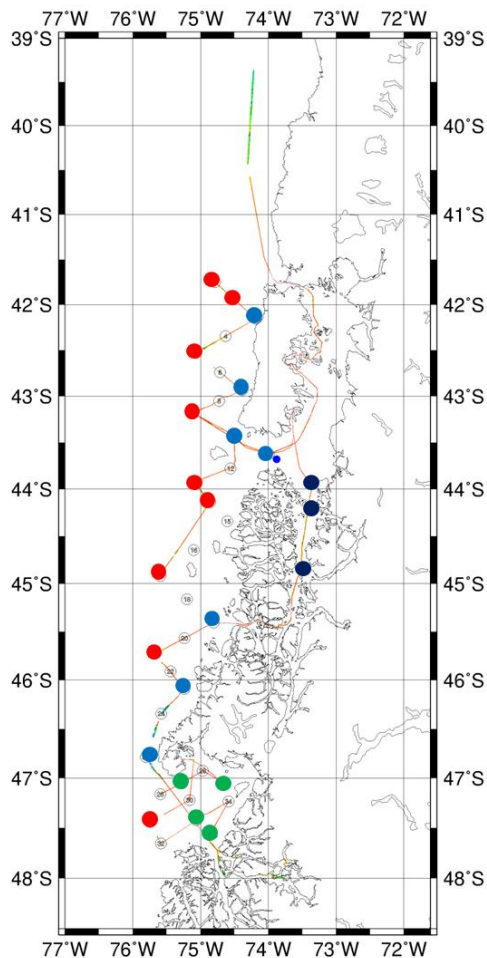


Figura 4.- Mapa de Chile Sur Austral con sus respectivas latitudes.

Lugar donde se realizaron los muestreos de los ejemplares TP. Los puntos rojos indican las estaciones de muestreo en la zona externa de la región, los puntos celestes indican las estaciones de muestreo en la zona interna de la región, los puntos de azul oscuro indican las estaciones de muestreo del canal Moraleda y por último los puntos verdes indican las estaciones de muestreo de Golfo de Penas.



Figura 5.- Mapa Bahía de Concepción, Región del Bio Bio.

En los puntos amarillos se indican las zonas de muestreo de los ejemplares PV donde se obtuvieron muestras a distintas profundidades.



Figura 6.- Mapa Bahía de Coronel, Región del Bio Bio.

En los puntos se indican las zonas de muestreos de los ejemplares C donde se obtuvieron muestras a distintas profundidades.

Las muestras se filtraron mediante sistema de filtración al vacío utilizando filtros para ADN Millipore Express de 0,22 μm de polietersulfona y fueron guardados dentro de tubos para proceder a la extracción de ADN. Fueron un total de 202 muestras etiquetadas como TP (Taitao Penas), PV (Bahía de Concepción) y C (Coronel).

2.2.- Extracción de ADN

Se tomaron los filtros y se cortaron dividiéndolo en dos tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregó 490 μL mezcla de reacción (500 μL buffer de extracción (Tris 20 mM, EDTA 50 mM), 100 μL SDS 10% y 380 μL agua PCR) y trituraró con ayuda del ultraturrax los filtros. Se agregó 20 μL de proteinasa K, se agitó en vortex y llevó a baño maría por 10 minutos a 50°C para después ser llevado a -20°C por 20 minutos. Se repitió ambas incubaciones tres veces.

Se agregó 500 μL de mezcla con solventes orgánicos cloroformo:fenol:ácido isoamilalcohol (25:25:1), se homogenizó en vortex y centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa y se depositó en un tubo falcon de 15 mL. Al tubo eppendorf se le agregó 500 μL de agua PCR y se volvió a centrifugar a 1400 rpm por 5 minutos. Se extrajo nuevamente la fase acuosa y se depositó en el tubo falcon anterior.

Se agregó 200 μL de NaCl 3M al tubo falcon y homogenizó suavemente, agregando luego 5 ml de etanol 95% a -20°C y se dejó incubando durante la noche a -20°C.

Se centrifugó las muestras durante 30 minutos a 5000 rpm y se extrajo el sobrenadante. El pellet dentro del tubo se lavó con 5 ml de etanol al 70% y se incubó a -20°C por dos horas. Se volvió a centrifugar por 30 minutos y lavar con 5 ml de etanol al 70% e incubar a -20°C por dos horas.

Se descartó el sobrenadante, se eliminó completamente el etanol y se resuspendió el pellet en 50 μL de agua PCR.

Las muestras fueron medidas en el equipo Nanodrop 2000 para comprobar su pureza y concentración, mediante la relación de absorbancia 260/280, considerando a 1.6 – 2.0 como rango aceptable de la cuantificación realizada y tomando que a 260 nm es la absorbancia en la cual el ADN absorbe a esa longitud de onda dividido por 280 nm siendo la absorbancia que absorben las proteínas. Si da un valor menor a 1.6, la contaminación del ADN es por compuestos aromáticos, y si es mayor que 2.1 es contaminación con ARN.

La otra relación que se mide es 260/230 siendo que a 230 nm es la absorbancia que absorben fenoles, algunas sales y carbohidratos que existan con un valor aceptable de <1.5. Si el valor es menor a 1.5, entonces está contaminado por azúcares, sales y/o fenoles, sin embargo si esto llega a ser superior llegando a valores 2.3 o 2.5 es porque se obtuvo una alta concentración de ADN y no indicaría contaminación

2.3.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través del software Excel 2013 y SPSS* 22. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las distintas áreas de muestreo y ver si hay diferencias significativas. Se realizó test de Tukey para saber cuáles son las áreas que tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.4.- Diseño de partidores

Se ocuparon partidores previamente diseñados para *Alexandrium catenella* (Cruzat *et al.* 2018) Alex-F (5'-CACTAACCTGCTAATGATATTGTGG-3') para forward y para reverse Alex-R (5'-AGTCTTCAGCTTGTCTCAGTTGT-3').

2.5.- PCR convencional y electroforesis en gel

Las muestras obtenidas anteriormente se analizaron mediante reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) con una mezcla de 5 μ L de Buffer GoTaq Flexi 1X, 3 μ L de $MgCl_2$ 3 mM, 0,4 μ L de dNTPs 0,4 mM, 0,25 μ L enzima Taq Polimerasa 1,25 U, 1 μ L partidore reverse y partidore forward 0,4 μ M, agua PCR 13,35 μ L y 1 μ L del ADN extraído anteriormente. El programa que se utilizó en el PCR es una pre-denaturación a 95°C por 5 minutos, 5 ciclos conformados por pre-denaturación a 95°C por 30 segundos, pre-alineamiento a 50°C por 30 segundos y pre-extensión a 72°C por 30 segundos; y 30 ciclos conformados por denaturación a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos; por último una extensión final a 72°C por 7 minutos para dejarlo a 4°C indefinidamente. Todas las reacciones fueron realizadas mediante el equipo termociclador T-personal Biometra®. Los productos pcr obtenidos fueron analizados mediante electroforesis por 45 minutos a 100 volt con gel de agarosa al 1,2% con tinción SafeWiew 3,8 μ L.

RESULTADOS

3.1 Análisis Nanodrop

Cada muestra fue analizada en el equipo Nanodrop 2000 obteniendo la concentración de ADN presente en ng/ μ L.

Tabla N°1.- Promedio de las concentraciones de ADN medidas de cada muestra ordenadas por zonas.

Áreas muestreo	Promedio (ng/uL)	Máximo (ng/uL)	Mínimo (ng/uL)
Coronel	205.2 \pm 346	1465.1	7.8
Bahía de Concepción	257.2 \pm 311.5	1498.7	4.6
Taitao Penas externo	55.7 \pm 68.4	368.8	4.6
Taitao Penas interno	57.5 \pm 117.1	651.7	3
Canal Moraleda	29.9 \pm 14.2	63.9	9.8
Golfo de Penas	29.3 \pm 13.4	56.8	4.8

Para tener una visión global de la concentración de ADN extraíble de las muestras obtenidas (n= 202), se calculó el promedio según la zona que fueron obtenidas.

Gracias a la desviación estándar, se puede ver la dispersión que hay en cada localidad.

Los valores de máximo y mínimo de cada área nos muestran cuáles fueron las concentraciones de ADN más altas y más bajas medidas a través del nanodrop.

El rango para Coronel muestra que tiene una alta dispersión en los datos, al igual que ocurre para Bahía de Concepción. En el caso de las muestras de Taitao Penas externo hasta el Golfo de Penas el rango va disminuyendo mostrando que tienen una baja dispersión los datos.

3.2.- Análisis estadístico

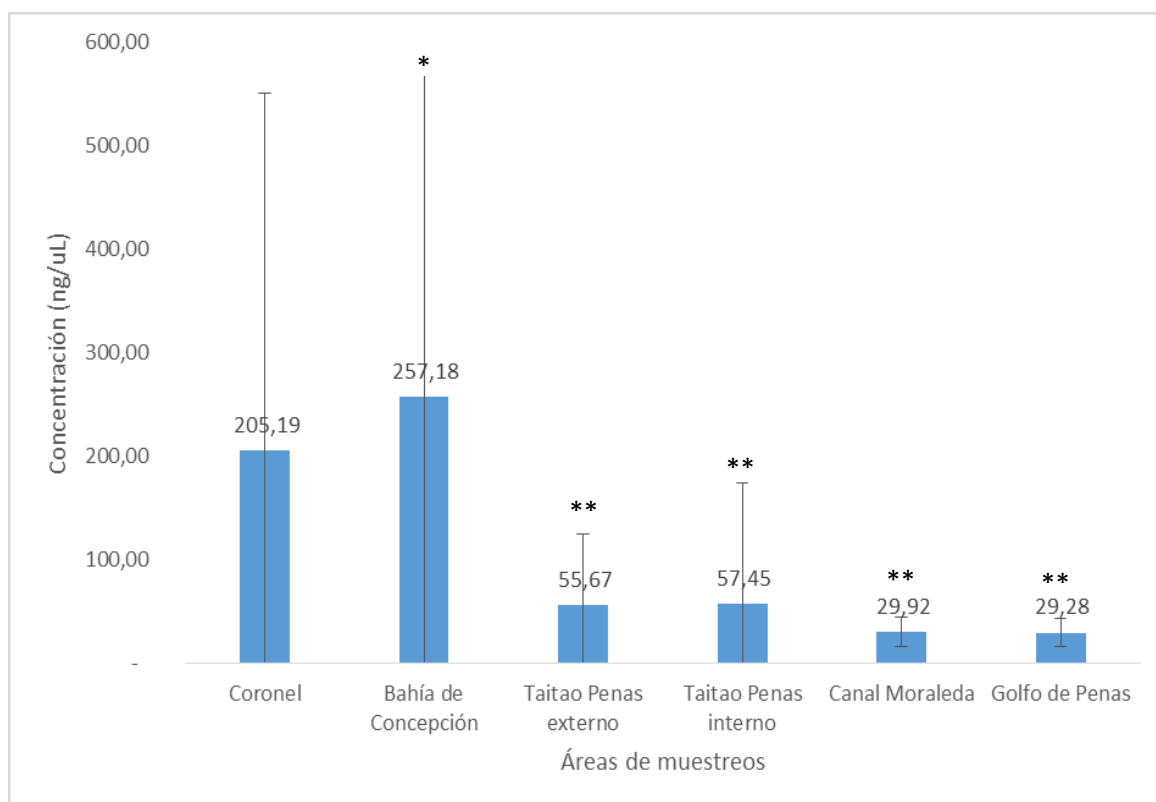


Fig. 7.- Gráfico del promedio de las concentraciones de ADN medidas vs áreas de muestreo (*Diferencia significativa con los que tienen **, ANOVA $p < 0,05$).

Se realizó un test estadístico para conocer las diferencias significativas entre cada promedio de las distintas áreas que se tomaron muestras, obteniendo que Bahía de Concepción tiene diferencias significativas mayor en concentración de ADN ambiental con casi todas las áreas, a excepción de Coronel, con el cual no presenta diferencias significativas.

Las otras áreas (Taitao Penas interno, Taitao Penas externo, Canal Moraleda y Golfo de Penas) no presentaron diferencias significativas, por lo que no difieren entre sí.

3.3 PCR y Electroforesis en gel

Se seleccionaron solo los geles que presentaron resultados positivos. Para las muestras totales obtenidas, se dividirá en dos grupos: zona fótica (0 m – 20 m) y zona afótica (21 m – 900 m)



Fig. 8.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **C5** 29-1-19, **C7** 29-1-19, **C9** 29-1-19, **TP-1** 25 m 1-11-18, **TP-5** 21 m 1-11-18, **TP-10** 12 m 13-11-18, **TP-23** 12 m 5-11-18, **PV-E2** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 20 m 3-10-18, **PV-E4** 0 m 3-10-18, **PV-E5** 0 m 3-10-18, **PV-E5** 10 m 3-10-18, **PV-E5** 20 m 3-1-18, **PV-E6** 0 m 3-10-18, **PV-E6** 20 m 3-10-18, **Desembocadura Manco**, C- y C+.

Se observó una amplificación positiva en once muestras de las dieciséis que se sembraron en total, equivale al 22% del total de muestras positivas. Comparando con la banda que amplificó en el C+, las muestras TP-10 de 12 m, TP-23 de 12 m, PV-E2 (3-10-18) de 10 m, PV-E3 (3-10-18) de 20 m, PV-E4(3-10-18) de 0 m, PV-E5 (3-10-18)de 0 m, PV-E5 (3-10-18) de 10 m, PV-E5 (3-10-18) de 20 m, PV-E6 (3-10-18) de 0 m, PV-E6 (3-10-18) de 20 m y Desembocadura Manco de 0 m, tienen presencia de *Alexandrium catenella*. En el caso de las muestras que no se ven bandas, son comparadas con el C- dando a entender que hay ausencia de *Alexandrium catenella*.

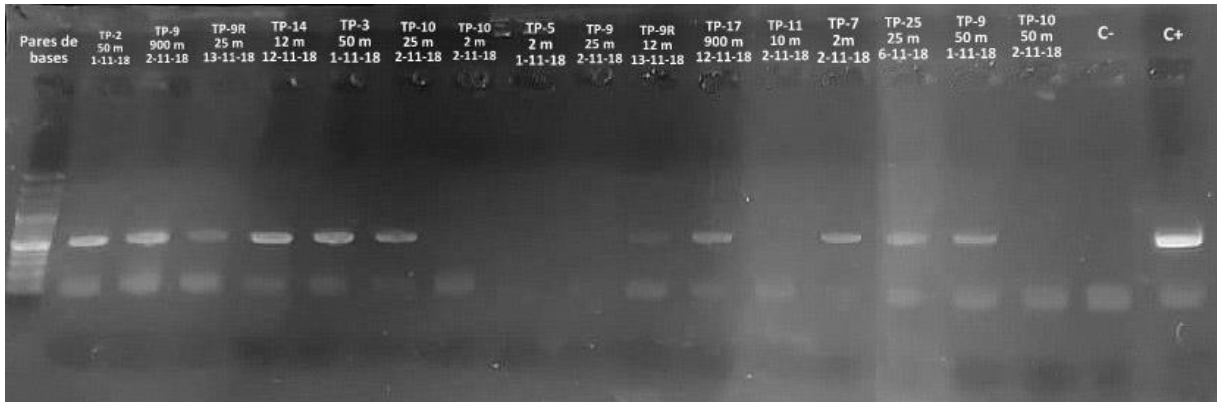


Fig. 9.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-2** 50 m 1-11-18, **TP-9** 900 m 2-11-18, **TP-9R** 25 m 13-11-18, **TP-4** 12 m 12-11-18, **TP-3** 50 m 1-11-18, **TP-10** 25 m 2-11-18, **TP-10** 2 m 2-11-18, **TP-5** 2 m 1-11-18, **TP-9** 25 m 2-11-18, **TP-9R** 12 m 13-11-18, **TP-17** 900 m 12-11-18, **TP-11** 10 m 2-11-18, **TP-7** 2 m 2-11-18, **TP-14** 50 m 12-11-18, **TP-25** 25 m 6-11-18, **TP-9** 50 m 1-11-18, **TP-10** 50 m 2-11-18, C- y C+.

Se observa en la figura que de las diecisiete muestras sembradas, once mostraron bandas, que al ser comparadas con el C+ muestra que hay presencia de *Alexandrium catenella*, siendo estas TP-2 de 50 m, TP-9 de 900 m, TP-4 de 12 m, TP-3 de 50 m, TP-10 de 25 m, TP-9R de 12 m, TP-17 de 900 m, TP-7 de 2 m, TP-25 de 25 m y TP-9 de 50 m. Estas equivalen al 22% de las muestras positivas totales. Las muestras que no se visualizó una banda, son comparadas con el C- tomándose como muestras negativas y por lo tanto, ausencia de *Alexandrium catenella*.

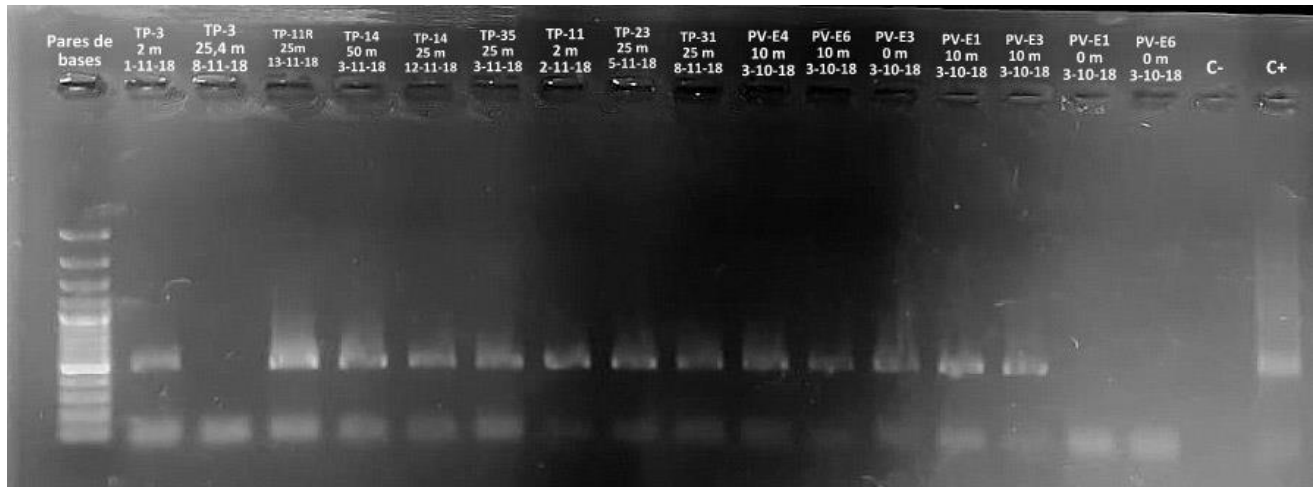


Fig. 10.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-3** 2 m 1-11-18, **TP-3** 25,4 m 8-11-18, **TP-11R** 25 m 13-11-18, **TP-14** 50 m 3-11-18, **TP-14** 25 m 12-11-18, **TP-35** 25 m 3-11-18, **TP-11** 2 m 2-11-18, **TP-23** 25 m 5-11-18, **TP-31** 25 m 8-11-18, **PV-E4** 10 m 3-10-18, **PV-E6** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 0 m 3-10-18, **PV-E1** 10 m 3-10-18, **PV-E3** 10 m 3-10-18, **PV-E1** 0 m 3-10-18, **PV-E6** 0 m 3-10-18, C- y C+.

Se observa en la figura que de las diecisiete muestras que fueron sembradas, trece de ellas muestran una banda que al ser comparadas con el C+ se toman como positivas, por ello en las muestras TP-3 de 2 m, TP-11R de 25 m, TP-14 de 50 m, TP-14 de 25 m, TP-35 de 25 m, TP-11 de 2 m, TP-23 de 25 m, TP-31 de 25 m, PV-E4 (3-10-18) de 10 m, PV-E6 (3-10-18) de 10 m, PV-E3 (3-10-18) de 0 m, PV-E1 (3-10-18) de 10 m y PV-E3 (3-10-18) 10 m. Estas equivalen al 25% de todas las muestras positivas totales.

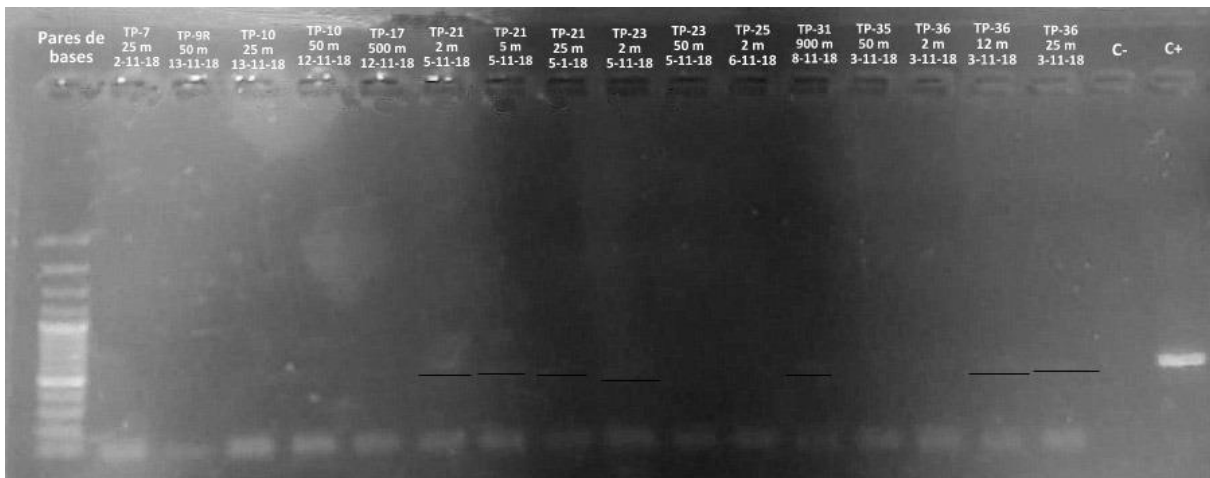


Fig. 11.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **TP-7** 25 m 2-11-18, **TP-9R** 50 m 13-11-18, **TP-10** 25 m 13-11-18, **TP-10** 50 m 12-11-18, **TP-17** 500 m 12-11-18, **TP-21** 2 m 5-11-18, **TP-21** 5 m 5-11-18, **TP-21** 25 m 5-1-18, **TP-23** 2 m 5-11-18, **TP-23** 50 m 5-11-18, **TP-25** 2 m 6-11-18, **TP-31** 900 m 8-11-18, **TP-35** 50 m 3-11-18, **TP-36** 2 m 3-11-18, **TP-36** 12 m 3-11-18, **TP-36** 25 m 3-11-18, C- y C+.

En la figura se observa de forma muy tenue siete muestras con bandas las cuáles al momento de visualizarse en el transiluminador se pudieron apreciar mucho mejor, y se comparan con el C+ tomándose como positivas y por lo tanto con presencia de *Alexandrium catenella*, sin embargo, las otras nueve muestras no se vio ninguna banda, así que se comparan con el C- siendo estas negativas y con ausencia de *Alexandrium catenella*.

Las muestras positivas fueron TP-21 de 2 m, TP-21 de 5 m, TP-21 de 25 m, TP-23 de 2 m, TP-31 de 900 m, TP-36 de 12 m y TP-36 de 25 m, equivaliendo al 14% de las muestras positivas totales.

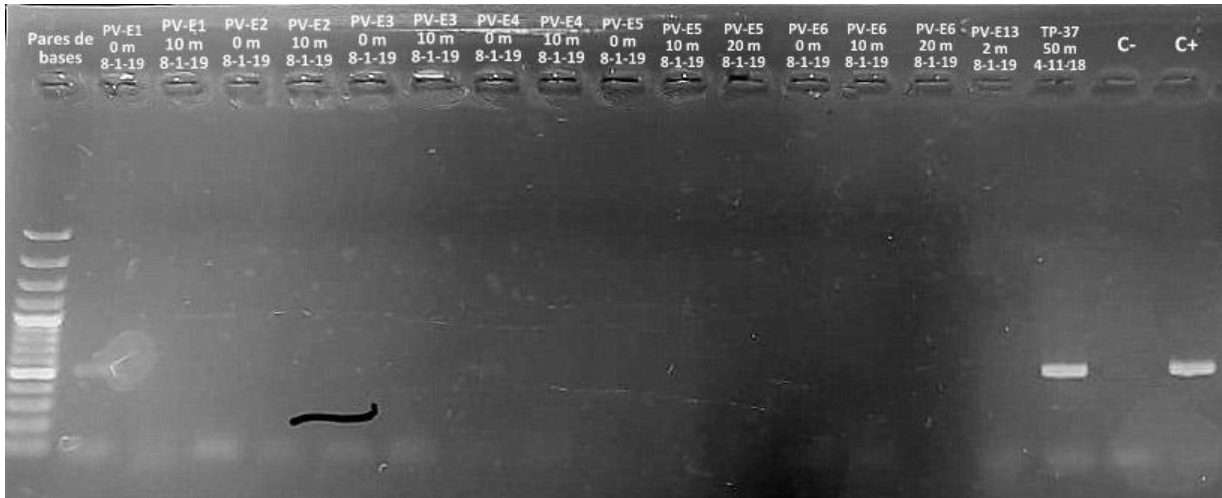


Fig. 12.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **PV-E1** 0 m 8-1-19, **PV-E1** 10 m 8-1-19, **PV-E2** 0 m 8-1-19, **PV-E2** 10 m 8-1-19, **PV-E3** 0 m 8-1-19, **PV-E3** 10 m 8-1-19, **PV-E4** 0 m 8-1-19, **PV-E4** 10 m 8-1-19, **PV-E5** 0 m 8-1-19, **PV-E5** 10 m 8-1-19, **PV-E5** 20 m 8-1-19, **PV-E6** 0 m 8-1-19, **PV-E6** 10 m 8-1-19, **PV-E6** 20 m 8-1-19, **PV-E13** 2 m 8-1-19, **TP-37** 50 m 4-11-18, C- y C+.

En la figura se observa que si bien en la muestra PV-E3 (8-1-9) de 0 m no se aprecia del todo la banda, en el transiluminador se vio de forma más nítida. Esta muestra junto con TP-37 de 50 m y PE-E1 (8-1-19) de 0 m, fueron comparadas con el C+ tomándose como muestras positivas, por lo tanto, con presencia de *Alexandrium catenella*, equivaliendo al 6% de las muestras positivas totales. En cambio las otras muestras restantes se compararon con el C- al no tener una banda y se toman como negativas y ausencia de *Alexandrium catenella*.

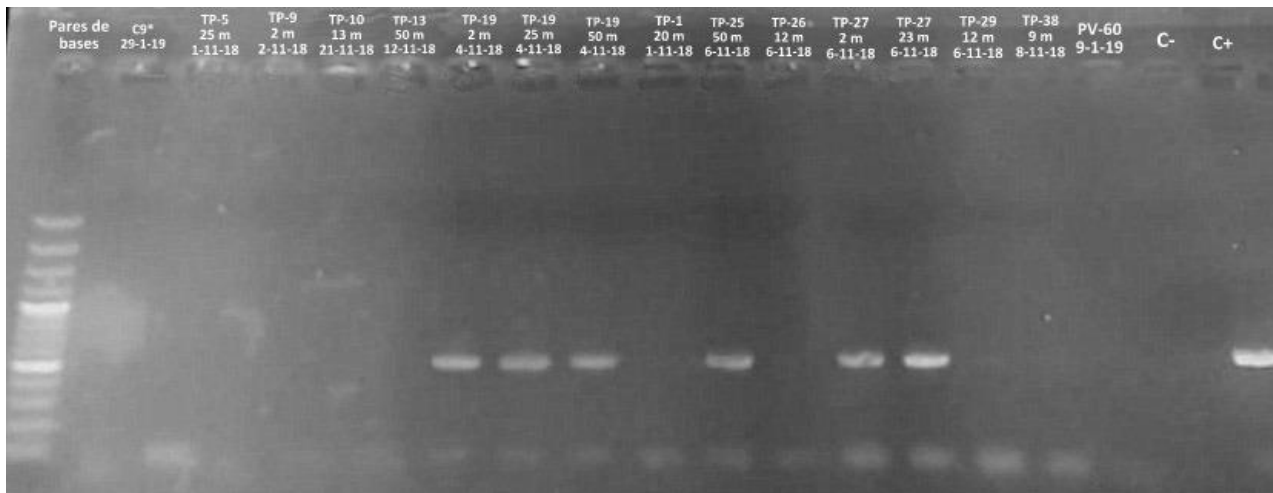


Fig. 13.- Resultados de presencia o ausencia de *Alexandrium catenella* en electroforesis en gel. Fotografía gel de agarosa con las muestras **C9*** 29-1-19, **TP-5** 25 m 1-1-18, **TP-9** 2m 2-11-18, **TP-10** 13 m 21-11-18, **TP-13** 50 m 12-11-18, **TP-19** 2 m 4-11-18, **TP-19** 25 m 4-11-18, **TP-19** 50 m 4-11-18, **TP-1** 20 m 1-11-18, **TP-25** 50 m 6-11-18, **TP-26** 12 m 6-11-18, **TP-27** 2 m 6-11-18, **TP-27** 23 m 6-11-18, **TP-29** 12 m 6-11-18, **TP-38** 9 m 8-11-18, **PV-60** 9-1-19, C- y C+.

En la figura se observa seis muestras con bandas que al compararse con el C+ se toman como positivas y presencia de *Alexandrium catenella*, mientras que las otras diez muestras no presentan bandas, por lo tanto se comparan con el C- tomándose como negativas y con ausencia de *Alexandrium catenella*.

Las muestras que resultaron positivas fueron TP-19 de 2 m, TP-19 de 25 m, TP-19 de 50 m, TP-25 de 50 m, TP-27 de 2 m y TP-27 de 23 m, que equivalen al 12% de las muestras positivas totales.

De todas las muestras corridas en electroforesis, se les hizo una tabla ordenado por profundidades, indicando con color azul las muestras que salieron negativas y con verde las que resultaron positivas que fueron 51 en total, que equivale al 25% de las 202 muestras que se analizaron.

Tabla N°2.- Número de muestras y sus correspondientes porcentajes de muestras positivas ordenadas por áreas de muestreo.

Áreas muestreo	Nº muestras	Nº muestras positivas	% muestras positivas por localidad	% muestras positivas del total positivo
Coronel	20	1	5%	2%
Bahía de Concepción	73	16	22%	31%
Taitao Penas externo	47	14	30%	27%
Taitao Penas interno	37	14	38%	27%
Canal Moraleda	13	3	23%	6%
Golfo de Penas	12	3	8%	6%

En la tabla 2 se indica cuántas muestras fueron tomadas en cada área de muestreo y el número de muestras que dieron positivo en cada zona, para indicar el porcentaje equivalente con respecto al número total de muestras que se tomaron en cada lugar; como también se calculó el porcentaje que equivale cada positivo obtenido en comparación con el total de muestras positivas obtenidas.

Tabla N°3.- Número de muestras positivas por zonas y sus correspondientes porcentajes ordenados por áreas de estudio.

Área de muestreo	Zona fótica (0 - 20 m)	Zona afótica (21 - 900 m)	% zona fótica	% zona afótica
Coronel	1	-	2%	-
Bahía de Concepción	16	-	31%	-
Taitao Penas externo	4	10	8%	19.6%
Taitao Penas interno	7	7	14%	13.7%
Canal Moraleda	1	2	2%	3.9%
Golfo de Penas	1	2	2%	3.9%

En la tabla 3 se subdividieron las muestras positivas obtenidas por dos zonas, fótica y afótica, para conocer cuáles se encuentran a bajas profundidades y los que se encuentran en el fondo como quistes de reposo. Se les calculó el porcentaje para tener una mejor visión global de las muestras obtenidas.

Tabla N°4.- Muestras positivas detectadas en Coronel (verde) ordenadas por profundidades.

Profundidad	C1	C2	C3	C4	C5	C5*	C7	C7*	C8	C8*	C9	C9*	C10	C11	C12	D. M.
0 m																
10 m																
30 m																

Los casilleros de color azul corresponden a detecciones negativas en Bahía Coronel, con ausencia de *Alexandrium catenella*, sin embargo en Desembocadura de Estero el Manco (D.M.) se obtuvo una muestra positiva en superficie. Las muestras corresponden al 28-1-19 y las que presentan un asterisco corresponden a la fecha de 29-1-19, exceptuando el C9* que es una réplica del C9.

En total de las 20 muestras obtenidas de Coronel, sólo una se detectó positiva equivaliendo al 5%; y de las muestras positivas totales equivale al 2%.

Tabla N°5.- Muestras positivas detectadas en Bahía Concepción (verde) ordenadas por profundidades.

Profundidad	PV-E1	PV-E1*	PV-E2	PV-E2*	PV-E3	PV-E3*	PV-E4	PV-E4*	PV-E5	PV-E5*	PV-E6	PV-E6*	PV-E13 P.N.
0 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
10 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
20 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Las muestras sin asterisco corresponden al 3-10-18. Las muestras que tienen asterisco (*) corresponden a la fecha 8-1-19.

P.N. corresponde a Playa Negra.

Las que están de color verde son muestras positivas, es decir, con presencia de *Alexandrium catenella* y están ubicadas en la zona fótica del océano.

En total en Bahía de Concepción se encontraron 16 muestras positivas de las 73 muestras analizadas en esta zona, equivaliendo al 22%; y de las muestras positivas totales equivale al 31%.

Tabla N°6.- Muestras positivas detectadas en Taitao Penas en la zona externa (verde), ordenadas por profundidades.

Profundidad	TP-1	TP-2	TP-5	TP-9	TP-9R	TP-13	TP-14	TP-17	TP-21	TP-31
2 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
5 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
9 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
10 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
10.5 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
12 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
13 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
15 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
20 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
21 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
23 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
25 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
25.4 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
50 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
500 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
900 m	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Para el caso de Taitao Penas en la zona externa se encontraron 14 muestras positivas de las 47 tomadas en este lugar, equivaliendo al 30% de muestras tomadas acá; y equivale al 27% de las muestras positivas totales. La mayoría de muestras positivas encontradas en este lugar, están ubicadas en la zona afótica. Las muestras corresponden a noviembre de 2018.

Tabla N°7.- Muestras positivas detectadas en Taitao Penas en la zona interna (verde), ordenadas por profundidades.

Profundidad	TP-3	TP-7	TP-10	TP-10*	TP-10**	*TP-10	*TP-10*	TP-11	TP-11R	TP-19	TP-23	TP-25
2 m	■							■		■		
5 m												
9 m												
10 m												
10.5 m												
12 m						■					■	
13 m												
15 m												
20 m												
21 m												
23 m												
25 m			■						■	■	■	■
25.4 m												
50 m	■									■		
500 m												
900 m												

Las muestras TP-10* es de la fecha 4-11-18, la TP-10** de la fecha 12-11-18, la *TP-10 de la fecha 13-11-18 y la *TP-10* de la fecha 21-11-18. El resto de las muestras corresponden a noviembre de 2018.

Para el caso de Taitao Penas en la zona interna se encontraron 14 muestras positivas de las 37 tomadas en este lugar, equivaliendo al 38% de muestras tomadas acá; y equivale al 27% de las muestras positivas totales.

Para este caso podemos encontrar la misma cantidad de muestra tanto en la zona fótica como la zona afótica.

Tabla N°8.- Muestras positivas detectadas en Canal Moraleda (verde) ordenadas por profundidades.

Profundidad	TP-26	TP-36	TP-37	TP-38
2 m				
5 m				
9 m				
10 m				
10.5 m				
12 m		■		
13 m				
15 m				
20 m				
21 m				
23 m				
25 m		■		
25.4 m				
50 m			■	
500 m				
900 m				

Para el caso de Taitao Penas en Canal Moraleda se encontraron 3 muestras positivas de las 9 tomadas en este lugar, equivaliendo al 8% de muestras tomadas acá; y equivale al 6% de las muestras positivas totales.

La mayoría de muestras positivas encontradas en este lugar, están ubicadas en la zona afótica.

Las muestras fueron tomadas en el mes de noviembre.

Tabla N°9.- Muestras detectadas positivas en Golfo de Penas (verde) ordenadas por profundidades.

Profundidad	TP-27	TP-29	TP-35
2 m	Verde	Azul	Azul
5 m	Azul	Azul	Azul
9 m	Azul	Azul	Azul
10 m	Azul	Azul	Azul
10.5 m	Azul	Azul	Azul
12 m	Azul	Azul	Azul
13 m	Azul	Azul	Azul
15 m	Azul	Azul	Azul
20 m	Azul	Azul	Azul
21 m	Azul	Azul	Azul
23 m	Verde	Azul	Azul
25 m	Azul	Azul	Verde
25.4 m	Azul	Azul	Azul
50 m	Azul	Azul	Azul
500 m	Azul	Azul	Azul
900 m	Azul	Azul	Azul

Para el caso de Taitao Penas en Golfo de Penas se encontraron 3 muestras positivas de las 12 tomadas en este lugar, equivaliendo al 25% de muestras tomadas acá; y equivale al 6% de las muestras positivas totales.

La mayoría de muestras positivas encontradas en este lugar, están ubicadas en la zona afótica.

Las muestras fueron tomadas en el mes de noviembre.

DISCUSIÓN

Las floraciones algales nocivas se forman al ocurrir una gran concentración de microalgas dentro de un área en particular, causada por condiciones medioambientales como la luz que les permite fijar carbono en la fotosíntesis, los nutrientes como nitrógeno y fósforo, permitiendo un mayor crecimiento. Por ello estos factores dentro del agua influyen en su distribución tanto en ambientes de agua dulce como marinos (McGowan, 2016).

La gravedad de los impactos negativos que generan, junto a la frecuencia y su cobertura geográfica de las FANs ha aumentado a nivel mundial en las últimas décadas, e incluso sigue continuando debido a las presiones del cambio climático y sus efectos en los sistemas de plancton marino. Estas FANs se van expandiendo cada vez más y se adaptan a climas cambiantes (Montes et al., 2018).

Debido a esto, se analizaron mediante su ADN ambiental, muestras tomadas en distintos puntos, como la zona austral y centro sur de Chile, obteniendo su concentración como indica en la tabla 1. En Bahía Concepción fue el lugar donde se obtuvo una concentración significativamente mayor ($p < 0,05$) de ADN ambiental en promedio siendo este de 257,2 ng/uL, con una concentración máxima de 1498,7 ng/uL y lugar donde se obtuvo mayor número de muestras positivas (Tabla 2) siendo estas 16. Coronel fue el segundo lugar donde se obtuvo mayor concentración de ADN ambiental en promedio siendo 205,2 ng/uL, no obstante, fue el lugar donde menos muestras positivas se obtuvieron, encontrando presencia solo en la Desembocadura Manco. Para los casos de Taito Penas interno y externo, tuvieron concentraciones de ADN ambiental en promedio similares con TP. Externo de 55,7 ng/uL y TP. Interno de 57,5 ng/uL. Sin embargo, T.P. interno obtuvo un valor máximo mayor de concentración de 651,7 ng/uL (Tabla 2) a comparación de T.P. externo que tuvo 368,8 ng7uL, pero también obtuvo el valor mínimo más bajo en concentración siendo 3 ng/uL comparado con todas las áreas de estudio. Canal Moraleda obtuvo un promedio de 29,9 ng/uL y Golfo de Penas un promedio de 29,3 ng/uL siendo promedio de concentraciones de ADN ambiental similares, y mediante un test estadístico se vio que no tuvieron diferencia significativa entre ambos (Figura 7); en lo que difieren ambos es en los valores de máximo y mínimo donde Canal Moraleda tuvo concentración máxima más alta (63,9 ng/uL) y Golfo de penas tuvo una concentración mínima más baja (4,8 ng/uL). El hecho de que en Bahía Concepción se haya

encontrado ADN ambiental con mayor concentración, es debido a que hay mayor productividad de área. La oceanografía de esta área, se caracteriza por fuertes eventos de afloramiento, junto con uno de los niveles más altos de producción primaria de cualquier océano en todo el mundo y una fuerte zona mínima permanente de oxígeno (González *et al.*, 2019).

Como se observa en la figura 7, que entre Coronel y las otras áreas no hay diferencias significativas en los promedios de las concentraciones, pero en Bahía de Concepción sí se encontraron diferencias significativas con Taitao Penas externo e interno, Golfo de Penas y Canal Moraleda. Esto se corrobora con el hecho de que en la Bahía de Concepción fue el lugar donde se obtuvo en promedio mayor concentración de ADN ambiental, y las muestras que tienen presencia de este fueron mayoritariamente en la estación de primavera donde ocurre mayor actividad fotosintética, sin embargo, para las muestras tomadas en la estación de verano siendo PV-E4, PV-E5 y PV-E6 no se encontró presencia. Una posible explicación a esto, es que PV-E4 y PV-5 son las estaciones más al norte de la bahía, por lo que puede haber factores que inhiban su crecimiento en ese lugar, al igual que en la PV-E6 que está más dentro de la bahía hacia mar adentro.

La región sur-austral se caracteriza por una morfología compleja que incluye canales, abismos, estuarios y bahías. Desde una perspectiva oceanográfica, es un ecosistema marino influenciado por aguas oceánicas profundas de alta salinidad y por agua dulce superficial de baja salinidad proveniente de múltiples fuentes (ríos, precipitación, nieve/fusión de glaciares) (Montes, 2018), sin embargo se encontró la presencia de *Alexandrium catenella* en 7 muestras superficiales (2 m) como se ve en las tablas 6, 7 y 9 para las estaciones TP-21, TP-3, TP-7, TP-11, TP-19, TP-23, TP-27. Estas muestras fueron tomadas en la estación de primavera, donde hay mayor actividad fotosintética en superficie.

En la zona interna de Taitao Penas (Tabla 7) se encontró igual cantidad de muestras positivas que en la zona fótica como en la afótica siendo un 14% en ambos casos (Tabla 3). Los estuarios y fiordos semicerrados proporcionan condiciones ideales para que prosperen las proliferaciones de algas nocivas (McGowan, 2016). Uno de ellos es el canal Puyuhuapi, donde anteriormente se detectó la presencia de *Alexandrium catenella* (Cruzat *et al.*, 2018). A comparación de la zona externa de Taitao Penas (Tabla 7) se encontró mayor presencia en la zona afótica con un 19,6% (Tabla 3), en comparación a la zona fótica encontrando 8%,

mostrando como ha ido expandiéndose a través de la plataforma continental a nivel de superficie del océano. Se encontraron muestras positivas (Tabla 3) a profundidades de 900 m, los cuales pueden ser quistes resistentes que sobreviven en esas condiciones.

El hecho de encontrar presencia de *Alexandrium catenella* a 900 m indica que los quistes resisten profundidades cerca de donde habitan especies mesopelágicas y cerca de la zona batial, sobreviviendo a las condiciones que se presentan a esa zona.

En la región sur-austral, es donde se observó el mayor porcentaje de muestras positivas (Tabla 2), a comparación con la zona centro-sur. Esto se puede deber a que *Alexandrium catenella* es una especie endémica en la zona sur-austral, no así en la zona centro-sur, no obstante el presente trabajo aporta evidencia de la detección del ADN ambiental de esta especie en las aguas de Bahía Concepción y Bahía Coronel.

La situación oceanográfica de los fiordos está dominada por la fuerte interacción de dos masas de agua que producen estratificación estuarina: a) la capa superior (hasta 10 m de ancho) se origina a partir de fuertes lluvias y de los procesos de fusión de los glaciares costeros. Está formado por aguas dulces, con temperaturas variables según la temporada; b) la capa inferior está representada por las aguas subantárticas llevadas a la superficie como resultado del efecto de surgencia de la deriva del viento del oeste contra las costas chilenas y que fluye hacia los fiordos. Está formado por aguas marinas, con una menor variabilidad de temperatura. Las aguas dulces son responsables de los gradientes batimétricos (aguas poco profundas) y longitudinales (fiordos interior-exterior) de salinidad, temperatura e insumos terrígenos. Estos gradientes están indirectamente influenciados también por oscilaciones estacionales de varios parámetros atmosféricos, incluyendo radiación solar, dirección e intensidad del viento, así como precipitaciones. Los factores físico-químicos que controlan los gradientes, junto con el grado de aislamiento de los fiordos, son responsables de la entidad de la circulación del agua y, en última instancia, controlan las características biológicas (Betti *et al.*, 2017). A pesar que hay mezclas de agua, lo que disminuye la salinidad de las aguas, *Alexandrium catenella* puede de igual forma sobrevivir en salinidades tan bajas como 10 psu y también puede crecer en salinidades de hasta 35 psu (Fig. 13).

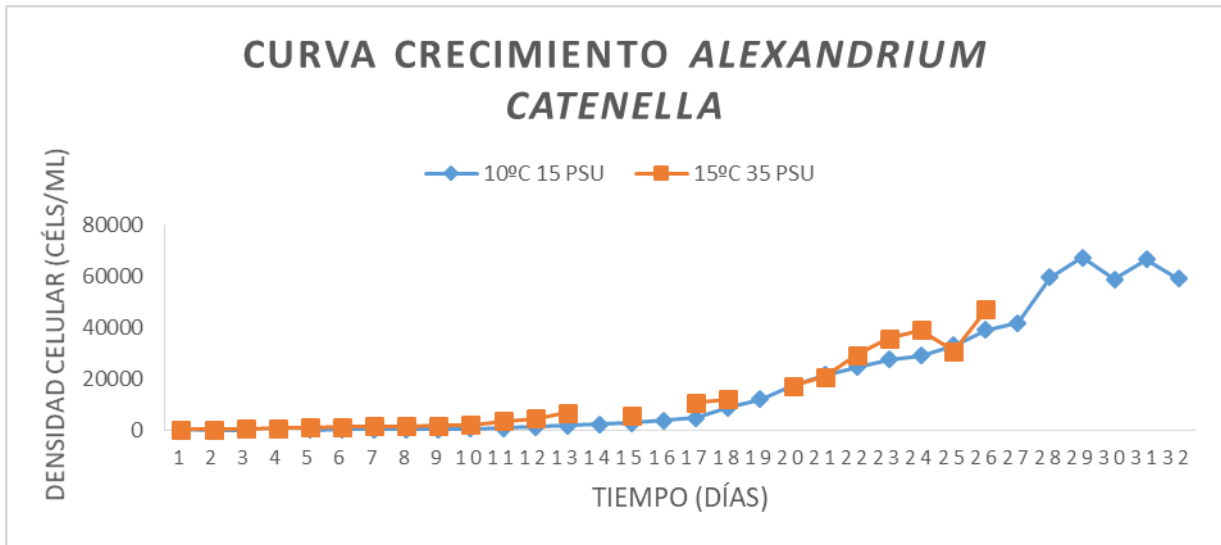


Fig. 13.- Gráfico que muestra la curva de crecimiento de *Alexandrium catenella* a través del tiempo a distintas salinidades (Centro COPAS Sur-Austral).

Los cultivos de cepas *Alexandrium catenella* del COPAS Sur-Austral fueron creciendo a una temperatura de 10°C y salinidad de 15 psu, mostrando que este dinoflagelado puede crecer y sobrevivir a bajas salinidades; también fueron creciendo a una temperatura de 15°C y una salinidad de 35 psu. Estos estudios reafirman que es posible encontrar presencia en una zona interna donde se ubican los fiordos con masas de aguas dulces.

También en el Canal Moraleda (Tabla 8) y Golfo de Penas (Tabla 9) que son lugares ubicados dentro de los fiordos, encontrándose de igual manera presencia de *Alexandrium catenella*. En Canal Moraleda, visualizando la tabla 3 vemos que hay más muestras positivas en la zona afótica (correspondiendo a TP-36 de 25 m y TP-37 de 50 m) comparada con la fótica (correspondiendo a TP-36 de 12 m). A pesar de que fue uno de los lugares donde se obtuvieron menor cantidad de muestras ambientales, de igual manera se encontró presencia de *A. catenella*. En el 2014 Díaz *et al.*, realizó un estudio donde sus resultados reflejaron las preferencias de la fase planctónica como los patrones de circulación local, que movieron los quistes en reposo depositándose principalmente en la parte más ancha del canal de Moraleda. En el Golfo de Penas ocurrió lo mismo, encontrando presencia en la zona afótica para TP-27 de 23 m y TP-35 de 25 m y en la zona fótica para TP-27 de 2 m (Tabla 3). Para ambas localidades, una de las opciones del porqué se encontró a bajas profundidades es a causa de los quistes de reposo que pueden vivir por un tiempo prolongado. La muestra TP-27 ubicada en

Golfo de Penas tuvo presencia en la superficie (2 m). Las aguas superficiales tiene los factores medioambientales ideales para que *Alexandrium catenella* pueda reproducirse.

Si bien, en ambos lugares se obtuvo el mismo número de muestras positivas (6%), a comparación de todas las muestras tomadas, el Golfo de Penas fue el que obtuvo menor porcentajes de positivos (8%), comparado al Canal Moraleda (23%) que se tomó una muestra más, y obtuvo mayor porcentaje.

Los principales determinantes de la recurrencia de los eventos de floraciones algales nocivas son la velocidad de formación y germinación de los quistes en reposo. Estos pueden sobrevivir en los sedimentos por períodos largos y reproducirse rápidamente cuando las condiciones ambientales son favorables (Díaz et al., 2014; McGowan, 2016). Estas las podemos visualizar en la tabla 5, donde se encontró presencia de ADN ambiental de *Alexandrium catenella* en la Bahía de Concepción a 20 m de profundidad en las muestras PV-E3, PV-E5 y PV-6. Estas muestras son de octubre 2018, excluyendo PV-E6 que es de diciembre 2018, siendo meses pertenecientes a la estación de primavera, donde las condiciones climáticas y medioambientales son más óptimas para que germinen los quistes. En promedio la temperatura en el sur austral es de 8°C y en la Bahía de Concepción en promedio 11.5°C, pero este dinoflagelado puede sobrevivir ante esos rangos de temperaturas, por lo que pueden crecer fácilmente (datos obtenidos al realizar el muestreo).

En Bahía de Concepción fue el lugar con mayor muestreo (tabla 2) en la zona centro-sur y es donde se obtuvo más muestras positivas en la Región del Bio Bio (22%). Anteriormente se ha realizó un estudio en este lugar (estación 18) para ver su presencia y comparar si su genética es la misma de *Alexandrium catenella* que se encuentra en el sur, como fue mencionado en la introducción (Muñoz et al., 2016).

También perteneciendo a la Región del Bio Bio, se encuentra la Bahía de Coronel, donde se obtuvo solo una muestra positiva que pertenece a la Desembocadura Manco. Fue tomada a 0 m (Tabla 4), donde llega directamente la luz solar y los nutrientes que desembocan del Estero Manco. Las costas más bajas del terreno coinciden con el curso del estero llevando tanto escurrimientos superficiales como subterráneo de las llanuras que se ubican en el sector, y también es el principal curso de la red primaria de evacuación de aguas lluvias. Es un sistema influenciado por la llegada de aguas de baja salinidad provenientes del río Biobío. Sin

embargo, dentro de los puntos de muestreo en Coronel (Fig. 6) no se encontró presencia de *Alexandrium catenella*.

En la tabla 2 vemos que en Coronel fue el porcentaje más bajo obtenido en positivos (5%), tanto en relación al total de muestras obtenidas como el total de muestras positivas siendo solo el 2%. Una de las opciones que debido a la contaminación que está presente en la Bahía de Coronel. En la actualidad, se han instalado muchas industrias en la comuna y tres termoeléctricas, donde estas últimas son percibidas por la comunidad como las responsables del deterioro ambiental en la bahía. El funcionamiento de estas industrias ha provocado una modificación del ecosistema marino, provocando alteraciones en la calidad del agua, producto de la emisión de los residuos que llegan al mar. En consecuencia, el estado actual de Bahía Coronel cuenta con un ecosistema modificado, asociado a la pérdida de biodiversidad en el lugar (Godoy *et al.*, 2016) y posiblemente por la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción de PCR, tomando en cuenta que la muestra positiva fue obtenida en la estación más distante de Bahía Coronel.

Uno de los motivos que explique el hecho que se haya encontrado *Alexandrium catenella* en la Región del Bio Bio, siendo una localidad alejada del lugar en donde fue hallado por primera vez este dinoflagelado, es posiblemente el agua de lastre. En estas aguas de lastre que son tomadas en las zonas costeras se pueden encontrar, como promedio, entre 3.000 a 4.000 especies diferentes y son transportadas en un barco. Muchas de estas especies que habitan en estas aguas pueden sobrevivir al confinamiento que impone un tanque de lastre, ya sea por días o varios meses, convirtiéndolo en un vector para el traslado de especies exóticas de un lugar a otro en el mundo. El traslado de las aguas de lastre ha dado origen a la introducción de forma involuntaria de organismos ajenos a su lugar de inicio, en diversas partes del mundo, logrando en algunos casos su establecimiento, y muchas veces desplazando a especies nativas volviéndose una potencial amenaza para el medio ambiente (Baro-Narbona & Stotz, 2018; Berasaluse 2006).

A lo largo de la costa de Chile se realiza la toma de agua para los buques. Para reducir los riesgos se han adoptado diversas medidas a nivel mundial para regular la carga y descarga de agua como el Convenio MARPOL 73/78, que hace énfasis en la limpieza de los tanques de lastre, y la Resolución OMI 868 (20) de 1997, de efectuar siempre que sea posible el cambio del agua de lastre por lo menos a 200 millas náuticas de la tierra más próxima y en aguas de

200 m de profundidad, reemplazando el agua costera que se carga generalmente en el puerto con salinidad baja, por aguas oceánicas con salinidades altas. Se adoptó esta medida porque los organismos costeros al ser expulsados en aguas con mayor salinidad, estos no sobreviven, y lo mismo ocurre para especies tomadas en aguas oceánicas que son vertidas en aguas costeras. Sin embargo, como se muestra en las figuras 13 y 14, *Alexandrium catenella* puede sobrevivir a distintos rangos de salinidad, por lo que no sería muy efectiva esta estrategia para esta especie en el recambio de agua de lastre.

El hecho de tomar agua en el sur austral de Chile que contenga *Alexandrium catenella* y ser descargado en una zona alejada como es en este caso la Región del Bio Bio, permite que esta especie invasora se aclimate, sobreviva y se reproduzca en las costas, como fue en este caso la Bahía de Coronel y la Bahía de Concepción. Esto puede ocurrir en otras zonas, ya que Chile realiza más del 70% del comercio exterior mediante vía marítima que va desde Arica a Puerto Williams.

CONCLUSIONES

- El encontrar presencia de ADN ambiental de *Alexandrium catenella* a grandes profundidades en la plataforma continental de la región sur-austral de Chile, sobre todo en las estaciones externas de la expedición Taitao, sugiere que en esta área oceanográfica puede haber una exportación *A. catenella* desde la zona de fiordos hacia la plataforma continental de la Patagonia (mar abierto).
- La distribución biogeográfica de *Alexandrium catenella* determinada en el presente trabajo, sumado a el reporte de FANs de este organismo en los últimos 40 años, sugiere que estamos en un proceso de expansión hacia el norte desde el ecosistema sur austral.
- El agua de lastre podría ser uno de los vectores más probable para la expansión biogeográficas de *Alexandrium catenella* desde el ecosistema sur-austral hasta la zona centro sur de Chile (Bahía de Concepción).
- Si bien no se conoce la concentración exacta de *Alexandrium catenella* presente en la Región del Bío Bío, el hecho de haber encontrado presencia de esta, es un inicio para estudiar más el área y estar atentos ante una posible proliferación. Como este dinoflagelado se adapta a distintos ambientes, cabe la posibilidad de que pueda crecer y reproducirse en las costas de la Bahía de Concepción formando floraciones algales nocivas.
- Un posterior estudio a las muestras con presencia de *Alexandrium catenella*, podría ser un análisis cuantitativo para conocer su concentración exacta y cuyos datos permitirían la prevención ante posibles proliferaciones de este dinoflagelado; y una secuenciación para corroborar si esta especie es la misma de la región sur-austral.

LITERATURA CITADA

- Aguilera A, Inostroza I, Sáez K, Franco J, Riobó P, Gómez P. 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23: 55–59.
- Álvarez G, Díaz P, Godoy M, Araya M, Ganuza I, Pino R, Álvarez F, Rengel J, Hernández C, Uribe E, Blanco J. 2019. Paralytic Shellfish Toxins in Surf Clams *Mesodesma donacium* during a Large Bloom of *Alexandrium catenella* Dinoflagellates Associated to an Intense Shellfish Mass Mortality. *Toxins* 2019, 11, 188; doi:10.3390/toxins11040188.
- Anderson D, Alpermann T, Cembella A, Collos Y, Masseret E, Montresor M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14 (2012) 10–35.
- Andree K, Fernández-Tejedor M, Elandaloussi L, Quijano-Scheggia S., Sampedro N., Garcés E. 2011. Quantitative PCR Coupled with Melt Curve Analysis for Detection of Selected *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) from the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied and environmental microbiology*. p. 1651–1659.
- Baro-Narbona & Stotz W. 2018. Propuesta para el control del agua de lastre en buques que arriban a puertos de la Ecorregión Marina de Chile Central. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 53, N°3: 297-306, 2018.
- Berasaluce J. 2006. La realidad de las aguas de lastre en Chile. *Ciencia y Tecnología*. REVISMAR 1/2006.
- Betti F, Bavestrello G, Bo M, Enrichetti F, Loi A, Wanderlingh A, Perez-Santo I, Daneri G. 2017. Benthic biodiversity and ecological gradients in the Seno Magdalena (Puyuhuapi Fjord, Chile). *Estuarine Coastal and Shelf Science*.
- Cárcamo P, Hernández-Miranda E, Veas R, Quiñones R. 2017. Macrofaunal community structure in Bahía Concepción (Chile) before and after the 8.8 Mw Maule mega-earthquake and tsunami. *Marine Environmental Research*.
- Carty S. & Parrow M. 2015. Dinoflagellates. *Freshwater Algae of North America*. Chapter 17.

- Cruzat F, Muñoz C, González-Saldía R, Inostroza A, Andree K. 2018. High genetic variability of *Alexandrium catenella* directly detected in environmental samples from the Southern Austral Ecosystem of Chile. *Marine Pollution Bulletin* 127 (2018) 437–444.
- Díaz P, Molinet C, Seguel M, Díaz M, Labra G, Figueroa R. 2014. Coupling planktonic and benthic shifts during a bloom of *Alexandrium catenella* in southern Chile: Implications for Bloom dynamics and recurrence. *Harmful Algae* 40 (2014) 9–22.
- Delgado, G., G. Popowski & M.C. Pombo. 2002. Nuevos registros de dinoflagelados tóxicos epibentónicos en Cuba. *Nota Científica. Revista de Investigaciones Marinas* 23(3): 229-232.
- Erdner DL, Percy L, Keafer B, Lewis J, Anderson DM. 2010. A quantitative real-time PCR assay for the identification and enumeration of *Alexandrium* cysts in marine sediments. *Deep Sea Res II* 57:279–287
- FAO. 2005. *Biotoxinas Marinas*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia
- Fischer A., Brosnahan M., & Anderson D. 2018. Quantitative Response of *Alexandrium catenella* Cyst Dormancy to Cold Exposure. *Biology Department, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA. Protist*, Vol. 169, 645–661, xx2018.
- Godoy C, Martín M, Vásquez V, Arce D, Serey I, Peralta J, Saavedra M, Bahamondes P, Rossel V. 2016. Diagnóstico Medioambiental Y Evaluación Preliminar De Riesgo Ecológico De La Bahía De Coronel. Centro de Ecología Aplicada. LICITACIÓN ID N° 608897-122-LP15.
- González R, Pino N, Muñoz C, Soto L, Durán E, Barra M.J, Gutiérrez S, Díaz V, Saavedra A. 2019. Fecal pollution source tracking and thalassogenic diseases: The temporal-spatial concordance between maximum concentrations of human mitochondrial DNA in seawater and Hepatitis A outbreaks among a coastal population. *Science of the Total Environment* 686 (2019) 158–170.
- Guillou, L., Nézan, E., Cuff, V., Erard-Le Denn, E., Cambon-Bonavita, M.A., Gentien, P., Barbier, G., 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinopysis* and *Karenia*) from the French Coasts. *Protist* 153, 223–238.

- Guzmán, L., Espinoza-González, O., Pinilla, E., Martínez, R., Carbonell, P., Calderón, M.J., López, L., Hernández, C., 2016. The *Alexandrium catenella* and PSP outbreak in the Chilean coast, the first in the open coast of the South East Pacific Ocean. ICHA The 17th International Conference on Harmful Algae Brazil 2016 Abstract Book 74.
- Hatfield R, Bean T, Turner A, Lees D, Lowther J, Lewis A, Baker-Austin C. 2019. Development of a TaqMan qPCR assay for detection of *Alexandrium* spp and application to harmful algal bloom monitoring. Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth, Dorset, UK. *Toxicon*: X 2 (2019) 100011.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen and P. Taberlet, 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
- Jedlicki1 A, Fernández G, Astorga M, Oyarzún P, Toro J, Navarro J and Martínez V. 2012. Molecular detection and species identification of *Alexandrium* (Dinophyceae) causing harmful algal blooms along the Chilean coastline. *AoB PLANTS* 2012: pls033.
- Lembeye, G. 2004. Distribución de Quistes de *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en Sedimentos de la zona Sur- Austral de Chile. *Cienc. y Tecnol. Mar.* 27(2): 21-31.
- Long M, Holland A, Planquette H, González D, Whitby H, Soudant P, Sarthou G, Hégaret H, Jolley D. 2019. Effects of copper on the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its allelochemical potency. *Aquatic Toxicology* (2019).
- Mardones J, Bolch C, Guzmán L, Paredes J, Varela D. 2016. Role of resting cysts in Chilean *Alexandrium catenella* dinoflagellate blooms revisited. *Harmful Algae* 55 (2016) 238–249.
- Mardones, J., Clement, A., Rojas, A., Aparicio, X., 2010. *Alexandrium catenella* during 2009 in Chilean waters, and recent expansion to coastal ocean. In: *Harmful Algae News*. 41. pp. 8–9.
- McGowan S. 2016. Algal Blooms. *Biological and Environmental Hazards, Risks, and Disasters*.

- Mohamed Z. 2018. Potentially harmful microalgae and algal blooms in the Red Sea: Current knowledge and research needs. Department of Botany and Microbiology, Faculty of Science, Sohag University, Sohag 82524, Egypt. Marine Environmental Research.
- Montes R, Rojas X, Artacho P, Tello A, Quiñones R. 2018. Quantifying harmful algal bloom thresholds for farmed salmon in southern Chile. *Harmful Algae* 77 (2018) 55–65.
- Muñoz C, González R, Cruzat F, Pino N. 2016. Presencia molecular de *Alexandrium catenella* en la región del Bío-Bío. Congreso Ciencias del Mar 2016.
- Prabowo D. & Agusti S. 2019. Free-living dinoflagellates of the central Red Sea, Saudi Arabia: Variability, new records and potentially harmful species. *Marine Pollution Bulletin* 141 (2019) 629–648.
- Satoshi Nagai & Shigeru Itakura. 2012. Specific detection of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Maruishi 2-17-5, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan.
- Seguel C, Mudge S, Salgado C and Toledo M. 2001. Tracing sewage in the marine environment: altered signatures in Concepción Bay, Chile. *Wat. Res.* Vol. 35, No. 17, pp. 4166–4174, 2001.
- Sellner, K., Douce, G., Kirkpatrick, G., 2003. Harmful algae blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 383–406.
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J.E., Place, A.R., 2010. A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (5), 2082–2087.
- Thomsen P, Møller P, Sigsgaard E, Knudsen S, Jørgensen A, Willerslev E. 2016. Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLoS ONE* 11(11): e0165252.
- Touzet, N., Franco, J.M., Raine, R., 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7, 782–797.

- Uribe JC., Oyarzún S. & Latorre V. 2010. *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech, 1985, in Magellan waters, Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia, Chile* 38(1): 103-110.
- Wang, D., Lin, L., Gu, H., Chan, L.L., Hong, H., 2008. Comparative studies on morphology, ITS sequence and protein profile of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* isolated from the China Sea. *Harmful Algae* 7, 106–113.