

UCH-FC  
MA6-B  
M971  
C.1

**ESTUDIO GENETICO DEL EFECTO DE AISLAMIENTO  
PROVOCADO POR LOS EMBALSES DE LA ZONA  
CENTRO NORTE DE CHILE  
EN LAS POBLACIONES NATURALES DE LOS PECES  
*Basilichthys microlepidotus* Y  
*Trichomycterus areolatus***



**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Pablo Andrés Muñoz Rojas**

**Septiembre, 2013**

**Director de Tesis Dr: David Véliz Baeza**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

PABLO ANDRES MUÑOZ ROJAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de Julio de 2013.

Director de Tesis:

DR. DAVID VELIZ



Comisión de Evaluación de la Tesis:

DR. ELIE POULIN

DRA. ALEJANDRA GONZALEZ

*A mis sobrinas Bárbara y Leonor,  
son el motor que mueve a nuestra  
familia*

## BIOGRAFIA



Nací en Santiago el 4 de Octubre de 1987. Desde mi infancia he vivido siempre en mi querida comuna de Maipú rodeado de un muy grato calor hogareño, cuando niño ingresé a estudiar la educación básica al colegio Nuestra Señora del Carmen, luego el año 2000 ingresé a estudiar al Instituto Nacional, liceo en el cual me gradué de 4° medio el año 2005. El 2006 ingresé a la Universidad de Chile titulándome posteriormente el año 2011 de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Por último, este año 2013 me encuentro terminando mi Magíster en Ciencias Biológicas.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a los académicos que integraron mi comisión, al Dr. Elie Poulin y la Dra. Alejandra González. Sus comentarios y acotaciones fueron un real aporte para que esta tesis de Magister resultase mucho mejor.

También me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio, han sido un apoyo muy importante durante los años que hemos estado juntos. Junto con ellos, quiero darle las gracias a mi tutor Dr. David Véliz por todo lo que me ha enseñado y por todos los momentos que hemos compartido en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también a mis amigos que han estado presente durante todos estos años apoyándome y haciendo de mi vida una historia muy entretenida.

Quiero agradecer de forma muy especial a mi tío Fernando Garrido, desde el cielo siempre has estado presente en mi vida. Con la culminación de esta tesis cumplo una más de las metas que nos propusimos.

Quisiera agradecer al pilar fundamental de mi vida, a mi familia, su apoyo incondicional ha sido muy importante para poder tener la convicción de seguir adelante con los objetivos que me he propuesto.

Por último, quiero agradecer a CONICYT, a la Universidad de Chile y al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por el apoyo financiero de becas durante el desarrollo de mi Magister.

## INDICE DE MATERIAS



RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
MATERIALES Y METODOS	19
SITIOS DE MUESTREO	19
OBTENCION DE MUESTRAS	20
OBTENCION DEL DNA Y AMPLIFICACION DE MICROSATELITES	21
ESTADISTICA DESCRIPTIVA	24
PRESENCIA DE ALELOS NULOS	25
ESTRUCTURACION POBLACIONAL	25
ASIGNACION POBLACIONAL E INDIVIDUAL	26
TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL	27
MIGRACION	30
CUELLOS DE BOTELLA	32
SIMULACIONES	32
RESULTADOS	34
ESTADISTICA DESCRIPTIVA	34
ESTRUCTURACION Y ASIGNACION POBLACIONAL	36
INDICE FST VERSUS TIEMPO	40

TAMAÑOS EFECTIVOS HISTORICOS Y ACTUALES	42
MIGRANTES EFECTIVOS HISTORICOS Y ACTUALES	44
CUELLOS DE BOTELLA	46
SIMULACIONES	47
DISCUSION	51
CONCLUSION	58
REFERENCIAS	60
ANEXOS	69



## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Caracterización de los embalses en estudio, incluyendo el año de construcción, ubicación geográfica, cuenca a la cual pertenece, río que embalsa, su capacidad y función

**Tabla 2** Resumen de las muestras colectadas en cada sitio de muestreo. <sup>1</sup> Afluente, <sup>2</sup> Efluente. Para el año 2010 se considera las muestras obtenidas durante las campañas del año 2010 y 2011. nm = no muestreado

**Tabla 3** Resumen de los microsatélites utilizados para *B. microlepidotus* con muestras del año 2006 y 2010 en cada sitio de estudio y análisis de heterocigosidad. L<sub>M</sub>: Loci monomórficos, L<sub>SE</sub>: Loci fuera del equilibrio de Hardy Weinberg, L<sub>D</sub>: Desequilibrio de ligamiento, A<sub>L</sub>: Número promedio de alelos por locus, G<sub>D</sub>: Diversidad Genética, A<sub>R</sub>: Riqueza Alélica, S<sub>D</sub> ±: Desviación estándar, p: significancia estadística calculada con 1000 permutaciones realizado para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse

**Tabla 4** Resumen de los microsatélites utilizados para *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010 en cada sitio de estudio y análisis de la heterocigosidad. L<sub>M</sub>: Loci monomórficos, L<sub>SE</sub>: Loci fuera del equilibrio de Hardy Weinberg, L<sub>D</sub>: Desequilibrio de ligamiento, A<sub>L</sub>: Número promedio de alelos por locus, G<sub>D</sub>: Diversidad Genética, A<sub>R</sub>:



Riqueza Alélica,  $S_D \pm$ : Desviación estándar,  $p$ : significancia estadística calculada con 1000 permutaciones realizado para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse

**Tabla 5** Valores de  $F_{ST}$  y su significancia estadística estimada con 10000 permutaciones para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010

**Tabla 6** Resumen de la Asignación Poblacional para *B. microlepidotus* con muestras del año 2006 y 2010. *LLOD*: Valores de probabilidad de diferenciación genética,  $p$ : significancia estadística calculada para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse. Adicionalmente se muestran valores porcentuales de individuos correctamente asignados según FLOCK y GENECLASS. \* Sitios de estudio donde la diferencia porcentual es menor al 10%

**Tabla 7** Resumen de la Asignación Poblacional para *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010 resultante en cada sitio de estudio. *LLOD*: Valores de probabilidad de diferenciación genética,  $p$ : significancia estadística calculada para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse. Adicionalmente se muestran valores porcentuales de individuos correctamente asignados según FLOCK y GENECLASS. \* Sitios de estudio donde la diferencia porcentual es menor al 10%

**Tabla 8** Análisis de señales de cuellos de botella mediante el cálculo de las pruebas de signos y Wilcoxon para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* para cada sitio de muestreo

**Tabla 9** Estimaciones de tamaño efectivo poblacional contemporáneo para *B. microlepidotus*. Para valores de método momentáneo y temporal se muestra el intervalo de confianza del 95% del límite inferior, superior, y el valor de  $N_E$  central

**Tabla 10** Estimaciones de tamaño efectivo poblacional contemporáneo para *T. areolatus*. Para valores de método momentáneo y temporal se muestra el intervalo de confianza del 95% del límite inferior, superior, y el valor de  $N_E$  promedio

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1** Distribución geográfica para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* (modificado de Véliz *et al.*, 2012)

**Figura 2** Mapa del lugar de muestreo. A la izquierda: Embalses Recoleta, Cogotí y La Paloma ubicados en la cuenca hidrográfica del Río Limarí. A la derecha: Embalse Corrales ubicado en la cuenca hidrográfica del Río Choapa. En azul se muestran los puntos de muestreo en afluentes y en rojo los puntos de muestreo en efluentes

**Figura 3** Esquema de los protocolos PCR utilizados en el estudio. (a) Protocolo PCR para *B. microlepidotus* descrito por Beheregaray & Sunnucks (2000). (b) Protocolo PCR para *B. microlepidotus* descrito por Koshimizu *et al.* (2009). (c) Protocolo PCR para *T. areolatus* descrito por Muñoz-Rojas *et al.* (2012)

**Figura 4** Plot índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  versus año de construcción de embalses. A) *B. microlepidotus* B) *T. areolatus*. Coeficientes de correlación de Spearman fueron calculados en ambos casos con muestras de los años 2010. \* En el caso de los embalses Recoleta y Corrales se plotearon dos puntos correspondientes a muestras de los años 2006 y 2010

**Figura 5** Boxplot de Tamaño efectivo poblacional ( $N_E$ ) para *B. microlepidotus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.002 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* Diferencias significativas fueron observadas al comparar tamaños efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes

**Figura 6** Boxplot de Tamaño efectivo poblacional ( $N_E$ ) para *T. areolatus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.0034 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* Diferencias significativas fueron observadas al comparar tamaños efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes

**Figura 7** Boxplot de Migrantes efectivos ( $N_{EM}$ ) para *B. microlepidotus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.002 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* No hubo diferencias significativas entre migrantes efectivos en ninguna de las comparaciones

**Figura 8** Boxplot de Migrantes efectivos ( $N_{EM}$ ) para *T. areolatus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.0034 locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* No hubo diferencias significativas entre migrantes efectivos en ninguna de las comparaciones

**Figura 9** Histograma comparativo de  $F_{ST}$  observado (vertical roja) versus la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados en Easypop para *B. microlepidotus*. A) Embalse Recoleta, año 2006 B) Embalse Corrales, año 2006 C) Embalse Recoleta, año 2010 D) Embalse Cogotí, año 2010 E) Embalse La Paloma, año 2010 F) Embalse Corrales, año 2010

**Figura 10** Histograma comparativo de  $F_{ST}$  observado (vertical roja) versus la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados en Easypop para *T. areolatus*. A) Embalse Recoleta, año 2006 B) Embalse Corrales, año 2006 C) Embalse Recoleta, año 2010 D) Embalse Cogotí, año 2010 E) Embalse La Paloma, año 2010 F) Embalse Corrales, año 2010

**Figura 11** Parámetros para optimizar la performance del programa BAYESASS. A) Índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  B) Tasa de migración C) Número de poblaciones D) Número de individuos muestreados por población E) Número de loci F) Número de alelos por locus. (Modificado de Faubet *et al.*, 2007)

## RESUMEN

Los ecosistemas dulceacuícolas son altamente complejos en cuanto a riqueza y abundancia de hábitats y especies constituyendo una parte significativa de la diversidad biológica total del mundo representando al 6% de las especies descritas. Sin embargo, pocos esfuerzos se destinan en la actualidad por mantener y conservar el patrimonio biológico que ellos guardan. Dentro de las principales amenazas que los afectan están los factores antrópicos siendo uno de los ejemplos más claros la construcción de embalses. Se ha descrito que los embalses interrumpen el continuo del río mediante la instalación de la barrera física de la represa y posterior formación de lagos o lagunas provocando la diferenciación de las poblaciones remanentes que quedan en el afluente y efluente del río.

El trabajo se enmarca en el estudio de cuatro grandes embalses en la zona centro norte de Chile: Embalse Recoleta, Cogotí, y La Paloma, emplazados en la cuenca hidrográfica del río Limarí y Embalse Corrales ubicado en la cuenca hidrográfica del río Choapa. En estas cuencas se describen dos especies de peces autóctonos dominantes: el pejerrey de río *Basilichthys microlepidotus* y el bagre *Trichomycterus areolatus*, ambos endémicos y con amplia distribución en Chile.

Se estudió el efecto de los embalses sobre los ríos de la zona centro norte de Chile, analizando los cambios en la discontinuidad de las poblaciones naturales de peces, comparando lo ocurrido río arriba y río abajo de las represas. El estudio involucró dos aspectos: (i) efectos sobre la estructuración de las poblaciones en el tiempo usando el acercamiento de la genética de poblaciones y (ii) estimación de migrantes efectivos y tamaños efectivos poblacionales históricos y contemporáneos en los afluentes y efluentes de los embalses.

Los resultados evidencian que los embalses de la zona centro norte de Chile afectan débilmente el grado de estructuración de las poblaciones naturales de *B. microlepidotus* y *T. areolatus*. Se observó una estructuración poblacional menor a la esperada en condiciones que el embalse fuese impermeable a los movimientos migratorios. Mas bien, los indicios de estructuración poblacional se verían reflejados principalmente en los tamaños efectivos poblacionales ( $N_E$ ), donde fue posible observar inclusive diferencias significativas en estimaciones comparativas entre  $N_E$  históricos y contemporáneos en afluentes y efluentes para ambas especies

## ABSTRACT

Freshwater ecosystems are highly complex in terms of richness and abundance of habitats and species contributing with the 6% of the total biological diversity in the world. However, few efforts were performed until today to maintain and conserve their biological heritage. Among the main threats, the construction of dams is one of the most important anthropic factors. It has described that reservoirs disrupt the continuous of the river by producing a physical barrier causing differentiation of the populations remaining in the affluent and effluent of the river.

This work is part of the study of four large reservoirs in the north-central Chile: Recoleta, Cogotí, and La Paloma, located in the Limarí River basin and Reservoir Corrales in the Choapa River basin. In the affluent and effluent of these basins, two native fish species are common: the silverside *Basilichthys microlepidotus* and the catfish *Trichomycterus areolatus*, both endemic and widely distributed in Chile.

In this thesis was studied the effect of dams on the fish populations located in the upstream and downstream of dams. The study involved two main aspects: (i) the effects on the fragmentation of populations over time using a population genetics approach and (ii) effective migrants and effective population sizes estimated both historical and contemporary in the affluent and the effluent of the reservoirs.



The results showed that reservoirs of north-central Chile weakly affect the structure of populations of *B. microlepidotus* and *T. areolatus*. Population structure was observed less than expected in the reservoir conditions completely blocked migration. Rather, the evidence of population structure will be reflected mainly in effective population sizes ( $N_E$ ), where it was possible to observe significant differences in estimates including comparisons between historical and contemporary ( $N_E$ ) affluent and effluent for both species.



## INTRODUCCION

Los ecosistemas de agua dulce presentan una alta complejidad en cuanto a riqueza y abundancia de hábitats y especies constituyendo una parte significativa de la diversidad biológica total del mundo (Dudgeon *et al.*, 2006). Su conocimiento está cobrando gran interés en la actualidad debido principalmente al preocupante problema de escasez, manejo y aprovechamiento de agua dulce al que se están viendo enfrentados los países. Sin embargo, pocos esfuerzos se destinan en la actualidad por mantener y conservar el patrimonio biológico que ellos guardan y lamentablemente su estado de conservación es bastante deplorable encontrándose ya en la década pasada entre los ecosistemas más críticos (Saunders *et al.*, 2002). Comparativamente más recursos son destinados a otros ecosistemas, por ejemplo a los terrestres, siendo que los de agua dulce han sido descritos como los más afectados en la última década (Sala *et al.*, 2000). Al centrar nuestro foco de atención en los sistemas lóticos, es posible presenciar factores que los están modificando como por ejemplo variables climáticas y efectos antrópicos. Aunque se ha reconocido que las barreras naturales como valles y montañas han fragmentado las poblaciones a una escala geológica (Awise, 2009), se ha descrito que las amenazas antrópicas como la sobreexplotación, invasión de especies exóticas, fragmentación y degradación de hábitat cambian negativamente las condiciones en que las poblaciones naturales de organismos viven en los ríos (Myers, 1995; Mora *et al.*, 2007), afectando finalmente el potencial evolutivo de las especies (Stockwell *et al.*, 2003).

Uno de los ejemplos más claros de la intervención del hombre sobre los sistemas límnicos ha sido la construcción de embalses (Dynesius & Nilsson, 1994). A modo general, los embalses interrumpen el continuo del río mediante la instalación de la barrera física de la represa y posterior formación de lagos o lagunas provocando la diferenciación de las poblaciones remanentes que quedan en el afluente y efluente del río. Los embalses remueven las secciones turbulentas de los ríos creando tranquilos cuerpos de agua lo que afecta los regímenes de flujo, temperaturas, transporte de sedimento y las comunidades de especies, constituyendo una gran amenaza para la diversidad de especies dulceacuícolas que allí habitan (Vorosmarty *et al.*, 2010), provocando primero la pérdida de especies nativas facilitando luego la invasión de especies exóticas, las cuales presentan alta probabilidad de establecerse en ecosistemas modificados o degradados (Liermann *et al.*, 2012), alterando el ensamblaje natural de los grupos taxonómicos y colocando a las especies endémicas en riesgo de extinción provocando la homogenización de la biota (Poff *et al.*, 2007).

Dentro de los sistemas lóticos, las poblaciones de peces se encuentran gravemente afectadas por los embalses debido a que los movimientos migratorios son bloqueados y se reduce el espacio físico en el cual se distribuían los individuos de la población natural (Leclerc *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2011; Apodaca *et al.*, 2012). Por lo tanto, se reducen los tamaños efectivos de las poblaciones y la deriva génica cobra mayor importancia eliminando los genes poco frecuentes de la población reduciendo el fitness (Frankham, 2005a). Como consecuencia, muchas especies de peces se han extinguido o se

encuentran fuertemente amenazadas, particularmente en ríos de regiones áridas y semi áridas (Collares-Pereira & Cowx, 2004). Se ha descrito que los embalses tienen el potencial para afectar la conectividad y el tamaño poblacional, reducir la diversidad genética, e incrementar las diferencias genéticas entre las poblaciones de peces de río que estaban previamente conectadas o en panmixia, creando gradientes afluente – efluente en diversidad genética (Meldgaard *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004). Adicionalmente, el decrecimiento de la diversidad genética puede afectar negativamente la habilidad de una población para responder a cambios ambientales, e incrementar la endogamia lo que finalmente puede exponer alelos recesivos deletéreos que podrían reducir el fitness (Allendorf & Ryman, 2002; Frankham *et al.*, 2001). Además, desde un enfoque físico - químico, las represas pueden producir cambios en la composición de los hábitats río abajo (ver Morais, 2008) además de suavizar los efectos de los cambios temporales principalmente de la temperatura, afectando el ritmo biológico de los organismos (McCully, 1996). Una de las posibles consecuencias de la instalación de embalses en los ríos es la fragmentación del hábitat, que provoca cambios ecológicos y evolutivos en las poblaciones naturales (Youngson *et al.*, 2003), lo cual tiene potenciales implicancias en la persistencia de las poblaciones a corto y largo plazo (Frankham, 2005b). La fragmentación también afecta la estructuración genética de las poblaciones, generando grupos aislados y una alta probabilidad de pérdida de variabilidad debido a la deriva genética (DeWoody & Avise, 2000). Dado lo anterior, la instalación de embalses ha sido catalogado como el factor mayormente determinante en el estado de conservación de los peces dulceacuícolas (Clavero *et al.*, 2004), sin embargo, en los artículos publicados no existe un consenso generalizado respecto al impacto de las

represas sobre los ecosistemas dulceacuícolas. Mientras algunos estudios no encuentran efectos (Reid *et al.*, 2008), otros muestran efectos débiles (Haponski *et al.*, 2007), y otros encuentran fuerte diferenciación genética entre individuos río arriba y río abajo de las represas (Neraas & Spruel, 2001).

Se ha enmarcado en un contexto global el impacto de los embalses sobre las poblaciones naturales en los ecosistemas dulceacuícolas, sin embargo, es evidente que dichas perturbaciones están vinculadas también a las características propias de los sistemas límnicos que irrumpen, donde influye principalmente la composición de la ictiofauna, la geomorfología de los ríos, el clima, profundidad de caudales y corrientes. En el contexto local se ha descrito que la composición ictiofaunística chilena proviene de diversas fuentes. Algunos elementos parecen estar relacionados con especies de otros ambientes tropicales o templados, como es el caso de los Siluriformes o bagres del género *Trichomycterus* (Arratia, 1997). Otras especies en cambio, tendrían un origen marino, como los Aterinópsidos o pejerreyes de los géneros *Odontesthes* y *Basilichthys*. Actualmente, la fauna íctica de Chile se compone de un total de 12 familias, 17 géneros y alrededor de 45 especies de peces nativos (Habit *et al.*, 2006) estrictamente dulceacuícolas y diádromas (Dyer, 2000). En líneas generales la ictiofauna chilena se caracteriza por ser poco diversa, estar adaptada a ríos con fuertes fluctuaciones estacionales de caudal, presentar pequeños tamaños corporales y un alto porcentaje de endemismo (Campos *et al.*, 1993; Vila *et al.*, 1999; Dyer, 2000). La geomorfología chilena ha permitido el desarrollo de una fauna propia, confiriéndole un valor biológico, que compensa en cierto modo la escasez de especies. En el proceso de diferenciación de

la ictiofauna chilena, respecto al resto de Sudamérica, la elevación de la cordillera de los Andes se presenta como la principal causa del alto número de especies exclusivas (Habit & Victoriano, 2006).

Para entender la estructuración de las poblaciones naturales de peces es necesario comprender el rol de las migraciones, los tamaños efectivos y la deriva génica. El estudio de procesos dispersivos como colonización y migraciones recíprocas son centrales en el campo de la genética de poblaciones, ecología molecular, conservación y manejo de vida silvestre. En la moderación del tamaño y la estructuración de poblaciones, la migración hace posible la persistencia de especies en ambientes heterogéneos, incluyendo aquellos afectados por pérdida de hábitat o fragmentación lo cual es particularmente cierto para peces que habitan redes de agua dulce donde la migración es requerida para asegurar la dispersión espacial y temporal de los recursos (Lamphere & Blum, 2012). Estimaciones directas de parámetros de migración pueden obtenerse usando enfoques puramente ecológicos como métodos de marcaje recaptura-liberación, pero tienen el inconveniente de consumir demasiado tiempo y ser impracticables en estudios que abarcan grandes extensiones espaciales. Por lo tanto, métodos indirectos basados en modelos de genética de poblaciones son una atractiva alternativa ya que son fáciles de implementar en esas situaciones y solo requieren un plan de muestreo cuidadoso para la colección de las muestras de tejido para la extracción y análisis de DNA (Faubet *et al.*, 2007).

No obstante la importancia de las migraciones recíprocas en el entendimiento de la dinámica de las poblaciones, el tamaño efectivo poblacional es un concepto central en ecología, evolución y biología de la conservación debido a que permite predecir tasas de pérdida de variación genética neutral, fijación de alelos deletéreos y dominantes, y la tasa de incremento de endogamia dentro de las poblaciones (England *et al.*, 2006). Sin embargo, es notoriamente difícil de estimar, debido principalmente a la naturaleza altamente estocástica de los procesos de endogamia y deriva genética (Wang, 2005), por lo tanto, presenta la dualidad de ser sumamente útil para el desarrollo de estrategias de conservación pero a su vez resulta complejo estimarlo de forma confiable. El tamaño efectivo poblacional es definido como el número de individuos reproductivos en una población ideal de Wright Fisher que perdería variación genética a la misma tasa que la población actual (Frankham *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 1999). En una población ideal, todos los individuos tienen igual posibilidad de ser los parentales de alguna progenie que constituyen la próxima generación. Esta población ideal es generalmente considerada temporalmente estable y libre de mutación, selección natural y migración. El tamaño efectivo poblacional provee información sobre cuán rápido se está perdiendo la variación genética, esto por efecto de la deriva, considerándose a menudo relacionado a la viabilidad de las poblaciones (Leberg, 2005). Por lo tanto, en casos donde el tamaño efectivo poblacional es pequeño, una población podría rápidamente perder variación genética por un mayor efecto de la deriva (Frankham, 1995). Cuando las fuerzas microevolutivas de mutación, selección y flujo génico están ausentes, propiedades genéticas como heterocigosidad, número de alelos, frecuencia de alelos y genotipo por locus de una población infinitamente grande se mantendrán constantes en el tiempo. Por

el contrario, cada una de las propiedades de una población con tamaño finito cambiarán de generación en generación, resultando a partir de procesos estocásticos de muestreo un número finito de gametos durante la reproducción y sobrevivencia. Debido al efecto de los procesos estocásticos la fuerza del cambio en las propiedades genéticas de una población depende de su tamaño efectivo poblacional, en donde, poblaciones con mayores tamaños efectivos tendrán menores cambios en las propiedades genéticas que aquellas poblaciones con tamaños efectivos menores. Una población real puede salir a partir de una población idealizada de Wright Fisher de muchas maneras distintas, y como resultado su tamaño efectivo puede ser muy diferente del tamaño censal. Adicionalmente al tamaño censal, muchos otros parámetros demográficos y genéticos como la proporción de sexos, varianza del éxito reproductivo entre individuos y sistemas de apareamiento afectan el tamaño efectivo de una población (Wang, 2005).

Estudios relacionados con migraciones y tamaños efectivos se han realizado principalmente con microsatélites, una de las herramientas moleculares más ampliamente utilizadas en los últimos años para estudios de genética de poblaciones (Selkoe & Toonen, 2006). Los microsatélites son repeticiones en tándem de secuencias simples que existen en abundancia y de forma azarosa en el genoma de los organismos eucariotas (Zane *et al.*, 2002) particularmente interesantes debido a que son uno de los pocos marcadores que permiten resolver interrogantes ecológicas a escala detallada dado el uso de múltiples loci comparables. Los microsatélites se han vuelto interesantes debido a que son neutros y codominantes (Jarne & Lagoda, 1996) por lo cual muchos



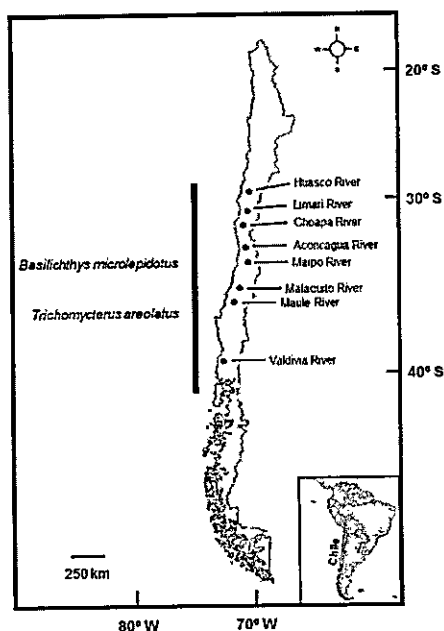
loci pueden ser eficientemente combinados en el proceso de genotipificación para proveer rápidos y económicos muestreos replicados del genoma.

En cuanto a los ríos del centro norte de Chile, se caracterizan principalmente por ser torrentosos; nacer a altitudes cercanas a los 4500 m.s.n.m. y tener un recorrido promedio de 100 kilómetros hasta desembocar en el océano siendo su paso bastante acotado, razón por la cual se hace económicamente necesario embalsarlos. Además son nivopluviales con altos volúmenes de caudal en invierno-primavera pero muy bajos en verano-otoño presentando una fauna similar dominada por unas pocas especies de peces (Vila *et al.*, 2006). Dado el torrente natural de estos ríos, su corta trayectoria desde la Cordillera de los Andes al Océano Pacífico y la carencia de acumulaciones naturales de agua, todas las aguas se vacían rápidamente al océano. Por esta razón, se ha planteado como estrategia de aprovechamiento de las aguas, la construcción de embalses en numerosos sistemas de drenaje, encontrándose los más grandes reservorios del país entre los 30° y 34° de latitud Sur. Dentro de estos, destacan cuatro grandes embalses en la zona centro norte de Chile: Embalse Recoleta (30°29'S - 71°06'O) construido en 1934, Cogotí (31°0'S - 71°5'O) construido en 1939 y La Paloma (30°45'S - 71°0' O) construido en 1966, emplazados en la cuenca hidrográfica del río Limarí y Embalse Corrales (31°30'S - 71°30'O) construido el año 2002 está ubicado en la cuenca hidrográfica del río Choapa.

En estas cuencas se describen dos especies de peces autóctonos dominantes, ambos endémicos y con amplia distribución en Chile (Habit & Victoriano, 2006; Figura 1). Uno de ellos es el pejerrey de río *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes:

Atherinopsidae) el cual se distribuye desde el Río Copiapó hasta la Isla Grande de Chiloé (Véliz *et al.*, 2012), es una especie pelágica que habita sistemas dulceacuícolas con aguas bastante oxigenadas, transparentes y de baja velocidad con zonas de refugio producto de la vegetación acuática (Comte & Vila, 1992). Se alimenta de larvas de insecto, pequeños invertebrados, algas filamentosas y detritos. En la época de reproducción forma grandes cardúmenes en áreas donde la corriente es lenta y la profundidad de las aguas es mayor (Duarte *et al.*, 1971). *B. microlepidotus* es una especie vulnerable a la predación por especies introducidas (Pardo *et al.*, 2009). La segunda especie es el bagre *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) el cual se distribuye desde Huasco por el norte hasta la Isla grande de Chiloé por el sur (Dyer, 2000). Los aspectos reproductivos indican que esta especie realiza el desove entre los meses de octubre y diciembre. En cuanto a su alimentación se consideran como peces carnívoros, consumen toda variedad de organismos que tengan contacto con el fondo, crustáceos, larvas de insectos invertebrados; efemerópteros, dípteros y tricópteros. Esta especie bentónica presenta una amplia tolerancia ambiental y es típicamente generalizada y abundante dentro de la mayoría de los ríos que habita (Habit *et al.*, 2005). *T. areolatus* puede ser encontrado a partir de pequeños cauces en ríos de baja elevación cercanos a la costa que tienen bajas corrientes con distintos sustratos, especialmente grava y rocas (Habit *et al.*, 2006), también se ha descrito su presencia en canales de regadío siendo una de las pocas especies endémicas que domina y persiste durante todo el año estos ambientes artificiales (Habit *et al.*, 2005).





**Figura 1** Distribución geográfica para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* (modificado de Véliz *et al.*, 2012).

*B. microlepidotus* y *T. areolatus* se encuentran bastante alejadas filogenéticamente, tienen amplia distribución en el país, además de existir cierto conocimiento de su biología. Otro punto importante que las contrasta es el uso del hábitat, el pejerrey es una especie pelágica mientras el bagre es bentónica, por lo tanto, fue posible comparar el efecto de los embalses sobre poblaciones naturales de peces que viven en la columna de agua y bentos respectivamente. Finalmente, ambas especies son típicamente fluviales, por lo tanto, su incidencia dentro del embalse mismo es muy baja (Vila I, comunicación personal).

Estudios genético poblacionales realizados en estas dos especies y en las mismas hoyas hidrográficas mostraron que los individuos ubicados en diferentes lugares del río, no intervenidos por embalses, representaron una población continua (Quezada *et al.*, 2010) lo que supone que estas especies poseen gran dispersión dentro de las cuencas cuando no hay intervención en el río. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es determinar mediante el uso de marcadores microsatélites efectos genético poblacionales producidos por la interrupción física debido a la presencia de embalses en las cuencas hidrográficas de los ríos Limarí y Choapa considerando como organismos modelo al pejerrey de río *B. microlepidotus* y al bagre *T. areolatus*. Para ello fue necesario tener presente que una parte vital de los patrones de comprensión de la variación genética de las poblaciones naturales se basa en la integración de los conocimientos de diferenciación genética de las poblaciones, tamaños efectivos poblacionales y los respectivos flujos génicos recíprocos entre sitios. Por este motivo, para validar posibles diferenciaciones poblacionales entre afluente y efluente en cada embalse se estimaron migrantes y tamaños efectivos poblacionales comparando lo que ocurre de forma independiente en *B. microlepidotus* y *T. areolatus*.

## **HIPOTESIS**

Los embalses de la zona centro norte de Chile afectan la estructuración de las poblaciones de peces ubicados en el afluente y efluente de éstos, encontrándose mayor diferenciación genética en embalses más antiguos.

## OBJETIVOS

### 3.1 General

Determinar efectos genético poblacionales en el pejerrey de río *Basilichthys microlepidotus* y en el bagre *Trichomycterus areolatus* producidos por la disrupción física de los ríos del centro norte de Chile debido a la presencia de embalses.

### 3.2 Específicos

1. Desarrollar y optimizar partidores microsatélites específicos para *T. areolatus* y probar partidores heterólogos para *B. microlepidotus*.
2. Estimar estructuración y asignación poblacional en cada sitio de estudio comparando además el porcentaje de individuos correctamente asignados según dos metodologías: algoritmo de remuestreo Monte Carlo y repetición de reasignaciones según similitud genética.
3. Relacionar el grado de diferenciación poblacional, río arriba y río abajo de los embalses, de ambas especies y el tiempo de construcción de los embalses.

4. Estimar tamaños efectivos poblacionales y migrantes efectivos históricos y contemporáneos para cada especie y relacionarlo con la separación río arriba y río abajo de los embalses.

5. Simular escenarios de diferenciación poblacional para cada especie, comparando además los datos simulados con los datos observados.

## MATERIALES Y METODOS

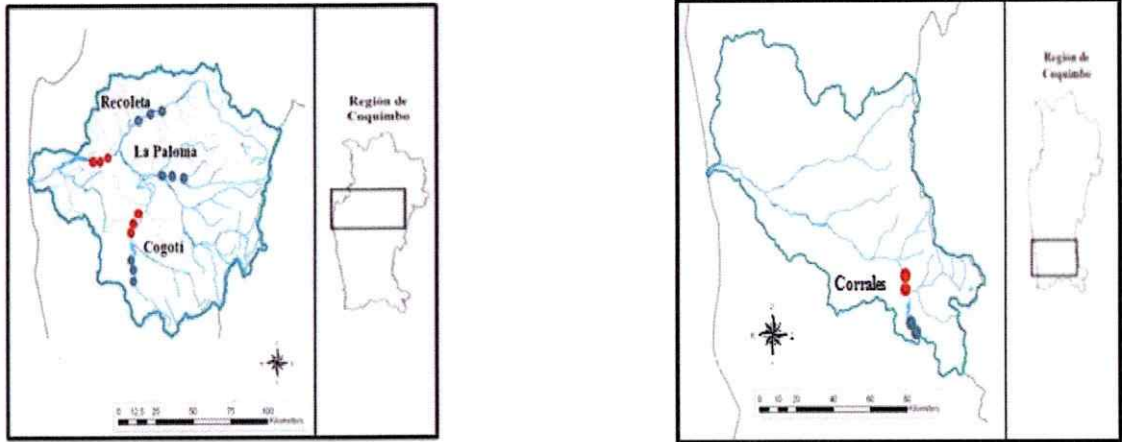
### 4.1.1 Sitios de muestreo

Los sitios de estudio corresponden a 4 ríos interrumpidos por embalses ubicados en la zona centro norte de Chile. Tres de ellos se encuentran en la hoya hidrográfica del Limarí: Río Hurtado el cual contiene el Embalse Recoleta, Río grande con el Embalse La Paloma y Río Combarbalá el cual contiene al Embalse Cogotí. En la hoya hidrográfica del Choapa se analizó el estero Camisas el cual contiene al Embalse Corrales (Figura 2; Tabla 1). Desde cada uno de estos ríos se escogió tres sitios río arriba y tres sitios río abajo de los embalses para realizar el muestreo del pejerrey de río *Basilichthys microlepidotus* y del bagre *Trichomycterus areolatus*. Se utilizó el superíndice 1 para denotar sitios río arriba o afluentes y el superíndice 2 para sitios río abajo o efluentes.

**Tabla 1** Caracterización de los embalses en estudio, incluyendo el año de construcción, ubicación geográfica, cuenca a la cual pertenece, río que embalsa, su capacidad y función.

Sitio de Estudio	Año	Ubicación geográfica	Cuenca Hidrográfica	Río que embalsa	Capacidad	Función
Embalse Recoleta	1934	30°29'S - 71°06'O	Limarí	Hurtado	100 mill. m <sup>3</sup>	Riego
Embalse Cogotí	1939	31°0'S - 71°5'O	Limarí	Combarbalá	150 mill. m <sup>3</sup>	Riego
Embalse La Paloma	1966	30°45'S - 71°0'O	Limarí	Grande	750 mill. m <sup>3</sup>	Riego
Embalse Corrales	2002	31°30'S - 71°30'O	Choapa	Camisas	50 mill. m <sup>3</sup>	Riego





**Figura 2.** Mapa del lugar de muestreo. A la izquierda: Embalses Recoleta, Cogotí y La Paloma ubicados en la cuenca hidrográfica del Río Limarí. A la derecha: Embalse Corrales ubicado en la cuenca hidrográfica del Río Choapa. En azul se muestran los puntos de muestreo en afluentes y en rojo los puntos de muestreo en efluentes.

#### 4.1.2 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron en dos periodos diferentes. Las primeras se obtuvieron en el mes de octubre de 2006 y marzo de 2007 desde un sitio río arriba y un sitio río abajo de los Embalses Recoleta y Corrales. En una segunda etapa, se realizaron muestreos los meses de septiembre y octubre del año 2010 y octubre del 2011 para los cuatro ríos embalsados. En cada uno de los sitios se colectó peces utilizando una pesca eléctrica de bajo impacto Marca Samus. Los peces se mantuvieron vivos y se anestesiaron con Tricaina Metanosulfonato (MS222) según protocolo descrito por Wasco *et al.* (2003). De cada pez se obtuvo un pequeño trozo de aleta caudal; siendo mantenidos en un

contenedor con agua con anestesia para ser liberados en el mismo lugar de muestreo. Los trozos de aleta fueron dispuestos en tubos eppendorf e inmersos en alcohol 95%.

El número de peces muestreados dependió de la cantidad de peces que se pudo colectar, por lo que el bajo número de peces que se muestreó durante los años 2010 y 2011 tuvieron que ser tratados juntos para asegurar un análisis estadístico robusto. El resumen de los sitios de muestreo considerados en cada año y la cantidad de muestras colectadas para cada especie se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2** Resumen de las muestras colectadas en cada sitio de muestreo. <sup>1</sup> Afluente, <sup>2</sup> Efluente. Para el año 2010 se considera las muestras obtenidas durante las campañas del año 2010 y 2011. nm = no muestreado.

Sitio de Estudio	Sitio de Muestreo	<i>Basilichthys microlepidotus</i>		<i>Trichomycterus areolatus</i>	
		Año 2006	Año 2010	Año 2006	Año 2010
Embalse Recoleta	Rec <sup>1</sup>	24	50	24	51
	Rec <sup>2</sup>	24	41	24	51
Embalse Cogotí	Cog <sup>1</sup>	nm	40	nm	62
	Cog <sup>2</sup>	nm	30	nm	40
Embalse La Paloma	Pal <sup>1</sup>	nm	48	nm	32
	Pal <sup>2</sup>	nm	42	nm	51
Embalse Corrales	Cor <sup>1</sup>	24	33	24	33
	Cor <sup>2</sup>	24	48	24	37
Total		96	332	96	357

#### 4.1.3 Obtención del DNA y amplificación de microsatélites

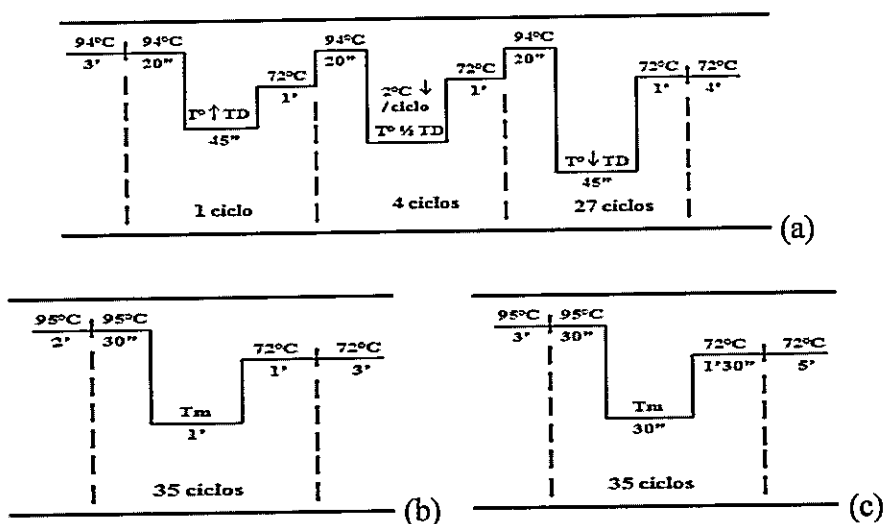
Se obtuvo el DNA utilizando el protocolo de extracción salina descrito por Aljanabi & Martínez (1997), conservando posteriormente las muestras a -20 °C. Se utilizó el

espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 para medir la concentración y pureza de las muestras extraídas. Se realizaron soluciones de trabajo de DNA, los cuales se estimaron en el rango de 50-80 ng/uL.

En el caso de *B. microlepidotus* se utilizó 10 partidores heterólogos, 5 descritos por Beheregaray & Sunnucks (2000) y 5 descritos por Koshimizu *et al.* (2009). La optimización del procedimiento para el uso de los 10 marcadores considerando una buena amplificación y polimorfismo del marcador ya fueron probados con éxito previamente en nuestro laboratorio (Muñoz *et al.*, 2011, se incluye el artículo en el Anexo I). En el caso de *T. areolatus* se utilizó 10 partidores microsatélites descritos por Muñoz-Rojas *et al.* (2012, se incluye el artículo en el Anexo II). En ambos casos los partidores con y sin fluorescencia fueron sintetizados en la empresa Applied Biosystems Inc. ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) siguiendo las etiquetas de fluorescencia 6FAM, VIC, NED y PET.

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de DNA se realizaron las reacciones de PCR en forma independiente. Para el caso de *B. microlepidotus* se utilizó el protocolo touchdown de amplificación descrito por Beheregaray & Sunnucks (2000) para los partidores OD02, OD07, OD09, OD38 y OD39. Para los partidores OB01, OB19, OB44, OB59 y OB71 se utilizó el protocolo descrito por Koshimizu *et al.* (2009) sin modificaciones. Para la amplificación de los 10 microsatélites de *T. areolatus* se utilizó el protocolo PCR descrito por Muñoz-Rojas *et al.* (2012) (Figura 3). En todos los casos la reacción de PCR se llevó a un volumen final de 10 µl que corresponde a 1.3 µl buffer

PCR 10X (50 mM KCL, 10mM tris-HCL, pH 8), 0.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5  $\mu$ l del partidor forward 50 ng/ $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l del partidor reverse 50 ng/ $\mu$ l, 2.4  $\mu$ l dNTP's 2.5 mM, 0.5  $\mu$ l BSA, 4.18  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.12  $\mu$ l *Taq* polimerasa. Finalmente, se agregó 1.5  $\mu$ l de DNA a 50 - 80 ng/ $\mu$ l.



**Figura 3** Esquema de los protocolos PCR utilizados en el estudio. (a) Protocolo PCR para *B. microlepidotus* descrito por Beheregaray & Sunnucks (2000). (b) Protocolo PCR para *B. microlepidotus* descrito por Koshimizu *et al.* (2009). (c) Protocolo PCR para *T. areolatus* descrito por Muñoz-Rojas *et al.* (2012).

El chequeo inicial de los fragmentos de DNA amplificados se realizó en geles de agarosa al 1.5% utilizando SYBR SAFE (Invitrogen) como agente intercalante. Posteriormente, los productos de PCR fueron ordenados en placas tipo 96-plate incorporando 5 marcadores fluorescentes distintos (6FAM, 6FAM, VIC, NED, PET), dichas placas fueron enviadas a la empresa Macrogen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) para ser analizadas con un secuenciador automático de DNA ABI 3730. Se utilizó LIZ500

como estándar de tamaño en las corridas del secuenciador. Con los electroferogramas obtenidos se realizó la genotipificación utilizando el software de análisis de fragmentos de DNA GeneMaker versión 2.2.0 (SoftGenetics Inc.).

#### 4.2.1 Presencia alelos nulos

Se verificó la posible presencia de errores en el conteo alélico. Para esto, se utilizó el software MICROCHECKER versión 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004) el cual permite estimar la probabilidad de encontrar errores de genotipificación debido a alelos no amplificados (alelos nulos), dominancia de alelos cortos (deserción de alelos grandes), y a errores “stuttering” en los peaks.

#### 4.2.2 Estadística descriptiva

Estimadores genético poblacionales como polimorfismos y heterocigosidades fueron calculados con el programa GENETIX versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2000). Se calculó el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  como medida de la desviación de la proporción de heterocigotos observados y la proporción esperada, buscando su significancia estadística al realizar permutaciones (10000 permutaciones) de alelos dentro del grupo de muestras. Se analizó la posible presencia de marcadores microsatélites ligados físicamente mediante el cálculo de desequilibrio de ligamiento para todos los pares de loci dentro de cada población, la significancia estadística fue probada con 10000 permutaciones. Todas estas estimaciones se realizaron con el programa GENETIX.

Diversidades genéticas ( $D_G$ ) y riquezas alélicas ( $A_R$ ) con sus respectivas desviaciones estándar fueron calculadas en cada afluente y efluente utilizando el software FSTAT versión 2.9.3 (Goudet, 1995) el cuál se basa en métodos de aleatorización para llevar a cabo las estimaciones. Siguiendo las recomendaciones de Goudet (1995), la comparación de  $D_G$  y  $A_R$  entre sitios se realizó utilizando análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) de permutaciones (1000 permutaciones) en el cual cada microsatélite es una réplica dentro del análisis. Se utilizó los códigos de ANOVA de 1 vía escritos por Dr. Pierre Legendre para el programa R (R Development Core Team, 2011) los cuales son de uso libre (<http://adn.biol.umontreal.ca/~numerica/ecology/Rcode/>).

#### 4.2.3 Estructuración Poblacional

Para cuantificar diferencias en las frecuencias de alelos de los individuos situados en el afluente y efluente de cada embalse se estimó el índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  con el programa GENETIX versión 4.02 (Belkhir *et al.*, 2000). La significancia estadística se probó utilizando 10000 permutaciones de genotipos entre los sitios utilizando el mismo programa. Como segundo análisis de estructuración poblacional se utilizó el software STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). STRUCTURE utiliza un método de agrupamiento bayesiano genotípico; bajo la suposición de la existencia de equilibrio de Hardy Weinberg y de equilibrio de ligamiento dentro de las poblaciones busca el número de poblaciones ( $k$ ) que mejor se ajusta al conjunto de los datos (Falush *et al.*, 2003; Falush *et al.*, 2007). Se utilizó un modelo de ancestría que

considera alelos correlacionados y posibles mezclas pasadas de individuos (“admixture model”) con un burn-in de 400000 iteraciones y un after burn-in de 200000 iteraciones para la convergencia de los modelos. Considerando que el número de iteraciones puede ser un factor importante en la toma de decisiones, se estimó cinco veces para asegurar que no existieran diferencias entre análisis independientes.

#### 4.2.4 Asignación Poblacional e Individual

Para estimar el nivel en el cual los individuos pueden ser clasificados de acuerdo a su procedencia de origen se utilizó métodos de asignación. Primero se utilizó un análisis de asignación poblacional implementado en el programa FLOCK versión 3.0 (Duchesne & Turgeon, 2012) el cual no requiere (i) conocer la procedencia de las muestras (ii) ni loci conformes al equilibrio Hardy Weinberg, realizando una asignación secuencial de individuos según sus similitudes genéticas, determinando el tamaño y número de poblaciones posibles dentro del universo muestreado. FLOCK es un algoritmo que se basa en repetidas reasignaciones de los individuos según un número supuesto de grupos de referencia ( $k$ ) en donde cada reasignación es mejor que la anterior, aumentando su efectividad linealmente con el tamaño muestral. El programa particiona aleatoriamente la colección de genotipos en  $k$  grupos, en donde las frecuencias alélicas son estimadas para cada uno de los  $k$  grupos, y cada genotipo es reasignado al grupo con más alta probabilidad siguiendo el método máxima verosimilitud de multilocus (Duchesne & Turgeon, 2009). Además del parámetro ( $k$ ) se considera un valor de mínima probabilidad de diferencia para asignar individuos a dos grupos de referencia ( $LLOD$ )

que corresponde a la diferencia entre el logaritmo de la probabilidad del agrupamiento más probable para un genotipo dado y la de su segundo agrupamiento más probable.

Se utilizó además un análisis convencional de asignación implementado en el software GENECLASS2 versión 2.0 (Piry *et al.*, 2004) cuyo objetivo es determinar la población de origen de individuos usando datos genéticos. En este análisis se calculó la probabilidad que los genotipos multilocus de cada individuo sean encontrados en una población dada mediante el algoritmo de remuestreo de Monte Carlo considerando 100.000 individuos simulados y un umbral de asignamiento de 0.01, siguiendo las recomendaciones de Howes *et al.* (2008). En nuestro caso, el criterio estadístico de clasificación para asignar o excluir poblaciones de referencia sobre la base de datos genotípicos de multilocus se basó en la frecuencia de alelos (Paetkau *et al.*, 2004).

#### 4.2.5 Tamaño efectivo poblacional

Para la estimación de tamaños efectivos poblacionales ( $N_E$ ) históricos y contemporáneos existen principalmente 3 métodos: a) coalescente, b) temporal y c) exceso de heterocigotos. El método de coalescencia es de suma importancia para estimaciones de  $N_E$  históricos (Leberg, 2005) mientras el método temporal se utiliza para estimaciones de  $N_E$  considerando la variación de datos genéticos en dos períodos de tiempo (Wang, 2001), y por último, el método basado en exceso de heterocigotos se aplica para estimaciones de  $N_E$  momentáneos (Peel *et al.*, 2004).



El método de coalescencia para la estimación de tamaños efectivos históricos se implementó en el programa MIGRATE-n versión 3.2.9 (Beerli & Felsenstein, 1999) para estimar  $\Theta$  ( $\Theta = x N_E m\mu$ , donde  $x = 4$  para datos diploides,  $N_E$  corresponde al tamaño efectivo poblacional y  $m\mu$  a la tasa de mutación). Para *B. microlepidotus* se utilizó una tasa de mutación equivalente a  $2 \times 10^{-3}$  /locus/generación, tasa promedio entre *Lepomis marginatus* del orden Perciformes (Mackiewicz *et al.*, 2002) y *Syngnathus typhle* del orden Syngnathiformes (Jones *et al.*, 1999), ambas especies cercanas filogenéticamente a *B. microlepidotus* (ver filogenia de los Actinopterygii en Near *et al.*, 2012). Para *T. areolatus* se utilizó una tasa de mutación equivalente a  $3.4 \times 10^{-3}$  /locus/generación, tasa promedio entre *Oncorhynchus gorboscha* del orden Salmoniformes (Steinberg *et al.*, 2002) y *Cyprinus carpio* del orden Cypriniformes (Yue *et al.*, 2007), ambas especies cercanas filogenéticamente a *T. areolatus* (Near *et al.*, 2012). A partir de las estimaciones de  $\Theta$  y conociendo las tasas de mutación para cada especie se obtuvo los tamaños efectivos históricos.

En nuestro caso se usaron corridas con 20 cadenas cortas con 40000 genealogías remuestreadas y 6 cadenas largas con 400000 genealogías considerando un burn-in de 40000. Se asumió el modelo de Wright Fisher con una matriz de migraciones completas, una tasa de mutación constante para todos los loci, un tamaño efectivo constante a través del tiempo y con intercambio de migrantes con tasas constantes por generación. Cada corrida se repitió 3 veces para corroborar las estimaciones obtenidas en cada análisis

Para estimaciones de tamaños efectivos contemporáneos a partir del método temporal se utilizó el software MLN<sub>E</sub> versión 1.0 (Wang & Whitlock, 2003). Este programa utiliza el principio de máxima verosimilitud para estimar tamaños efectivos actuales asumiendo que las mutaciones y la selección son despreciables, las potenciales fuentes de migrantes son conocidas *a priori*, que el muestreo es aleatorio y que los eventos de muestreo no cambian la constitución de la población muestreada. Con el programa MLN<sub>E</sub> se estimaron 3 valores de tamaño efectivo para cada corrida de datos, un valor en el límite inferior del intervalo de confianza del 95%, uno en el límite superior y un valor central. El método temporal se utilizó para estimaciones de N<sub>E</sub> en los Embalses Recoleta y Corrales (con muestras de los años 2006 y 2010), para los Embalses Cogotí y La Paloma no fue posible llevar a cabo las estimaciones debido a la ausencia de muestras para el año 2006.

Considerando que no se obtuvo muestras temporales en todos los ríos intervenidos por embalses, se utilizó el método basado en el exceso de heterocigotos implementado en el programa NeEstimator versión 1.3 (Peel *et al.*, 2004). Al igual que en el caso anterior, con NeEstimator se estimaron 3 valores de tamaño efectivo contemporáneo, límite inferior y superior del intervalo de confianza del 95% y un valor central.

Para determinar un efecto global de los embalses sobre los tamaños efectivos poblacionales entre afluente y efluente, ya sea históricos y contemporáneos, se comparó todos los embalses en un mismo análisis. Se realizó análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) de 1000 permutaciones implementados en el programa R (R Development

Core Team, 2011) considerando la variable dependiente tamaño efectivo poblacional y las variables independientes afluente – efluente y temporalidad.

#### 4.2.6 Migración

Para determinar posibles cambios en migraciones recíprocas entre afluentes y efluentes se estimó primero las tasas de migración para luego estimar migrantes efectivos por generación ( $N_{EM}$ ) históricos y contemporáneos. Los métodos que permiten la estimación de parámetros de migración pueden ser agrupados en dos categorías: (a) enfoque en coalescencia que usa la información genealógica y (b) enfoque en la genotipificación de multilocus. Los métodos coalescentes estiman parámetros evolutivos históricos mientras los métodos de genotipificación de multilocus estiman parámetros ecológicos recientes (Faubet *et al.*, 2007).

Para estimar migrantes efectivos históricos se utilizó el software MIGRATE-n versión 3.2.9 (Beerli & Felsenstein, 1999), el cual requiere que haya equilibrio migración-deriva pero no equilibrio Hardy Weinberg (Beerli, 2006). El supuesto que las poblaciones son cerradas a inmigración ha sido relajado, haciendo posible obtener estimaciones separadas de  $N_E$  y  $m$  para múltiples subpoblaciones (Beerli & Felsenstein, 2001). El método de máxima verosimilitud implementado en el programa permite estimar  $M$ , una tasa de migración escalada por la tasa de mutación ( $M = m/m\mu$ , donde  $m$  es equivalente a la tasa de migración y  $m\mu$  a la tasa de mutación), posteriormente se efectúa  $M \times \Theta$

$(m/m\mu \times x N_E m\mu)$  para obtener los migrantes efectivos históricos. Las configuraciones utilizadas para realizar estos análisis fueron descritas en la sección 4.2.5.

Para estimar migraciones recíprocas actuales se utilizó el enfoque bayesiano implementado en el software BAYESASS versión 1.3 (Wilson & Rannala, 2003). Este programa estima tasas de migración recientes (generalmente últimas dos generaciones) entre poblaciones a partir de datos genotípicos de multilocus usando Cadenas de Markov Monte Carlo. El modelo asume equilibrio de ligamiento y tiene como supuesto que no hay equilibrio migración-deriva ni Hardy Weinberg (Howes *et al.*, 2008). Adicionalmente el método asume que la deriva y migración durante las últimas generaciones no cambia las frecuencias alélicas de las subpoblaciones (Faubet *et al.*, 2007). En nuestro caso la configuración del programa utilizó 30000000 de iteraciones, 3000000 de burn-in, un valor de 0.15 para el delta de la frecuencia de alelos y 0.15 para el índice de endogamia tal como sugiere el autor del software. Se realizaron 10 corridas en cada caso, promediando los valores de migrantes obtenidos. Posteriormente, las tasas de migración contemporáneas estimadas fueron multiplicadas por los tamaños efectivos poblacionales actuales (ver sección 4.2.5), obteniéndose los migrantes efectivos por generación actuales.

Para determinar un efecto global de los embalses sobre los migrantes efectivos entre afluente y efluente, ya sea histórico y contemporáneo, se comparó todos los embalses en un mismo análisis. Al igual que en el caso anterior se realizó análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) de 1000 permutaciones implementados en el programa R (R

Development Core Team, 2011) considerando la variable dependiente migrantes efectivos y las variables independientes afluente – efluente y temporalidad.

#### 4.3.7 Cuellos de botella

Para determinar posibles reducciones recientes en tamaños efectivos poblaciones se utilizó el software BOTTLENECK v.1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). BOTTLENECK detecta posibles cuellos de botella comparando la heterocigosidad esperada bajo el equilibrio de Hardy Weinberg con la esperada bajo equilibrio mutación deriva. Los datos de microsatélites fueron probados bajo el modelo de mutación de dos fases (TPM) con 70% de las mutaciones siguiendo el modelo de mutación paso a paso (SMM), con una varianza del 30% y llevando a cabo 1000 iteraciones para calcular la significancia mediante el test de signos y el test de Wilcoxon (Luikart & Cornuet, 1998).

#### 4.2.7 Simulaciones

Con el fin de construir un modelo nulo que simule escenarios de estructuración poblacional y así validar nuestros resultados se utilizó el software EASYPOP v. 2.0.1 (Balloux, 2002), el cual se basa en un modelo finito de islas con  $I$  subpoblaciones, cada una con tamaño poblacional constante e igual proporción de sexos (Hoban *et al.*, 2012). Escenarios de estructuración poblacional fueron simulados con 1000 iteraciones para cada sitio de estudio y para cada especie (i.e 4 embalses para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* respectivamente, dos embalses muestreados en dos tiempos (2006 y 2010),

total corridas = 12000) utilizando los tamaños efectivos históricos considerando un modelo nulo con tasa de migración  $m = 0$  (para simular el efecto de la represa como barrera impermeable ante las migraciones de peces entre afluente y efluente).

Se utilizó como configuración del programa en cada corrida un número de poblaciones igual a 2 (correspondiente al afluente y efluente en cada embalse) con número distinto de individuos en cada poblacional (este valor se obtuvo a partir del cálculo de  $N_E$  histórico en cada sitio de estudio), un mismo esquema de migración nulo para toda la simulación ( $m = 0$ ), considerando además el modelo Single Step Mutation "SSM" (modelo de mutación en el cual los estados alélicos producidos por la mutación dependen del estado inicial de un alelo) para todos los loci con una tasa  $m\mu = 2 \times 10^{-3}$  para *B. microlepidotus* y  $m\mu = 3.38 \times 10^{-3}$  para *T. areolatus*, y considerando por último un número de generaciones diferenciado en las corridas para cada embalse de acuerdo al año de construcción correspondiente. La distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados se comparó con los valores de  $F_{ST}$  observados para analizar el efecto del embalse en cada caso (dado por  $m = 0$ ). Lo anterior, debido a que los valores simulados corresponden a lo que se debiese esperar en poblaciones que se están diferenciando debido al bloqueo de las migraciones entre afluente y efluente producto de la instalación de la barrera impermeable del embalse.

## RESULTADOS

### 5.1 Estadística Descriptiva

Un total de 10 marcadores microsatélites específicos para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* fueron amplificados, algunos resultaron ser monomórficos y otros presentaron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg en algunos sitios (ver Anexo III y IV). Mediante el uso del software MICROCHECKER no se evidenció la presencia de alelos nulos en los microsatélites amplificados en ambas especies.

En el caso de *B. microlepidotus*, datos del año 2006 (Embalses Recoleta y Corrales) y 2010 (Embalses Recoleta, Cogotí, La Paloma y Corrales) se muestran en la Tabla 3. Se observó a lo sumo dos loci monomórficos o dos loci no conformes con el equilibrio Hardy Weinberg por lo que éstos no fueron utilizados en los análisis comparativos que requieren de este supuesto. El ANOVA de permutaciones, en el cual se comparó la diversidad genética ( $G_D$ ) y riqueza alélica ( $A_R$ ) río arriba y río abajo de los embalses, no evidenció diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).



**Tabla 3** Resumen de los microsatélites utilizados para *B. microlepidotus* con muestras del año 2006 y 2010 en cada sitio de estudio y análisis de heterocigosidad. L<sub>M</sub>: Loci monomórficos, L<sub>SE</sub>: Loci fuera del equilibrio de Hardy Weinberg, L<sub>D</sub>: Desequilibrio de ligamiento, A<sub>L</sub>: Número promedio de alelos por locus, G<sub>D</sub>: Diversidad Genética, A<sub>R</sub>: Riqueza Alélica, S<sub>D</sub> ±: Desviación estándar, p: significancia estadística calculada con 1000 permutaciones realizado para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse.

Locaciones	Año	L <sub>M</sub>	L <sub>SE</sub>	L <sub>D</sub>	A <sub>L</sub>	Heterocigosidad					
						G <sub>D</sub>	S <sub>D</sub> ±	p	A <sub>R</sub>	S <sub>D</sub> ±	P
Sitio											
Rec <sup>1</sup>	2006	1	1	0.603	3.252	0.448	0.187	0.963	3.12	1.208	0.455
Rec <sup>2</sup>	2006	2	0	0.488	2.753	0.443	0.122		2.680	1.052	
Cor <sup>1</sup>	2006	1	0	0.462	3.882	0.503	0.268	0.746	3.768	1.598	0.809
Cor <sup>2</sup>	2006	1	0	0.506	4.114	0.542	0.246		3.957	1.689	
Rec <sup>1</sup>	2010	0	2	0.324	4.751	0.373	0.231	0.717	4.32	1.738	0.387
Rec <sup>2</sup>	2010	0	2	0.344	5.625	0.413	0.237		5.238	2.426	
Cog <sup>1</sup>	2010	0	1	0.436	3.110	0.28	0.213	0.523	2.562	0.597	0.934
Cog <sup>2</sup>	2010	0	1	0.563	2.672	0.358	0.232		2.531	0.859	
Pal <sup>1</sup>	2010	0	2	0.549	4.375	0.403	0.197	0.996	3.791	1.152	0.583
Pal <sup>2</sup>	2010	1	1	0.481	3.750	0.404	0.203		3.486	1.110	
Cor <sup>1</sup>	2010	1	0	0.492	3.556	0.46	0.26	0.695	3.308	1.515	0.551
Cor <sup>2</sup>	2010	1	0	0.455	4.889	0.511	0.264		3.717	1.388	

En el caso de *T. areolatus*, se observó un número mayor de loci monomórficos y de loci con desviaciones estadísticamente significativas del equilibrio Hardy Weinberg para muestras de los años 2006 y 2010 (Tabla 4). Los cálculos de número promedio de alelos por locus (A<sub>L</sub>), diversidad genética (G<sub>D</sub>) y riqueza alélica (A<sub>R</sub>) fueron estimados a partir de loci polimórficos en equilibrio de Hardy Weinberg.



**Tabla 4** Resumen de los microsatélites utilizados para *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010 en cada sitio de estudio y análisis de la heterocigosidad.  $L_M$ : Loci monomórficos,  $L_{SE}$ : Loci fuera del equilibrio de Hardy Weinberg,  $L_D$ : Desequilibrio de ligamiento,  $A_L$ : Número promedio de alelos por locus,  $G_D$ : Diversidad Genética,  $A_R$ : Riqueza Alélica,  $S_D \pm$ : Desviación estándar,  $p$ : significancia estadística calculada con 1000 permutaciones realizado para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse.

Locaciones	Año	$L_M$	$L_{SE}$	$L_D$	$A_L$	Heterocigosidad					
						$G_D$	$S_D \pm$	$P$	$A_R$	$S_D \pm$	$P$
Sitio											
Rec <sup>1</sup>	2006	4	0	0.518	3.167	0.556	0.128	0.563	3.116	1.496	0.81
Rec <sup>2</sup>	2006	3	1	0.5	3.500	0.593	0.098		3.302	1.504	
Cor <sup>1</sup>	2006	2	2	0.461	4.167	0.578	0.21	0.621	3.999	1.882	0.56
Cor <sup>2</sup>	2006	3	1	0.549	4.000	0.52	0.243		3.448	1.480	
Rec <sup>1</sup>	2010	2	3	0.484	4.200	0.584	0.105	0.789	4.066	1.9	0.347
Rec <sup>2</sup>	2010	2	3	0.55	3.200	0.568	0.11		3.052	1.1	
Cog <sup>1</sup>	2010	1	4	0.476	4.200	0.586	0.103	0.887	3.766	1.827	0.889
Cog <sup>2</sup>	2010	2	3	0.429	4.000	0.598	0.144		3.984	2.920	
Pal <sup>1</sup>	2010	3	0	0.442	3.571	0.525	0.211	0.959	3.556	1.873	0.819
Pal <sup>2</sup>	2010	2	1	0.56	4.429	0.533	0.267		4.082	3.591	
Cor <sup>1</sup>	2010	4	1	0.343	3.600	0.506	0.151	0.292	3.554	1.508	0.141
Cor <sup>2</sup>	2010	3	2	0.615	5.000	0.59	0.09		4.790	.969	

Al igual a lo observado en *B. microlepidotus*, no se detectó evidencias de desequilibrio de ligamiento dado que los marcadores segregan independientemente. Comparaciones pareadas de diversidad genética y riqueza alélica entre afluente y efluente en cada embalse no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

## 5.2 Estructuración y asignación Poblacional

Al utilizar el índice  $F_{ST}$  para medir la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones de peces ubicadas en el afluente y efluente de cada embalse se observó en

algunos casos diferencias significativas para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* tanto entre sitios separados por embalses (Tabla 5) como sitios localizados en diferentes cuencas (Anexo V al VIII), sin embargo, dichos valores de  $F_{ST}$  son cercanos a cero ( $0.002 < F_{ST} < 0.05$ ) lo cual sugiere una estructuración poblacional débil.

**Tabla 5** Valores de  $F_{ST}$  y su significancia estadística estimada con 10000 permutaciones para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010.

Locaciones	Año	<i>B. microlepidotus</i>		<i>T. areolatus</i>	
		$F_{ST}$	P	$F_{ST}$	P
Sitio					
Rec <sup>1</sup>	2006	0.022	0.06	0.006	0.27
Rec <sup>2</sup>	2006				
Cor <sup>1</sup>	2006	0.011	0.04	0.05	0.03
Cor <sup>2</sup>	2006				
Rec <sup>1</sup>	2010	0.026	0.6	0.002	0.001
Rec <sup>2</sup>	2010				
Cog <sup>1</sup>	2010	0.029	0.01	0.032	0.05
Cog <sup>2</sup>	2010				
Pal <sup>1</sup>	2010	0.013	0.16	0.016	0.002
Pal <sup>2</sup>	2010				
Cor <sup>1</sup>	2010	0.02	< 0.01	0.013	0.07
Cor <sup>2</sup>	2010				

Por otro lado, el análisis bayesiano, realizado con el programa STRUCTURE para *B. microlepidotus* y *T. areolatus*, comparando individuos provenientes de afluentes y efluentes de cada embalse tampoco permite rechazar la hipótesis nula de no diferenciación entre zonas, arrojando como número más probable de grupos un  $K = 1$  para cada embalse.

Con el fin de determinar si es posible asignar correctamente individuos presentes en cada zona (afluente versus efluente) se utilizó el programa FLOCK para realizar pruebas de asignación poblacional. En el caso de *B. microlepidotus* (Tabla 6) se observó que dentro de los embalses Recoleta, Cogotí y Corrales existió una diferenciación genética ya que en dichos casos los valores de *LLOD* para afluente y efluente son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la diferenciación genética entre los grupos fue bastante débil. En el caso del embalse La Paloma, no se observó diferencias significativas en la asignación ( $p = 0.69$ ).

**Tabla 6** Resumen de la Asignación Poblacional para *B. microlepidotus* con muestras del año 2006 y 2010. *LLOD*: Valores de probabilidad de diferenciación genética, *p*: significancia estadística calculada para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse. Adicionalmente se muestran valores porcentuales de individuos correctamente asignados según FLOCK y GENECLASS. \* Sitios de estudio donde la diferencia porcentual es menor al 10%.

Localidades	Año	LLOD	P	Asignación Poblacional (%)	
				FLOCK	GENECLASS
Sitio					
Rec <sup>1</sup>	2006	0.844	0.03	0.67	0.58
Rec <sup>2*</sup>	2006	-0.266		0.71	0.66
Cor <sup>1*</sup>	2006	1.323	0.04	0.75	0.75
Cor <sup>2*</sup>	2006	-0.077		0.6	0.66
Rec <sup>1*</sup>	2010	0.535	0.01	0.64	0.68
Rec <sup>2</sup>	2010	-1.533		0.65	0.53
Cog <sup>1*</sup>	2010	0.2	0.05	0.82	0.75
Cog <sup>2*</sup>	2010	-0.777		0.6	0.64
Pal <sup>1</sup>	2010	0.433	0.69	0.35	0.46
Pal <sup>2</sup>	2010	0.522		0.7	0.83
Cor <sup>1</sup>	2010	1.163	0.03	0.41	0.82
Cor <sup>2*</sup>	2010	-0.529		0.76	0.79

Es importante mencionar en cuanto a la comparativa de asignación poblacional que en 7 de los 12 sitios de muestreo los porcentajes de asignación calculados en los programas

FLOCK y GENECLASS fueron similares y correspondieron a valores dentro del intervalo de 60% - 80% de individuos correctamente asignados. Particularmente, sólo el sitio Cor<sup>1</sup> año 2010 muestra asignaciones claramente distintas.

En el caso de *T. areolatus*, en muestras del año 2006 provenientes de Recoleta y Corrales (Tabla 7) se observó en la comparativa afluente - efluente que no es posible evidenciar diferenciación genética ya que en ambos casos los valores de *LLOD* no fueron significativamente diferentes. En cambio, para los bagres muestreados el año 2010 (Tabla 7), se observó valores de *LLOD* significativamente distintos sugiriendo que existen diferencias genéticas entre afluente y efluente en cada embalse. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, la diferenciación genética encontrada fue débil.

**Tabla 7** Resumen de la Asignación Poblacional para *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010. *LLOD*: Valores de probabilidad de diferenciación genética, *p*: significancia estadística calculada para las comparaciones pareadas entre afluente y efluente en cada embalse. Adicionalmente se muestran valores porcentuales de individuos correctamente asignados según FLOCK y GENECLASS. \* Sitios de estudio donde la diferencia porcentual es menor al 10%.

Localidades	Año	LLOD	P	Asignación Poblacional (%)	
				FLOCK	GENECLASS
Sitio					
Rec <sup>1*</sup>	2006	0.782	0.17	0.53	0.5
Rec <sup>2*</sup>	2006	-0.005		0.68	0.63
Cor <sup>1</sup>	2006	0.234	0.16	0.63	0.42
Cor <sup>2*</sup>	2006	-0.622		0.61	0.67
Rec <sup>1*</sup>	2010	0.515	0.01	0.72	0.67
Rec <sup>2*</sup>	2010	-0.915		0.6	0.65
Cog <sup>1</sup>	2010	1.12	0.01	0.69	0.81
Cog <sup>2*</sup>	2010	-0.35		0.62	0.65
Pal <sup>1*</sup>	2010	0.562	0	0.84	0.81
Pal <sup>2*</sup>	2010	-2.163		0.63	0.69
Cor <sup>1</sup>	2010	0.759	0.01	0.64	0.73
Cor <sup>2*</sup>	2010	-0.685		0.69	0.7

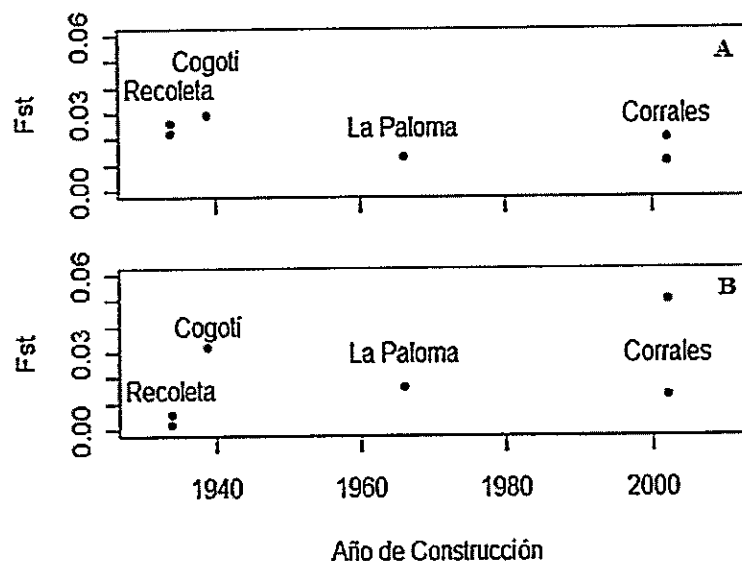
Finalmente la comparación de asignación poblacional implementada en los programas FLOCK y GENECLASS mostró que en 9 de los 12 sitios estudiados para *T. areolatus*, los porcentajes de asignación fueron similares y correspondieron a valores dentro del intervalo de 50% - 84% de individuos correctamente asignados. Particularmente, sólo el sitio Cor<sup>1</sup> año 2006 mostró asignaciones diferentes. Para ambas especies se observó que los porcentajes de individuos correctamente asignados no fue alto, lo cual da indicios de que las poblaciones ubicadas en los afluentes y efluentes no presentan grandes diferencias genéticas en cuanto a la variación en las frecuencias alélicas de sus individuos, por lo tanto, dado la similitud de cada individuo a ambas poblaciones (afluente y efluente de cada embalse) fue difícil asignarlos correctamente a su población de origen.

En resumen, los resultados de estructuración poblacional obtenidos independientemente para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* a partir de F-estadística, métodos bayesianos y reasignaciones individuales implementadas por separado en los programas GENETIX, STRUCTURE y FLOCK respectivamente sugieren que la diferenciación genética encontrada entre afluente y efluente en cada embalse es débil y por lo tanto, en la mayoría de los casos no es posible rechazar la hipótesis nula de no estructuración poblacional.

### 5.3 Índice de estructuración poblacional $F_{ST}$ versus tiempo

Posteriormente al análisis de estructuración poblacional en ambas especies nos interesa

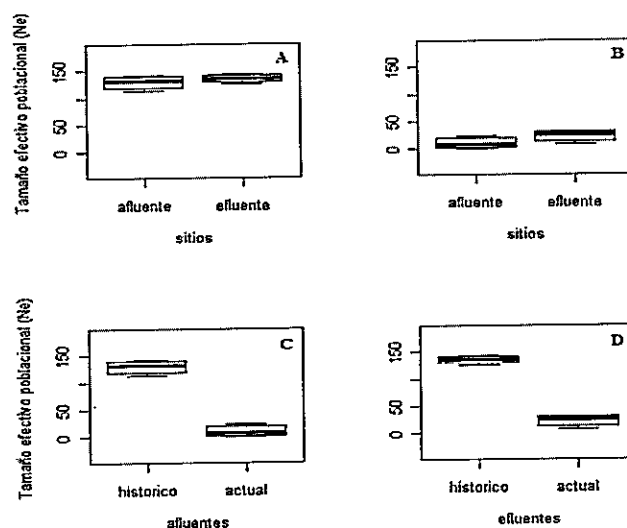
establecer si el grado de diferenciación se relaciona con el tiempo en el cual han estado separados estos grupos. En la Figura 4 es posible observar mediante estimaciones del coeficiente de correlación de Spearman que tanto para *B. microlepidotus* ( $\rho = -0.58$ ,  $p = 0.42$ ) como para *T. areolatus* ( $\rho = 0.2$ ,  $p = 0.92$ ) no existió una relación entre el índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  y el año de construcción de los embalses, es más, en el caso del bagre *T. areolatus* el embalse Corrales siendo el más nuevo según año de construcción (año 2002) presenta los valores más altos de  $F_{ST}$  para muestras del año 2010. Por lo tanto, no es posible evidenciar un efecto del tiempo de instalación de los embalses sobre las poblaciones naturales en un rango de al menos 80 años (correspondiente al periodo de tiempo desde la construcción del primer embalse en estudio hasta la fecha).



**Figura 4** Plot índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  versus año de construcción de embalses. A) *B. microlepidotus* B) *T. areolatus*. Coeficientes de correlación de Spearman fueron calculados en ambos casos con muestras de los años 2010.\* En el caso de los embalses Recoleta y Corrales se plotearon dos puntos correspondientes a muestras de los años 2006 y 2010.

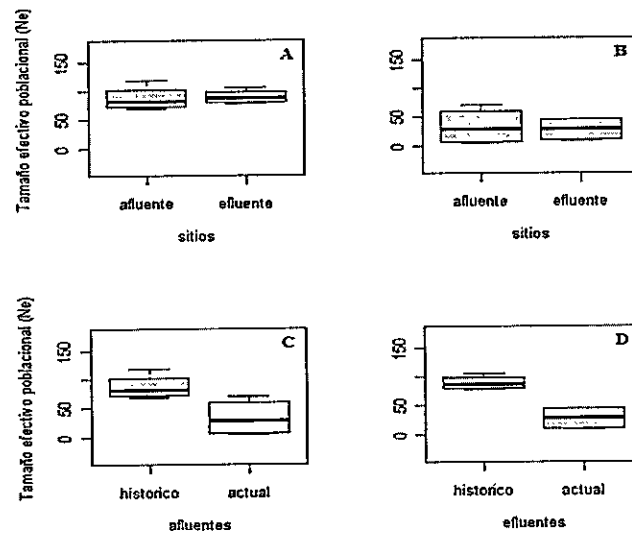
#### 5.4 Tamaños efectivos históricos y actuales

Con el fin de encontrar un efecto global de los embalses sobre los tamaños efectivos poblacionales en afluentes y efluentes, ya sea históricos y contemporáneos, se comparó todos los embalses en un mismo análisis. En el caso de *B. microlepidotus* se observó que los tamaños efectivos históricos entre afluente y efluente no mostraron diferencias significativas (Figura 5 A;  $p = 0.449$ ). En el caso de los tamaños efectivos contemporáneos, éstos no mostraron valores estadísticamente diferentes (Figura 5 B;  $p = 0.136$ ). Sin embargo, al comparar los tamaños efectivos históricos y contemporáneos se observaron valores históricos mayores a los valores actuales, tanto para afluentes (Figura 5 C;  $p = 0.017$ ) como para efluentes (Figura 5 D;  $p = 0.009$ ).



**Figura 5** Boxplot de Tamaño efectivo poblacional ( $N_E$ ) para *B. microlepidotus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.002 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* Diferencias significativas fueron observadas al comparar tamaños efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes.

Para *T. areolatus* se observó que los tamaños efectivos históricos entre afluente y efluente no mostraron diferencias significativas (Figura 6 A;  $p = 0.896$ ). En el caso de los tamaños efectivos contemporáneos, estos no mostraron valores estadísticamente diferentes (Figura 6 B;  $p = 0.768$ ). Sin embargo, al igual que en el caso anterior al comparar los tamaños efectivos históricos y contemporáneos se observaron valores históricos mayores a los valores actuales, tanto para afluentes (Figura 6 C;  $p = 0.045$ ) como para efluentes (Figura 6 D;  $p = 0.026$ ).



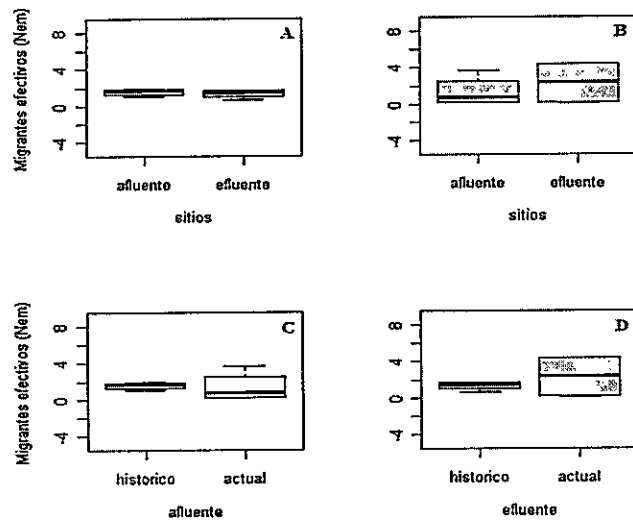
**Figura 6** Boxplot de Tamaño efectivo poblacional ( $N_E$ ) para *T. areolatus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.0034 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* Diferencias significativas fueron observadas al comparar tamaños efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes.



En resumen, tanto para *B. microlepidotus* como para *T. areolatus* es posible evidenciar que los tamaños efectivos históricos son significativamente mayores a los actuales en afluentes y efluentes (Figura 5C – 5D; Figura 6C – 6D respectivamente). Por tanto, no es posible descartar este parámetro como factor influyente en la diferenciación genética observada en los distintos sitios de estudio.

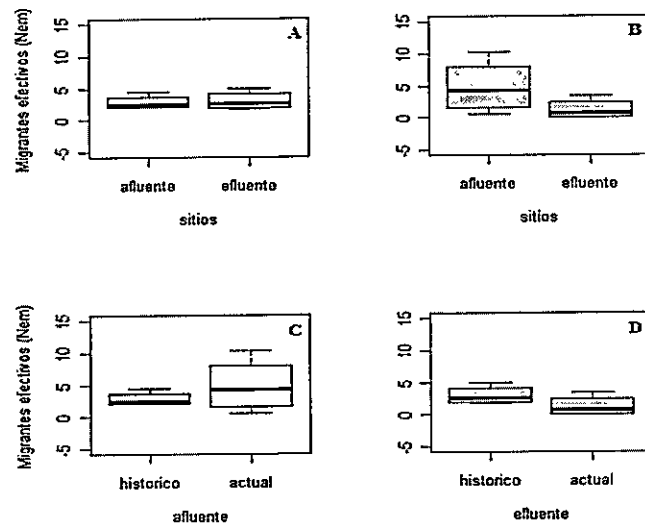
### 5.5 Migrantes efectivos históricos y actuales

Se comparó todos los embalses en un mismo análisis con el objetivo de encontrar un efecto global de los embalses sobre los migrantes efectivos por generación históricos y contemporáneos entre afluente y efluente. Para *B. microlepidotus* es posible observar en la Figura 7 A) y B) estimaciones de migrantes efectivos entre afluente y efluente históricos y contemporáneos no significativas respectivamente ( $p_A = 0.53$ ,  $p_B = 0.558$ ), mientras en C) y D) se estimaron migrantes efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes respectivamente, ambos casos con valores no significativos ( $p_C = 0.867$ ,  $p_D = 0.416$ ).



**Figura 7** Boxplot de Migrantes efectivos ( $N_{EM}$ ) para *B. microlepidotus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.002 /locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* No hubo diferencias significativas entre migrantes efectivos en ninguna de las comparaciones.

En el caso de los cálculos de migrantes efectivos para *T. areolatus* es posible observar en la Figura 8 A) y B) estimaciones de migrantes efectivos entre afluente y efluente históricos y contemporáneos no significativos respectivamente ( $p_A = 0.831$ ,  $p_B = 0.179$ ), mientras en C) y D) se estimaron migrantes efectivos históricos versus actuales en afluentes y efluentes respectivamente, ambos casos con valores no significativos ( $p_C = 0.473$ ,  $p_D = 0.128$ ).



**Figura 8** Boxplot de Migrantes efectivos ( $N_{EM}$ ) para *T. areolatus*. A) Valores históricos estimados con tasa de mutación = 0.0034 locus/generación B) Valores actuales C) Valores históricos versus actuales en afluentes D) Valores históricos versus actuales en efluentes. \* No hubo diferencias significativas entre migrantes efectivos en ninguna de las comparaciones.

En resumen, las diversas comparaciones de migrantes efectivos realizadas independientemente para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* no evidenciaron diferencias significativas en ningún caso, por lo tanto,  $N_{EM}$  no tendría mayor efecto sobre la diferenciación genética encontrada en las poblaciones naturales de peces en estudio. De esta forma, el tamaño efectivo poblacional sería el parámetro más importante para dilucidar la dinámica que adquieren las poblaciones cuando el afluente queda separado físicamente del efluente producto de la instalación de la represa en el cauce del río.

### 5.6 Cuellos de Botella

Los resultados de las pruebas de signos y de Wilcoxon mostraron en análisis independientes para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* que en la mayoría de los casos las

poblaciones no evidenciaron cuellos de botella recientes (Tabla 8). Sin embargo, en el caso del pejerrey se observó señales de cuello de botella (dado por valores estadísticamente significativos en ambas pruebas) en el afluente del embalse Recoleta, efluente de Cogotí y en el embalse La Paloma. Por otra parte, en el caso del bagre solo se observó señales de cuello de botella en el afluente del embalse Recoleta.

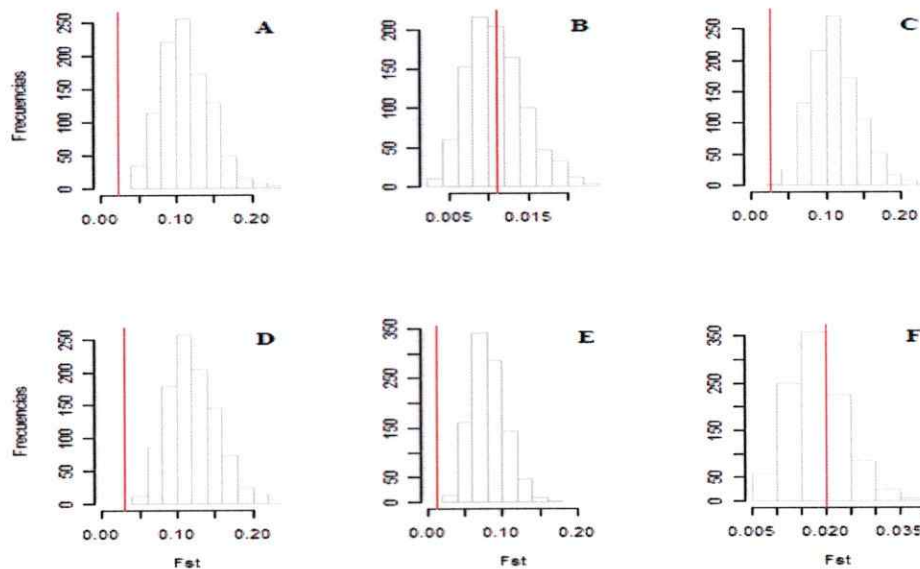
**Tabla 8** Análisis de señales de cuellos de botella mediante el cálculo de las pruebas de signos y Wilcoxon para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* para cada sitio de muestreo.

Año	Sitio de Estudio	Sitio de Muestreo	<i>Basilichthys microlepidotus</i>		<i>Trichomycterus areolatus</i>	
			Signos	Wilcoxon	Signos	Wilcoxon
2006	Embalse Recoleta	Rec <sup>1</sup>	0.171	0.362	0.022	0.016
		Rec <sup>2</sup>	0.414	0.641	0.301	0.578
	Embalse Corrales	Cor <sup>1</sup>	0.599	0.91	0.268	0.383
		Cor <sup>2</sup>	0.173	0.203	0.327	0.375
2010	Embalse Recoleta	Rec <sup>1</sup>	0.084	0.105	0.097	0.461
		Rec <sup>2</sup>	0.015	0.009	0.454	0.547
	Embalse Cogotí	Cog <sup>1</sup>	0.021	0.018	0.179	0.426
		Cog <sup>2</sup>	0.381	0.57	0.544	0.844
	Embalse La Paloma	Pal <sup>1</sup>	0.016	0.005	0.572	0.578
		Pal <sup>2</sup>	0.034	0.02	0.437	0.547
	Embalse Corrales	Cor <sup>1</sup>	0.38	0.82	0.532	0.844
		Cor <sup>2</sup>	0.32	0.496	0.122	0.297

## 5.7 Simulaciones

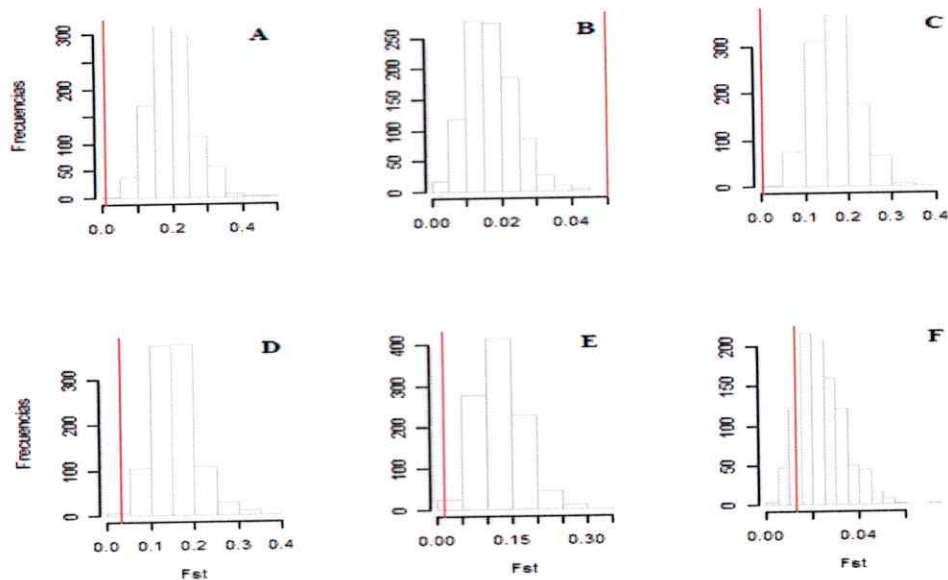
A partir de la simulación de escenarios de estructuración poblacional basados en el modelo nulo ( $m = 0$ ) se comparó los índices de  $F_{ST}$  observados (cálculos obtenidos con el programa GENETIX) con los índices  $F_{ST}$  simulados en EASYPOP. En el caso de *B.*

*microlepidotus* se observó que exceptuando el Embalse Corrales, en todos los otros casos los valores de  $F_{ST}$  observado fueron significativamente menores a la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados (Figura 9 A, C, D, E;  $p < 0.05$ ), por lo tanto, para *B. microlepidotus* se observó una estructuración poblacional menor a la esperada si el embalse fuese impermeable a los movimientos migratorios. Considerando que la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados representa posibles escenarios de estructuración poblacional en presencia del embalse bloqueando las migraciones, y considerando además que los  $F_{ST}$  observados fueron significativamente menores a los simulados, queda en evidencia que el embalse no estaría provocando efectos sobre la estructuración de las poblaciones de peces.



**Figura 9** Histograma comparativo de  $F_{ST}$  observado (vertical roja) versus la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados en Easypop para *B. microlepidotus*. A) Embalse Recoleta, año 2006 B) Embalse Corrales, año 2006 C) Embalse Recoleta, año 2010 D) Embalse Cogotí, año 2010 E) Embalse La Paloma, año 2010 F) Embalse Corrales, año 2010.

Para el caso de *T. areolatus* exceptuando el Embalse Corrales, en todos los otros casos los valores de  $F_{ST}$  observado fueron significativamente menores a la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados (Figura 10 A, C, D, E;  $p < 0.05$ ). Por lo tanto, al igual que en el caso anterior, también queda en evidencia que el embalse no estaría provocando efectos sobre la estructuración de las poblaciones de peces.



**Figura 10** Histograma comparativo de  $F_{ST}$  observado (vertical roja) versus la distribución de valores de  $F_{ST}$  simulados en Easypop para *T. areolatus*. A) Embalse Recoleta, año 2006 B) Embalse Corrales, año 2006 C) Embalse Recoleta, año 2010 D) Embalse Cogotí, año 2010 E) Embalse La Paloma, año 2010 F) Embalse Corrales, año 2010

En resumen, las comparativas de  $F_{ST}$  observado versus  $F_{ST}$  simulado para *B. microlepidotus* y *T. areolatus* evidencian que en la mayoría de los sitios no se rechaza la hipótesis nula de no diferenciación genética poblacional ya que se observan valores de  $F_{ST}$  observados (obtenidos a partir de F-estadística) significativamente menores a los  $F_{ST}$

simulados (tasa de migración  $m = 0$ ). Es decir, el embalse sería una barrera permeable a las migraciones que no afecta la estructuración poblacional. Sin embargo, en ambas especies las comparativas de  $F_{ST}$  observados y  $F_{ST}$  simulados para el embalse Corrales señalan que la estructuración poblacional observada sería similar a la esperada bajo el modelo nulo ( $m = 0$ ). Por lo tanto, es este caso el embalse Corrales efectivamente sería una barrera impermeable a los movimientos migratorios. Lo anterior podría asociarse a evidencias que señalan la ausencia de conexiones mediante canales de regadío entre afluente y efluente en el embalse Corrales, y a evidencias de conexiones entre afluente y efluente en los tres embalses de la cuenca del Limarí.

## DISCUSION

Efectos antrópicos sobre las poblaciones naturales de peces que habitan sistemas dulceacuícolas han sido descritos recientemente en la literatura (e.g. Sterling *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2012; García *et al.*, 2011) aunque no siempre es fácil detectarlos debido al corto tiempo en el cual las poblaciones han sido expuestas a la degradación de los hábitats, de hecho otros artículos han reportado ausencia de impacto de las represas en los sistemas límnicos (ver Reid *et al.*, 2008). En el presente estudio ha quedado en evidencia que considerando que los ríos llevan pocos años intervenidos (tiempo menor a 80 años) es observable solo un efecto débil de fragmentación en las poblaciones de *B. microlepidotus* y *T. areolatus*. Si bien este efecto no se relaciona con el tiempo de separación impuesto por los embalses, tampoco guardaría relación con cuellos de botella recientes sufridos por las poblaciones debido a que no hubo señales claras de aquello en ninguna de las dos especies. Mas bien, los indicios de estructuración poblacional se verían reflejados principalmente en los tamaños efectivos poblacionales ( $N_E$ ), donde fue posible observar inclusive diferencias significativas en estimaciones comparativas entre  $N_E$  históricos y contemporáneos en afluentes y efluentes tanto para *B. microlepidotus* como para *T. areolatus*, dando cuenta que este parámetro sería clave en la determinación de la diferenciación genética poblacional.



## Tamaños efectivos poblacionales

En relación a las estimaciones históricas del tamaño efectivo, el acercamiento coalescente es el más aceptado a pesar que es sabido el problema existente para calcular las tasas de mutación de microsatélites especie – específicas. En otras palabras, se debe considerar que el acercamiento coalescente es una aproximación para el cálculo de  $N_E$  histórico que puede estar sesgado por la dificultad de estimar con certeza las tasas de mutación. Mientras que en el caso de las estimaciones contemporáneas, se considera que los estimadores de  $N_E$  temporales suelen ser más precisos y confiables debido a que no solo informan de lo que está ocurriendo en un momento determinado sino que utilizan muestras de dos periodos de tiempo para realizar las estimaciones reduciendo el error existente al calcular  $N_E$  (Wang, 2005). Sin embargo, la dificultad de este método es que no siempre es posible obtener muestras temporales en los estudios realizados, por lo cual se han desarrollado métodos relacionados al desequilibrio de ligamiento y exceso de heterocigotos, los cuales aún no han logrado una aproximación precisa debido a que presentan supuestos restrictivos (Wilson & Rannala, 2003).

Con el objetivo de determinar la validez de los de tamaños efectivos contemporáneos estimados con el método momentáneo basado en exceso de heterocigotos, se realizaron comparaciones con los valores de tamaño efectivo actual obtenidos con el método temporal. La comparación entre ambos métodos se pudo realizar sólo para los embalses Recoleta y Corrales tanto para *B. microlepidotus* (Tabla 9) como para *T. areolatus* (Tabla 10) de los cuales se tenían muestras desde el año 2006.

**Tabla 9** Estimaciones de tamaño efectivo poblacional contemporáneo para *B. microlepidotus*. Para valores de método momentáneo y temporal se muestra el intervalo de confianza del 95% del límite inferior, superior, y el valor de  $N_E$  central.

Localidades	Tamaño efectivo poblacional					
	Método Momentáneo			Método Temporal		
	Inferior 95%	Superior a 95%	$N_E$	Inferior 95%	Superior 95%	$N_E$
Sitio						
Rec <sup>1</sup>	11	16	13	24	∞	59
Rec <sup>2</sup>	6	8	7	12	116	26
Cor <sup>1</sup>	2	3	2	19	84	34
Cor <sup>2</sup>	15	24	19	59	146	78

**Tabla 10** Estimaciones de tamaño efectivo poblacional contemporáneo para *T. areolatus*. Para valores de método momentáneo y temporal se muestra el intervalo de confianza del 95% del límite inferior, superior, y el valor de  $N_E$  promedio.

Localidades	Tamaño efectivo poblacional					
	Método Momentáneo			Método Temporal		
	Inferior 95%	Superior a 95%	$N_E$	Inferior 95%	Superior 95%	$N_E$
Sitio						
Rec <sup>1</sup>	3	4	4	14	∞	19
Rec <sup>2</sup>	30	82	46	35	189	66
Cor <sup>1</sup>	49	∞	71	7	16	10
Cor <sup>2</sup>	10	16	12	13	26	18

Si bien es posible observar algunas variaciones en la estimación de tamaños efectivos con ambos métodos, en general los valores son del mismo orden de magnitud, pudiendo observarse una magnitud de cambio entre afluente y efluente proporcional para cada embalse comparable entre el método momentáneo y temporal. Sin embargo, cabe resaltar que uno de los supuestos del método temporal es que el cambio en las frecuencias alélicas está dado únicamente por el efecto de la deriva génica, por lo tanto, selección natural, mutaciones y migraciones recíprocas no son consideradas (Wang & Whitlock, 2003). En estimaciones a corto plazo, como ocurre en este caso, tanto la selección como mutación pueden no considerarse ya que su efecto es mínimo en

periodos de tiempo corto. Sin embargo, se puede incurrir en equivocaciones al omitir efectos de la migración ya que éstas podrían estar regulando parte de la estructuración de las poblaciones mediante la conectividad por flujo génico (Wang, 2001).

#### Parámetros genéticos y su importancia en el estudio de poblaciones

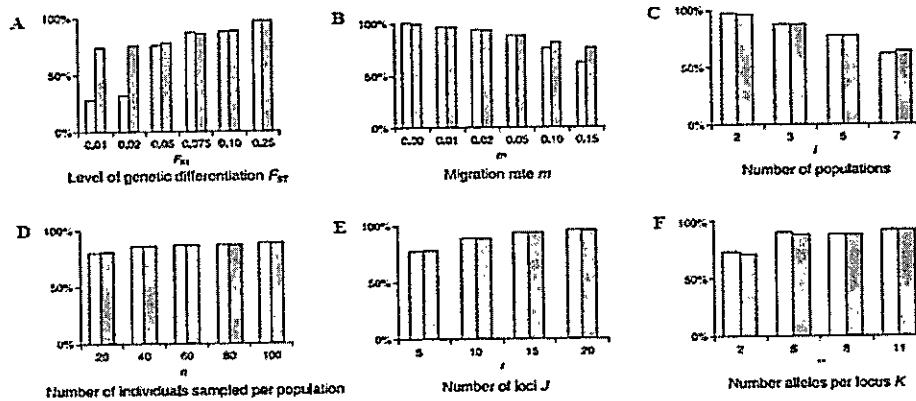
Los primeros indicios que mostraron ausencia de un efecto claro del embalse sobre las poblaciones de peces fueron los resultados obtenidos de riqueza alélica ( $A_R$ ), diversidad genética ( $G_D$ ) y número promedio de alelos por locus ( $A_L$ ) en ambas especies ya que se esperaba observar valores discrepantes en las comparaciones pareadas afluente - efluente, sin embargo estos parámetros no mostraron diferencias significativas. Lo anterior podría deberse al bajo número promedio de alelos por locus observado en los sitios de estudio para las dos especies ( $A_L = 3.9$ ) en relación al promedio descrito para otros peces dulceacuícolas ( $A_L = 7.5$ , Dewoody & Avise, 2000). En este contexto, se revisó la diversidad alélica de estos loci en muestras realizadas en otras cuencas. Información obtenida a partir del Embalse Rapel indica que *T. areolatus* presenta un número promedio de alelos por locus mayor en un número comparable de individuos analizados ( $A_{L\_RAPEL} = 8.8$ ). Adicionalmente, resultados comparativos para *T. areolatus* entre los embalses en estudio y Rapel indican que los primeros presentan valores de diversidad genética significativamente menores a los observados en el Embalse Rapel ( $G_D = 0.379 \pm 0.225$ ;  $G_{D\_RAPEL} = 0.714 \pm 0.17$ ,  $p = 0.013$ ). Sumado a esto, algunas evidencias indican que no es problema de la elección de loci; este bajo número de alelos podría estar relacionado con el reducido tamaño de las poblaciones en estas dos cuencas.

Quezada *et al.* (2010) indica que en estas cuencas se encuentran los pejerreyes y bagres con menor diversidad genética de la zona central pudiendo atribuirse al pequeño tamaño poblacional histórico.

### Migraciones recíprocas

Se esperaba encontrar estimaciones de migrantes efectivos menores en los registros actuales con respecto a valores históricos, sin embargo, no se observó diferencias significativas al comparar migrantes provenientes de afluentes con dirección a efluentes ni viceversa tanto para valores históricos como actuales. De la misma forma, tampoco se observó diferencias en la comparación de migrantes efectivos históricos versus contemporáneos. Esto podría deberse a posibles subestimaciones de las tasas de migración históricas o sobreestimaciones de las tasas de migración contemporáneas. Desde esta perspectiva, se ha descrito en estos últimos años que los avances computacionales y el conocimiento proveniente del área de la ecología y genética de la conservación han permitido notorias mejoras en la estimación del flujo génico, específicamente para el cálculo de tasas de migración históricas y contemporáneas (Waples & Gaggiotti, 2006). Adicionalmente, los análisis de migrantes se han realizado considerando las condiciones de corrida de los distintos programas sugeridas por los autores. Por ejemplo, Faubet *et al.* (2007) indica que el programa BAYESASS bajo condiciones de  $F_{ST} > 0.02$ , tasas de migración cercanas a  $m = 0.1$ , número de subpoblaciones  $k < 5$ , tamaños muestrales de  $n > 40$ , con 5 – 10 loci, y con un promedio de  $A_L = 5$  (Figura 11) provee estimaciones de tasas de migración recientes con precisión.

En nuestro caso, la mayoría de estas condiciones se cumplieron al llevar a cabo los análisis.



**Figura 11** Parámetros para optimizar la performance del programa BAYESASS. A) Índice de estructuración poblacional  $F_{ST}$  B) Tasa de migración C) Número de poblaciones D) Número de individuos muestreados por población E) Número de loci F) Número de alelos por locus. (Modificado de Faubet *et al.*, 2007)

## Simulaciones

Uno de los puntos interesantes acerca de la estructuración poblacional y sus parámetros asociados fue la simulación de posibles escenarios de estructuración poblacional considerando el modelo nulo de migración ( $m = 0$ ). Al comparar la distribución de valores simulados de  $F_{ST}$  con aquellos estimados mediante F-estadística se observó que éstos últimos fueron significativamente menores. Se esperaba que los valores de diferenciación genética observados fuesen mayores dado el posible efecto del embalse como barrera a las migraciones, sin embargo, esto no ocurrió observándose valores de  $F_{ST}$  significativamente menores a lo esperado, por lo tanto, es probable que la barrera del

embalse sea permeable al paso de peces. Un antecedente de suma importancia es que al observar los resultados de las simulaciones se puede ver que el  $F_{ST}$  observado y simulado en el Embalse Corrales coinciden (no presentan diferencias significativas), es decir, este es el único caso en que el embalse estaría funcionando como barrera impermeable al paso de peces, y aún más importante, esta situación ocurre tanto para *B. microlepidotus* como para *T. areolatus*. Hay evidencias de que en los otros tres embalses estudiados existen canales de regadío que conectan el afluente y efluente en cada caso, por lo tanto, en los embalses Recoleta, Cogotí y La Paloma no se estaría observando estructuración de las poblaciones debido a que los peces estarían migrando entre afluente y efluente utilizando canales de regadío.

El hecho que no fuese posible evidenciar efectos de diferenciación poblacional provocados por la instalación de embalses en ambas especies (a excepción del embalse Corrales) es sumamente importante ya que *B. microlepidotus* y *T. areolatus* no son especies cercanas filogenéticamente, siendo además disímiles en cuanto a formas de vida y movilidad. Es decir, considerando cada una de las especies como un elemento de análisis independiente se observó un patrón similar en cuanto al estudio de estructuración poblacional.

## CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos se concluye que solo es posible evidenciar un efecto débil de los embalses sobre la estructuración de las poblaciones naturales de peces al analizar independientemente el caso de *B. microlepidotus* y *T. areolatus*. Sin embargo, la poca diferenciación genética observada no tendría relación con la antigüedad de los embalses, encontrándose inclusive el caso de Corrales, que siendo el embalse más reciente presentó el índice de estructuración poblacional mayor. Aparentemente, el uso de canales de regadío como ruta migratoria sería clave para mantener la conectividad de las poblaciones en los embalses de la cuenca del río Limarí. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis de diferenciación genético poblacional dependiente del tiempo de instalación de los embalses.

Por otra parte, análisis de migrantes y tamaños efectivos poblacionales mostraron particularmente que éstos últimos serían clave para detectar indicios de estructuración poblacional. Específicamente, estimaciones de tamaños efectivos poblacionales evidenciaron valores actuales significativamente menores a los históricos.

Además, mediante el cálculo de  $F_{ST}$  simulados se observó que la estructuración poblacional encontrada en ambas especies fue significativamente menor a la esperada

bajo el supuesto que el embalse funcionase como barrera impermeable a las migraciones.



## REFERENCIAS

**Aljanabi S.M, Martinez I. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693

**Allendorf F.W, Ryman N. 2002.** The role of genetics in population viability analysis. In: *Population Viability Analysis*. S. R. Beissinger and D. R. McCullough, editors. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. pp. 50-85

**Anderson J, Karel W, Mione A. 2012.** Population structure and evolutionary history of southern flounder in the gulf of Mexico and Western Atlantic ocean. *Transactions of the American Fisheries Society* 141: 46-55

**Apodaca J.J, Rissler L, Godwin J. 2012.** Population structure and gene flow in a heavily disturbed habitat: implications for the management of the imperiled Red Hills salamander (*Phaeognathus hubrichti*). *Conservation Genetics* 13; 913-923

**Arratia G. 1997.** Basal teleosts and teleostean phylogeny. *Palaeo Ichthyologica* 7: 5-168

**Avise J. 2009.** Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15

**Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology* 11: 155-165

**Beerli P, Felsenstein J. 1999.** Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective populations numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763-773

**Beerli P, Felsenstein J. 2001.** Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in  $n$  subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4563-4568

**Beerli P. 2006.** Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22: 341-345

**Beheregaray L, Sunnucks P. 2000.** Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology* 9: 629-644

**Belkhir K, Borsa P, Chikki L, Goudet J, Bonhomme F. 2000.** GENETIX version 4.02. Logiciel sous WindowsMT pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France

**Campos H, Gavilán J, Alay F, Ruiz V.H. 1993.** Comunidad íctica de la hoya hidrográfica del Río biobío. En: *Monografías científicas EULA*, Ed. Universidad de Concepción, Chile 12: 249-271

**Clavero M, Blanco-Garrido F, Prenda J. 2004.** Fish fauna in Iberian Mediterranean river basins: biodiversity, introduced species and damming impacts. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem* 14: 575-585

**Collares-Pereira M.J, Cowx I.G. 2004.** The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. *Fisheries Management and Ecology* 11: 303-312

**Comte S, Vila I. 1992.** Spawning of *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns). *Journal of Fish Biology* 41: 971-981

**Cornuet J-M, Luikart G. 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014

**DeWoody J, Avise J. 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461- 473

**Duarte W, Feito R, Jara C, Moreno C, Orellana A. 1971.** Ictiofauna del sistema hidrográfico del río Maipo. *Boletín del Museo de Historia Natural de Chile* 32: 227 - 268

**Duchesne P, Turgeon J. 2009.** FLOCK: a method for quick mapping of admixture without source samples. *Molecular Ecology Resources* 9: 1333 – 1344

**Duchesne P, Turgeon J. 2012.** FLOCK provides reliable solutions to the “Number of populations” problem. *Journal of Heredity* 103: 734-743

- Dudgeon D, Arthington A.H, Gessner M.O, Kawabata Z.I, Knowler D.J, Leveque C, Naiman R.J, Prieur-Richard A.H, Soto D, Stiassny M.L.J, Sullivan C.A. 2006.** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: 163–182
- Dyer B. 2000.** Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos* 19:77–98
- Dynesius M, Nilsson C. 1994.** Fragmentation and Flow Regulation of River Systems in the Northern Third of the World. *Science* 266: 753 – 762
- England P.R, Cornuet J.M, Berthier P, Tallmon D.A, Luikart G. 2006.** Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias using small samples. *Conservation Genetics* 7: 303-308
- Falush D, Stephens M, Pritchard J.K. 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587
- Falush D, Stephens M, Pritchard J.K. 2007.** Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578
- Faubet P, Waples R, Gaggiotti O. 2007.** Evaluating the performance of a multilocus bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular ecology* 16: 1149-1166
- Frankham R, Ballou, J.D, Briscoe D.A. 2002.** *Introduction to Conservation Genetics.* Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Frankham R, Gilligan D.M, Morris D, Briscoe D.A. 2001.** Inbreeding and extinction: Effects of purging, *Conservation Genetics* 2: 279–284
- Frankham R. 1995.** Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305–327.
- Frankham R. 2005a.** Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140
- Frankham R. 2005b.** Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 750-755

- García A, Jorde K, Habit E, Camaño D, Parra O. 2011.** Downstream environmental effects of dam operations: changes in habitat quality for native fish species. *River Research and Applications* 27: 312-327
- Goudet J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *The Journal of Heredity* 86: 485-486
- Habit E, Dyer B, Vila I. 2006.** Current state of knowledge of freshwater fishes of Chile. *Gayana* 70: 100 – 113
- Habit E, Victoriano P, Campos H. 2005.** Ecología trófica y aspectos reproductivos de *Trichomycterus areolatus* (Pisces, Trichomycteridae) en ambientes lóticos artificiales. *Revista de Biología Tropical* 53: 195-210
- Habit E, Victoriano P. 2006.** Freshwater fishes of the Chilean coastal range. Smith-Ramírez C, Armesto J & Valdovinos C (eds.) *Biodiversidad y Ecología de la Cordillera de la Costa de Chile*. Editorial Universitaria, pp.: 392-403
- Hall C.J, Jordan A, Frisk M.G. 2011.** The historic influence of dams on diadromous fish habitat with a focus on river herring and hydrologic longitudinal connectivity. *Landscape Ecology* 26: 95–107
- Haponski A, Thomas A, Stepien C. 2007.** Genetic divergence across a low-head dam: A preliminary analysis using Logperch and Greenside Darters. *Journal of Great Lakes Research* 33: 117-126
- Hoban S, Bertorelle G, Gaggiotti O. 2012.** Computer simulations: tools for population and evolutionary genetics. *Nature review Genetics* 13: 110-122
- Howes B, Brown J, Lisle Gibbs H, Herman T, Mockford S, Prior K, Weatherhead P. 2008.** Directional gene flow patterns in disjunct populations of the black ratsnake (*Pantheropsis obsoletus*) and the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). *Conservation Genetics* 10: 407-417
- Jarne P, Lagoda P. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424–429
- Jones A, Rosenqvist G, Berglund A, Avise J.C. 1999.** Clustered Microsatellite Mutations in the Pipefish *Syngnathus typhle*. *Genetics* 152: 1057-1063

- Koshimizu E, Strussmann C, Tejedor E, Okamoto N, Fukuda H, Sakamoto T. 2009.** Development of polymorphic microsatellite loci for two Atherinopsid fishes, pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*) and Patagonian pejerrey (*O. hatcheri*). *Molecular Ecology Resources* 9: 1460-1466
- Lamphere B.A, Blum M.J. 2012.** Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. *Ecology of Freshwater Fish* 21: 75-86
- Leberg P. 2005.** Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *Journal of Wildlife Management* 69: 1385-1399
- Leclerc E, Mailhot Y, Mingelbier M, Bernatchez L. 2008.** The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Molecular Ecology* 17: 1702-1717
- Liermann C, Nilsson C, Robertson J, Rebecca Y. 2012.** Implications of dams obstruction for global freshwater fish diversity. *Bioscience* 62: 539-548
- Luikart G, Cornuet JM. 1998.** Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237
- Mackiewicz M, Fletcher D.E, Wilkins S.D, DeWoody J, Avise J. 2002.** A genetic assessment of parentage in a natural population of dollar sunfish (*Lepomis marginatus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:1877-1883
- McCully P. 1996.** Ríos Silenciados. Ecología y política de las grandes Represas. Jorge Cappato (ed). No más ríos: los efectos ambientales de las represas. pp 35-76. Proteger Ediciones. Argentina
- Meldgaard T, Nielsen E.E, Loescheke V. 2003.** Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics* 4: 735-747
- Mora C, Metzger R, Rollo A, Myers R. 2007.** Experimental simulations about the effects of overexploitation and habitat fragmentation on populations facing environmental warming. *Proceedings of Royal Society B* 274: 1023-1028

- Morais P. 2008.** Review on the major ecosystem impacts caused by damming and watershed development in an Iberian basin (SW-Europe) - focus on the Guadiana estuary. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 44: 69-81
- Muñoz P.A, Quezada-Romegialli C, Veliz D. 2011.** Cross-amplification of microsatellites from the silverside *Odontesthes perugiae* and *O. argentinensis* to the Chilean silversides of the Genus *Odontesthes* and *Basilichthys*. *Gayana* 75: 182-186
- Muñoz-Rojas P, Quezada-Romegialli C, Véliz D. 2012.** Isolation and characterization of ten microsatellite loci in the catfish *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae), with cross-amplification in seven Trichomycterinae species. *Conservation Genetics Resources* 4: 443 – 445
- Myers N. 1995.** Environmental unknowns. *Science* 269: 358 – 360
- Near T, Eytana R, Dornburga A, Kuhna K, Mooreb J, Davisc M, Wainwrightd P, Friedmane M, Smithe W. 2012.** Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 13698-13703
- Neraas L.P, Spruell P. 2001.** Fragmentation of riverine systems: the origins of bull trout (*Salvelinus confluentus*) collected at the base of Cabinet Gorge Dam, Montana. *Molecular Ecology* 10: 1153-1164
- Oosterhout C, Hutchinson W, Wills D, Shipley P. 2004.** MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A. 2004.** Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55–65
- Pardo R, Vila I, Capella J.J. 2009.** Competitive interaction between introduced rainbow trout and native silverside in a Chilean stream. *Environmental Biology of Fishes* 86: 353-359
- Peel D, Ovenden J.R, Peel S.L. 2004.** NeESTIMATOR: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J.M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. 2004.** GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536-539

- Poff N.L, Olden J.D, Merritt D, Pepin D. 2007.** Homogenization of regional river dynamics by dams and global biodiversity implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5732–5737
- Pritchard J.K, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Quezada-Romegialli C, Fuentes M, Véliz D. 2010.** Comparative population genetics of *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes: Atherinopsidae) and *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) in north central Chile. *Environmental Biology of Fishes* 89:173 -- 186
- Reid S.M, Wilson C.C, Mandrak N.E, Carl L.M. 2008.** Population structure and genetic diversity of black redbhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. *Conservation Genetics* 9: 531-546
- Sala O, Stuart Chapin III F, Armesto J, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Hueneke L, Jackson R, Kinzig A, Leemans R, Lodge D, Mooney H, Oesterheld M, LeRoy Poff N, Sykes M, Walker B, Walker M, Wall D. 2000.** Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774
- Saunders D, Meeuwig J, Vincent A. 2002.** Freshwater protected areas: Strategies for conservation. *Conservation Biology* 16: 30-41
- Schwartz M.K, Tallman D.A, Luikart G. 1999.** Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Animal Conservation* 1: 293-299
- Selkoe K, Toonen R. 2006.** Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629
- Steinberg E.K, Lindner K.R, Gallea J, Maxwell A, Meng J, Allendorf F.W. 2002.** Rates and patterns of microsatellite mutations in pink salmon. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1198–1202
- Sterling K, Reed D, Noonan B, Warren M. 2012.** Genetic effects of habitat fragmentation and population isolation on *Etheostoma raneyi* (Percidae). *Conservation Genetics* 13: 859-872

**Stockwell C, Hendry A, Kinnison M. 2003.** Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 94 – 101

**Véliz D, Catalán L, Pardo R, Acuña P, Díaz A, Poulin E, Vila I. 2012.** The genus *Basilichthys* (Teleostei: Atherinopsidae) in Chile: use of mtDNA or taxonomy and species recognition. *Revista Chilena de Historia Natural*. (En revisión) 85: 49-59

**Vila I, Fuentes L, Contreras M. 1999.** Peces límnicos de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)* 48: 61-75

**Vila I, Pardo R, Dyer B, Habit E. 2006.** Peces límnicos; diversidad, origen y estado de conservación. En: *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*. (Eds. Vila, I., A. Veloso, R. Schlatter & C. Ramírez), pp. 73-102. Editorial Universitaria, Santiago de Chile

**Vorosmarty C.J, McIntyre P.B, Gessner M.O, Dudgeon D, Prusevich A, Green P, Glidden S, Bunn S.E, Sullivan C.A, Liermann C, Davies P.M. 2010.** Global threats to human waáter security and river biodiversity. *Nature* 467: 555-561

**Wang J, Whitlock M. 2003.** Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* 163: 429-446

**Wang J. 2001.** A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetic Research* 78: 243-257

**Wang J. 2005.** Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 1395-1409

**Waples R, Gaggiotti O. 2006.** What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15: 1419-1439

**Wasko A.R, Martins C, Oliveira C, Foresti F. 2003.** Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138:161-165

**Wilson G.A, Rannala B. 2003.** Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177 – 1191



**Yamamoto S, Morita K, Koizumi I, Maekawa K. 2004.** Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics* 5: 529–538

**Youngson A.F, Jordan W.C, Verspoor E, McGinnity P, Cross T, Ferguson A. 2003.** Management of salmonid fisheries in the British Isles: towards a practical approach based on population genetics. *Fisheries Research* 62: 193–209

**Yue G.H, David L, Orban L. 2007.** Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetica* 129: 329-331

**Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002.** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1 – 16

**Anexos I** Artículo “Cross-amplification of microsatellites from the Atherinopsidae *Odontesthes perugiae* and *Odontesthes argentinensis* to Chilean silversides of the genus *Odontesthes* and *Basilichthys*” publicado en *Gayana* 75: 182 – 186. 2011

## Cross-amplification of microsatellites from the Atherinopsidae *Odontesthes perugiae* and *Odontesthes argentinensis* to Chilean silversides of the genus *Odontesthes* and *Basilichthys*

### Amplificación cruzada de microsatélites de los Atherinopsidae *Odontesthes perugiae* y *Odontesthes argentinensis* en pejerreyes chilenos del género *Odontesthes* y *Basilichthys*

PABLO MUÑOZ<sup>1,2</sup>, CLAUDIO QUEZADA-ROMEGIALLI<sup>1,2</sup>, IRMA VILA<sup>1</sup> & DAVID VÉLIZ<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Ecológicas and <sup>2</sup>Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) Universidad de Chile, Casilla 653, Ñuñoa, Santiago, Chile

\*E-mail: dveliz@uchile.cl

#### RESUMEN

Se prueba el potencial de amplificación de 8 microsatélites descritos inicialmente para *Odontesthes perugiae* y *O. argentinensis* en 3 especies de *Odontesthes* y 4 especies de *Basilichthys*. La mayoría de los partidores microsatélites amplificaron correctamente y presentan polimorfismo por lo que serán de utilidad en planes de conservación genética de estas especies.

#### ABSTRACT

We tested the amplification potential of 8 microsatellites initially described for *Odontesthes perugiae* and *O. argentinensis* in 3 species of *Odontesthes* and 4 species of *Basilichthys*. Most of the microsatellites amplified and showed polymorphism; thus they will be useful in genetic conservation plans for these species.

Biodiversity protection measures should consider both the conservation of the habitat and the genetic variability of the species involved, in order to maintain effective population sizes and the evolutionary potential of the species (Reed & Frankham 2003, Reed 2004).

Among the molecular techniques frequently used in conservation studies, microsatellites have been particularly important. These molecular markers are tandem repeats of simple sequences (usually composed of about 10 – 50 repetitions of 1 – 6 base pairs) which are abundant and randomly distributed in the genome of the majority of eukaryotes. The variation in the number of repetitions produces considerable polymorphism (Hearne *et al.* 1992). These genetic markers have been described as evolutionarily neutral with Mendelian inheritance (Jarne & Lagoda 1996); thus they provide many advantages in the study of populations (Selkoe & Toonen 2006).

Although there are published protocols for locating these tandem repeats (e.g. Zane *et al.* 2002), specialized

laboratory services are required to obtain the clones that allow development of microsatellite loci. Given the high cost of this process, some investigators in Chile are already using primers described for related species with good results (e.g. Canales-Aguirre *et al.* 2010).

Most of aquatic species with conservation problems in Chile are those which inhabit rivers and estuaries (Habit *et al.* 2006). For many native species, life cycles, migrations, spatial patterns, age and population structure, among other aspects, are unknown, thus studies of these aspects are important in order to establish effective conservation plans. One of the groups of threatened species is that of the silversides of the genera *Odontesthes* and *Basilichthys*, which includes marine *Odontesthes regia* (Humboldt, 1821); freshwater *Odontesthes mauleanum* (Steindachner, 1896); estuarine *Odontesthes brevianalis* (Günther, 1880), and freshwater *Basilichthys semotilus* (Cope, 1874), *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns, 1841) and *Basilichthys australis* (Eigenmann, 1928) species.

TABLE 1: Data summary, including: number of samples (N), number of alleles (A) and size range of the alleles (in base pairs) for the studied species of *Odontesthes* and *Basilichthys*. The touchdown temperature for each microsatellite is also shown. NA: no amplification.

TABLE 1: Resumen de los datos, incluyendo: número de muestras (N), número alelos (A) y rango del tamaño de los alelos (en pares de bases) para las especies de *Odontesthes* y *Basilichthys* estudiados. Se muestra además la temperatura touchdown usada para cada microsatélite. NA: sin amplificación.

Genus	Species	Loci									
		Odon02	Odon07	Odon08	Odon09	Odon23	Odon27	Odon38	Odon39		
<i>Odontesthes</i>	Touchdown Temperature	61 → 53	55 → 47	55 → 47	59 → 51	59 → 51	59 → 51	61 → 53	59 → 51		
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	A	2	2	3	1	3	2	2	2	2	
<i>O. regia</i> (Iquique and Puerto Montt)	Allele size	119-121	160-184	123-141	156-172	125	188-206	86-90			
	N	7	7	7	7	7	7	7	7		
	A	3	2	6	4	NA	NA	5	1		
<i>O. mauleanum</i> (Valdivia estuary)	Allele size	119 - 123	160 - 172	123 - 171	154 - 162			84 - 98	91		
	N	3	3	3	3	3	3	3	3		
	A	4	2	2	5	3	3	2	1		
<i>O. brevianalis</i> (Conchalí Lagoon)	Allele size	119 - 125	178-182	123-127	150-164	115-123	200-208	94-98	99		
	N	3	3	3	3	3	3	3	3		
	A	3	NA	NA	4	NA	NA	1	NA		
<i>Basilichthys</i>	Allele size	119-123			154-164			98			
	N	7	7	7	7	7	7	7	7		
	A	1	1	1	1	2	1	1	2		
<i>B. aff. semotilus</i> (Loa River)	Allele size	123	188	123	156	103-123	174	98	97-159		
	N	9	9	9	9	9	9	9	9		
	A	3	4	1	3	2	1	1	2		
<i>B. microlepidotus</i> (Choapa River)	Allele size	119-123	168-176	123	154-158	103-123	174	98	97-161		
	N	10	10	10	10	10	10	10	10		
	A	2	3	1	3	2	1	1	1		
<i>B. australis</i> (Maule River)	Allele size	119-121	168-174	123	154-162	103-123	174	98	97		
	N	10	10	10	10	10	10	10	10		
	A	2	3	1	3	2	1	1	1		

TABLE 2: Comparative summary of two sample sites of *Basilichthys microlepidotus* from Limari and Choapa drainages and the original information for *O. perugiae* and *O. argentinensis* from Beheregaray & Sunnucks (2000). Sample size (N), number of alleles per locus (A), allele size, expected and observed heterozygosity ( $H_E$  and  $H_O$ ) and  $F_{IS}$  according to Weir & Cockerham (1984). P is the probability that  $F_{IS}$  is zero. \* = statistically significant difference ( $P < 0.05$ )

TABLE 2: Resumen comparativo de dos muestras de *Basilichthys microlepidotus* provenientes de la Hoya Hidrográfica del Limari y Choapa y datos originales de Beheregaray & Sunnucks (2000) para *O. perugiae* y *O. argentinensis*. Se incluye número de muestras (N), número alelos (A) y el tamaño de los alelos observados. Se muestra además valores de heterocigosidad observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ ) y  $F_{IS}$  según Weir & Cockerham (1984). \* = diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Genus	Loci										
	Odon02	Odon07	Odon08	Odon09	Odon23	Odon27	Odon38	Odon39			
<i>Basilichthys microlepidotus</i> (Limari River)	N	29	29	29	30	29	29	30	28		
	A	3	6	1	4	2	1	1	1		
	Allele size	119-123	166-178	123	140-158	103-123	174	98	159-161		
	$H_E$	0.53	0.623	0	0.497	0.158	0	0	0.499		
	$H_O$	0.552	0.586	0	0.400	0.172	0	0	0.464		
	$F_{IS}$	-0.023	0.077	-	0.211	-0.077	-	-	0.088		
	P	0.372	0.178	-	0.148	0.086	-	-	0.196		
<i>Basilichthys microlepidotus</i> (Choapa River)	N	30	27	30	30	7	26	29	22		
	A	3	4	1	4	3	1	3	3		
	Allele size	119-123	166-176	123	154-160	103-123	174	100-110	153-161		
	$H_E$	0.625	0.706	0	0.447	0.602	0	0.099	0.385		
	$H_O$	0.533	0.63	0	0.567	0.149	0	0.103	0.409		
	$F_{IS}$	0.163	0.126	-	-0.251	0.793	-	-0.024	-0.038		
	P	0.082	0.107	-	0.950	0.000*	-	0.538	0.269		
<i>Odontesthes perugiae</i>	N				402			12			
	A				18			11			
	Allele size				149-193			104-150			
<i>Odontesthes argentinensis</i>	N	204	402	402		204	15		402		
	A	30	26	25		33	6		18		
	Allele size	129-191	153-209	126-178		108-180	185-199		163-199		

Taking into account the need to undertake genetic conservation at the species level, and the scarce population information available for these species (e.g. Quezada-Romegialli *et al.* 2010), this study tests the utility of microsatellite primers described for Atlantic species of the genus *Odontesthes* in species of the genera *Basilichthys* and *Odontesthes* species from rivers, estuaries and coasts of Chile.

Specimens of *Odontesthes regia* (from Iquique and Puerto Montt), *O. mauleanum* (Valdivia estuary), *O. brevianalis* (Conchalí wetland), *Basilichthys semotilus* (Lima, Perú), *B. aff. semotilus* (Loa River), *B. microlepidotus* (Choapa River) and *B. australis* (Maule River) were obtained from Chile and Perú (Table 1). Total genomic DNA was extracted from ethanol-preserved fin clips using the salt extraction method (Aljanabi & Martinez 1997); purified DNA was stored at -20° C in 50 µL of water until analysis.

All the microsatellite primers (N = 12) described for *Odontesthes perugiae* (Odont09 and Odont 38) and *Odontesthes argentinensis* (Odont02, Odont07, Odont08, Odont11, Odont16, Odont23, Odont25, Odont27, Odont29 and Odont39) by Beheregaray & Sunnucks (2000) were tested in a first step. The PCR reaction mixture had a final volume of 10 µL, including 1.3 µL buffer PCR 10X (50 mM KCl, 10 mM tris-HCl, pH 8), 0.5 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µL of the forward and of the reverse primers 50 ng/µL, 2.4 µL dNTPs 2.5 mM, 4.68 µL H<sub>2</sub>O, 0.12 µL Taq polymerase. To this mixture we added 1.5 µL of DNA 50 ng/µL. The amplification protocol used a PCR touchdown method as described by Beheregaray & Sunnucks (2000), with the modifications indicated in the above paragraph.

The PCR products obtained were visualized on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide for positive amplification. We selected 8 pairs of microsatellite primers which gave us the best amplification (Odont02, Odont07, Odont08, Odont09, Odont23, Odont27, Odont38 and Odont39); their reverse primers were marked with a dye (FAM, NED, PET and VIC) for visualization in an automatic DNA sequencer. The final PCR products were sent to MacroGen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) for fragment analysis and allelic sizes were scored against the size standard LIZ-500 (Applied Biosystems) using PeakScanner software (Applied Biosystems).

Most of the primers amplified the microsatellite loci in all species under the conditions of our modified protocol (Table 1); the results showed a clean amplification and characteristic microsatellite peaks. Only two polymorphic microsatellite loci were found in *Basilichthys aff. semotilus* from the Loa River, while five were polymorphic in *Odontesthes mauleanum*. Comparing Chilean and Argentinean *Odontesthes*, four

out of eight microsatellites had a shared range of allele size (Odont07, Odont08, Odont09 and Odont23); a similar pattern was observed when *Odontesthes* species were compared with the genus *Basilichthys*. Furthermore, microsatellites showed common alleles in almost all species studied here (e.g. allele 123 for Odon08; allele 119 for Odon02). In order to test Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), two sites containing 30 specimens of *B. microlepidotus* each were analyzed (Table 2). The test found not evidences of Hardy Weinberg disequilibrium for all loci, except the microsatellite Odont23 in samples from Choapa River. With the individuals sampled, only two loci (Odont27 and Odont38) could be compared among Argentinean *Odontesthes* and Chilean *Basilichthys*. For these loci, *Basilichthys* showed a lower number of alleles than Argentinean *Odontesthes*, as expected for microsatellites amplified from a related genus (see Barbará *et al.* 2007).

In conclusion, the microsatellite primers described by Beheregaray & Sunnucks (2000) can be used to amplify polymorphic loci in species of *Odontesthes* and *Basilichthys* from Chile with very clear allele peaks in the electropherograms.

Considering that watersheds in which these species are distributed are those with the greatest alterations in their aquatic systems (Vila *et al.* 1999; Dyer 2000; Habit *et al.* 2006; Quezada-Romegialli *et al.* 2009), these variable microsatellites will be useful in future genetic conservation plans, allowing the monitoring of changes in allele frequencies over time, and complementing studies of genetic migration within and between watersheds, spatial structure of the populations and paternity analysis of *Basilichthys* and *Odontesthes* in Chile.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to R Gauci, M Espinoza, L Eaton, C Jara, R Quispe and H Ortega. Financial support: Fondecyt 1100341, 11060496, PFB-23, ICM P05-002 to DV; Doctoral CONICYT Grant to CQR.

## BIBLIOGRAPHY

- ALJANABI, S.M. & MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- BARBARÁ, T., C. PALMA-SILVA, G.M. PAGGI, F. BERED, M.F. FAY & LEXER, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759-3767.
- BEHEREGARAY, L.B. & SUNNUCKS, P. 2000. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in the other South

- American silverside fish. *Molecular Ecology* 9: 629-644.
- CANALES-AGUIRRE, C.B., S. FERRADA, C.E. HERNANDEZ & GALLEGUILLOS, R. 2010. Usefulness of heterologous microsatellites obtained from *Genypterus blacodes* (Schneider 1801) in species *Genypterus* off the Southeast Pacific. *Gayana* 74: 74-77.
- DYER, B. 2000. Sytematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos, Chile* 19: 99-127.
- HABIT, E., B. DYER & VILA, I. 2006. Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 100-113.
- HEARNE, C.M., S. GHOSH & TODD, J.A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetics traits. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 288-294.
- JARNE, P. & LAGODA, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- QUEZADA-ROMEGIALLI, C., M. FUENTES & VÉLIZ, D. 2010. Comparative population genetics of *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes : Atherinopsidae) and *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes : Trichomycteridae) in north central Chile. *Environmental Biology of Fishes* 89: 173-186.
- QUEZADA-ROMEGIALLI, C., I. VILA & VÉLIZ, D. 2009. A new invasive freshwater fish species in Central Chile: *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes : Anablepidae). *Gayana* 73: 233-236.
- REED, D.H. & FRANKHAM, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17(1): 230-237.
- REED, D.H. 2004. Extinction risk in fragmented habitats. *Animal Conservation* 7(2): 181-191.
- SELKOE, K.A. & TOONEN, R.J. 2006 Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- VILA, I., L. FUENTES & CONTRERAS, M. 1999. Peces límnicos de Chile. *Boletín del Museo nacional de Historia Natural, Chile*. 48: 61-75.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- ZANE, L., L. BARGELLONI & PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Recibido: 00.00.00  
 Aceptado: 00.00.00

**Anexos II** Artículo “Isolation and characterization of ten microsatellite loci in the catfish *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae), with cross-amplification in seven Trichomycterinae species. publicado en: Conservation Genetics Resources 4: 443 – 445. 2012



## Isolation and characterization of ten microsatellite loci in the catfish *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae), with cross-amplification in seven *Trichomycterinae* species

Pablo Muñoz-Rojas · Claudio Quezada-Romegialli · David Véliz

Received: 28 October 2011 / Accepted: 9 November 2011 / Published online: 20 November 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** A total of ten microsatellite loci were isolated and characterized in the endangered freshwater catfish *Trichomycterus areolatus* from Chile. Samples from three separate watersheds were also analyzed. The mean number of alleles per locus in a sample of 63 individuals was 4 (1–13 alleles per locus) and the observed heterozygosities ranged from 0 to 0.83. Hardy–Weinberg equilibrium was observed in all loci except for a few isolated cases, while none of the loci exhibited significant linkage disequilibrium. Cross-amplification analysis showed a low number of loci and alleles amplified in other seven species of the Family Trichomycteridae.

**Keywords** Microsatellite markers · Population genetics · *Trichomycterus areolatus* · Cross-amplification

### Introduction

Freshwater fauna are among the most threatened taxa of the planet (Ricciardi and Rasmussen 1999; Saunders et al. 2002). In Chile, 64% of the freshwater fish are in danger of extinction and 29% are vulnerable or insufficiently known (Habit et al. 2006; Vila et al. 2006); currently there are few effective protection measures for these organisms.

One of these threatened species is the river catfish *Trichomycterus areolatus* (Valenciennes 1840), which is

widely distributed in Chile from Huasco (28°27'S) to Chiloe (42° 32'S) (Arratia 1981; Dyer 2000). This species has conservation problems, as do all the species of the subfamily Trichomycterinae in Chile (Habit et al. 2006; Vila et al. 2006; Quezada-Romegialli et al. 2010).

In order to improve the plans of population conservation, we describe here the isolation and characterization of ten polymorphic microsatellite loci for the Chilean Andean catfish *T. areolatus*. Total genomic DNA was extracted from ethanol-preserved fin clips using the salt-extraction method (Aljanabi and Martinez 1997) from samples collected from the Limari watershed (Los Aromos: 30° 29' S), Choapa watershed (Choapa Pueblo: 31° 45' S) and Maipo watershed (Estero Puangue: 33° 39' S).

The library was developed by ATG Genetics (Vancouver, BC, Canada). Template DNA was digested by the restriction enzyme *Hae*III and the microsatellite enrichment by biotin capture of dinucleotide (TC<sub>n</sub> and GA<sub>n</sub>) microsatellites. The first 36 plasmid clones containing a dinucleotide motif were purified and amplified by PCR. Seventeen primer pairs were designed using Primer5 and tested in our laboratory, of which ten gave reliable amplifications and polymorphic markers using agarose gel electrophoresis. In order to evaluate polymorphism in an automatic sequencer, reverse primers of each microsatellite were marked with a fluorescent dye.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification mixtures (12 µL) contained 100 ng template DNA, 0.25 µM of each primer, 100 µM of each dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL 10 × PCR buffer and 0.5 U Taq platinum Polymerase (Invitrogen). Cycling conditions consisted of an initial denaturing step of 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at the specific temperature, 1 min 30 s at 72°C, and a final elongation step at 72°C for 5 min. PCR products were genotyped in MacroGen Inc (<http://www.macrogen.com>)

P. Muñoz-Rojas · C. Quezada-Romegialli · D. Véliz (✉)  
Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile  
e-mail: dveliz@uchile.cl

P. Muñoz-Rojas · C. Quezada-Romegialli · D. Véliz  
Instituto de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias,  
Universidad of Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

**Table 1** Primer sequences and characteristics for ten microsatellite loci for *Trichomycterus areolatus*, including their polymorphism in three populations (LA, Los Aromos 30° 29'S–71° 06' W; CC, Choapa 31° 45'S–70°40' W; PU, Puangue 33° 39'S–71° 20'W)

Locus	Primer sequence (5'–3')	Repeat motif	Tm (°C)	GenBank accession no.	Sample	N	Ho/He	N <sub>A</sub>	Size range (bp)
Taredi1	F: GAATTCTGAGTGCAGAGCTCT R: CATACCAGCTGTGAAATTCATACA	(CA) <sub>9</sub>	55	JN167505	LA	23	–	1	126
					CC	21	–	1	126
					PU	12	0.25/0.3	4	122–138
Taredi4	F: TTTTGAAACCGTCGCTGGAC R: CTGTCCTCAGGCTCTTTAC	(GT) <sub>18</sub>	55	JN167506	LA	17	0.41/0.47	2	281–283
					CC	–	–	–	–
					PU	6	0.83/0.81	7	273–293
Taredi6	F: TTTTCAGCTCACCACAATGC R: GCTGCGTCACATGGTGTAT	(TG) <sub>12</sub>	55	JN167507	LA	22	–	1	192
					CC	–	–	–	–
					PU	4	0/0.63	3	192–195
Taredi10	F: CCGTGTGTTTATTCGAGCTC R: GCAGTTATCAGCTGAACCAG	(CA) <sub>9</sub>	55	JN167508	LA	21	0.48/0.49	2	141–155
					CC	21	0.48/0.47	2	141–155
					PU	14	0.29/ 0.91*	13	141–167
Taredi11	F: CGAGAGCGAGATCGTGTGTA R: TCATAAATCAACGATGCGTCA	(CA) <sub>12</sub>	55	JN167509	LA	22	0.36/0.46	2	191–201
					CC	22	0.59/0.54	3	191–201
					PU	–	–	–	–
Taredi14	F: TCTTACAGTATTTAACATCCTGG R: GAATTCAGTTCAGCTTTATTCAC	(CA) <sub>34</sub>	50	JN167510	LA	19	0.63/0.62	6	187–207
					CC	20	0.3/0.81*	8	173–207
					PU	12	0.67/0.84	8	131–163
Taredi17	F: CATAAACTGTGTATGTGTGTC R: GGGGTTTCGTTTTCAGAACTG	(GT) <sub>13</sub>	55	JN167511	LA	23	–	1	110
					CC	–	–	–	–
					PU	12	0/0.38*	2	110–112
Taredi21	F: AACCACAAGGTTTGAGCGTC R: AACACTGCTGCATAGACCAG	(AC) <sub>13</sub>	55	JN167512	LA	22	0.64/0.69	4	261–275
					CC	13	0.69/0.62	4	261–275
					PU	–	–	–	–
Taredi212	F: GGTCTGGAATAAAAATTACAAACACA R: ACCGAACAGGTGTCACCATC	(GA) <sub>17</sub>	55	JN167513	LA	24	0.63/0.65	3	210–221
					CC	24	0.5/0.52	3	210–226
					PU	10	0.4/0.86*	9	225–259
Taredi24	F: CCAAGTGGAGCTGCTAGAAA R: CTGCACGCTCCTTTTCCAAA	(GT) <sub>20</sub> (CA) <sub>9</sub>	55	JN167514	LA	23	0.48/0.41	2	213–214
					CC	24	0.75/0.49	2	213–214
					PU	8	0/0.22	2	193–195

T<sub>m</sub> annealing temperature, N number of analyzed individuals, N<sub>A</sub> number of alleles; \*  $P < 0.01$  for significant departures from HWE, tested after 3,000 permutation in Genetix (Belkhir et al. 1996)

using the internal size standard LIZ 500 (Applied Biosystems). Clone sequences were published in Genbank with the following accession numbers: JN167505 to JN167514 (Table 1).

In the 63 individuals from three geographically isolated watersheds of the central zone of Chile we observed between 1 and 13 alleles per locus (Table 1); some alleles were found in all three watersheds. The Los Aromos site (LA, Limarí watershed) had the least allele diversity (1–6 alleles per locus), while Choapa (CC, Choapa watershed) had from one to 8 alleles per locus and Puangue (PU, Puangue watershed) presented the greatest allele richness (1–13 alleles/locus) (Table 2).

Deviations from Hardy–Weinberg expectations (HWE) were calculated using the permutation test associated with the  $F_{IS}$  calculation performed with GENETIX software (Belkhir et al. 1996). Significant deviations from HWE were observed only in three out of ten loci in the Puangue River (Taredi10, Taredi17 and Taredi212) and one from Choapa (Taredi14). MICROCHECKER software (Oosterhout et al. 2004) was used to identify genotyping errors due to null alleles, large allele dropout and scoring of stutter peaks. The analyses suggested that null alleles may be present in three loci in Puangue (Taredi10, Taredi17 and Taredi 212) and one locus from Choapa (Taredi14). Furthermore, no significant linkage disequilibrium was detected among pairs of the

**Table 2** Number of alleles from cross-species amplification in seven South American catfishes

Species	N	Locus (Taredi)									
		1	4	6	10	11	14	17	21	212	24
<i>Trichomycterus punctulatus</i> Valenciennes, 1846	2	2	0	1	1	0	1	1	0	0	2
<i>Trichomycterus</i> aff <i>rivulatus</i> Valenciennes, 1846	6	8	1	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>Trichomycterus laucaensis</i> Arratia, 1983	3	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Trichomycterus chungaraensis</i> Arratia, 1983	3	4	0	1	3	0	1	0	0	2	2
<i>Trichomycterus cf chiltoni</i> (Eigenmann, 1927)	4	3	0	3	3	0	7	4	0	4	3
<i>Bullockia maldonadoi</i> (Eigenmann, 1928)	3	1	0	0	4	0	4	4	0	0	2
<i>Hatcheria macreii</i> (Girard, 1855)	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

N is the number of individuals tested

studied loci, indicating that the loci are probably not closely linked on chromosomes; thus the loci may be considered as independent markers.

In addition, the analysis of cross amplification using 23 individuals of 7 other species of South American catfish found amplifiable loci in all species (e.g., Taredi1) and others which did not amplify (e.g. Taredi11 y Taredi21). Species of the same genus amplified from 3 to 7 of the ten loci analyzed; *Hatcheria macreii* was the species which showed the smallest number of amplified loci (N = 2), which is expectable in this type of cross amplification given that the phylogenetic relations among the species are not clear. Interestingly, 5 of the 10 loci amplified in *Bullockia maldonadoi*, suggesting that this genus may be closer to the species *T. areolatus* than to the genus *Hatcheria*.

These results show the utility of these 10 independent markers to devise plans of genetic conservation for populations of *T. areolatus* which are currently threatened, and will potentially be useful for other species of the family Trichomycteridae.

**Acknowledgments** We thank C. Newton and ATG Genetics, M. Espinoza for lab assistance and L. Eaton for reviewing the English version of the manuscript. This study was supported by Fondecyt 1100341 to DV. DV also thanks Grant PFB-23 (CONICYT, Chile) and Grant ICM P05-002. PM thanks IEB master grant and CQR thanks CONICYT doctoral grant.

## References

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693
- Arratia G (1981) Géneros de peces de aguas continentales de Chile. Museo Nacional de Historia Natural Chile, Publicaciones Ocasionales 4: 3–108
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) Genetix 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier
- Dyer D (2000) Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estud Oceanol* 19:77–98
- Habit E, Dyer B, Vila I (2006) Estado de conocimiento de los peces dulceacuicolas de Chile. *Gayana* 70:100–113
- Oosterhout C, Hutchinson W, Wills D, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Quezada-Romegialli C, Fuentes M, Véliz D (2010) Comparative population genetics of *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes: Atherinopsidae) and *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) in north central Chile. *Environ Biol Fishes* 89:173–186
- Ricciardi A, Rasmussen J (1999) Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conserv Biol* 13:1220–1222
- Saunders D, Meeuwig J, Vincent A (2002) Freshwater protected areas: strategies for conservation. *Conserv Biol* 16:30–41
- Vila I, Pardo R, Dyer B, Habit E (2006) Peces límnicos: diversidad, origen y estado de conservación. In: Vila I, Veloso A, Schlatter R, Ramírez C (eds) *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, pp 73–102

**Anexos III** Descripción de los microsatélites utilizados para *B. microlepidotus* con muestras del año 2006 y 2010. n: número de individuos analizado por sitio, A<sub>L</sub>: número de alelos por locus, He: heterocigosidad esperada, Ho: heterocigosidad observada, Fis: coeficiente de endogamia con su respectivo estadígrafo p. \* Desviación del Equilibrio de Hardy Weinberg en el cálculo de Fis global.

Loci	L o c a c i o n e s (año 2006)				L o c a c i o n e s (año 2010)								
	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cog <sup>1</sup>	Cog <sup>2</sup>	Pal <sup>1</sup>	Pal <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>	
<b>OB01</b>													
N	19	21	21	18	48	38	35	29	35	39	32	46	
A <sub>L</sub>	2	3	5	5	4	6	2	2	4	3	5	7	
He	0.099	0.176	0.655	0.716	0.157	0.219	0.029	0.098	0.256	0.209	0.684	0.675	
Ho	0.105	0.191	0.667	0.722	0.125	0.158	0.029	0.103	0.114	0.18	0.688	0.63	
Fis	-0.029	-0.06	0.007	0.02	0.211	0.291	0	-0.037	0.564	0.153	0.011	0.077	
P	0	0	0.382	0.325	0.12	0.024	0	0	0	0.258	0.362	0.137	
<b>OB19</b>													
N	19	22	21	22	47	38	39	30	35	37	23	47	
A <sub>L</sub>	5	5	5	7	4	6	3	3	7	5	5	7	
He	0.639	0.533	0.722	0.802	0.578	0.61	0.523	0.546	0.656	0.599	0.767	0.749	
Ho	0.632	0.456	0.714	0.818	0.638	0.421	0.564	0.533	0.457	0.541	0.652	0.702	
Fis	0.038	0.17	0.035	0.003	-0.093	0.256	-0.065	0.04	0.317	0.112	0.171	0.072	
P	0.284	0.1	0.281	0.372	0.322	0.01	0.282	0.337	0.01	0.235	0.106	0.223	
<b>OB44</b>													
N	19	18	26	12	48	31	28	19	44	24	14	47	
A <sub>L</sub>	2	2	7	6	8	4	4	3	3	3	6	7	
He	0.266	0.5	0.743	0.78	0.351	0.232	0.136	0.467	0.204	0.254	0.651	0.695	
Ho	0.105	0.444	0.682	0.625	0.25	0.194	0.071	0.158	0.182	0.292	0.429	0.638	
Fis	0.621	0.139	0.105	0.229	0.296	0.179	0.488	0.677	0.119	-0.126	0.373	0.092	
P	0.052	0.443	0.34	0.067	0	0.06	0.07	0.01	0.358	0.605	0.02	0.173	

## OB59

N	24	23	23	24	50	41	38	29	46	42	32	48
A <sub>L</sub>	3	2	2	2	3	3	4	3	7	3	1	1
He	0.338	0.364	0.083	0.305	0.132	0.159	0.147	0.067	0.458	0.423	0	0
Ho	0.167	0.304	0.087	0.208	0.06	0.122	0.105	0.069	0.087	0.119	0	0
Fis	0.522	0.185	-0.023	0.335	0.553	0.245	0.297	-0.018	0.814	0.724	-	-
P	0.01	0.299	0.978	0.158	0	0.135	0.126	0.985	0	0	-	-

## OB71

N	23	24	20	24	49	41	40	30	48	41	33	48
A <sub>L</sub>	2	1	1	1	2	3	3	1	5	2	2	2
He	0.044	0	0	0	0.04	0.158	0.073	0	0.158	0.048	0.114	0.041
Ho	0.044	0	0	0	0	0.073	0.025	0	0.083	0.049	0.121	0.042
Fis	0	-	-	-	1	0.545	0.664	-	0.479	-0.013	-0.049	-0.011
P	1	-	-	-	0.01	0.06	0.05	-	0	0	0	0

## OD02

N	24	24	24	24	50	40	39	30	46	42	33	47
A <sub>L</sub>	3	2	3	3	5	4	4	3	3	4	3	3
He	0.536	0.478	0.629	0.525	0.544	0.645	0.525	0.585	0.509	0.526	0.358	0.6
Ho	0.458	0.623	0.5	0.667	0.38	0.525	0.385	0.5	0.5	0.643	0.303	0.553
Fis	0.165	-0.287	0.226	-0.249	0.311	0.197	0.279	0.162	0.029	-0.211	0.168	0.088
P	0.257	0.15	0.097	0.126	0.01	0.06	0.04	0.192	0.362	0.09	0.116	0.179

## OD07

N	24	23	23	24	40	37	35	27	32	27	28	46
A <sub>L</sub>	5	4	4	5	5	11	3	4	5	4	3	5
He	0.592	0.519	0.714	0.669	0.576	0.676	0.134	0.486	0.555	0.555	0.656	0.712
Ho	0.542	0.652	0.609	0.708	0.45	0.649	0.143	0.519	0.531	0.519	0.643	0.717
Fis	0.106	-0.236	0.169	-0.037	0.231	0.054	-0.049	-0.049	0.059	0.084	0.036	0.003
P	0.279	0.086	0.062	0.304	0.027	0.339	0.861	0.483	0.214	0.189	0.296	0.404

## OD09

N	24	24	24	24	46	38	38	30	44	40	28	46
A <sub>L</sub>	4	2	4	4	7	8	4	4	4	6	3	7
He	0.509	0.395	0.406	0.529	0.565	0.556	0.425	0.423	0.274	0.475	0.223	0.44
Ho	0.333	0.375	0.5	0.5	0.413	0.553	0.447	0.3	0.273	0.375	0.25	0.391
Fis	0.363	0.072	-0.211	0.075	0.279	0.019	-0.041	0.307	0.016	0.223	-0.105	0.122
P	0.04	0.546	0.157	0.367	0.01	0.507	0.488	0.06	0.266	0.01	0.646	0.16

## OD38

N	24	24	24	24	46	39	38	30	44	40	33	47
A <sub>L</sub>	1	1	3	3	2	3	4	4	4	1	2	3
He	0	0	0.119	0.119	0.466	0.516	0.26	0.215	0.279	0	0.14	0.121
Ho	0	0	0.125	0.125	0	0.077	0.158	0.1	0.046	0	0.152	0.085
Fis	-	-	-0.03	-0.03	1	0.855	0.403	0.547	0.84	-	-0.067	0.308
P	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0.849	0.08

## OD39

N	24	22	24	20	37	26	33	26	43	28	12	33
A <sub>L</sub>	2	2	2	2	7	6	2	2	4	3	2	3
He	0.497	0.484	0.353	0.32	0.806	0.692	0.496	0.473	0.564	0.511	0.413	0.506
Ho	0.5	0.455	0.375	0.4	0.324	0.077	0.546	0.462	0.465	0.25	0.083	0.273
Fis	0.014	0.083	-0.04	-0.226	0.606	0.893	-0.085	0.045	0.186	0.524	0.814	0.473
P	0.306	0.184	0.677	0.424	0	0	0.199	0.26	0.1	0.01	0.01	0.08

Fis	0.204*	0.008	0.06	0.023	0.222*	0.194*	0.083	0.179*	0.192*	0.119	0.19*	0.12*
Total												



**Anexos IV** Descripción de los microsátélites utilizados para *T. areolatus* con muestras del año 2006 y 2010. n: número de individuos analizado por sitio, A<sub>L</sub>: número de alelos por locus, He: heterocigosidad esperada, Ho: heterocigosidad observada, Fis: coeficiente de endogamia con su respectivo estadígrafo p. \* Desviación del Equilibrio de Hardy Weinberg en el cálculo de Fis global

Loci	L o c a c i o n e s (año 2006)				L o c a c i o n e s (año 2010)								
	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cog <sup>1</sup>	Cog <sup>2</sup>	Pal <sup>1</sup>	Pal <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>	
<b>TR01</b>													
N	22	23	22	21	50	51	58	39	31	51	33	37	
A <sub>L</sub>	1	1	2	2	2	4	4	2	1	4	1	1	
He	0	0	0.201	0.047	0.113	0.131	0.131	0.025	0	0.131	0	0	
Ho	0	0	0.136	0.047	0	0.078	0.035	0.026	0	0.078	0	0	
Fis	-	-	0.344	0	1	0.407	0.741	0	-	0.407	-	-	
P	-	-	0.227	0	0	0.01	0	0	-	0.01	-	-	
<b>TR04</b>													
N	17	20	15	24	45	44	59	38	30	44	33	35	
A <sub>L</sub>	2	2	5	3	2	2	2	2	2	2	2	5	
He	0.36	0.469	0.689	0.624	0.458	0.456	0.488	0.472	0.48	0.456	0.397	0.512	
Ho	0.353	0.45	0.8	0.792	0.489	0.477	0.407	0.605	0.467	0.477	0.424	0.429	
Fis	0.049	0.066	-0.128	-0.249	-0.056	-0.034	0.175	-0.27	0.045	-0.034	-0.054	0.177	
P	0.185	0.211	0.324	0.007	0.25	0.286	0.15	0.09	0.275	0.285	0.23	0.09	
<b>TR10</b>													
N	24	22	21	24	44	51	56	34	31	51	33	37	
A <sub>L</sub>	2	3	2	5	4	2	2	3	2	2	3	4	
He	0.486	0.533	0.459	0.542	0.532	0.5	0.484	0.514	0.4813	0.5	0.495	0.522	
Ho	0.583	0.046	0.143	0.5	0.341	0.529	0.571	0.441	0.355	0.529	0.455	0.378	
Fis	-0.179	0.169	0.701	0.098	0.37	-0.049	-0.172	0.157	0.278	-0.049	0.098	0.287	
P	0.09	0.131	0	0.212	0.01	0.469	0.15	0.22	0.113	0.481	0.349	0.03	

## TR11

N	20	24	19	24	44	49	57	37	32	49	33	35
A <sub>L</sub>	2	2	4	4	3	3	5	2	4	3	3	4
He	0.495	0.478	0.614	0.603	0.536	0.5	0.57	0.49	0.55	0.499	0.349	0.54
Ho	0.5	0.375	0.421	0.542	0.25	0.367	0.597	0.514	0.438	0.367	0.364	0.429
Fis	0.016	0.236	0.338	0.123	0.542	0.273	-0.038	-0.025	0.221	0.273	-0.025	0.22
P	0.3	0.06	0.03	0.243	0	0.08	0.314	0.315	0.1	0.06	0.614	0.06

## TR14

N	23	21	21	24	35	51	60	36	31	51	31	31
A <sub>L</sub>	6	7	14	14	12	13	15	19	7	13	16	10
He	0.721	0.649	0.875	0.872	0.792	0.855	0.852	0.91	0.641	0.855	0.844	0.868
Ho	0.478	0.667	0.571	0.625	0.543	0.608	0.583	0.528	0.452	0.608	0.484	0.645
Fis	0.356	-0.004	0.368	0.302	0.328	0.298	0.323	0.432	0.31	0.298	0.44	0.27
P	0	0.389	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0

## TR06

N	8	22	18	19	40	46	48	40	29	46	33	34
A <sub>L</sub>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
He	0	0	0	0	0	0	0.041	0	0	0	0	0
Ho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fis	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-

## TR17

N	19	23	11	24	48	49	54	40	28	49	33	37
A <sub>L</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
He	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



## TR21

N	14	23	13	22	34	45	45	32	30	45	31	30
A <sub>L</sub>	4	4	7	7	7	4	7	9	5	4	6	6
He	0.609	0.689	0.757	0.721	0.729	0.714	0.716	0.8	0.727	0.714	0.732	0.729
Ho	0.714	0.609	0.462	0.636	0.824	0.689	0.42	0.688	0.8	0.689	0.677	0.833
Fis	-0.135	0.138	0.424	0.14	-0.115	0.046	0.419	0.156	-0.084	0.046	0.09	-0.126
P	0.161	0.105	0	0.175	0.09	0.247	0	0.06	0.166	0.253	0.248	0.166

## TR22

N	18	24	22	24	42	50	57	38	30	50	33	37
A <sub>L</sub>	3	3	5	3	5	5	5	4	3	5	4	6
He	0.569	0.65	0.619	0.515	0.626	0.637	0.641	0.665	0.639	0.637	0.518	0.597
Ho	0.444	0.625	0.591	0.5	0.619	0.62	0.456	0.5	0.5	0.62	0.576	0.46
Fis	0.247	0.06	0.068	0.05	0.024	0.037	0.297	0.261	0.234	0.037	-0.096	0.243
P	0.124	0.412	0.244	0.311	0.326	0.287	0	0.07	0.06	0.402	0.327	0.04

## TR24

N	20	24	24	24	42	48	56	35	31	48	33	35
A <sub>L</sub>	1	2	2	1	2	2	5	3	2	2	1	2
He	0	0.042	0.041	0	0.024	0.021	0.07	0.056	0.092	0.021	0	0.028
Ho	0	0.042	0.041	0	0.024	0.021	0.071	0.057	0.032	0.021	0	0.028
Fis	-	0	0	-	0	0	0.013	0.007	0.659	0	-	0
P	-	0	0	-	0	0	0	0.02	0.06	0	-	0

---

Fis	0.079	0.112	0.264*	0.033	0.137	0.054	0.163*	0.082	0.173*	0.111	0.014	0.142
Total												

---

**Anexos V** Diferenciación poblacional en cuatro sitios de estudio (afluentes y efluentes de los embalses Recoleta y Corrales) con muestras del año 2006 para *B. microlepidotus* utilizando GENETIX. Valores de  $F_{ST}$  (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) calculado con 10000 permutaciones se muestran para cada interacción de poblaciones.

$F_{ST}$	<i>B. microlepidotus</i> (año 2006)			
Sitios	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>
Rec <sup>1</sup>		0.022	0.131	0.106
Rec <sup>2</sup>	0.06		0.117	0.1
Cor <sup>1</sup>	0	0		0.011
Cor <sup>2</sup>	0	0	0.04	

**Anexos VI** Diferenciación poblacional en ocho sitios de estudio (afluentes y efluentes de los embalses Recoleta, Cogotí, La Paloma y Corrales) con muestras del año 2010 para *B. microlepidotus* utilizando GENETIX. Valores de  $F_{ST}$  (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) calculado con 10000 permutaciones se muestran para cada interacción de poblaciones.

$F_{ST}$	<i>B. microlepidotus</i> (año 2010)							
Sitios	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cog <sup>1</sup>	Cog <sup>2</sup>	Pal <sup>1</sup>	Pal <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>
Rec <sup>1</sup>		0.026	0.041	0.013	0.009	0.005	0.036	0.047
Rec <sup>2</sup>	0.6		0.016	0.011	0.006	0.023	0.015	0.062
Cog <sup>1</sup>	0.001	0.07		0.029	0.032	0.019	0.074	0.068
Cog <sup>2</sup>	0	0	0.01		0.026	0.034	0.055	0.038
Pal <sup>1</sup>	0.14	0.02	0	0		0.013	0.012	0.033
Pal <sup>2</sup>	0	0.09	0.11	0.04	0.16		0.008	0.029
Cor <sup>1</sup>	0	0.003	0	0	0	0.007		0.02
Cor <sup>2</sup>	0	0	0	0.005	0	0	0	

**Anexos VII** Diferenciación poblacional en cuatro sitios de estudio (afluentes y efluentes de los embalses Recoleta y Corrales) con muestras del año 2006 para *T. areolatus* utilizando GENETIX. Valores de  $F_{ST}$  (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) calculado con 10000 permutaciones se muestran para cada interacción de poblaciones.

$F_{ST}$	<i>T. areolatus</i> (año 2006)			
Sitios	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>
Rec <sup>1</sup>		0.006	0.08	0.058
Rec <sup>2</sup>	0.27		0.085	0.071
Cor <sup>1</sup>	0	0		0.05
Cor <sup>2</sup>	0.03	0	0.03	

**Anexos VIII** Diferenciación poblacional en ocho sitios de estudio (afluentes y efluentes de los embalses Recoleta, Cogotí, La Paloma y Corrales) con muestras del año 2010 para *T. areolatus* utilizando GENETIX. Valores de  $F_{ST}$  (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) calculado con 10000 permutaciones se muestran para cada interacción de poblaciones.

$F_{ST}$		<i>T. areolatus</i> (año 2010)							
Sitios	Rec <sup>1</sup>	Rec <sup>2</sup>	Cog <sup>1</sup>	Cog <sup>2</sup>	Pal <sup>1</sup>	Pal <sup>2</sup>	Cor <sup>1</sup>	Cor <sup>2</sup>	
Rec <sup>1</sup>		0.002	0.037	0.01	0.01	0.015	0.086	0.054	
Rec <sup>2</sup>	0.001		0.071	0.052	0.012	0.04	0.102	0.065	
Cog <sup>1</sup>	0			0.032	0.087	0.042	0.07	0.043	
Cog <sup>2</sup>	0.002	0	0.05		0.028	0.056	0.089	0.054	
Pal <sup>1</sup>	0.004	0.002	0	0		0.016	0.091	0.059	
Pal <sup>2</sup>	0	0	0	0.004	0.002		0.102	0.065	
Cor <sup>1</sup>	0	0.001	0	0	0	0		0.013	
Cor <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0.07		