



Universidad Austral de Chile

FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

PROFESORA PATROCINANTE

Dra. Leyla Cárdenas T.

Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas

PROFESOR CO-PATROCINANTE

Dr. Luciano Caputo G.

Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas

“Caracterización genética en muestras geográficamente aisladas de la diatomea invasora *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt M., 1899 en ríos de Chile Centro-Sur”

Memoria de grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de **Licenciado en Biología Marina** y Título Profesional de **Biólogo Marino**.

ANGELICA JARAMILLO OBANDO

VALDIVIA – CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer al proyecto DID S-2014-21 de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile, el cual permitió que yo realizara esta tesis, gracias a su financiamiento.

Agradecer a mi profesora Patrocinante Dra. Leyla Cárdenas, por sus horas de dedicación y educación para la realización de esta tesis. Primera profesora que destaco en estos años de Universidad, por su constante e interminable apoyo y presencia.

A mi profesor Co-patrocinante Dr. Luciano Caputo por esos terrenos mágicos, que me permitieron salir del estrés, recorrer lugares que quizás nunca vuelva a visitar, salidas que me llenaron de energía. Agradecer por su apoyo y dedicación hacia mi tesis, es una excelente persona, tanto en lo académico como en lo personal.

A mi compañera y amiga de terreno, Dayane Osman por su tremenda dedicación en esos terrenos interminables, sus ganas de enseñar, paciencia y dedicación son las palabras que te definen. Gracias por responder mis dudas, siempre con una sonrisa.

Agradecer a Fernando Runil, que si bien hace miles de años que no lo veo, fue el que me enseñó las técnicas básicas del laboratorio con una constante dedicación y paciencia, resolviendo grandes dudas que me aquejaban en aquellos momentos.

Agradecer a mi familia y amigos que aunque estén en último lugar de esta plana, no son los menos importantes, de hecho, sin ustedes no hubiera podido realizar esta tesis. Por su constante apoyo y palabras de ánimo, muchas gracias.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
<i>Didymosphenia geminata</i> en Chile	4
Estudios genéticos en <i>Didymosphenia geminata</i>	6
Características generales de Didymo	6
Método de identificación en Didymo	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
MATERIAL Y METODOS	12
A- Colecta inicial para el desarrollo y búsqueda de protocolos Moleculares.	12
B- Colecta de muestras desde distintas áreas geográficas.	14
C- Desarrollo de un protocolo de extracción de ADN.	16
D- Desarrollo de marcadores moleculares específicos para Didymo.	17
ANALISIS DE DATOS	18
A- Diversidad genética	18

B- Relaciones filogenéticas	18
RESULTADOS	20
A- Desarrollo de un protocolo de extracción de ADN.	20
B- Desarrollo de marcadores moleculares específicos y amplificación por PCR	21
ANALISIS DE DATOS	23
A- Diversidad genética	23
B- Relaciones filogenéticas	25
DISCUSION	31
APORTE DE ESTA TESIS	37
BIBLIOGRAFIA	38
ANEXOS	43
ANEXO 1: Protocolo de extracción CTAB + PK	43
ANEXO 2: Listado de especies utilizadas para el estudio del gen 18S	44
ANEXO 3: Listado de especies utilizadas para el estudio del gen Rbcl	45

RESUMEN

Didymosphenia geminata, más conocida como Didymo o moco de roca, es una microalga invasiva de agua dulce, endémica de las regiones polares del hemisferio Norte. La distribución original de esta especie corresponde a aguas continentales de la región templada fría, boreal y alpina, incluyendo ríos de Europa, Asia y América del Norte.

Didymo fue recientemente introducido en Nueva Zelanda en el año 2004 en el río Waiau, donde en menos de 18 meses se propagó a 12 ríos de la Isla del Sur, formando grandes floraciones, las que se han mantenido hasta el presente año. Otros países recientemente invadidos son Argentina y Chile (2010) en donde este último destaca, una masiva floración en la cuenca del Futaleufú, Región de los Lagos. Invasión que hasta el presente año (2015) sobrepasa los 3000 km en extensión.

La diversidad genética que existe en las muestras establecidas en Chile y sus relaciones filogenéticas con otras muestras de Didymo del mundo es la información clave para el desarrollo de cualquier estrategia de control y manejo de esta especie invasora.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento del proceso de invasión de la especie y específicamente de evaluar el estatus genético y la diversidad genética en las muestras de Chile, en esta tesis se utilizaron dos marcadores moleculares: el gen plástidial Rubisco; Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad 1 (Rbcl) y el gen nuclear SSU; subunidad pequeña del ribosoma (18S) rRNA, los cuales permitirán reconstruir las relaciones filogenéticas de Didymo y caracterizar genéticamente las muestras recientemente establecidas en Chile.

Los resultados confirman que la especie Chilena corresponde al género *Didymosphenia*. Para el gen 18S no se detectaron sitios polimórficos entre las muestras chilenas, mientras que el gen Rbcl se registró un alto polimorfismo con 53 sitios polimórficos. Esto último sugiere más de un foco de introducción en nuestro país.

ABSTRACT

Didymosphenia geminata (Lyngbye) Schmidt, commonly known as Didymo or “Rock snot” is an invasive freshwater benthic diatom, native to rivers of the Circumboreal Region of Europe. In Chile, Didymo was first found blooming in the Espolón River (around 44°S) in Patagonia in 2010. Several years later, Didymo has expanded its range to 3000 km from 38°S to 53°S. Genetic information about this alga could improve the early detection and monitoring of this invasive species especially in uncontaminated rivers. Therefore, this information could help managers to make conservation decisions about places threatened by Didymo invasion. Here, phylogenetic analysis employing two commonly used molecular markers was conducted to identify Chilean Didymo samples from different spatially distant infested rivers. The data herein presented confirm the presence of Didymo in Chile and include the first genetic account of an invasion in South America.

INTRODUCCION

La actual invasión de especies acuáticas en Chile y el mundo ha llevado a los científicos a estudiar la dinámica de dispersión, los mecanismos de transporte y los potenciales efectos de los organismos exóticos sobre los ecosistemas invadidos. Las consecuencias adversas de las invasiones son diversas y pueden estar interconectadas. Los invasores pueden alterar características ecológicas fundamentales, tales como las especies dominantes en una comunidad, las propiedades físicas del ecosistema, el ciclo de nutrientes y la productividad primaria (Mack et al. 2000). Los efectos combinados a las invasiones causadas por los seres humanos amenazan los esfuerzos de conservar la biodiversidad, sustentar el funcionamiento de los ecosistemas naturales y también proteger la salud humana (Mack et al. 2000).

Dentro de las especies acuáticas introducidas en Chile, aquellas que destacan por tener un amplio rango de distribución e impactos relevantes en los ecosistemas invadidos son: la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) y la trucha café (*Salmo trutta*) (Iriarte et al. 2005), el alga verde *Codium fragile* (Villaseñor et al. 2011), el mitilido *Mytilus galloprovincialis* (Ruiz et al. 2008).

En Chile recientemente ha sido reportada una nueva especie de microalga exótica, que ha invadido rápidamente varios ríos y lagos del centro sur del país. Se trata de la especie *Didymosphenia geminata* más conocida como Didymo o moco de roca. Esta diatomea constituye un caso de invasión biológica único en su tipo (Programa de Inventario y Evaluación de los Recursos Hídricos de la Provincia, P.I.E.R.H.P., 2013). Para el caso de Chile esta microalga ha expandido su rango de distribución en más de 3000 km desde el Biobío hasta el Rio Grande en Tierra del Fuego (Leone et al. 2014).

El estado actual de la invasión de Didymo en Chile (38°-53°S) ha llevado a investigadores a concentrar esfuerzos en desarrollar métodos y/o protocolos que permitan evaluar y mitigar su propagación. Entre los estudios llevados a cabo destacan: (1) la recolección de muestras para identificación de especie mediante rasgos morfológicos (Rivera et al. 2013) (2) caracterización física, química y biológica de las cuencas hidrográficas impactadas (Díaz et al. 2012) y (3) la transferencia de metodologías de prevención de la invasión (e.g. uso de detergentes) que han sido desarrolladas principalmente en Nueva Zelanda, donde la especie ha sido invasora desde el año

2004 (Craig et al. 2006). Sin embargo ningún programa de investigación ha incorporado estudios genéticos de las muestras o cepas de *Didymo* con el objetivo de implementar estrategias de control biotecnológico para neutralizar la expansión de esta microalga a sitios no infectados.

Mediante el desarrollo de marcadores moleculares específicos para *Didymo*, se aportará información relevante respecto a la diversidad genética de las muestras de *Didymo* en ríos chilenos, información que hasta ahora es desconocida. En particular usando marcadores moleculares de ADN se evaluará el patrón de distribución espacial de la diversidad genética en las muestras introducidas como una manera de avanzar en la búsqueda de mecanismos potencialmente eficaces para la implementación de estrategias de gestión que impidan la propagación de *Didymo* a nuevos ambientes.

Didymosphenia geminata en Chile

En el año 2007 algunos investigadores ya habían advertido el riesgo de invasión en países como Perú, Chile y Argentina, principalmente en ríos patagónicos por ser estos destinos atractivos para la pesca con mosca, siendo la actividad turística uno de los principales vectores de dispersión (Spaulding & Elwell 2007). Estos autores presentaron un mapa de riesgo basado en los ambientes adecuados para el desarrollo de la especie, según por McNyset & Julius (2006).

Estudios realizados por científicos del Centro de Investigación en Ecosistemas de la Patagonia (CIEP, Chile) confirmaron la existencia de la especie en la Región de Aysén (Burgos 2010). En octubre del mismo año se resuelve declarar por el plazo de dos años contados desde la publicación de la resolución, a algunos cuerpos de agua como área de plaga de la especie *Didymo*. Entre estos, se encuentran: (1) **Río Espolón**, desde su nacimiento hasta su confluencia con el río Futaleufu y (2) **Río Futaleufu** desde su inicio en el límite territorial Hito VII-6, hasta su desembocadura ubicada en Lago Yelcho.

Estudios posteriores realizados por la Subsecretaría de Pesca, reportan la expansión de *Didymo* hacia el norte del país, detectándose su presencia en la Región de la Araucanía (sector Lonquimay/Pino Hachado), Río Liucura (cerca de Villarrica) y en la Región de los Ríos, específicamente en la Cuenca del Río Valdivia en distintos tramos del río, desde el lago Pihueico hasta el río San Pedro (SUBPESCA Res. Ex. N° 996-17.04.2013).

En el año 2013 el Centro de Estudios del Cuaternario, Fuego-Patagonia y Antártica (Cequa), monitoreando el sector chileno del río Grande, encuentran *Didymo*, hallazgo que aumenta el rango de distribución austral de la microalga. Más recientemente estudios realizados por investigadores de la Universidad Austral de Chile detectan la presencia en la Cuenca del Río Bueno, cuenca que hasta el 2013 se encontraba libre de floraciones de *Didymo*.

Tres meses después de publicada la Res. Ex. N°996 de abril del 2013 se añade una nueva región de plaga, la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena, encontrándose *Didymo* en la cuenca de Tierra del Fuego en las subsubcuencas del Río Grande hasta confluencia con río Rusphen, Lago Lynch y río Grande hasta antes río Grande, ríos Cochrane y Grande hasta frontera, Lago Blanco y río Blanco (SUBPESCA Res. Ex. N° 1927-30.07.2013).

El 17 de abril del 2014 la Subsecretaría de Pesca nuevamente modifica la resolución pasada y añade una nueva región plaga, la Región del Biobío (SUBPESCA Res. Ex. N° 1965-17.04.2014).

Estudios realizados en la primavera del 2013 y verano del 2014 por el Comité Consultivo del Reglamento sobre Plagas Hidrobiológicas, las cuales consideran los resultados de prospecciones realizadas por la Dirección Regional del Biobío del Sernapesca junto al apoyo del Centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción, incluyen la subsubcuenca “Río Palena entre río salto y río Tranquilo”, perteneciente a la cuenca del “Río Palena y costeras límite de la Región de los Lagos”, como parte de la Región de los Lagos, lo anterior con fines administrativos presentados en el Informe Técnico N°221/2014. La información aquí analizada identifica una extensión al norte de la actual área declarada plaga, fundamentando su ampliación hacia 7 subsubcuencas de la cuenca del Biobío, 1 subsubcuenca de la cuenca del río Valdivia de la Región de Los Ríos, y 2 subsubcuencas de la cuenca del río Aysén en la Región de Aysén (SUBPESCA Informe Técnico D. AC. N°253/2014).

Posterior resoluciones hasta la fecha solo han añadido nuevas áreas de plagas y se ha ampliado los rangos de distribución de resoluciones anteriores, detectándose ahora la presencia de *Didymo* en Lagos. La última resolución exenta declara al Lago Maihue, comuna de Lago Ranco, Región de los Ríos, como área de emergencia de plaga (SERNAPESCA Res. Ex. N° 005-7.01.2015).

Estudios genéticos en *Didymosphenia geminata*

Estudios genéticos relacionados con diversidad genética en muestras de Didymo o aquellos que identifiquen relaciones filogenéticas y geográficas dentro de esta especie en Chile están todavía por realizarse. Entre los actuales estudios destacan el trabajo de Craig et al. (2006), quien desarrollo un método de extracción de ADN desde un pool de células de Didymo y otras especies provenientes del rio Waiau en Nueva Zelanda, además, desarrollo partidores específicos para el gen 18S. Otro estudio de esta autora (Craig et al. 2007) se basa en un método de qPCR o PCR de tiempo real, el cual es un método para la detección temprana de Didymo en los cuerpos de agua, pero aún es un método experimental y en desarrollo.

Recientemente, Uyua et al. (2014) mejora el método de extracción de ADN anterior, añadiendo una resina quelante llamada Chelex, permitiendo aumentar en un 30% la cantidad de ADN desde muestras chilenas.

Por último los neozelandeses Ruck et al. (2014) y Nakov et al. (2014), establecen relaciones filogenéticas de los marcadores Rubisco y 18S de muestras de Didymo de Nueva Zelanda, Rusia y USA con otras especies de diatomeas y a la vez se estudió la perdida de genes específicos dentro de la evolución de las diatomeas.

En este trabajo de tesis se caracterizara la diversidad genética en muestras estables y espacialmente aisladas de *D. geminata*, obtenidas desde cuencas hidrográficas de las regiones centro-sur de Chile. Para esto se generarán marcadores genéticos específicos para la especie, como son el gen nuclear 18S y el gen plástidial Rbcl. Esta información será útil para evaluar la diversidad genética en muestras de Didymo permitiendo analizar la conectividad geográfica del alga, en ríos desde la Regiones de Aysén y la Araucanía.

Características generales de Didymo

Las diatomeas constituyen un grupo de microalgas que se caracterizan por presentar una pared celular llamada frústulo o teca (Figura 1), la cual se compone principalmente por sílice (P.I.E.R.H.P., 2013). En su conjunto son un grupo de microalgas muy diverso que habitan

ambientes marinos y continentales de agua dulce, pueden formar parte del plancton (es decir tener vida libre en la columna de agua) o vivir adheridas a distintos tipos de sustratos.

Didymosphenia geminata es una diatomea (Bacillariophyceae) de agua dulce más conocida como Didymo o moco de roca. Fue descrita por primera vez como *Echinella geminata* por Lyngbye en 1819. Cinco años más tarde Agardh C. la nombro como *Gomphonema geminatum* y en el año 1899 Schmidt M. la clasifica dentro de la familia de las Gomphonemataceae, dándole así su actual nombre (Whitton 2009).



Figura 1. Célula de Didymo en donde se detalla su frústulo silíceo. Aumento a 40X en microscopio óptico. Fuente: Dayane Osman. Laboratorio de Limnología, Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, UACH.

Didymosphenia geminata posee una longitud celular que varía entre los 60 a 140 micrones, dependiendo del tamaño de la población. Su ancho celular varía entre los 32 a 43 micrones. En su superficie celular posee poros que forman estrías, las cuales poseen una densidad de 9.5 a 10.2 en 10 micrones. Presenta en su centro perforaciones denominadas estigmas, encontrándose 2 a 5 estigmas por célula. Este es un carácter distintivo del genero lo que permite

diferenciarlo de *Cymbella* que no tiene estigmas y de *Gomphonema* que posee solo uno (SUBPESCA, Informe Técnico D.AC. N° 2064/2010).

Los frústulos de *Didymo* se fijan al sustrato por medio de excreciones de mucilago (pies o pedúnculos) que forman grandes matas cuando éstas crecen en grandes densidades. Este tipo de crecimiento característico, también puede encontrarse en otras especies de diatomeas, como *Gomphonema* y *Gomphoneis* (aunque de menor envergadura). Los pedúnculos se ramifican cuando las células se dividen y cada célula hija continúa secretando el pedúnculo. Cuando las condiciones son favorables, los organismos pueden formar matas (color amarillo pálido o blanco) que pueden llegar a cubrir grandes extensiones del fondo de los arroyos y ríos. Para el observador estas matas tienen la apariencia de fibra de vidrio, cuero de oveja, o alfombras de peluche, nombrándola vulgarmente como “moco de roca” (Figura 2). A medida que los arroyos disminuyen su profundidad las matas se mantienen secas sobre las rocas y pueden ser confundidas con papel higiénico que da un aspecto desagradable al sitio (Díaz et al. 2012).



Figura 2. Roca cubierta con la microalga *Didymo*, con la apariencia de papel higiénico. Fuente: Luciano Caputo.

Didymo se encuentra en dos estados en la naturaleza; un estado fijo pedunculado y otro de vida libre, por lo que los individuos pueden ser hallados tanto formando estructuras mucilaginosas sobre sustratos, como en forma aislada en la columna del agua y/o sedimentos. Se reporta estacionalidad en el desarrollo de los estados fijos y libres de Didymo, encontrándose las formas fijas desde primavera hasta fines del verano, luego liberándose las células para pasar a la forma móvil o libre (P.I.E.R.H.P., 2013). Por lo tanto, se espera encontrar la mayor biomasa fija y mayor producción de tractos mucilaginosos en la época cálida del hemisferio austral, entre Diciembre y Febrero. Contrariamente se han reportado una menor producción de pedúnculos durante el invierno (P.I.E.R.H.P. 2013).

En cuanto al hábitat, Didymo prefiere ambientes loticos oligotróficos (pocos nutrientes) pero también ha sido encontrada en cuerpos de agua lenticos de aguas someras y profundas. Se observa preferencia por lugares donde hay mucho movimiento de agua, tales como ríos turbulentos y orillas de lagos batidas por el oleaje. A pesar de que *D. geminata* se encuentra en lagos, ríos y charcos, los crecimientos masivos o blooms hasta ahora, sólo se han registrado en ríos y arroyos (P.I.E.R.H.P. 2013). Didymo coloniza preferentemente sustratos rocosos, pero también se halla sobre otros tipos de sustratos (restos vegetales, macrófitas, etc.) y en su forma libre, puede encontrarse en la columna de agua y en los sedimentos.

Se supone que Didymo, al igual que otras diatomeas se reproduce de forma asexual y sexual, aunque no existe un estudio específico para la especie. La reproducción asexual sería una reproducción por bipartición donde hay una reorganización intracelular, una expansión y duplicación de todos los componentes celulares, una división celular, la formación de nuevas valvas lo que conlleva una disminución en tamaño de la célula, mientras que el patrón de estrías y areolas se mantienen estables a través de las generaciones. En esta reproducción asexual una de las células hijas adquiere el mismo tamaño que la célula madre, pero la otra queda más pequeña. Al repetirse las divisiones conduce a la disminución progresiva del tamaño lo que conlleva a una reproducción sexual, en la cual hay una isogamia o recombinación genética generando gametos idénticos al progenitor.

Método de identificación en Didymo

La identificación morfológica en diatomeas puede ser muy difícil, ya que hay especies muy similares, lo que lleva a identificarlas erróneamente. Por lo tanto, necesario un concepto de especie estrecho si lo que queremos es evaluar la biodiversidad y biogeografía en diatomeas (Evans et al. 2007). Actualmente, *Didymo* es una especie que ha sido identificada basándose solo en rasgos morfológicos (Rivera et al. 2013), siendo este un impedimento debido a la marcada similitud que posee *Didymo* con otras diatomeas como las *Cymbellas* y *Gomphonemas* (P.I.E.R.H.P., 2013). Para la identificación de esta diatomea en base a la identificación de frústulos se requiere de un alto entrenamiento teórico y mucha práctica. Además, de que es necesario reconocer a los especialistas y que estos se interrelacionen, para que de esta manera los resultados sean confiables (SUBPESCA 2011).

Actualmente en Chile se ha gastado una gran cantidad de recursos destinados a la prospección de *Didymo*, establecer áreas plagas, educación a los lugareños para que no dispersen mas esta diatomea, estudiar las cuencas hidrográficas para establecer la preferencia de sustrato y se han establecido estaciones de desinfección en ríos contaminados. Por lo tanto, establecer técnicas genéticas que permitan la correcta identificación de esta especie, estudiar la diversidad genética dentro de las muestras de *Didymo* desde distintas áreas geográficas y establecer relaciones filogenéticas con otras diatomeas, permitirían evitar posibles inconvenientes en un futuro y daños irreparables si seguimos confundiéndola con otras especies.

HIPOTESIS

Las muestras del alga *Didymo* colectadas en Chile, corresponden a la diatomea *Didymosphenia geminata* y debido a que los eventos de introducción en las distintas regiones de Chile han ocurrido en diferentes épocas del año y en distintos años, se esperaría encontrar alta diversidad genética entre las localidades geográficamente distantes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Didymo* en ríos, mediante análisis moleculares e identificar los posibles linajes filogenéticos de la especie en Chile.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Desarrollar un protocolo de extracción de ADN para el alga *Didymo*, en base a material obtenido desde el campo.
- 2) Desarrollar marcadores moleculares genéticos específicos para *Didymo*, que faciliten su identificación.
- 3) Describir y analizar diversidad genética de muestras de *Didymo* que habitan los distintos ríos y cuencas del Centro-Sur de Chile.

MATERIAL Y METODOS

Colecta de Muestras

A.- Colecta inicial para el desarrollo y búsqueda de protocolos moleculares

Para el desarrollo de los protocolos moleculares se colectaron muestras del campo estableciendo tres replicas por sitio muestreado. Desde el río Fuy, 39° 49' 25.79'' S y 71° 56' 17.28'' W (Figura 3) se trasladaron muestras vivas y fijadas en etanol al 100% en tubos falcón de 50ml, siguiendo las normas de bioseguridad dictadas por SUBPESCA. En el río, se procedió a seleccionar florecimientos de células, en base a su coloración. Se colectaron matas pardas, blancas y café oscuro, para posteriormente en laboratorio ser aisladas bajo lupa con una aguja de insulina de 5ml y guardadas en tubos eppendorf de 1.7 ml con etanol al 70% (Figura 4).



Figura 3. Río Fuy, Región de los Ríos. Primera localidad de extracción de muestras.

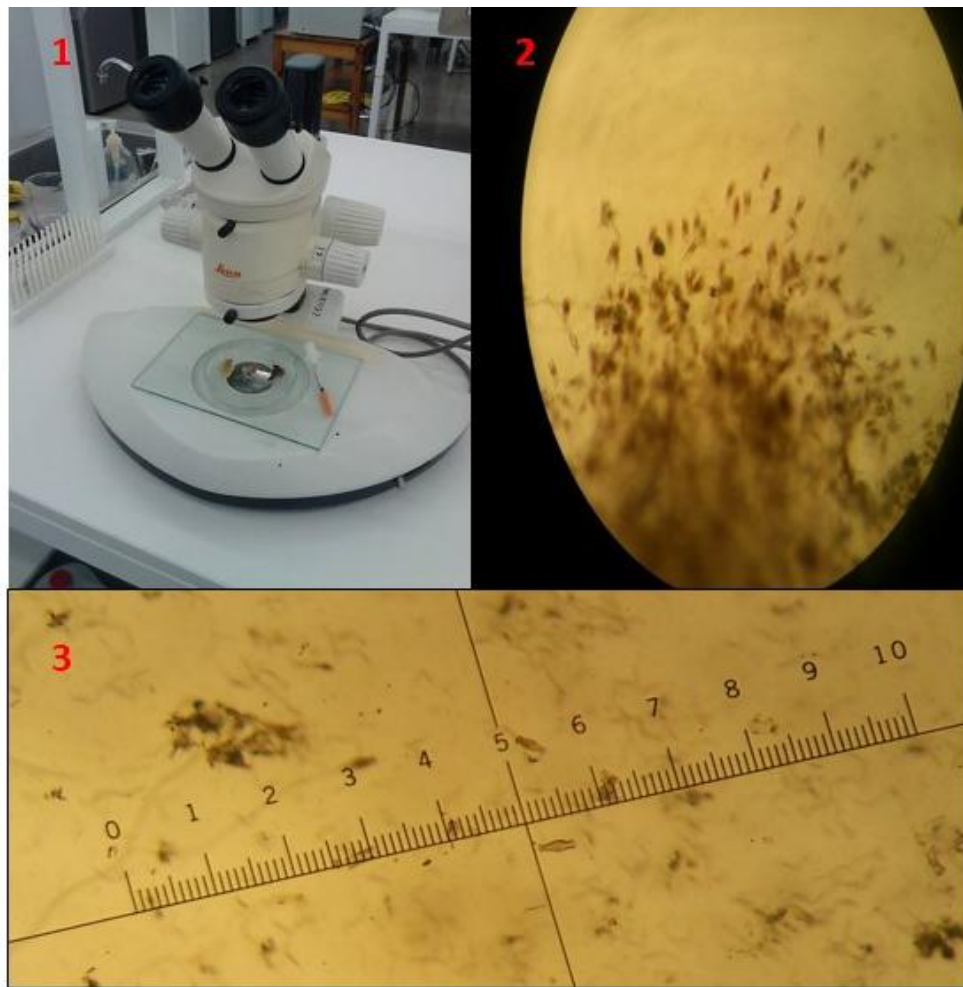


Figura 4. Etapas de aislamiento de células de *Didymo* en el Laboratorio de Genética Marina del Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, UACH. **1:** aislamiento bajo lupa con aguja de insulina, **2:** pool de células aisladas en lupa a 4.0X y **3:** medida de una célula de *Didymo* en milímetros. Fuente: Angélica Jaramillo O.

Se realizó un análisis macroscópico y microscópico de las muestras para establecer si el tipo de coloración de las matas de esta diatomea, permitían entender y a la vez extraer la mejor cantidad de ADN (Figura 5).



Figura 5. Aspectos macroscópicos de matas de Didymo. De izquierda a derecha: **1** mata blanca, **2** mata parda y **3** mata café oscuro. Fuente: Angélica Jaramillo O.

B- Colecta de muestras desde distintas áreas geográficas

Los ríos muestreados fueron los siguientes:

- 1.** Río Biobío
- 2.** Río Curriñe
- 3.** Río Fuy
- 4.** Río Pollux.

En la primera localidad, Araucanía se muestreo todo el tramo alto. Destacando las localidades de Rahue, Tucapel, Lollen y Caracoles. Se realizaron 3 transectos separados cada 1km, los que fueron georreferenciados (Tabla 1 y Figura 6). Las muestras fueron fijadas en etanol al 70% y trasladadas al laboratorio donde se aislaron siguiendo el protocolo descrito previamente.

Tabla 1. Ríos muestreados, ubicación geográfica y altura o metros sobre el nivel del mar (msnm).

Cuenca	Estación	Fecha	Localización		Altura (m.s.n.m)
			Latitud (S)	Longitud (O)	
1. Río Biobío	A. Caracoles	01-11-2014	38°20'29.27''	71°17'35.43''	824
	B. Rahue	01-11-2014	38°24'28.85''	71°14'46.81''	873
	C. Lollen	01-11-2014	38°28'25.11''	71°14'10.03''	899
	D. Tucapel	01-11-2014	38°35'13.07''	71°8'19.37''	966
2. Río Valdivia	A. Fuy	10-10-2014	39°49'30.74''	71°56'17.24''	587
	B. Fuy	10-10-2014	39°49'25.37''	71°59'47.28	549
3. Río Bueno	A. Curriñe	16-11-2014	40°12'46.69''	72°0'7.02''	146
4. Río Aysén	A. Pollux	12-11-2014	45°41'28''	72°03'24''	358

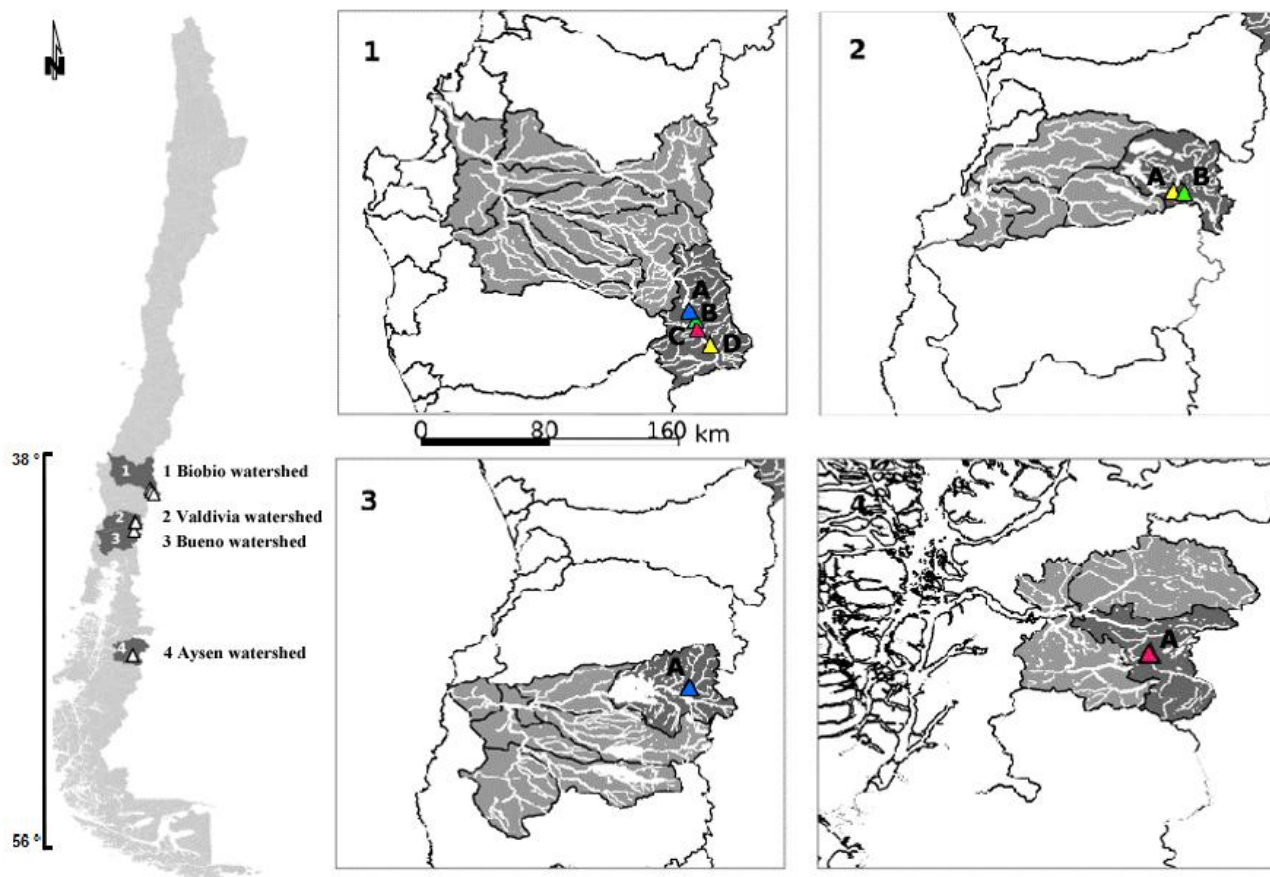


Figura 6. Mapa de Chile con el detalle de los ríos distantes seleccionados, infestados por *Didymo*, donde se realizó la recogida de muestras fitobentónicas. Aparecen barras escala indicando el rango aproximado de distribución actual de *D. geminata* I) Región de la Araucanía. II y III) Región de los Ríos y IV) Región de Aysén. Atributos específicos de los ríos y los sitios estudiados se muestran en la Tabla 1.

C- Desarrollo de un protocolo de extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico desde la diatomea, se probaron los siguientes protocolos:

- CTAB + Proteinasa K (Craig et al. 2006) Anexo 1.

- CTAB + Chelex-100 (CTABCH) (Uyua et al. 2014)
- Kit de extracción comercial Invitrogen Chargeswitch

Para probar estos protocolos se procedió a aislar 1000 células con una aguja de insulina, pero la cantidad de ADN obtenido era mínimo para realizar una PCR (alrededor de 2.4ng/ul), por lo que se procedió a seleccionar las matas pardas desde donde se eliminaron las células de otros organismos, las cuales ocupaban alrededor de un 10% del volumen total. Se trabajó con alrededor de 100 mg de células, las cuales fueron pesadas en un tubo eppendorf. En el mismo tubo se procedió a practicar la extracción de ADN. Cada extracción de ADN fue cuantificada en un Nanodrop-1000, donde además se analizó su calidad, con las razones de 260:280 y 260:230. Además, cada extracción de ADN fue visualizada en un gel de agarosa al 1% teñido con red gel.

D.- Desarrollo de marcadores moleculares específicos para Didymo

La base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/) libero dos secuencias de Didymo en el año 2014. El marcador genético 18S con una secuencia obtenida de 1025 pares de bases (pb) (Craig et al. 2006) y el genoma completo del cloroplasto de 117.972 pb (Ruck et al. 2014). Estas fueron la base para desarrollar partidores específicos para esta tesis. El diseño de los partidores se llevó a cabo en el programa PRIMER-BLAST, software de libre acceso disponible en NCBI, donde se seleccionaron los partidores tomando en cuenta la Temperatura de Melting (TM), la concentración de GC y la formación de dímeros.

Para el desarrollo de los experimentos de PCR se utilizó un volumen final de 12.5ul conteniendo 1X PCR buffer, 5mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 1μM de cada primer, 0,24mg/ml de BSA, 0.02 unidades de DNA polimerasa (Invitrogen). Para el gen Rbcl, el programa del termociclador incluye una denaturación inicial (94°C por 2 min); 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 s, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min); y una extensión final (72°C por 5 min). Para el gen 18S se utilizó el siguiente ciclo de termiciclado: una etapa de denaturación inicial (94°C por 2 min); 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 s, 64°C por 1 min y 72°C por 2 min); y una extensión final (72°C por 5 min). Se seleccionaron 2 muestras con un volumen de

12.5ul los cuales fueron purificados usando el Kit de purificación E.Z.N.A.® Cycle Pure (Omega Bio-tek). La purificación del producto PCR fue secuenciada en el core facility Austral-omics (<http://www.australomics.cl/>) de la Universidad Austral de Chile usando el secuenciador automático ABI Prism 310.

Análisis de Datos

A- Diversidad genética

Con el programa ProSeq v2.9 (Filatov 2002) se procedió a identificar los sitios polimórficos (S). La Diversidad genética en las muestras de Didymo en Chile fue estimada determinando los índices estándares de diversidad y el nivel de diversidad presente, todo esto en el programa DnaSP V5.10 (Rozas et al. 2010).

Los índices estimados fueron:

- Hd : Diversidad genética total
- Π : Diversidad nucleotídica
- K : N° promedio de diferencias entre pares de secuencias

B- Relaciones filogenéticas

Para enriquecer el conjunto de datos con nuevas secuencias de diatomeas, se extrajeron secuencias desde la base de datos publica de Genbank (Benson et al. 2014). Recientes evidencias moleculares sobre Bacillariophyceas (Kermarrec et al. 2011, Craig et al. 2014, Nakov et al. 2014), demostraron que el género *Didymosphenia*, actualmente asignado a la familia de las Gomphonemataceae, está estrechamente relacionado con la familia de las Cymbellaceae. De este modo, desde GenBank se descargaron secuencias de especies de Gomphonemataceae y Cymbellaceae, para posteriormente analizar las relaciones con el género *Didymosphenia* (Anexo 2 y 3). Un grupo de Encyonemas se utilizó para enraizar el mejor modelo de reconstrucción filogenética para el gen 18S y Rbcl; esta especie según Nakov et al. (2014) corresponde al grupo

externo más adecuado. En la base de datos de GenBank se encontraron dos secuencias de Didymo que recientemente están disponibles, estas secuencias corresponden a la especie *Didymosphenia dentata* y *Didymosphenia geminata*, estas también fueron incorporadas en los análisis (Anexo 2 y 3).

La reconstrucción filogenética se realizó desde un alineamiento de secuencias de un total de 832 pb para el gen 18S y 649 pb para el gen RbcL. Utilizando el programa Mega v6.0 (Tamura et al. 2013) se procedió a construir árboles filogenéticos. La búsqueda del mejor árbol se realizó utilizando el modelo de Maximum Composite Likelihood (ML) (Tamura & Nei 1993) con 1,000 bootstrap como soporte de nodos. Basados en la estrategia de selección de Akaike como esta implementada en el programa JModelTest v2.1.7 (Darriba et al. 2011) se buscó el mejor modelo descriptivo de evolución el cual fue GTR para ambos marcadores genéticos con una proporción de sitios invariables y distribución gamma. Seleccionado el modelo se procedió en la búsqueda y construcción del mejor árbol mediante la utilización de la aproximación filogenética de Inferencia Bayesiana (BI) en el programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist et al. 2012). Este análisis bayesiano comenzó con la estructuración al azar de un árbol y simultáneamente se estructuraron 3 cadenas de Markov. Estos análisis de cadenas de Markov (MCMC) fueron realizadas para 5.000.000 de generaciones, con muestras de árboles filogenéticos cada 5000 generaciones. El primer 1.000.000 de muestras de árboles filogenéticos fueron descartadas, estas muestras fueron consideradas como la base prueba y los 4.000.0000 de árboles restantes fueron utilizados para construir el árbol definitivo o árbol consenso con probabilidad a posterior.

Una vez determinada las relaciones filogenéticas entre las microalgas, se construyó una matriz de distancia genética para Didymo en el programa Mega v6.0 (Tamura et al. 2013) y con el programa PRIMER v.6.0 (Clarke K. & Gorley R. 2006), se analizó la gráfica de esta distancia construyendo un análisis multidimensional.

RESULTADOS

A- Desarrollo de un protocolo de extracción de DNA

El análisis microscópico de las muestras estableció que las matas pardas eran ideales para extraer DNA, ya que estaban en un 90% libre de otros organismos y su aislamiento era más fácil. Las matas blancas por el contrario eran solo los pedúnculos de polisacáridos de *Didymo* y no traían células viables. Por ultimo las matas café oscuro presentaban una alta cantidad de sedimento y otros organismos, los cual imposibilitó aislar células de *Didymo*.

Los métodos con los cuales obtuvimos un ADN amplificable y de calidad fueron el de CTAB + PK y con el Kit de Extracción comercial Invitrogen Chargeswitch (Figura 7). Con 100 mg de células obtuvimos alrededor de 20ng/ul de ADN con absorbancias de 260:280 de 1.7 y 260:230 de 1.5 para el método CTAB + PK. Para el método con kit comercial se obtuvo un ADN de mejor calidad, pero en menor cantidad, alrededor de 10ng/ul con razones de absorbancia de 260:280 de 2 y de 260:230 de 1.8 (Figura 8). Con el método CTAB + CHELEX se obtuvo por sobre los 400ng/ul de ADN, con razones de absorbancias de 260:280 de 0.7 y 260:230 de 0.5. Pero como el quelex es una resina quelante, esta interfería con los reactivos de la PCR no logrando ser amplificado.

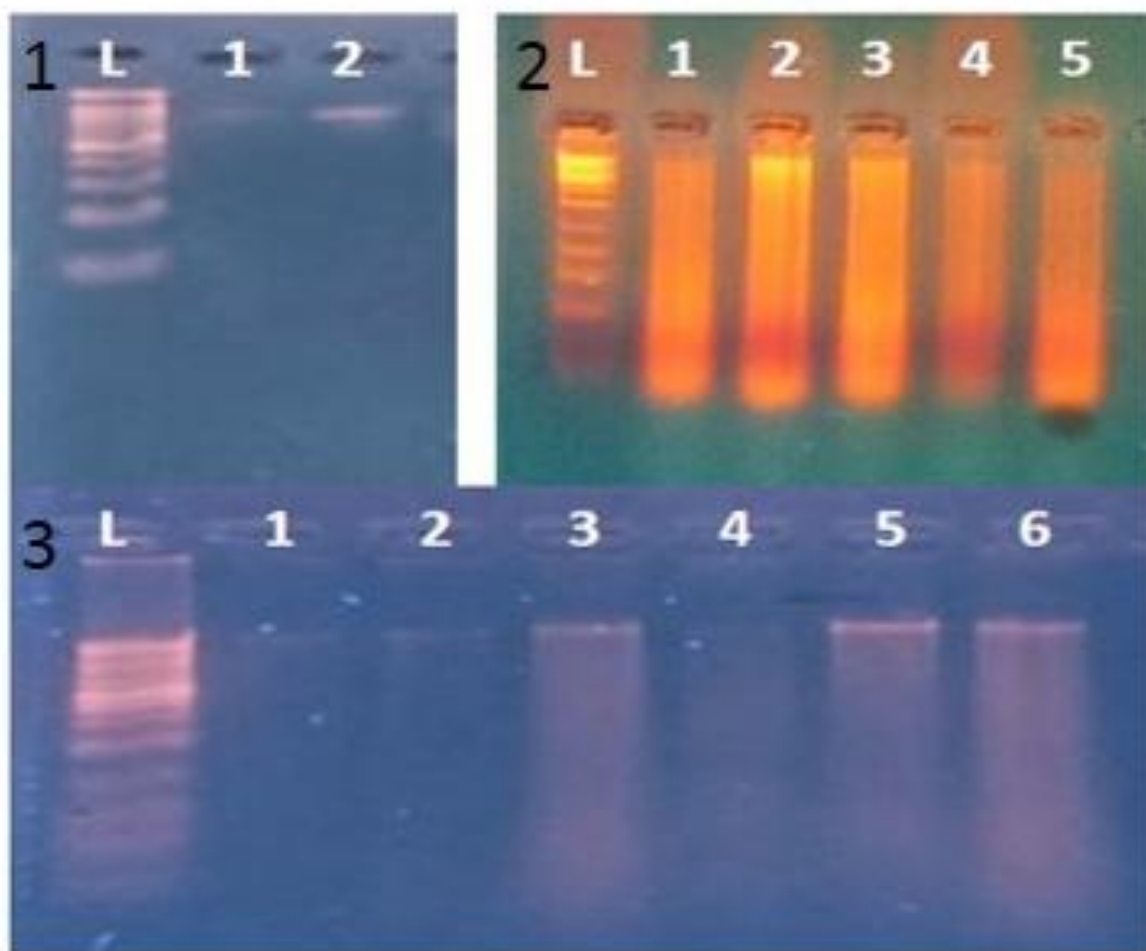


Figura 7. Geles de agarosa al 1% con un estándar de peso molecular de 1Kb (L). Se representan los 3 métodos de extracción de DNA. 1: Extracción con kit comercial cada número corresponde a una extracción diferente; 2: extracción con CTAB + CHELEX y 3: extracción con CTAB + PK.

B- Desarrollo de marcadores moleculares y amplificación por PCR

Las secuencias de los partidores diseñados para cada uno de los genes seleccionados como marcadores moleculares es la siguiente:

Rubisco: Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad 1 (rbCL)

Partidor Forward: 5'-ACCAACAACGTACCAGCGT-3'

Partidor Reverse: 5'-TGGGATGCTTCATACGCAGT-3'

18S: Pequeña subunidad del ribosoma (SSU) rRNA

Partidor Forward: 5'-TCAGTCGTTCAAAGCAGAC-3'

Partidor Reverse: 5'-TTCAATCGGTAGGTGCGAG-3'

La figura 8, muestra la amplificación de los genes 18S y Rbcl. En ambos se obtuvo un amplicón del tamaño esperado y solo una banda para cada gen.

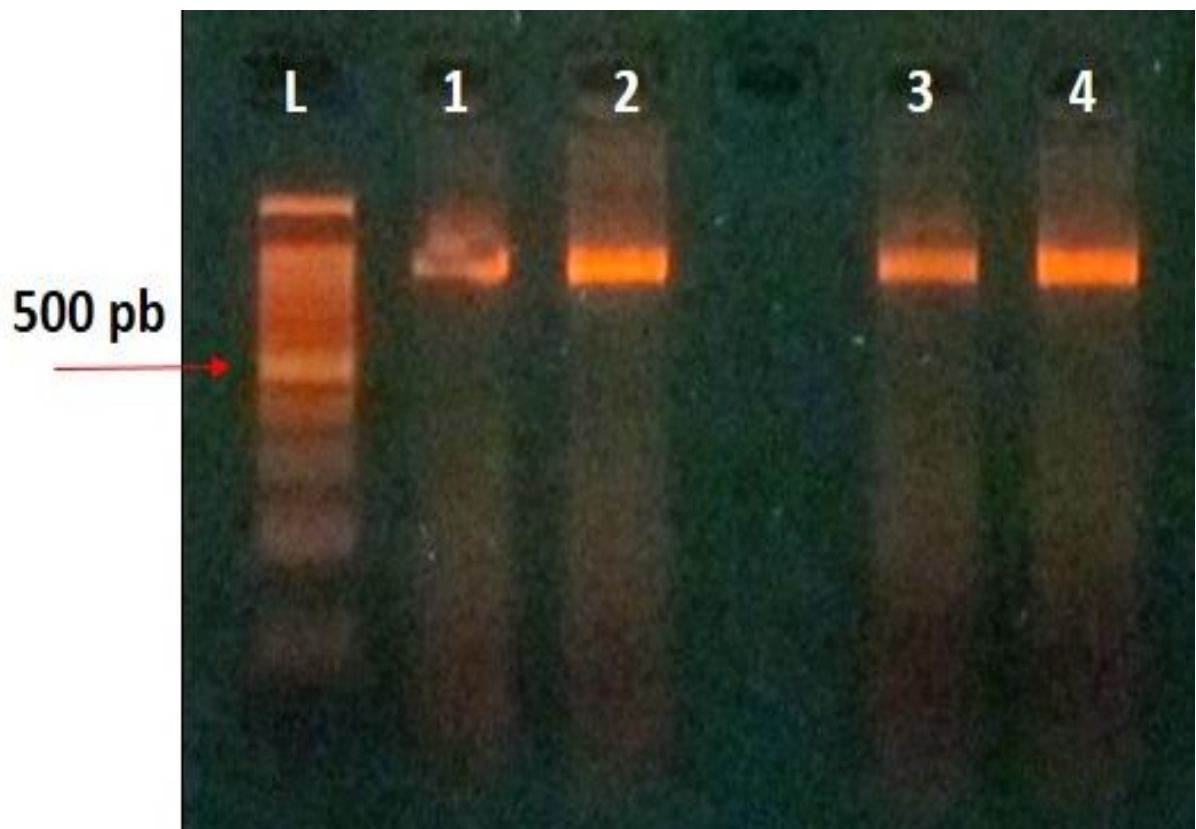


Figura 8. Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación por PCR de los marcadores genéticos 18S y Rbcl. L representa el estándar de peso molecular (100 pb); 1 y 2 corresponden al gen Rbcl, (tamaño esperado 1000 pb), respectivamente. 3 y 4 muestran amplicones del gen 18S (tamaño esperado 1000 pb).

Análisis de datos

A- Diversidad genética

Con un total de 7 muestras de *Didymo* provenientes de 4 ríos a lo largo de Chile se procedieron a secuenciar los genes *Rbcl* y *18S*. Se obtuvieron un total de 832 pb para *18S* y 799 pb para *Rbcl*.

Para el gen *18S*, no se encontraron sitios polimórficos entre las muestras chilenas, pero para el gen *Rbcl* se encontró un total de 53 sitios polimórficos. Para el análisis de diversidad genética utilizando el gen *Rbcl* se incluyeron las secuencias de *Didymo* disponibles en GenBank, correspondiente a una muestra de USA y una de Rusia. De este modo, se encontraron un total de 6 haplotipos, en donde las localidades de Coyhaique, Rahue, Fuy y USA comparten un mismo haplotipo. Se encontró para las muestras chilenas de *Didymo* una diversidad genética total de (H_d) de $0,83 \pm 0,02$; una diversidad nucleotídica (π) de 0,023 y el número promedio de diferencias entre pares de secuencias (k) de 19,80. En total, de los 799 pb utilizados, 746 fueron sitios invariables, 53 sitios fueron polimórficos y 40 fueron parsimoniosamente informativos.

Las estimaciones de la divergencia evolutiva entre las secuencias son representadas en la Tabla 2. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de Maximum Composite Likelihood. La tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 2). El análisis incluyó a 10 secuencias de nucleótidos, las que corresponden a 7 secuencias chilenas de *Didymo* (1 por cada localidad muestreada), más una secuencia de *Didymosphenia geminata* de Rusia y una de USA, además, se añadió la única secuencia de *Didymo*, pero de otra especie, *Didymosphenia dentata*.

En la tabla N° 2 se expone que las secuencias de Fuy, USA, Rahue y Coyhaique comparten un haplotipo común y poseen la mayor distancia genética con la localidad de Lollen (7.1%). Las localidades de Fuy, Coyhaique, Rahue y USA poseen la menor distancia genética (con 0% de divergencia).

Esto también está representado en una matriz de escalamiento multidimensional (nMDS) en donde se muestran las 4 localidades con menor distancia genética en un mismo punto y la

localidad más alejada es la que posee la mayor distancia genética, en este caso la localidad de Lollen (Figura 9)

Tabla 2. Distancia genética entre las muestras de *Didymo* chilenas (1-7), aquellas obtenidas desde GenBank (8 y 9) y la secuencia de *Didymosphenia dentata* (10). Debajo de la diagonal se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre las secuencias representadas en porcentajes. La estimación del error estándar (s) se muestran por encima de la diagonal y se obtuvieron por un procedimiento de bootstrap (1000 repeticiones).

	CODIGO	LOCALIDAD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	DCA	CARACOLES		0,009	0,005	0,008	0,009	0,008	0,009	0,009	0,009	0,01
2	DRA	RAHUE	5,30%		0,011	0,003	0	0,002	0	0	0,002	0,004
3	DLO	LOLLEN	1,70%	7,10%		0,01	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012
4	DTU	TUCAPEL	4,30%	0,90%	6,10%		0,003	0,004	0,003	0,003	0,004	0,005
5	DFU	FUY	5,30%	0%	7,10%	0,90%		0,002	0	0	0,002	0,004
6	DCU	CURRIÑE	4,90%	0,50%	6,70%	1,30%	0,50%		0,002	0,002	0,002	0,004
7	DCO	POLLUX	5,30%	0%	7,10%	0,90%	0%	0,50%		0	0,002	0,004
8	DUS	USA KC509523.1	5,30%	0%	7,10%	0,90%	0%	0,50%	0%		0,002	0,004
9	DRU	RUSIA KJ011820.1	5%	0,30%	6,80%	1,10%	0,30%	0,50%	0,30%	0,30%		0,004
10	DDE	DENTATA KJ011818.1	5,80%	1,3%	7,70%	2,20%	1,30%	1,50%	1,30%	1,30%	1,30%	

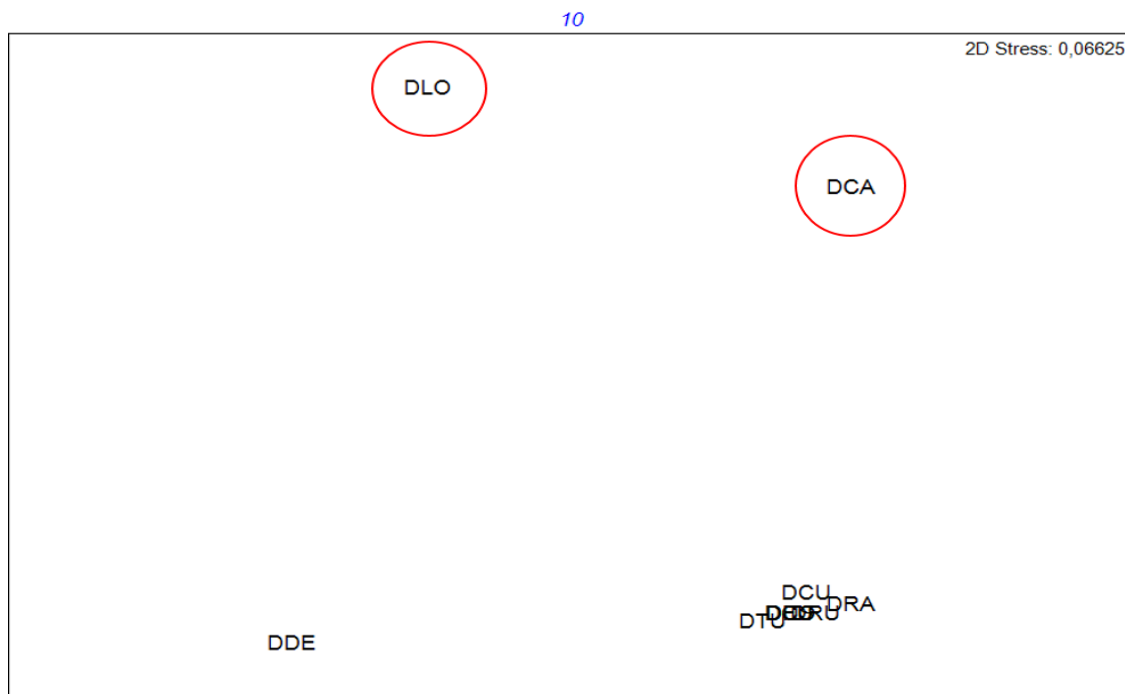


Figura 9. Escalamiento Multidimensional (nMDS) a partir de distancias genéticas de las muestras de Didymo chilenas con aquellas de la base de datos de genbank. Los sitios de muestreo corresponden a: DCU: Curriñe, DLO: Lollen, DCA: Caracoles, DTU: Tucapel, DRU: Rusia, DRA: Rahue, DCO: Coyhaique, DUS: Estados Unidos, DFU: Fuy, DDE: *Didymosphenia dentata*.

B- Relaciones Filogenéticas

Se realizó una reconstrucción filogenética basado en una aproximación de ML como esta implementado en el programa Mega.

En la Figura 10 para el marcador genético 18S, el análisis incluyo un grupo externo correspondiente a especies del genero Encyonemas (color amarillo). Aquí la filogenia revela un clado compuesto exclusivamente por muestras de Didymo (rojo), algunas especies de Cymbellas (azul) y una única secuencia de otra especie d Didymo la que corresponde a *Didymosphenia dentata* (negro) con un soporte de bootstrap de 98%.. El clado de las Gomphonemas (verde) revela la mayor distancia genética que posee con Didymo.

La Figura 11 muestra la reconstrucción filogenética basado ML para el gen Rbcl. Para este análisis se utilizó a un grupo de Encyonemas (amarillo) como grupo externo. En esta reconstrucción nuevamente Didymo (rojo), algunas especies de Cymbellas (azul) y la única secuencia del genero Didymosphenia, la que corresponde a *Didymosphenia dentata* (negro) conforman un clado con un soporte de bootstrap de 95%. Sin embargo las muestras de Lollen (DLO) y Caracoles (DCA) quedan en otro subclado relacionadas con la familia de las Gomphonemataceae.

Se realizó un análisis de Inferencia bayesiana en donde el mejor modelo fue GTR para los genes 18S y Rbcl. Con el fin de observar la cercanía o relaciones que hay entre las muestras de Didymo chilenas y extranjeras con todo un grupo de diatomeas. Para este estudio se incluyeron todas las secuencias de los géneros relacionados a Didymosphenia según trabajos de Nakov et al. (2014), es decir, secuencias de Cymbellas, Gomphonemas, Encyonemas y una especie de Didymo descrita recientemente, *Didymosphenia dentata*. Se utilizó como grupo externo a un grupo de Encyonemas (Figura 12 y 13). Se utilizaron un total de 832 pb para el marcador nuclear 18S y para el marcador plástidial Rubisco un total de 649 pb. Para ambos genes el soporte de nodos mínimo mostrado es 50% y sobre cada nodo se adjunta los valores de MrBayes/ML. Este análisis de Inferencia Bayesiana muestra una topología similar a la presentada en la reconstrucción con la aproximación de ML Figura 10 y 11. Para el gen Rbcl el árbol consenso resultante es mostrado en la Figura 12. En este caso, el clado de Didymo queda con un soporte del 95% de ML y cercano a especies del genero Cymbellas. Aunque, las muestras de Lollen (DLO) y Caracoles (DCA) forman un subclado aparte con un soporte de 93% de probabilidad posterior. Para el caso del gen 18S, el árbol consenso es mostrado en la Figura 13 y se observa que el clado de Didymo incluye las muestras de Lollen y Caracoles en conjunto con otras especies de Cymbellas.

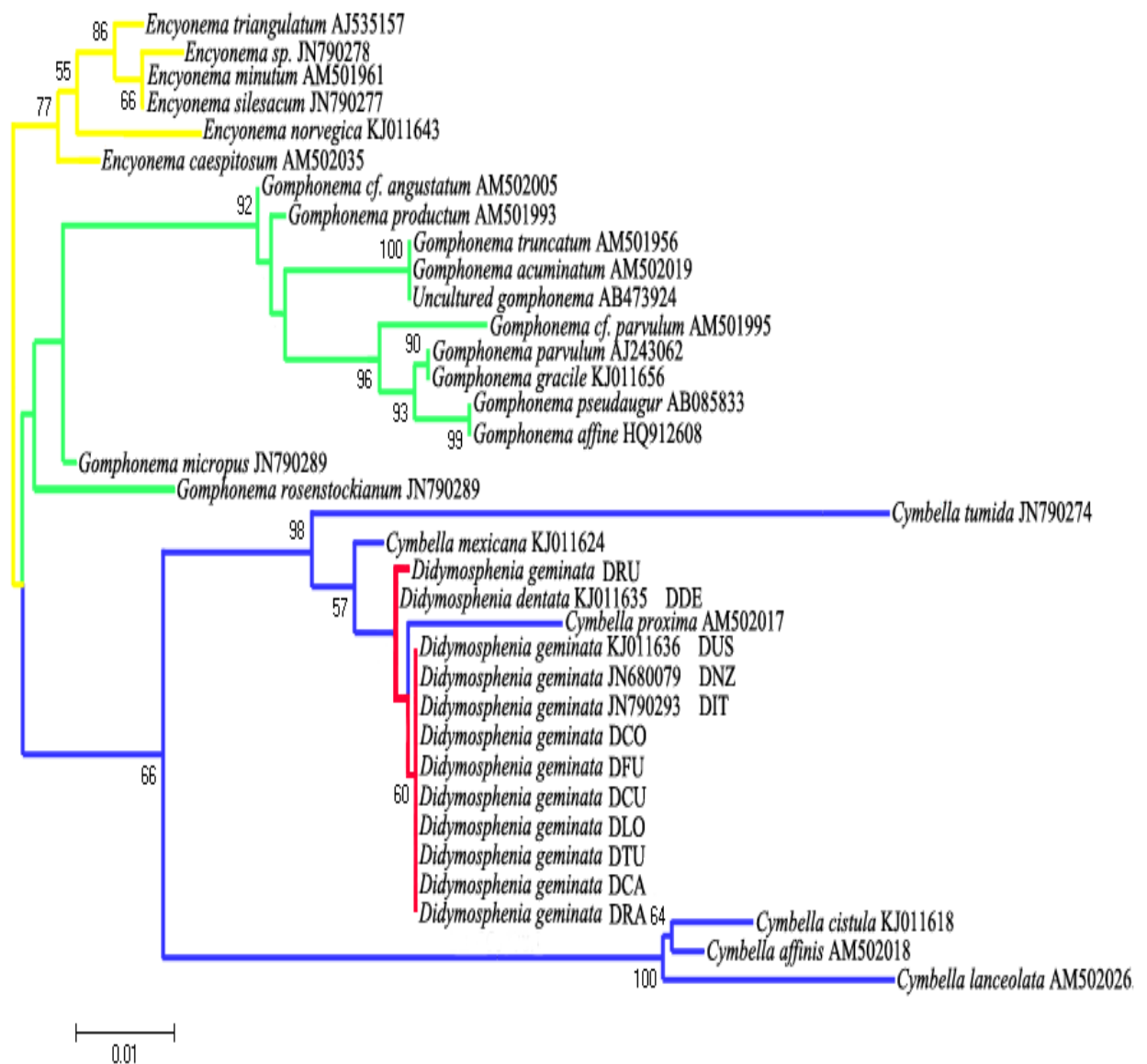


Figura 10. Reconstrucción filogenética para el marcador genético 18S. Se utilizó el modelo de Máximo Composite Likelihood (ML) (Tamura & Nei 1993) con 1,000 bootstrap como soporte de nodos. Cada género es representado de un color diferente. El soporte de nodos mínimo mostrado es del 50%.

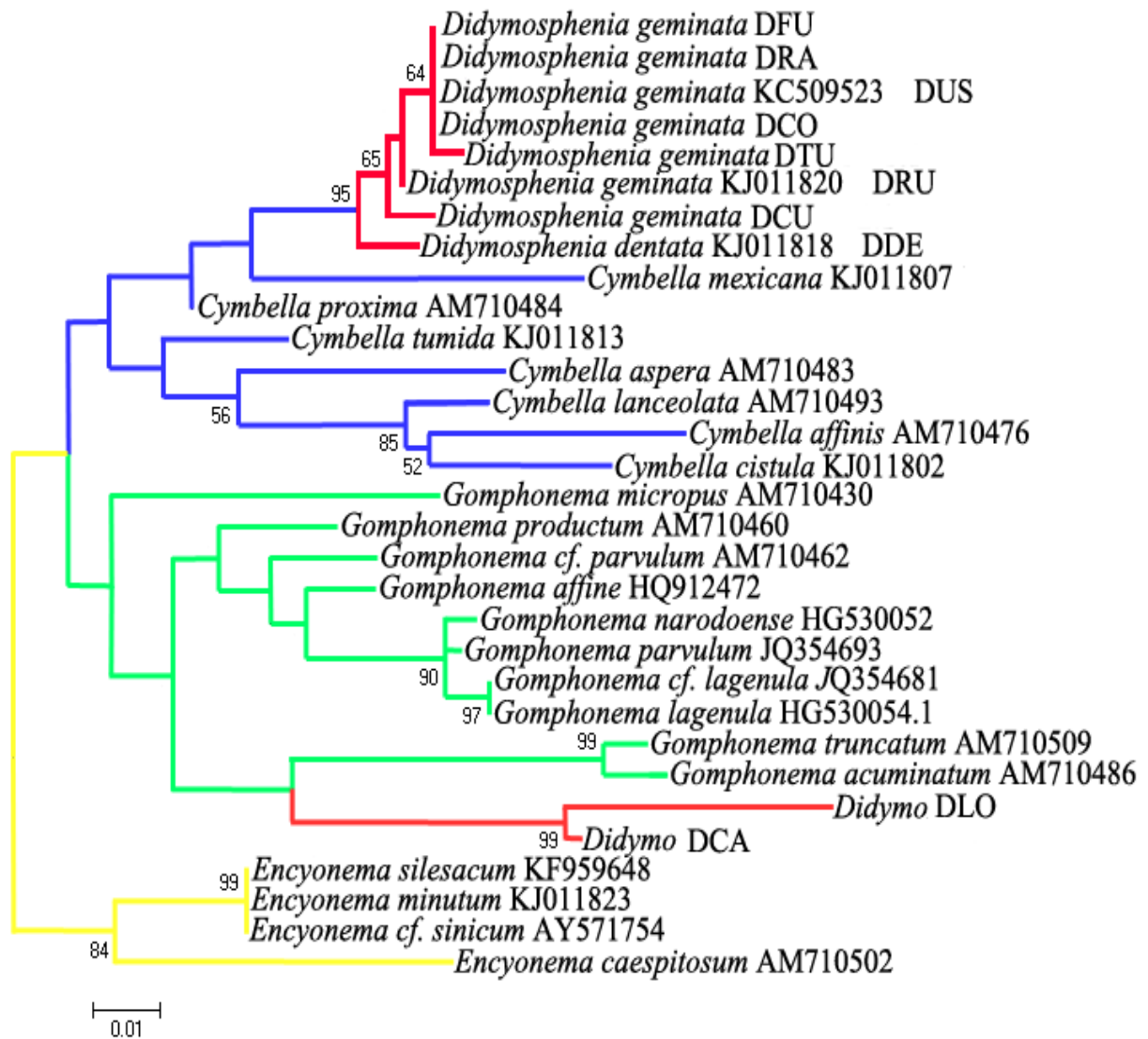


Figura 11. Reconstrucción filogenética para el marcador genético Rbcl. Se utilizó el modelo de Máximo Composite Likelihood (ML) (Tamura & Nei 1993) con 1,000 bootstrap como soporte de nodos. Cada género es representado de un color diferente. El soporte de nodos mínimo mostrado es del 50%.

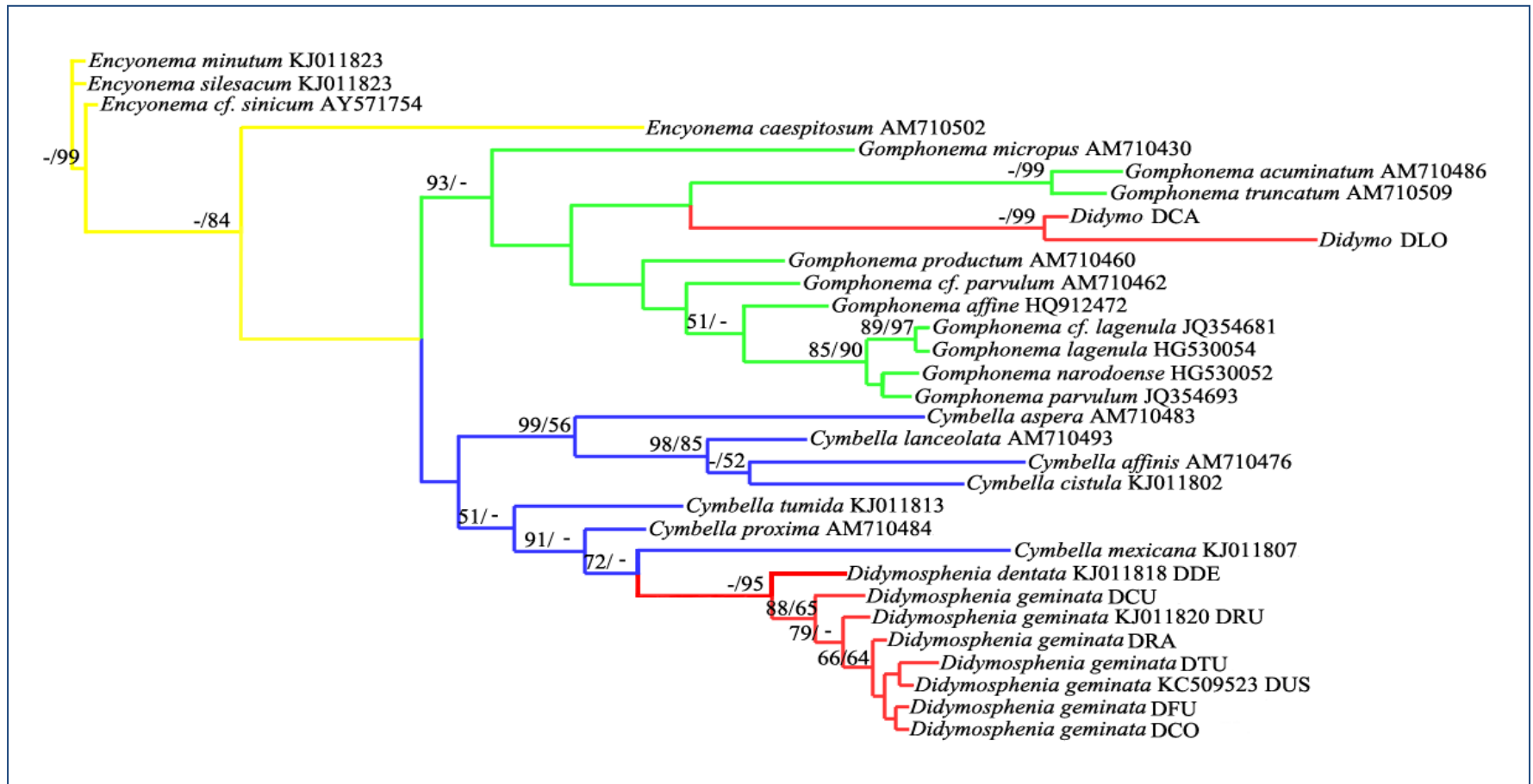


Figura 12. Filograma consenso del analisis bayesiano para el gen Rbcl. El grupo externo *Planothidium* se utilizo para enraizar el arbol. Cada genero es representado de un color diferente. Los numeros sobre los nodos representan el soporte estadistico para cada uno de los metodos utilizados. A la izquierda el soporte estadistico para el analisis bayesiano (en porcentaje) y a la derecha el soporte estadistico para el analisis de ML. Solo aquellos valores sobre 50% son mostrados. $-\ln$ 2544.76085.

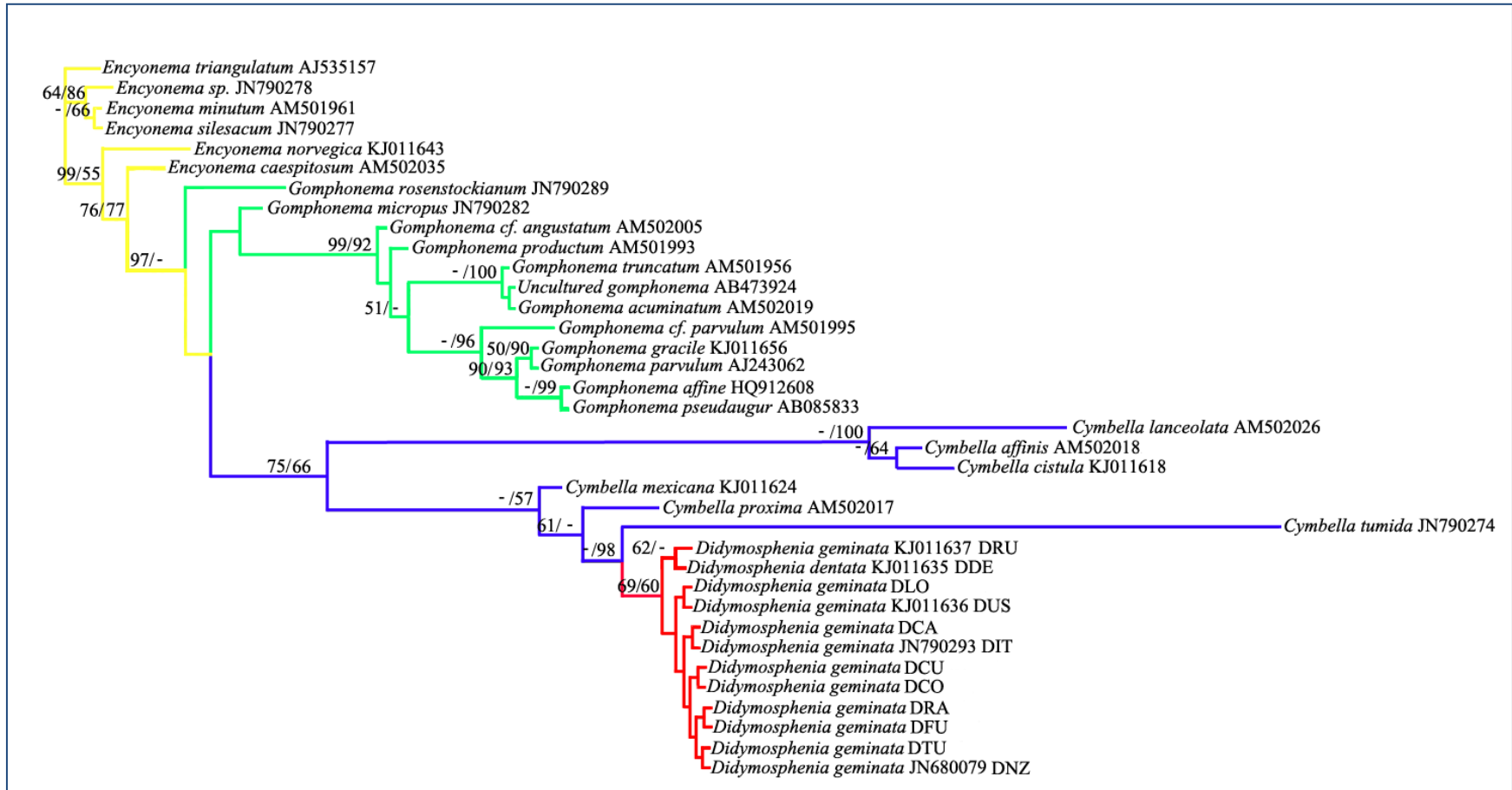


Figura 13. Filograma consenso del analisis bayesiano para el gen 18S. El grupo externo *Encyonemas* se utilizo para enraizar el arbol. Cada genero es representado de un color diferente. Los numeros sobre los nodos representan el soporte estadistico para cada uno de los metodos utilizados. A la izquierda el soporte estadistico para el analisis bayesiano (en porcentaje) y a la derecha el soporte estadistico para el analisis de ML. Solo aquellos valores sobre 50% son mostrados. -ln 2414.58700.

DISCUSIÓN

Uno de los resultados más importantes es que se logró estandarizar un método de extracción de ADN desde muestras del campo, el cual es amplificable por PCR y reproducible. Factores intrínsecos (propios de la muestra) que deben ser considerados al momento de realizar experimentos de extracción de ADN y amplificación de genes por PCR, son por ejemplo: la composición de la muestra ambiental asociada (población microbiana asociada) o en el caso de *Didymo* las sustancias propias del metabolismo de la especie, como son el mucilago que sirve para fijar el alga al sustrato y constituye el principal componente de las colonias que crecen durante los florecimientos algales (Jones et al. 2014). Por ejemplo, Craig et al. (2006) realizaba un raspado de la roca donde el *Didymo* se adhería, extrayendo a la vez no solo *Didymo* sino, que también otras diatomeas y compuestos asociados, lo que podría afectar la reproducibilidad de su método. Nosotros logramos determinar cuáles eran las matas de *Didymo* exactas para extraer ADN evitando así la contaminación por otros organismos o sedimento, modificando así el protocolo original de esta autora, para lograr la optimización de la extracción de ADN y su eventual amplificación.

También existen factores intrínsecos (ajenos a la muestra) que podrían inhibir la PCR y están asociados a compuestos químicos de la extracción de ADN, como por ejemplo alcoholes y sales amplificadas en la precipitación del ADN (Jones et al. 2014). Uyua et al. (2014) añadió al protocolo de Craig et al. (2006) una resina quelante llamada CHELEX, la cual si bien optimiza notablemente la cantidad total de ADN extraído, no es eficiente al momento de amplificar en una PCR, principalmente debido a que la resina puede interactuar con algunos otros químicos usados en la PCR haciendo difícil la amplificación del gen de interés. Por otro lado, lo que este autor desarrolla es un método solo para extraer una alta cantidad de ADN desde un pool de células que si bien permiten informarnos sobre posibles métodos de extracción desarrollados, no aportan nada relevante si lo que pretendemos es desarrollar métodos genéticos de detección de la especie en nuevos cuerpos de agua libres de *Didymo*.

Posteriormente tuvimos éxito en desarrollar los partidores específicos, estableciendo que el género *Didymosphenia* se encuentra en nuestro país y que en varios puntos muestreados, se encontraba la especie *Didymosphenia geminata*.

Existe una amplia cantidad de códigos de barras utilizados en plantas como las regiones plastidiales: Rbcl, matK, trnH-psbA, el gen 23S ARNr, los mitocondriales, cox1 y los marcadores nucleares ITS, 18S rRNA, 28S (Evans et al. 2007, Zimmermann et al. 2011). Sin embargo para las diatomeas se han utilizado Rbcl como marcador plástidial, el cox1 que es mitocondrial y a nivel nuclear SSU (18S), el LSU (28S) y el ITS (Leliaert et al. 2014).

El marcador genético nuclear 18S que se usó para este estudio es un marcador muy utilizado para la identificación de diatomeas (Evans et al. 2007). Es un marcador altamente conservado exhibiendo a la vez bajas tasas de mutación en diatomeas en general, debido a su baja variación intraespecífica y alta variación interespecífica (Zimmermann et al. 2011). Una ventaja adicional del marcador 18S es su alta representación en las bases de datos, permitiendo una correcta identificación si se depende de datos de referencia (Zimmermann et al. 2011).

Por otro lado, el marcador plástidial Rbcl es un gen que codifica proteínas facilitando el alineamiento de las secuencias, debido a la ausencia de gaps (Evans et al. 2007). Además, Rbcl es mucho más variable que el gen 18S permitiendo obtener una resolución a nivel intraespecífica. Al ser un gen plástidial es mucho más específico, evitando así, la amplificación de contaminantes de las muestras ambientales, como hongos, (Evans et al. 2007).

La hipótesis filogenéticas presentadas en esta tesis concuerda en su mayoría en agrupar en un mismo clado las especies de *Cymbella* con las muestras chilenas de *Didymo* y las muestras de *Didymosphenia geminata* obtenidas desde GenBank. Específicamente las especies *Cymbella mexicana*, *Cymbella proxima* y *Cymbella tumida* están siempre en un mismo clado con las muestras de *Didymo*. Sin embargo algunas diferencias son observadas entre las hipótesis presentadas por el gen 18S y el gen Rbcl. Estas diferencias son principalmente que las muestras de Lollen (DLO) y Caracoles (DCA) quedan fuera del subclado de *Didymo* y forman un subclado diferente para los análisis con el gen Rbcl, más aún las diferencias genéticas entre estas y el resto de las muestras de *Didymo* en Chile evidencian un total de 53 mutaciones de diferencias. Estas diferencias entre los resultados de los genes podrían deberse a varios factores:

(1) el tipo de herencia del cloroplasto podría no ser uniparental, por lo que podría existir más de una copia del gen Rbcl dentro de una célula de diatomea (Casteleyn et al. 2009; Jensen et al. 2003; Ghiron et al. 2008; Ronda et al. 1990) y a la vez pueden existir los híbridos naturales

dentro de las poblaciones ya que los loci de cloroplastos se heredan de una manera diferente que el ADN nuclear (Casteleyn et al. 2009).

(2) debido a que el gen *Rbcl* es más variable que el gen 18S en las muestras de *Didymo* chilenas, las diferencias encontradas podrían deberse a que existe más de una especie de *Didymo* en Chile. Esto se concluye debido a que ha aumentado notablemente la cantidad de resoluciones dictadas por SERNAPESCA que amplían el rango de invasión de *Didymosphenia geminata* hacia nuevas áreas libres, a lo que además se suma el reconocimiento de 11 especies del género *Didymosphenia*, las cuales están descritas en base a diferencias de la morfología del frústulo (Canter-Lund y Lund, 1995). Sin embargo la falta de acuerdo sobre los límites taxonómicos de las especies, dificulta la interpretación de la evolución y distribución pasada y presente (Whitton et al. 2009).

En la actualidad se reconocen 11 especies válidas para el género *Didymosphenia* (Tabla 3) pero solo dos de ellas contiene información genética disponible, esta es *D. geminata* y *D. dentata*. De este modo, incertezas taxonómicas en la clasificación de estas diatomeas y la falta de información genética disponible podrían incidir en que las hipótesis filogenéticas estén incompletas y grupos monofiléticos sean aun difíciles de identificar.

Tabla 3. Especies del genero *Didymosphenia* descritos hasta la actualidad. Whitton B., Ellwood N. & Kawecka B. 2009. Biology of the freshwater diatom *Didymosphenia*: a review. *Hydrobiology* 630(1) 1-37.

Especie
<i>Didymosphenia clavaherculis</i>
<i>D. curvata</i>
<i>D. curvirostrum</i>
<i>D. dentata</i>
<i>D. geminata</i>
<i>D. lineata</i>
<i>D. neocaledonica</i>
<i>D. pumila</i>
<i>D. siberica</i>
<i>D. tatrensis</i>
<i>D. fossilis</i>

(3) El concepto de especies en algas es también debatible, debido a que conceptos tradicionales como el biológico o el filogenético se ven muchas veces invalidados por características del ciclo de vida de estas especies y/o por contactos secundarios entre taxas diferentes.

En la literatura existe una amplia variedad de conceptos de especies en algas, pero aunque muchos de los conceptos de especie estén relacionados, ninguno es completamente satisfactorio, y la mayoría son al menos parcialmente incompatibles, lo que puede conducir a diferentes conclusiones con respecto a límites de las especies (Leliaert et al. 2014). Estos debates sobre el concepto de especie, pueden llegar a algún consenso, pues las especies no son solamente una unidad biológica, sino que además, podrían ser el resultado de una interrupción del flujo genético en las poblaciones, que conllevan a divergencias debido a la selección y la deriva génica, dando como resultado linajes metapoblacionales (Leliaert et al. 2014). Aquí las especies mostrarían mayor independencia evolutiva entre sí, integrando a las poblaciones dentro de una misma especie lo que estará sujeto a la cantidad de genes que se traspasan entre los linajes y el momento de la separación de los linajes. Cuando dos linajes se separan pueden adquirir eventualmente

propiedades diferentes, como por ejemplo ser sexualmente compatibles y morfológicamente distintos, lo que puede servir como prueba relevante para la delimitación de especies. Durante el proceso de especiación estas propiedades no necesariamente surgen al mismo tiempo o en un orden, sino que además pueden no aparecer en absoluto, por lo que el conflicto de especie crece. Por otra parte las conexiones entre los organismos son efímeras lo que hace más o menos imposible para los humanos identificar a las especies con solo observación (Queiroz 2007).

El concepto general de que las especies han evolucionado por linajes separados o metapoblaciones y que se han extendido a través del tiempo, no significa que sean clados monofiléticos, sino que el término se refiere a que en una metapoblación se incluyen poblaciones y subpoblaciones conectadas. Por último, una especie no es un linaje metapoblacional entero, sino que segmentos de un linaje. El punto aquí es que las especies dan lugar a otras especies, formando de esta manera (a nivel de especies) linajes. Cualquier especie dada no es sino uno de los muchos segmentos que conforman un linaje (Queiroz 2007).

Se ha demostrado que utilizando datos morfológicos o de ciclos de vida generan a menudo una problemática para la identificación de especies, de aquí que datos moleculares son valiosos para delimitar especies tradicionales (Leliaert et al. 2014). En el caso del género *Didymosphenia* y para una mejor identificación de las unidades evolutivas que se encuentran en Chile sería interesante incluir nuevos marcadores moleculares para corroborar el patrón acá detectado y dilucidar el nivel de diferenciación de los linajes metapoblacionales. Una mezcla de marcadores nucleares y cloroplastidiales con diferentes tasas mutacionales podrían ayudar a identificar correctamente las especies de *Didymo* presentes en Chile, el nivel de diversidad genética dentro de cada linaje y las especies cercanas a este género.

Didymo posee gran capacidad para sobrevivir fuera del medio acuático. Los estudios indican que las células de *D. geminata* son capaces de sobrevivir y seguir siendo viables, durante por lo menos 40 días fuera del agua, cuando se las mantiene en condiciones de baja exposición solar y en ambientes frescos y húmedos (Kilroy 2005). Los equipos de pesca deportiva, principalmente las botas de vadeo con suelas de fieltro y los porosos waders de neoprene, proporcionan un lugar donde células potencialmente sobreviven (Kilroy & Dale 2006).

En nuestro país los efectos negativos de esta microalga aún no se ven reflejados como ocurre en Nueva Zelanda, en donde el impacto económico causado por *Didymosphenia geminata* ha sido de NZ \$57-285 millones en 8 años, destacándose pérdidas en la pesca comercial, suministros de agua y turismo (P.I.E.R.H.P. 2013). Además se sabe que el gobierno de los Estados Unidos, a través de la U.S.EPA se han planteado los problemas y riesgos asociados a la invasión de esta microalga, destacándose los problemas más relevantes como: que es la única diatomea bentónica que posee un comportamiento invasivo a escala global; es una especie capaz de producir extraordinaria cantidad de mucopolisacaridos extracelulares; su invasión tiene un impacto significativo en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, alterando la estructura de las cadenas alimentarias y las características hidráulicas de ríos y arroyos; es un organismo que ha expandido su rango de tolerancia ecológica; produce un potencial impacto significativo en las economías regionales y nacionales, afectando el turismo, las pesquerías y la industria hidroeléctrica; se carece de conocimientos básicos acerca de su biología y ecología (P.I.E.R.H.P. 2013, Branson 2006).

La persistencia espacial de esta microalga es cada vez mayor, lo cual hasta hace poco se restringía en ambientes con baja cantidad de nutrientes, pero ahora ocurre que se encuentra en ambientes con una mayor cantidad de nutrientes, provocando crecimientos bentónicos dañinos que pueden alcanzar hasta 1km y persistir durante varios meses al año (P.I.E.R.H.P. 2013). Su agresividad y generación de problemas está ligada a su capacidad de expansión y colonización de nuevos sitios. Los mecanismos de expansión de *D. geminata* a nuevas cuencas no son del todo conocidos. En trabajos recientes se muestra la capacidad de esta diatomea de sobrevivir fuera del agua, lo que constituye un potencial (P.I.E.R.H.P. 2013).

Conclusiones

Actualmente en Chile se está invirtiendo un enorme esfuerzo profesional y económico para la prospección de *Didymo* en los distintos cuerpos de agua, lo que conlleva a realizar análisis lentos tanto de terreno como análisis en laboratorio sobre su morfología y distinciones microscópicas. Se requiere de recurso humano interiorizado en las normas de bioseguridad para evitar la propagación de esta diatomea hacia nuevos cursos libres de *Didymo*. Esta tesis entrega una herramienta molecular para la identificación temprana de *Didymosphenia* en áreas que no se tengan datos sobre la invasión de esta especie, evitando los costosos terrenos y la alta cantidad de recurso humano requerido en la identificación morfológica.

El conocimiento que entrega este trabajo referente a la taxonomía de la diatomea *Didymo* en Chile y la sugerencia de que sean varias especies del género, revela un estado básico del conocimiento del grupo. Aunque por otro lado, también sugiere que nuevos eventos de introducción independientes pudieran haber sido responsables de la rápida expansión geográfica de la invasión en Chile.

Además, esta diatomea es un excelente candidato para estudios ecológicos, aunque a menudo se requiere de reconocimientos macroscópicos. Su estudio ayudaría en temas relacionados con cambios estacionales, morfología, como se forman los tallos, epifitas asechadas y pastoreo. Una mejor comprensión de la ecología del organismo permitirá entregar medidas de control adecuado para el manejo de ríos libre de esta diatomea.

BIBLIOGRAFIA

- Benson R. & Druckenmiller P. 2014. Faunal turnover of marine tetrapods during the Jurassic–Cretaceous transition. *Biological Reviews*, 89(1), 1-23.
- Branson J. 2006. *Didymosphenia geminata* economic impact assessment. New Zealand Institute of Economic Research, Final Report to Biosecurity New Zealand.
- Burgos J. 2010. Presencia de *Didymosphenia geminata* en Río Espolón y Río Futaleufú, Región de los Lagos. Propuesta de área de plaga. Subsecretaría de Pesca. Gobierno de Chile. Informe Técnico D. AC. 2064/2010.
- Canter-Lund, H. & Lund J. 1995. *Freshwater Algae. Their Microscopic World Explored*. Biopress, Bristol, UK: 360 pp.
- Casteleyn G., Adams N., Vanormelingen P., Debeer A., Sabbe K. & Vyverman W. 2009. Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence. *Protist*, 160(2), 343–354.
- Clarke K. & Gorley R. 2006. *PRIMER version 6: user manual/tutorial. PRIMER-E*, Plymouth, UK, 192.
- Craig C., Hicks B., Crawford N. & Coyne K. 2006. A sensitive genetic-based detection capability for *Didymosphenia geminata*.
- Craig C., Hicks B., Coyne K., Rueckert A., Gemmill C. & Barnett C. 2007. A sensitive genetic-based detection capability for *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: Phases two and three.
- Craig C., Coyne J., Rueckert A., Wood A., Kelly S., Gemmill E., Vieglais C. & Hicks J. 2014. Development and validation of a quantitative PCR assay for the early detection and monitoring of the invasive diatom *Didymosphenia geminata*. *Harmful Algae*, 36, 63-70.
- Darriba D., Taboada G., Doallo R. & Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27(8), 1164-1165.

- De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), 879-886.
- Díaz C., Molina X. & Montesino V. 2012. Manual para el monitoreo e identificación de la microalga bentónica *Didymosphenia geminata*. Producido por POCH-Universidad de Chile y financiado por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. 74 pp.
- Evans K., Wortley A. & Mann D. 2007. An assessment of potential diatoms “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS Rdna) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), 349-364.
- Filatov D. 2002. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 621-624.
- Ghiron J., Amato A., Montresor M. & Kooistra W. 2008. Plastid inheritance in the planctonic raphid pennate Pseudo-nitzschia delicatissima (Bacillariophyceae). *Protist*, 159(1), 91-98.
- Iriarte J., Lobos G. & Jaksic F. 2005. Invasive vertebrate species in Chile and their control and monitoring by governmental agencies. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78(1), 143-154.
- Jensen K., Moestrup Ø. & Schmid A. 2003. Ultrastructure of the male gametes from two centric diatoms, Chaetoceros laciniosus and Coscinodiscus wailesii (Bacillariophyceae). *Phycologia*, 42(1), 98-105.
- Jones L., Uyua N. & Manrique J. 2014. The perfil of PCR inhibitors in environmental samples: the case of *Didymosphenia geminata*. *Biodivers Conserv.* DOI 10.1007/s10531-014-0849-5.
- Kermarrec A., Le Scouarnec N. & Straub G. 2011. Repairing multiple failures with coordinated and adaptive regenerating codes. In *Network Coding (NetCod)*, 2011 International Symposium on, pp. 1-6. IEEE.
- Kilroy C. & Dale M. 2006. A comparison of sampling methods for the detection of the invasive alga *Didymosphenia geminata* in New Zealand rivers. NIWA Client Report: CHC2006-078.
- Kilroy C. 2005. Test to determine the effectiveness of methods for decontaminating materials that have been in contact with *Didymosphenia geminata*: National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand, Client Report, CHC2005-005, NIWA Project MAF05501.

- Leliaert F., Verbruggen H., Vanormelingen P., Steen F., Lopez-Bautista J., Zuccarello G. & Clerck O. 2014. DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49(2), 179-196.
- Leone B., Cerda J., Sala S. & Reid B. 2014. Mink (*Neovison vison*) as a natural vector in the dispersal of the diatom *Didymosphenia geminata*. *Diatom Research*, 29(3), 259-266.
- Mack R., Simberloff D., Lonsdale W., Evans H., Clout M. & Bazzaz F. 2000. Invasiones biológicas: causas, epidemiología, consecuencias globales y control. *Tópicos en Ecología*, 5, 1-20.
- McNyset K. & Julius M. 2006. Potential geographic distribution of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt in North America based on ecological niche models. Abstract. Region Biomonitoring and Bioassessment Meeting Utah State University, Logan.
- Nakov T., Ruck, E., Galachyants Y., Spaulding S. & Theriot E. 2014. Molecular phylogeny of the Cymbellales (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) with a comparison of models for accommodating rate variation across sites. *Phycologia* 53(4) 359-373.
- Programa de Inventario y Evaluación de los Recursos Hídricos de la Provincia. 2013. Dirección General de Recursos Hídricos: Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente Subprograma de Monitoreo Presencia/Ausencia en Cursos de Agua de la Provincia, de la especie exótica invasora: *Didymosphenia geminata*. Ushuaia - Provincia de Tierra del Fuego. Pp 25.
- Rivera, P., Basualto, S., & Cruces, F. (2013). Acerca de la diatomea *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: su morfología y distribución en Chile. *Gayana. Botánica*, 70(1), 154-158.
- Ronda F., Crawford R. & Mann D. 1990. Las diatomeas-Biología y Morfología de los Generos. Cambridge University. Pp 747.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. & Huelsenbeck J. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61(3), 539-542.
- Rozas J., Librado P., Sánchez-Del Barrio J., Messeguer X. & Rozas R. 2010. DnaSP Version 5 Help Contents [Help File]. Available with the program at <http://www.ub.edu/dnasp/>.

- Ruck E., Nakov T., Jansen R., Theriot E. & Alverson A. 2014. Serial gene losses and foreign DNA underlie size and sequence variation in the plastid genomes of diatoms. *Genome biology and evolution* 6(3), 644-654.
- Ruiz F., Abad M., Rodríguez J., Cáceres L., González-Regalado M., Carretero M., Pozo, M & Gómez F. 2008. The geological record of the oldest historical tsunamis in southwestern Spain. *Rivista Italiana di Paleontología e Stratigrafía*, 114(1), 147-156.
- Segura P (2011) A slimy invader blooms in the rivers of Patagonia. *Science* 331: 18, doi:10.1126/science.331.6013.18
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura Res. Ex. N° 005-7.01.2015. Renueva emergencia de plaga por presencia de la microalga *Didymosphenia geminata* en sector que indica.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Res. Ex. N° 1965-17.04.2014. Modifica resolución que declara área de plaga que indica.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Res. Ex. N° 996-17.04.2013. Declara área de plaga y de riesgo de plaga que indica en cuerpos de agua que señala en materia de acuicultura.
- Spaulding S. & Elwell L. 2007. Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater Diatom: *Didymosphenia geminata*. Recommendations for response. USEPA Región, 8.
- Subsecretaria de Pesca y Acuicultura. INFORME TÉCNICO D. AC. N°253/2014. Propuesta modifica y amplia resolución Ex. N°996 y 1927 ambas del 2013. Amplía área de plaga de *Didymosphenia geminata* incluyendo unidades de subsubcuencas que señalan para las regiones que indica.
- Subsecretaria de Pesca y Acuicultura. INFORME TECNICO D.AC. N° 2064/2010. Presencia de *Didymosphenia geminata* en rio Espolón y rio Futaleufú, Región de Los Lagos. Propuesta área de plaga.
- Subsecretaria de Pesca. Res. Ex. N° 1927-30.07. 2013. Modifica resolución que declara área de plaga que indica.

- Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Uyua N., Manrique J. & Jones L. 2014. An optimized DNA extraction protocol for benthic *Didymosphenia geminata*. *Journal of Microbiological Methods* 104, 12-18.
- Villaseñor C. & Neill P. 2011. Spatial distribution of epiphytes along the thallus of the introduced macroalga, *codium fragile* subsp. *Tomentosoides* in the subtial zone Caldera. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 46(2): 257-262.
- Whitton B., Ellwood N. & Kawecka B. 2009. Biology of the freshwater diatom *Didymosphenia*: a review. *Hydrobiology* 630(1) 1-37.
- Zimmermann J., Abarca N., Enk N., Skibbe O., Kusber W. & Jahn R. 2014. Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: a best practice example from diatom research. *PLoS one*, 9(9), e108793.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción CTAB + PK

- 1- Trasladar muestras fijadas en etanol al 70% desde el campo.
- 2- En laboratorio aislar las células en lupa al 4X y trasladarlas a tubos eppendorf de 1.7ml.
- 3- Realizar dos lavados con agua MilliQ en una centrifuga a 8000rpm por 5 minutos.
- 4- Eliminar el agua MilliQ y reemplazarla por 400ul de CTAB.
- 5- Moler con un mini mortero el contenido del tubo, añadir 0.4% de B-mercaptoetanol y 21ul de Proteinasa K (10mg/ml).
- 6- Incubar en un termoblock a 55°C por 1 hora, vortecear.
- 7- Incrementar la temperatura del termoblock a 65°C por 20 minutos.
- 8- Añadir 400ul de cloroformo alcohol isoamilico 24:1 y vortecear por 20 minutos hasta observar una emulsión.
- 9- Centrifugar a 16.000 rpm por 15 minutos.
- 10- Con una micro pipeta extraer 400ul aprox. de la fase superior, con cuidado de no tocar la fase inferior. Trasladar a un nuevo tubo de micro centrifuga.
- 11- Adicionar 150ul de NaCl 5M y 300ul de isopropanol helado. Invertir para mezclar y dejar en el refrigerador a -20°C hasta el otro día.
- 12- Remover del refrigerador y centrifugar a 13.000rpm por 20 minutos. Se formara un pellet en el fondo.
- 13- Eliminar el líquido superior y reemplazarlo por 1ml de etanol al 70%. Invertir para mezclar y centrifugar a 13.000rpm por 20 minutos.
- 14- Remover el etanol con cuidado de no remover el pellet blanco/marrón del fondo.
- 15- Dejar secar al aire o en una campana de extracción por unos 10 minutos o hasta no observar etanol.
- 16- Re suspender el pellet en 20ul de agua MilliQ.

Anexo 2

Listado de especies utilizadas para el estudio del gen 18S y obtenidas desde el GenBank.

Species Name	Family	N° access
<i>Cymbella cistula</i>	Cymbellaceae	KJ011618 (16)
<i>Cymbella lanceolata</i>	Cymbellaceae	AM502026 (5)
<i>Cymbella tumida</i>	Cymbellaceae	JN790274 (10)
<i>Cymbella proxima</i>	Cymbellaceae	AM502017 (5)
<i>Cymbella mexicana</i>	Cymbellaceae	KJ011624 (16)
<i>Cymbella affinis</i>	Cymbellaceae	AM502018 (5)
<i>Didymosphenia geminata</i> ITALIA	Cymbellaceae	JN790293 (10)
<i>Didymosphenia geminata</i> NZ	Cymbellaceae	JN680079 (9)
<i>Didymosphenia geminata</i> RUSIA	Cymbellaceae	KJ011637 (16)
<i>Didymosphenia geminata</i> USA	Cymbellaceae	KJ011636 (16)
<i>Didymosphenia dentata</i>	Cymbellaceae	KJ011635 (16)
<i>Gomphonema acuminatum</i>	Gomphonemataceae	AM502019 (5)
<i>Gomphonema affine</i>	Gomphonemataceae	HQ912608 (8)
<i>Gomphonema gracile</i>	Gomphonemataceae	KJ011656 (16)
<i>Gomphonema parvulum</i>	Gomphonemataceae	AJ243062 (3)
<i>Gomphonema micropus</i>	Gomphonemataceae	JN790282 (10)
<i>Gomphonema productum</i>	Gomphonemataceae	AM501993 (5)
<i>Gomphonema pseudaugur</i>	Gomphonemataceae	AB085833 (1)
<i>Gomphonema cf. angustatum</i>	Gomphonemataceae	AM502005 (5)
<i>Gomphonema truncatum</i>	Gomphonemataceae	AM501956 (5)
<i>Gomphonema cf. parvulum</i>	Gomphonemataceae	AM501995 (5)
<i>Uncultured gomphonema</i>	Gomphonemataceae	AB473924 (2)
<i>Gomphonema rosenstockianum</i>	Gomphonemataceae	JN790289 (10)
<i>Encyonema norvegica</i>	Cymbellaceae	KJ011643 (16)
<i>Encyonema caespitosum</i>	Cymbellaceae	AM502035 (5)
<i>Encyonema minutum</i>	Cymbellaceae	AM501961 (5)
<i>Encyonema triangulatum</i>	Cymbellaceae	AJ535157 (4)
<i>Encyonema sp.</i>	Cymbellaceae	JN790278 (10)
<i>Encyonema silesacum</i>	Cymbellaceae	JN790277 (10)

Anexo 3

Listado de especies utilizadas para el estudio del gen Rbcl y obtenidas desde el GenBank.

Species Name	Family	N° access
<i>Cymbella aspera</i>	Cymbellaceae	AM710483 (5)
<i>Cymbella cistula</i>	Cymbellaceae	KJ011802 (16)
<i>Cymbella lanceolata</i>	Cymbellaceae	AM710493 (5)
<i>Cymbella tumida</i>	Cymbellaceae	KJ011813 (16)
<i>Cymbella proxima</i>	Cymbellaceae	AM710484 (5)
<i>Cymbella mexicana</i>	Cymbellaceae	KJ011807 (16)
<i>Cymbella affinis</i>	Cymbellaceae	AM710476 (5)
<i>Didymosphenia geminata</i> RUSIA	Cymbellaceae	KJ011820 (15)
<i>Didymosphenia geminata</i> USA	Cymbellaceae	KC509523 (13)
<i>Didymosphenia dentata</i>	Cymbellaceae	KJ011818 (16)
<i>Gomphonema acuminatum</i>	Gomphonemataceae	AM710486 (5)
<i>Gomphonema affine</i>	Gomphonemataceae	HQ912472 (8)
<i>Gomphonema parvulum</i>	Gomphonemataceae	JQ354693 (11)
<i>Gomphonema micropus</i>	Gomphonemataceae	AM710430 (5)
<i>Gomphonema productum</i>	Gomphonemataceae	AM710460 (5)
<i>Gomphonema truncatum</i>	Gomphonemataceae	AM710509 (5)
<i>Gomphonema cf. parvulum</i>	Gomphonemataceae	AM710462 (5)
<i>Gomphonema lagenula</i>	Gomphonemataceae	HG530054 (7)
<i>Gomphonema cf. lagenula</i>	Gomphonemataceae	JQ354681 (11)
<i>Gomphonema narodoense</i>	Gomphonemataceae	HG530052 (7)
<i>Encyonema caespitosum</i>	Cymbellaceae	AM710502 (5)
<i>Encyonema minutum</i>	Cymbellaceae	KJ011823 (16)
<i>Encyonema silesacum</i>	Cymbellaceae	KF959648 (15)
<i>Encyonema cf. sinicum</i>	Cymbellaceae	AY571754 (6)

Para los marcadores genéticos 18S y RbcL los números de acceso entre paréntesis () representa el número de la publicación.

- 1- Mayama S. & Kuriyama A. 2002. Diversity of mineral cell coverings and their formation processes: a review focused on the siliceous cell coverings. *Journal of plant research*, 115(4), 289-295
- 2- Horath T., Yuhana M., Haehnlein J. & Hanselmann K. 2008. SSU rRNA gene sequences of microorganisms from the river Toess in Switzerland. Published Only in Database.
- 3- Beszteri B., Acs E., Makk J., Kovacs G., Marialigeti K. & Kiss K. 2001. Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(4), 1581-1586.
- 4- Medlin L. & Kaczmarek I. 2004. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*, 43(3), 245-270.
- 5- Bruder K. & Medlin L. 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected genera in the Naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia*, 85(3-4), 331-352.
- 6- Jones H., Simpson G., Stickle A. & Mann D. 2005. Life history and systematics of *Petroneis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters. *European Journal of Phycology*, 40(1), 61-87.
- 7- Abarca N., Jahn R., Zimmermann J. & Enke N. 2014. Does the Cosmopolitan Diatom *Gomphonema parvulum* (Kützinger) Kützinger Have a Biogeography? *PloS one*, 9(1), e86885.
- 8- Theriot E., Ashworth M., Ruck E., Nakov T. & Jansen R. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution*, 143(3), 278-296.
- 9- Cary S., Coyne K., Rueckert A., Wood S., Kelly S., Gemmill C., Vieglais C. & Hicks B. 2014. Development of a quantitative PCR assay for the early detection and monitoring of the invasive diatom *Didymosphenia geminata*. *Harmful Algae*, 36, 63-70.
- 10- Kermarrec L., Ector L., Bouchez A., Rimet F. & Hoffmann L. 2011. A preliminary phylogenetic analysis of the Cymbellales based on 18S rDNA gene sequencing. *Diatom Research*, 26(3), 305-315.

- 11- Kermarrec L., Bouchez A., Rimet F. & Humbert J. 2013. First evidence of the existence of semi-cryptic species and of a phylogeographic structure in the *Gomphonema parvulum* (Kutzing) Kutzing complex (Bacillariophyta. *Protist*, 164(5), 686-705.
- 12- Novis P., Braidwood J. & Kilroy C. 2012. Small diatoms (Bacillariophyta) in cultures from the Styx River, New Zealand, including descriptions of three new species. *Phytotaxa* 64, 11-45.
- 13- Ruck E., Nakov T., Jansen R., Theriot E. & Alverson A. 2014. Serial gene losses and foreign DNA underlie size and sequence variation in the plastid genomes of diatoms. *Genome biology and evolution*, 6(3), 644-654.
- 14- Brinkmann N., Hodac L., Mohr K., Hodacova A., Jahn R., Ramm J., Hallmann C., Arp G. & Friedl T. Diversity of cyanobacterial and diatom communities along pCO₂ and calcite saturation gradients in biofilms of karstic streams, Germany. Unpublished.
- 15- Larras F., Keck F., Montuelle B., Rimet F., Bouchez A. & Rimet F. 2014. Linking diatom sensitivity to herbicide to phylogeny: A step forward for biomonitoring? *Environmental science & technology*, 48(3), 1921-1930.
- 16- Nakov T., Ruck E., Galachyants Y., Spaulding S. & Theriot E. 2014. Molecular phylogeny of the Cymbellales (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) with a comparison of models for accommodating rate variation across sites. *Phycologia* 53 (4), 359-373.
- 17- Zimmermann J., Abarca N., Enk N., Skibbe O., Kusber W. & Jahn R. 2014. Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: a best practice example from diatom research. *PloS one*, 9(9), e108793.
- 18- Stoof-Leichsenring K., Epp S., Trauth M. & Tiedemann R. 2012. Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation. *Molecular ecology*, 21(8), 1918-1930.

