

UCH-FC
MAG-B
B. 456
C1

**ORIGEN Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA ESPECIE
INTRODUCIDA TRUCHA ARCOÍRIS *Oncorhynchus mykiss*
(SALMONIFORMES: SALMONIDAE) EN CHILE**

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

Javiera Nidia Benavente Paredes

DICIEMBRE, 2016

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

**Co-Director de Tesis Dr:
Daniel Gómez Uchida**



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER**

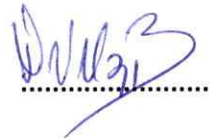
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Javiera Nidia Benavente Paredes

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 6 de diciembre de 2016.

Director de Tesis

Dr. David Véliz Baeza



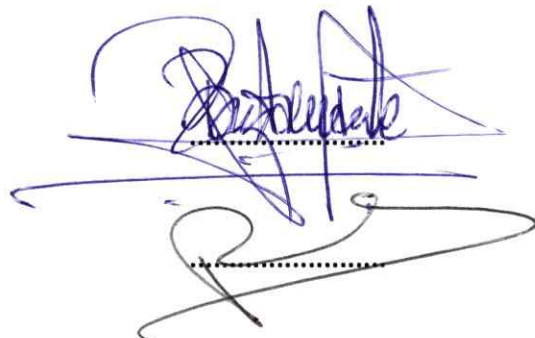
Co-Director de Tesis

Dr. Daniel Gómez Uchida

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

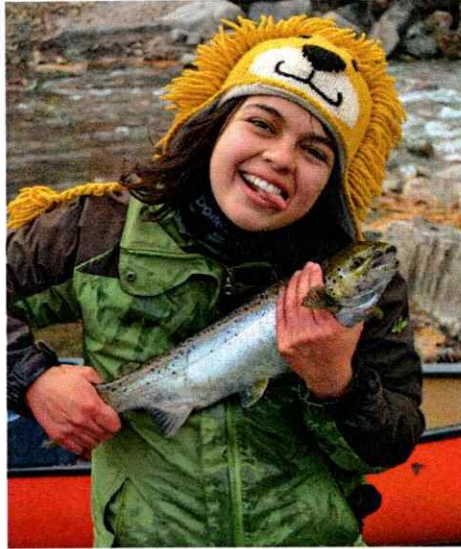
Dr. Ramiro Bustamante



Dr. Elie Poulin

"La verdadera ciencia enseña a dudar de nosotros mismos"

BIOGRAFÍA



Javiera Benavente nació el 24 de julio de 1989 en Santa Cruz de Chile. A la edad de dos años, su familia se trasladó a la ciudad de Curicó donde cursó su enseñanza básica y media en la Alianza Francesa de Curicó. Posteriormente, ingresó a la carrera de Biología de la Universidad de Concepción, obteniendo el grado de Bióloga con mención en bases y gestión del medio ambiente a principios del año 2013. El año 2014 comenzó el programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores David Véliz y Daniel Gómez Uchida por todo su apoyo, tiempo y paciencia, y por todos los conocimientos que he adquirido gracias a ellos.

Doy las gracias a la gente del "Laboratorio de Ecología y Genética" de la Universidad de Chile y a la gente del "GEECLAB" de la Universidad de Concepción, en especial a Tannia Ramírez, Noemí Rojas, María Ignacia Cádiz y Diego Cañas por su ayuda en laboratorio. Además, agradecer a Claudio Quezada por ayudarme en terreno, y a la profesora Irma Vila y a él por proporcionarme muestras para esta tesis.

Agradecer a mi familia y amigos por su apoyo. Especialmente a mi hermana Francisca y a Esteban por ayudarme en terreno.

Finalmente, señalar el apoyo financiero de Beca de Magister Nacional CONICYT 22140438, y que este estudio fue financiado por los proyectos FONDECYT 1130807, FONDAP 15110027 de CONICYT y por fondos del IEB.

ÍNDICE DE MATERIAS

Biografía.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de Materias.....	iii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Resumen.....	viii
Abstract.....	x
Introducción.....	1
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Resultados.....	22
Discusión.....	36
Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen histórico de la invasión de la trucha arcoíris en las Zonas Norte, Centro y Sur de Chile.

Tabla 2. Tabla de localidades de muestreo; Código de cada localidad, en mayúsculas se abrevian los nombres de cuencas, en minúsculas se abrevian localidades en cuencas con más de una localidad de muestreo; Zona del área de estudio y Cuenca por localidad; Colección de obtención de muestras; Año de colecta de muestras; Lat y Long: Coordenadas geográficas de localidad de muestreo.

Tabla 3. Haplotipos por localidad, por cuenca y por zona, n: Tamaño muestral; Haplotipos: Nombres de haplotipos según nomenclatura usada en rango nativo; h (SD): diversidad haplotípica (desviación estándar); π : diversidad nucleotídica.

Tabla 4. Estimadores de diversidad genética por localidad, n: Tamaño con muestral por localidad; %P: Porcentaje de polimorfismo; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; RA: Riqueza alélica; F_{IS} : Coeficiente de endogamia.

Tabla 5. Tabla de F_{ST} pareado entre todas las localidades, Bajo la diagonal valores de F_{ST} y sobre la diagonal valores de significancia para cada comparación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con localidades de muestreo, se muestran las cuencas estudiadas, los código en mayúsculas se abrevian los nombres de las cuencas, en las cuencas con muestras de más de una localidad se abreviaron las localidades en minúsculas (Ver Tabla 2). a) Zona Norte; b) Zona Centro; c) Zona Sur.

Figura 2. Mapa con proporción de haplotipos encontrados por localidad, el tamaño del círculo es proporcional al tamaño muestral por localidad. a) Zona Norte; b) Zona Centro; c) Zona Sur.

Figura 3. Red haplotipos mitocondriales de trucha arcoíris en el rango introducido. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia del haplotipos, los colores representan proporción del haplotipo encontrada en cada zona del área de estudio y las líneas conectando los nodos representan los pasos mutacionales entre haplotipos.

Figura 4. Boxplot donde se compara las RA de las localidades que no presentan piscicultura a gran escala (1) con la RA de las cinco localidades de LLAN y PISBL (2). Las letras sobre los boxplots representan diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

Figura 5. Análisis de correspondencias (CA) para todas las localidades de las tres zonas, Graficados PC 1 vs PC 2.

Figura 6. DAPC realizado con ocho clústers encontrados. a: Gráfico DA 1 vs DA 2, b: Gráfico DA 1 vs DA 3.

Figura 7. Mapa con la proporción de individuos asignados a cada clúster del DAPC por cuenca. Tamaño del círculo es proporcional a tamaño muestral por localidad.

RESUMEN

La trucha arcoíris es el pez invasor con mayor área de distribución en Chile. Se sabe mucho de los impactos de la especie en los ecosistemas nativos pero existe poca información sobre el origen de las poblaciones invasoras, la expansión y el movimiento de estas entre cuencas. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética mitocondrial y nuclear, el origen geográfico y el grado de estructuración poblacional de las poblaciones de trucha arcoíris introducidas en Chile. Se muestrearon truchas desde 24 localidades desde la latitud 18°S a la 41°S. Se usaron secuencias de la región control del mtDNA para determinar el origen en el rango nativo de las truchas asilvestradas y 96 SNPs para estimar su diversidad genética. Se encontró cierto grado de estructuración espacial dada por las diferencias en haplotipos y en frecuencia de los alelos de SNPs. Las truchas presentes en los ríos altiplánicos tienen signos de provenir de pisciculturas peruanas a partir de un linaje de truchas proveniente del norte de Norteamérica a diferencia de las truchas del Centro y Sur de Chile que provienen predominantemente de pisciculturas europeas. Otro punto importante es la alta diversidad genética observada en localidades donde se practica la piscicultura a gran escala, lo que se debe principalmente a mezcla de individuos fugitivos con aquellos naturalizados, siendo la hibridación de cepas de distintos orígenes una práctica común en los centros de cultivo chilenos. En la Zona Centro y Sur se encontró estructura genética sin un patrón geográfico claro, lo que podría explicarse por el movimiento antrópico de individuos

entre las distintas cuencas. Estudios de este tipo pueden ayudar a diseñar planes de manejo efectivos para controlar la invasión de trucha arcoíris y otras especies invasoras en Chile.

ABSTRACT

Rainbow trout is the most widespread invasive fish species in Chile. The ecological impacts of the species on native ecosystems are well documented, but there is little information about the origin, expansion and movement between watersheds of rainbow trout populations. The goal of this study was to evaluate the mitochondrial and nuclear genetic diversity, geographic origin and population structure of the rainbow trout populations introduced in Chile. Twenty four localities were sampled from 18°S to 41°S latitude. mtDNA sequences were used to determine the origin in the native range of naturalized rainbow trout and SNPs were used to estimate their genetic diversity. A certain degree of spatial structure was found according with the differences in haplotypes and the frequency of SNP alleles. Trout in the Altiplano Rivers have signs of being introduced from Peruvian fish farms from a lineage of trout originated in the North of North America contrary to naturalized trout in Central and Southern Chile mostly introduced from European fish farms. The high genetic diversity observed in the localities with massive commercial fish farms, due to the admixture between escapees and naturalized trout, being the admixture of stocks of different origins a common practice in Chilean fish farms. Central and Southern Chile present population structure without a clear geographic pattern, what could be explained by anthropic movement of individuals between watersheds. This kind of studies can help to design effective management plans to control rainbow trout and others invasive species in Chile.

INTRODUCCIÓN

Las especies invasoras son una de las principales amenazas a la biodiversidad a nivel global (Mack et al. 2000; Sala 2000), siendo los ecosistemas de agua dulce particularmente sensibles a este tipo de amenazas biológicas (Sala 2000; García-Berthou 2007). El conocimiento sobre los impactos ecológicos de las invasiones biológicas ha aumentado en los últimos años, sin embargo, aún hay vacíos en el conocimiento sobre los mecanismos microevolutivos que subyacen al éxito de las invasiones biológicas, por ejemplo, las interacciones genéticas que ocurren cuando hibridan individuos de múltiples poblaciones de origen (Dlugosch et al. 2015).

No hay consenso en si una alta diversidad genética es necesaria para el éxito de una invasión biológica (Dlugosch et al. 2015). Cuando una especie es introducida a un nuevo rango de distribución, se espera que las nuevas poblaciones presenten una menor diversidad genética que las poblaciones de origen, lo que es conocido como efecto fundador (Nei et al. 1975; Lee 2002). Es comúnmente aceptado que poblaciones con poca diversidad genética tienden a la extinción (Frankham 2005). Paradójicamente existen especies invasoras que logran expandirse en nuevos rangos de distribución a pesar de poseer poca diversidad genética (Novak & Mack 2005; Dlugosch & Parker 2008; Ayres et al. 2010; Thulin et al. 2006). Aunque existe cada vez más evidencia de especies invasoras cuyas poblaciones en su rango introducido, presentan mayor diversidad

genética que poblaciones en su rango nativo, lo que suele deberse a múltiples eventos de introducción deliberados o accidentales (Kolbe et al. 2004; Roman & Darling 2007; Dlugosch & Parker 2008; Dlugosch et al. 2015).

Históricamente, entre las principales causas por las que se han introducido especies de peces en los ecosistemas dulceacuícolas se encuentran su uso como control biológico, pesca recreativa, fines ornamentales y cultivo comercial (Basulto 2003; Gozlan 2008; Iriarte et al. 2005). Por estas razones, dichas especies de peces introducidos suelen ser de gran importancia para el desarrollo económico de algunos países, a pesar de sus perniciosos impactos en los ecosistemas de agua dulce nativos (Simon & Townsend 2003; Gozlan et al. 2010). Un claro ejemplo de esto, son algunas especies pertenecientes al grupo de los salmónidos (Familia Salmonidae). En Chile, el cultivo de estas especies llegó a generar más \$2000 millones de dólares el año 2014 (SUBPESCA 2014), mientras que se ha estimado que la pesca recreativa de estos peces, sólo en el lago Llanquihue, puede generar hasta \$5,3 millones de dólares al año (Arismendi & Nahuelhual 2007).

De las once especies de salmónidos introducidas en Chile, seis de estas pueden considerarse invasoras según el criterio de Mack et al. (2000) (Vargas et al. 2015): la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón Chinook (*O. tshawytscha*), usados como recurso para la pesca recreativa y la salmonicultura (Basulto 2003; Soto et al. 2006, 2007); el salmón del Pacífico (*O. kisutch*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), que son

usados principalmente como peces de cultivo (Soto et al. 2006); y la trucha café (*S. trutta*) y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), que son especies utilizadas solamente para la pesca recreativa (Basulto 2003). La mayoría de estas especies han tenido un gran impacto en los ecosistemas nativos, ya que son especies carnívoras y de crecimiento rápido, por lo que afectan a las especies de peces y macroinvertebrados nativos (Figueroa et al. 2010; Arismendi et al. 2012; Habit et al. 2010, 2014).

El salmónido más ampliamente distribuida en Chile es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), considerada una de las “100 especies invasoras más dañinas del mundo” (Lowe et al. 2004). Es una especie nativa del Pacífico norte, su rango nativo abarca la península de Kamchatka, en Asia, y desde Alaska hasta México, en Norteamérica (Quinn 2011). Como todos los miembros del género *Oncorhynchus*, es buena colonizadora de nuevos ambientes, a pesar de presentar filopatría, es decir, que los adultos vuelven a desovar en los ríos donde nacieron (Quinn 2011).

Es comúnmente aceptado que el origen de las truchas arcoíris introducidas a nivel mundial es el Río McCloud, afluente del Río Sacramento en California (MacCrimmon 1971), aunque el origen de las primeras cepas domésticas podría ser más complejo, ya que las primeras truchas en cultivarse fuera de su rango nativo también incluían truchas provenientes de otros ríos del estado de California (Stanković et al. 2015). Actualmente, existen muchas cepas que se han desarrollado en diversos países y tienen un origen

incierto en el rango nativo de la especie (MacCrimmon 1971; Gross et al. 2007; Monzón-Argüello et al. 2014).

En Chile, las primeras truchas arcoíris fueron introducidas para pesca recreativa, siendo las primeras en ser cultivadas con éxito provenientes de Hamburgo en Alemania (Basulto 2003; Crawford & Muir 2008; Cárcamo et al. 2015). Estas llegaron a la piscicultura del Río Blanco, afluente del Río Aconcagua en la V región, en el año 1905 (Basulto 2003). A partir del Río Blanco se comenzó a poblar con éxito ríos de las regiones Metropolitana, VI, VII, IX y XIV (Basulto 2003). Con la finalidad de poblar los ríos del sur del país, en 1910 se abre una piscicultura temporal en el Río Maullín y posteriormente en 1916 comienza funcionar la piscicultura de Lautaro, en el Río Cautín, IX región; ambas pisciculturas usaron cepas provenientes de Alemania (Basulto 2003; Cárcamo et al. 2015). En los años siguientes continuaron las siembras y repoblamientos en los ríos de las Zonas Centro y Sur del país, como sucedió en el Lago Todos los Santos donde las primeras introducciones de trucha fueron realizadas por pescadores deportivos alrededor de 1932 (Basulto 2003). Además, con la misma finalidad de poblar de salmónidos los ríos de Chile, se inauguraron nuevas pisciculturas como la Piscicultura de Polcura, en un afluente del Río Ñuble en la VIII región en 1952 (Basulto 2003). Actualmente, existen poblaciones de trucha arcoíris en la mayoría de los ríos de estas zonas y los repoblamientos siguen realizándose principalmente en la Zona Sur de Chile, donde la pesca recreativa es una importante actividad económica (Basulto 2003; Arismendi & Nahuelhual 2007; Habit et al. 2014).

En la Zona Norte de Chile se puede encontrar poblaciones de trucha arcoíris incluso en la zona desértica, específicamente en el Río Loa y en el altiplano chileno boliviano incluyendo al Lago Chungará y los ríos Lluta y Caquena (Vila et al. 2007). Dichas poblaciones del altiplano tienen el mismo origen que las truchas presentes en Lago Titicaca, provenientes de la Piscicultura Chucuito en Perú, las cepas de esta piscicultura provendrían principalmente de Estados Unidos y de la Piscicultura de Lautaro (Loubens 1991; Vila et al. 2007). Mientras que las truchas presentes en el Río Loa fueron introducidas en 1949 por la Dirección General de Pesca y Caza (Basulto 2003).

Además de las introducciones para fines recreativos, actualmente la trucha arcoíris se cultiva a pequeña escala en algunos ríos de la Zona Centro de Chile e intensivamente en los cuerpos de agua dulce de la Zona Sur del país, con la finalidad de exportar su carne. El primer ensayo de piscicultura comercial del país se realizó en el Lago Llanquihue en 1969; posteriormente entre los años 1984 y 1991, se otorgaron 32 concesiones para el cultivo de salmónidos en los lagos Araucanos o Nor-Patagónicos (Basulto 2003; León-Muñoz et al. 2007). Desde que se inició el cultivo de trucha arcoíris como especie comercial se han registrado escapes masivos de individuos de distintas cepas genéticas, desde las instalaciones de cultivo a los ríos y lagos del sur del país, especialmente en la X región (Soto et al. 2006; Arismendi et al. 2009). Los constantes escapes de peces desde las instalaciones de cultivo en la Zona Sur, no solo generan mayor presión de propágulos contribuyendo al éxito de la invasión, sino que además la hibridación de peces de cultivo

con individuos asilvestrados, estaría modificando fenotípica y genotípicamente las poblaciones asilvestradas, provenientes de introducciones para la pesca recreativa (Arismendi et al. 2009; Consuegra et al. 2011; Monzón-Argüello et al. 2014; Benavente et al. 2015) (Tabla 1). Las diferencias en la historia de invasión en las distintas zonas del país pueden implicar diferencias en el comportamiento invasor de la especie.

En este contexto, las herramientas moleculares han sido de gran utilidad en la identificación del origen de las poblaciones invasoras, las rutas de invasión y determinar la existencia de múltiples introducciones, lo que puede ayudar a entender el éxito de la invasión y sus impactos (Gaskin et al. 2005; Croxton et al. 2011). Además, estas pueden ayudar a detectar estructuración genética entre poblaciones de especies invasoras (Lecis et al. 2008; Reusch et al. 2010), lo que puede ser relevante en especies que presentan filopatría y pueden desarrollar estructura genética poblacional en pocas generaciones como es el caso de los salmónidos del género *Oncorhynchus* (Hendry et al. 2000; Huey et al. 2005). Todo lo anterior puede ser útil a la hora de planificar estrategias de manejo o erradicación de una especie invasora y para monitorear el éxito de dichas estrategias de manejo (Fraser et al. 2013).

Tabla 1. Resumen histórico de la invasión de la trucha arcoíris en las Zonas Norte, Centro y Sur de Chile.

Periodo	Zona	Cuencas estudiadas afectadas	Eventos
1905-2016	Centro	Aconcagua; Maipo; Rapel; Maule; Imperial	Apertura de la Piscicultura del Río Blanco, comienza siembra de ríos de las regiones Metropolitana, VI, VII, IX y XIV
1910-1916	Sur	Llanquihue	Apertura de Piscicultura temporal de Maullín con finalidad de sembrar ríos de Zona Sur
1916-2016	Sur	Biobío; Imperial; Llanquihue; Todos los Santos	Apertura de Piscicultura de Lautaro en Río Cautín, finalidad de continuar siembras y repoblamientos en Zona Sur
1932	Sur	Todos los Santos	Primeras introducciones en Lago Todos los Santos por pescadores deportivos
1939	Norte	Lluta, Caquena	Primeras siembras de salmónidos en ríos altiplánicos, posible origen Piscicultura de Chucuito en Puno, Perú
1949	Norte	Loa	Siembra de trucha arcoíris en Río Loa por parte de Dirección General de Pesca y Caza
1952	Centro	Itata	Apertura de Piscicultura de Polcura en afluente del Río Ñuble
1969	Sur	Llanquihue	Primer ensayo de piscicultura comercial en orilla sur de Lago Llanquihue
1975	Sur	Llanquihue	Instalación de Piscicultura comercial del Río Pescado en Lago Llanquihue
1984-1991	Sur	Llanquihue	Se otorgaron 32 concesiones para el cultivo comercial de salmónidos en los lagos Araucanos o Nor-Patagónicos
Actualidad	Sur	Llanquihue	Escapes masivos desde las instalaciones de cultivo hacia ríos de la zona e hibridación de truchas de cultivo con truchas asilvestradas

Fuentes: Loubens 1991; Basulto 2003; Soto et al. 2006; León-Muñoz et al. 2007; Vía et al. 2007; Crawford & Muir 2008; Consuegra et al. 2011; Cárcamo et al. 2015.

Uno de los marcadores moleculares más utilizados son las secuencias de DNA mitocondrial (en adelante, mtDNA), estas han sido ampliamente en estudios de filogeografía. Esto debido a que a diferencia del DNA nuclear, no presenta recombinación y presenta tasas de mutación más altas, que permiten estudiar la variación

intraespecífica de linajes maternos de una especie a través de su rango geográfico y en un contexto histórico de unos pocos millones de años (Harrison 1989). La región que posee la tasa de mutación más alta en el mtDNA es la región control o D-loop, la que se ha usado para estudios filogeográficos en el rango nativo de varias especies, por lo que ha sido útil para determinar el origen geográfico de poblaciones de especies invasoras en su rango introducido (Kolbe et al. 2004; Facon et al. 2008; Stanković et al. 2016). Por otro lado, uno de los marcadores nucleares biparentales actualmente en uso son los Polimorfismos de Único Nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms); estos son sustituciones puntuales de un nucleótido cada cierto número de pares de bases en el genoma, siendo generalmente bialélicos y pudiendo encontrarse tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma (Seeb et al. 2011). Al igual que marcadores como los microsatélites, pueden usarse para determinar la variación genética entre poblaciones, la identificación de individuos y linajes parentales, determinar estructura poblacional y estimar tamaño efectivo poblacional (Morin et al. 2004). Las principales ventajas que presentan en relación con otros marcadores de este tipo es que su tipificación a gran escala puede ser automatizada a un costo moderado (Schlötterer 2004; Seeb et al. 2011) y que al estar presentes en regiones adaptativas del genoma pueden usarse para estudios tanto de variación adaptativa como neutral (Morin et al. 2004; Gomez-Uchida et al. 2011; Seeb et al. 2011).

La trucha arcoíris ha sido estudiada extensamente tanto a nivel genético como genómico. Dentro de estos estudios, muchos han usado secuencias de mtDNA para estudiar la filogeografía de la especie dentro de su rango nativo (Nielsen et al. 1998; Graziano et al. 2005; Brunelli et al. 2010) y para encontrar el origen de poblaciones introducidas fuera de este (Stanković et al. 2016). Asimismo, más recientemente se han hecho estudios que utilizan Polimorfismos de único nucleótido (SNPs), estos se han usados para diversos fines como la inferencia demográfica clásica (Limborg et al. 2012), evaluar diversidad genética ligada a rasgos fenotípicos (Limborg et al. 2012; Hale et al. 2013; Hecht et al. 2013; Brunelli et al. 2008) y análisis de parentesco (Abadía-Cardoso et al. 2013). Dentro de estos estudios, el trabajo de Limborg et al. (2012) desarrolló un panel de SNPs para la especie que ha sido utilizado para estudios poblacionales en trucha arcoíris tanto dentro de su rango nativo como introducido (Limborg et al. 2012; Benavente et al. 2015).

En este contexto, se usaron secuencias de la región control del mtDNA, comparando los haplotipos encontrados en Chile con secuencias del rango nativo presentes en GENBANK, para determinar el origen de las truchas arcoíris que están invadiendo los ríos de las zonas Norte, Centro y Sur de Chile, y además se usaron SNPs nucleares para evaluar la diversidad genética y la existencia de estructura poblacional de la especie en las distintas cuencas hidrográficas estudiadas en Chile.

HIPÓTESIS

H1: La trucha arcoíris en Chile presenta múltiples orígenes geográficos en el rango nativo de la especie.

H2: Los escapes de individuos de diversas cepas desde las instalaciones de cultivo generan una mayor variabilidad genética en la trucha arcoíris asilvestrada cerca de las localidades donde existen pisciculturas en comparación a localidades sin piscicultura.

H3: La introducción de trucha arcoíris desde diferentes áreas geográficas en diferentes zonas de Chile generó estructura poblacional sin un patrón de aislamiento por distancia.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el origen y la estructura poblacional espacial de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) en el rango introducido en Chile.

Objetivos específicos

- (1) Determinar el origen geográfico, diversidad haplotípica y haplotipos compartidos entre poblaciones de trucha arcoíris introducidas en cuencas de las zonas Norte, Centro y Sur de Chile, usando mtDNA.
- (2) Evaluar la influencia de la piscicultura en la diversidad genética de truchas arcoíris asilvestradas en cuencas de las zonas Norte, Centro y Sur de Chile, usando SNPs.
- (3) Evaluar la estructuración poblacional de la trucha arcoíris asilvestrada en las cuencas de las zonas Norte, Centro y Sur de Chile, usando SNPs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio:

Chile continental puede ser dividido en cuatro zonas de acuerdo a los macrobioclimas que se presentan a lo largo del país: Tropical, Mediterráneo, Templado y Antiboreal (Amigo & Ramírez 1998; Luebert & Pliscoff 2006). En concordancia con lo anterior, el área de estudio fue dividida en tres zonas: Zona Norte, que se encuentra bajo la influencia del macrobioclima tropical; Zona Centro, que se encuentra bajo la influencia del macrobioclima mediterráneo; Zona Sur que se encuentra bajo la influencia del macrobioclima templado (Fig. 1; Tabla 2).

En la Zona Norte, se obtuvieron muestras de tres localidades, dos en la XV región y una en la II región. Esta zona presenta el macrobioclima tropical de tipo desértico, con precipitaciones casi inexistentes, siendo la temporada de precipitaciones entre diciembre y marzo en las partes de mayor altura, en el llamado invierno altiplánico (DGA, 1989, 2004a; Luebert & Pliscoff 2006).

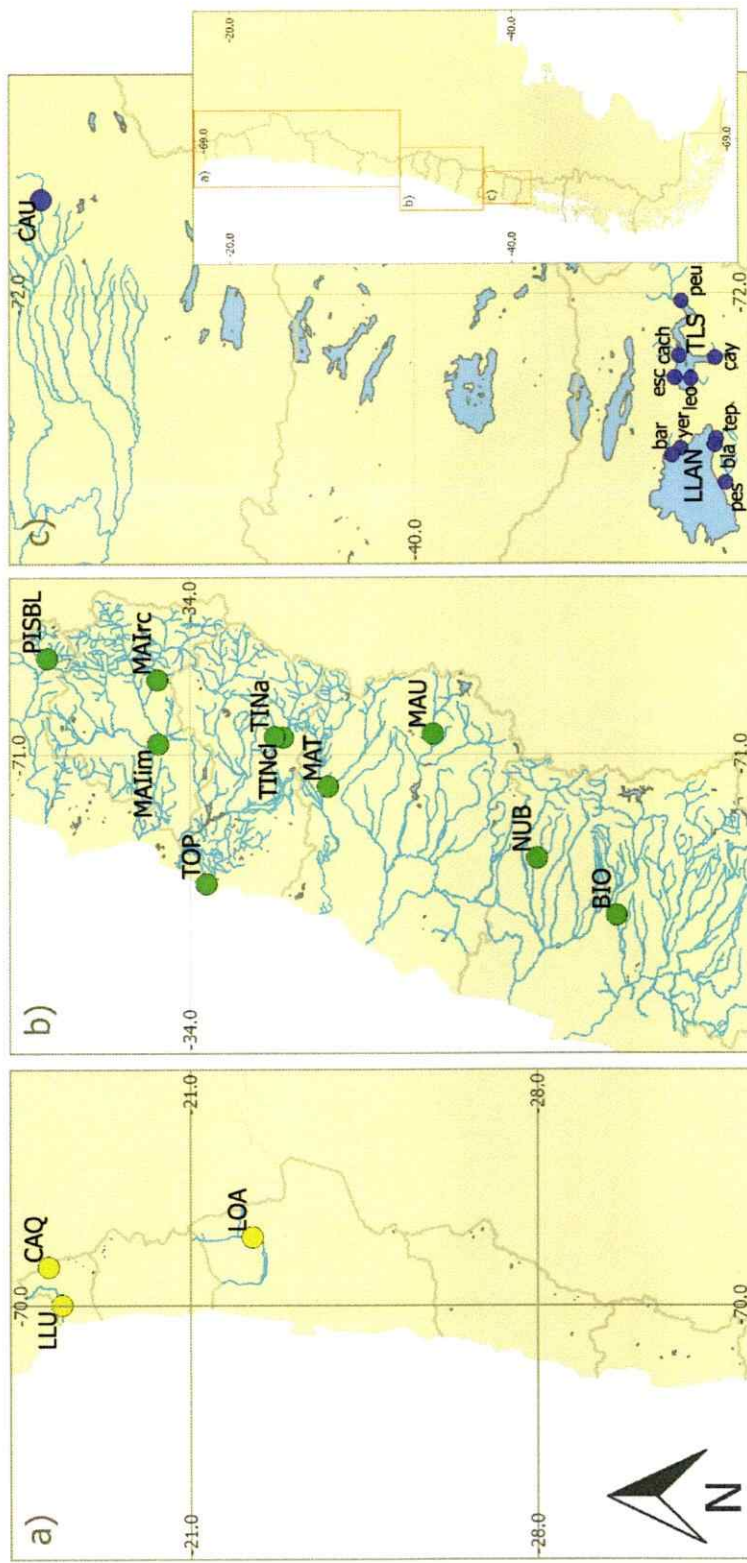


Fig. 1: Mapa con localidades de muestreo, se muestran las cuencas estudiadas, los código en mayúsculas se abrevian los nombres de las cuencas, en las cuencas con muestras de más de una localidad se abreviaron las localidades en minúsculas (Ver Tabla 2). a) Zona Norte; b) Zona Centro; c) Zona Sur.

Tabla 2. Tabla de localidades de muestreo; Código de cada localidad, en mayúsculas se abrevian los nombres de cuencas, en minúsculas se abrevian localidades en cuencas con más de una localidad de muestreo; Zona del área de estudio y Cuenca por localidad; Colección de obtención de muestras; Año de colecta de muestras; Lat y Long: Coordenadas geográficas de localidad de muestreo.

Localidad	Código	Zona	Cuenca	Colección	Año	Lat	Long
Río Lluta	LLU	Norte	Lluta	Claudio Quezada	2007	-18.403	-69.992
Río Caquena	CAQ	Norte	Caquena	Claudio Quezada	2007	-18.130	-69.222
Río Loa	LOA	Norte	Loa	Claudio Quezada	2009	-22.239	-68.616
Piscicultura Río Blanco	PISBL	Centro	Aconcagua	Cristián Araneda; Rubén Avendaño	2015	-32.933	-70.282
Río Clarillo	MAIrc	Centro	Maipo	Claudio Quezada	2015	-33.759	-70.442
Isla Maipo	MAIim	Centro	Maipo	Claudio Quezada	2015	-33.764	-70.922
Río Topocalma	TOP	Centro	Topocalma	Claudio Quezada		-34.124	-71.966
Río Tinguiririca, Río Claro	TINcl	Centro	Rapel	Esta tesis	2016	-34.697	-70.875
Río Tinguiririca, Río Antivero	TINa	Centro	Rapel	Esta tesis	2016	-34.635	-70.869
Río Claro	MAT	Centro	Mataquito	Cristián Araneda	2014	-35.032	-71.241
Camino a Laguna Maule	MAU	Centro	Maule	Esta tesis	2016	-35.820	-70.846
Río Ñuble	NUB	Centro	Itata	Claudio Quezada	2006	-36.598	-71.775
Río Laja	BIO	Centro	Biobio	GEEC Lab	2015	-37.192	-72.202
Río Cautín	CAU	Sur	Imperial	GEEC Lab	2014	-38.471	-71.614
Río Pescado	LLANpes	Sur	Llanquihue	GEEC Lab	2014	-41.271	-72.775
Río Tepu	LLANtep	Sur	Llanquihue	GEEC Lab	2013	-41.233	-72.596
Río Blanco	LLANbla	Sur	Llanquihue	GEEC Lab	2013	-41.228	-72.621
Río Yerbas Buenas	LLANyer	Sur	Llanquihue	GEEC Lab	2013	-41.087	-72.635
Río Blanco Arenales	LLANbar	Sur	Llanquihue	GEEC Lab	2013	-41.051	-72.663
Río León	TLSleo	Sur	Todos los Santos	GEEC Lab	2013	-41.129	-72.349
Río Cachimba	TLScach	Sur	Todos los Santos	GEEC Lab	2013	-41.080	-72.257
Río Escape	TLScsc	Sur	Todos los Santos	GEEC Lab	2013	-41.062	-72.346
Río Cayetue	TLScay	Sur	Todos los Santos	GEEC Lab	2013	-41.229	-72.265
Río Peulla	TLSpou	Sur	Todos los Santos	GEEC Lab	2014	-41.089	-72.033

La Zona Centro comprende a cuencas hidrográficas desde la región metropolitana hasta la VIII región. Dicha zona se caracteriza por presenta el macrobioclima mediterráneo, teniendo una estacionalidad muy marcada, con al menos dos meses de déficit hídrico y precipitaciones concentradas en los meses de otoño e invierno, lo cual genera gran variación del caudal de los ríos entre las diferentes estaciones del año (Luebert & Pliscoff 2006; Meza et al. 2012). Dentro de las localidades de esta zona se obtuvieron muestras de la Piscicultura del Río Blanco (PISBL) (Afluente del Río Aconcagua, V Región) que fue la primera piscicultura en cultivar trucha arcoíris en el país (Basulto 2003).

Finalmente, la zona sur del área de estudio comprende cuencas de la IX y X región de Chile. El macrobioclima de esta zona es el templado con influencia mediterránea, este presenta precipitaciones todo el año aunque estas se concentran principalmente en los meses de invierno (DGA, 2004b, 2004c; Luebert & Pliscoff 2006). Cabe destacar que esta zona comprende la cuenca del Río imperial, con muestras obtenidas de su afluente el Río Cautín (CAU), donde se ubica la piscicultura de Lautaro (Basulto 2003) y la cuenca tributaria del Lago Llanquihue (LLAN), que es el lago donde está la mayor producción de smolts de trucha arcoíris del país (León-Muñoz et al. 2007).

Obtención de muestras:

Se obtuvieron muestras de individuos de *O. mykiss* en distintas cuencas hidrográficas de Chile. Algunas muestras, DNA extraído y datos de SNPs fueron obtenidos de diferentes colecciones, por lo que no todos los individuos fueron muestreados en el transcurso del mismo año.

Se obtuvieron muestras de trozos de aleta de truchas arcoíris de diversas colecciones y laboratorios, para las cuencas de las zonas Norte y Sur, además de las cuencas de los ríos Topocalma, Mataquito, Ñuble, Biobío y la Piscicultura del Río Blanco en la Zona Centro (Tabla 2).

Las muestras de las cuencas de los ríos Maipo y Tinguiririca fueron obtenidas para este estudio usando una mochila de pesca eléctrica. Para la cuenca del Río Maule se capturaron truchas mediante pesca con mosca. Los individuos capturados fueron anestesiados en baldes con una solución de benzocaína, para la obtención de trozos desde las aletas caudal y adiposa de las truchas que después fueron almacenados en alcohol 95%, las truchas fueron liberadas posteriormente.

Extracción de DNA y secuenciación del mtDNA:

El DNA genómico total se aisló usando el método de sales según las indicaciones de Aljanabi & Martinez 1997. Para la obtención de secuencias de región control (D-loop) del mtDNA se amplificaron segmentos de aproximadamente 500 pares de bases usando los primers (primer forward: CCA CTC TTT ACG CCG GTA G y primer reverse ACT CTT ATT GAT GGT CAG GGG CAG) y condiciones de PCR descritos en Brunelli et al. (2010); los productos PCR fueron enviados a secuenciar en un servicio externo, finalmente se alinearon las secuencias de mtDNA usando el programa BioEdit v7.2.5 (Hall 1999).

Tipificación de SNPs:

Para los SNPs, se seleccionaron 96 SNPs concordantes con la base de datos que se poseía para los ríos de las cuencas tributarias de los Lagos Llanquihue y Todos los Santos en la Zona Sur, estos a su vez, se seleccionaron a partir de 276 SNPs disponibles, diseñados para poblaciones naturales de Norteamérica (Limborg et al. 2012). Dentro de los 96 SNP elegidos, tres son SNPs especie-específicos que permitieron excluir de los análisis juveniles de otras especies de salmónidos mal identificados como trucha arcoíris. La tipificación de los SNPs se realizó mediante PCR masiva usando chips Fluidigm® 96.96; siguiendo las condiciones y concentraciones recomendadas en Seeb et al. (2009).

Origen y diversidad haplotípica de poblaciones introducidas:

Una vez alineadas las secuencias de D-loop del mtDNA, se usó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de GENBANK (Benson et al. 2013) para buscar a que cuencas del rango nativo de *O. mykiss* pertenecen los haplotipos encontrados en los ríos estudiados en el rango introducido. La proporción de haplotipos encontrados fue graficada por cuenca en gráficos de torta sobre el mapa del área de estudio.

Para estas secuencias, se hizo una red de haplotipos usando el método de “median-joining”, usando el programa PopART v1.7 (Leigh y Bryant 2015). Además, se estimó el número de haplotipos, sitios polimórficos, diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) usando el programa DnaSP v4.9 (Rozas et al. 2003).

Análisis exploratorios de SNPs: Integridad, desequilibrio de ligamiento y loci bajo selección

Se verificó la integridad de los datos de SNPs calculando algunos estadísticos genéticos. Para todos los SNPs en cada localidad de muestreo, se buscaron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) y se midió desequilibrio de ligamiento usando el programa GENEPOP v4.5 (Rousset 2008), se calculó el coeficientes de endogamia (F_{IS}) usando el programa GENETIX v4.05 (Belkhir et al. 2004). Se usó el programa BAYESCAN

v2.1 (Foll 2012) para determinar la existencia de SNPs candidatos a estar bajo selección natural, con el fin de descartarlos en los análisis de estructura poblacional.

Diversidad genética de SNPs:

Como aproximación a la diversidad genética, se calculó el polimorfismo (%P), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) de los SNPs de trucha arcoíris usando el programa Genalex v6.5 (Peakall & Smouse 2012) y la riqueza alélica (RA) de estos en el programa FSTAT v2.9.3 (Goudet 2001).

Para evidenciar el efecto en la diversidad genética de la piscicultura comercial a gran escala, se realizó un boxplot en que se comparó la suma de las RA de cada locus de las localidades de la cuenca tributaria de LLAN y las muestras obtenidas de PISBL, con el resto de las cuencas muestreadas donde no hay piscicultura a gran escala, se excluyeron de esta comparación las cuencas que poseían menos de cinco individuos tipificados. Posteriormente, se realizó un Test U de Mann-Whitney para determinar si las diferencias entre ambos grupos son significativas.



Estructura genética poblacional:

Para la estimación de estructura genética, se usaron métodos basados en poblaciones y en individuos. Se usó el programa GENETIX (Belkhir et al. 2004) para calcular los valores de F_{st} pareado (Weir & Cockerham 1984) entre las todas las localidades estudiadas y la significancia de dichos valores utilizando un test de permutaciones (10000 permutaciones). Para representar gráficamente los patrones de diferencia ya mencionados, se realizó un análisis de correspondencia (CA) para todas las localidades de las cuencas estudiadas, usando el paquete adegenet de R (Jombart 2008; R Core Team 2016).

El método basado en individuos realizado fue un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) en el paquete adegenet de R (Jombart et al. 2010). DAPC es un método que no se basa poblaciones en equilibrio para determinar el número de clústers o pools génicos óptimos existentes en una muestra de individuos, el análisis busca combinaciones lineales de los alelos o funciones discriminantes (DA) para mostrar la mayor diferencia entre grupos. Basado en las funciones discriminantes retenidas, el análisis calcula la probabilidad de asignación de cada individuo a los clústers génicos definidos. Para encontrar el número de clústers génicos (K) óptimos se usó la función "find.cluster", que usa el método de Criterio de Información Bayesiano (BIC), dicha función fue corrida con 50.000.000 de iteraciones y conservando todos los alelos

obtenidos (número de componentes principales = 87), desde $K=2$ hasta $K=24$. Después de encontrar el número óptimo de clusters, se realizó un primer DAPC conservando todas las funciones discriminantes calculadas ($K-1$) de acuerdo a las recomendaciones de Jombart & Collins (2015) cuando estas son menos de diez, también se conservaron los 87 componentes principales (PC) para este primer análisis. Posteriormente, con el primer DAPC se usó la función de optimización propuesta por adegenet para determinar el número de PC óptimos a conservar en el DAPC definitivo; este fue realizado con 14 PC y 7 funciones discriminantes. Finalmente, se hicieron gráficos de dispersión para "DA 1 vs. DA 2" y "DA 1 vs. DA 3". Además, la proporción de individuos pertenecientes a cada clúster también fue graficada por cuenca en gráficos de torta sobre el mapa del área de estudio.

RESULTADOS

Origen y diversidad haplotípica de poblaciones introducidas:

Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 500 bp de la región control del mtDNA, en 160 individuos provenientes desde las 24 localidades de muestreo.

Se encontró cinco haplotipos distintos en toda el área de estudio (Tabla 3; Fig. 2; Fig. 3). El haplotipo más común fue el haplotipo MYS01, presente en todas las localidades de muestreo y siendo el único haplotipo presente en las localidades LOA, TOP, NUB, BIO y los cinco ríos tributarios del Lago TLS estudiados. El segundo haplotipo con mayor frecuencia es el haplotipo MYS03; este haplotipo es el predominante en las localidades TINcl y CAU, y también está presente en las localidades CAQ, PISBL, MAIrc, MALim, TINa, MAT y MAU. Los haplotipos MYS1G, MYS10 y MYS12 fueron raros; el haplotipo MYS1G se encontró solo en un individuo de los ríos tributarios de LLAN (LLANbar); el haplotipo MYS10 se encontró en un individuo de cada una de las localidades de PISBL, LLANbar y LLANpes. El haplotipo MYS12 se encontró sólo en las localidades de los ríos altiplánicos LLU y CAQ, en la Zona Norte, estando presente en un individuo de LLU y en 4 individuos de CAQ (Fig.2).

Tabla 3: Haplotipos por localidad, por cuenca y por zona, n: Tamaño muestral; Haplotipos: Nombres de haplotipos según nomenclatura usada en rango nativo; h(SD): diversidad haplotípica (desviación estándar); π : diversidad nucleotídica.

Cuenca	Localidad	n	Haplotipos					Total haplotipos	h(SD)	π
			MYS01	MYS01G	MYS03	MYS10	MYS12			
Lluta	LLU	2	1	-	-	-	1	2	1,00(0,50)	0,004
Caquena	CAQ	6	1	-	1	-	4	3	0,600(0,22)	0,003
Loa	LOA	6	6	-	-	-	-	1	0	0
Total zona Norte		14	8	-	1	-	5	3	0,582(0,09)	0,003
Aconcagua	PISBL	7	5	-	1	1	-	3	0,524(0,21)	0,002
Maipo	MAIrc	6	5	-	1	-	-	2	0,333(0,22)	0,001
Maipo	MAIim	13	7	-	6	-	-	2	0,538(0,06)	0,001
Total Maipo		19	12	-	7	-	-	2	0,491(0,07)	0,001
Topocalma	TOP	3	3	-	-	-	-	1	0	0
Rapel	TINcl	4	1	-	3	-	-	2	0,500(0,27)	0,001
Rapel	TINa	3	2	-	1	-	-	2	0,667(0,31)	0,001
Total Rapel		7	3	-	4	-	-	2	0,571(0,12)	0,001
Mataquito	MAT	4	3	-	1	-	-	2	0,500(0,27)	0,001
Maule	MAU	18	11	-	7	-	-	2	0,523(0,05)	0,001
Itata	NUB	16	16	-	-	-	-	1	0	0
Biobio	BIO	18	18	-	-	-	-	1	0	0
Total zona Centro		92	71	-	20	1	-	3	0,373(0,05)	0,001
Imperial	CAU	16	7	-	9	-	-	2	0,525(0,06)	0,001
Llanquihue	LLANpes	4	3	-	-	1	-	2	0,5(0,27)	0,002
Llanquihue	LLANtep	3	3	-	-	-	-	1	0	0
Llanquihue	LLANbla	5	4	-	1	-	-	2	0,400(0,24)	0,001
Llanquihue	LLANyer	3	3	-	-	-	-	1	0	0
Llanquihue	LLANbar	4	2	1	-	1	-	3	0,833(0,22)	0,003
Total Llanquihue		19	15	1	1	2	-	4	0,380(0,13)	0,001
Todos los Santos	TLSleo	4	4	-	-	-	-	1	0	0
Todos los Santos	TLScach	5	5	-	-	-	-	1	0	0
Todos los Santos	TLSesc	3	3	-	-	-	-	1	0	0
Todos los Santos	TLScay	4	4	-	-	-	-	1	0	0
Todos los Santos	TLSpeu	3	3	-	-	-	-	1	0	0
Total Todos los Santos		19	19	-	-	-	-	1	0	0
Total zona Sur		54	41	1	10	2	-	4	0,395(0,07)	0,001

Haplotipos
 MYS01
 MYS01G
 MYS03
 MYS10
 MYS12

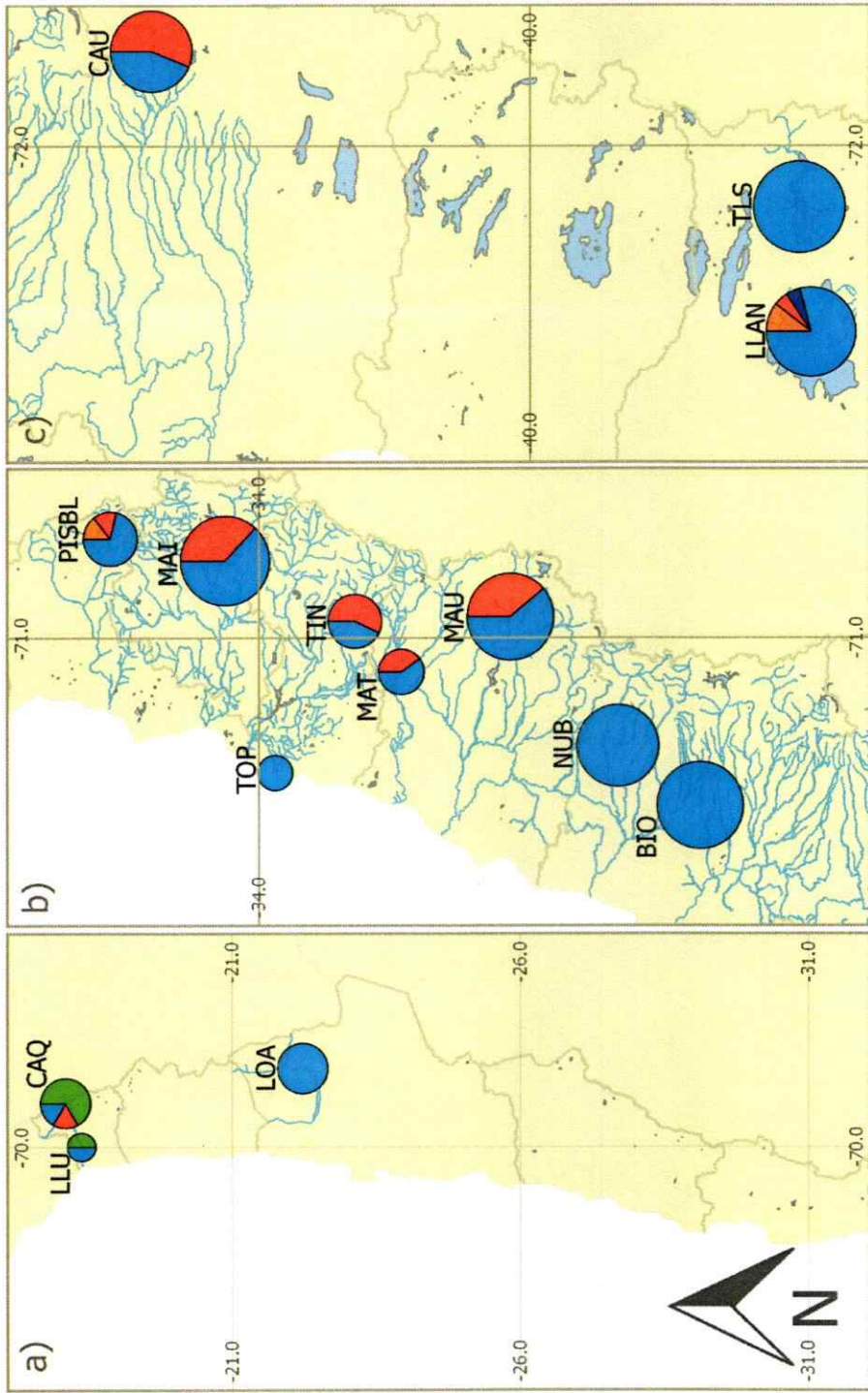
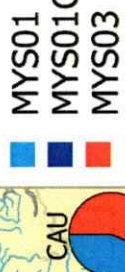


Fig. 2: Mapa con proporción de haplotipos encontrados por localidad, el tamaño del círculo es proporcional al tamaño muestral por localidad. a) Zona Norte; b) Zona Centro; c) Zona Sur.

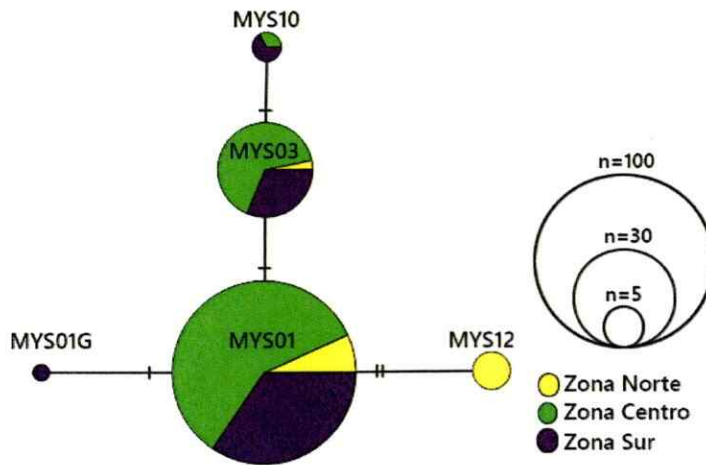


Fig. 3: Red haplotipos mitocondriales de trucha arcoíris en el rango introducido. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia del haplotipos, los colores representan proporción del haplotipo encontrada en cada zona del área de estudio y las líneas conectando los nodos representan los pasos mutacionales entre haplotipos.

Los valores de la diversidad haplotípica (h) fluctuaron entre 0,582 y 0,373, entre la Zona Norte y la Zona Centro respectivamente; mientras que la diversidad nucleotídica (π) fluctuó entre 0,003 y 0,001 entre la Zona Norte y las zonas Centro y Sur, que presentaron el mismo valor de (π) (Tabla 3).

Análisis exploratorios de SNPs: integridad, desequilibrio de ligamiento y potenciales loci bajo selección

De los 93 SNPs analizados, se encontró un SNP fuera del equilibrio de HW (*Omy_mcsf-268*), este SNP fue eliminado de todo el análisis. Se encontraron tres grupos de

ligamiento, consistentes en las diferentes localidades de muestreo, de estos, cinco SNPs fueron descartados de los análisis posteriores (Omy_112820-82; OMS00177; Omy_dacd1-131; Omy_U11_2a-114; Omy_arp-630).

El programa BAYESCAN no detectó SNPs candidatos bajo selección. Finalmente, se seleccionaron 87 SNPs para los análisis posteriores de estimación de diversidad genética y estructura poblacional.

No se encontraron SNPs que presentaran coeficientes de endogamia (F_{IS}) significativos consistentemente en las localidades estudiadas. Las localidades CAQ y PISBL presentaron F_{IS} positivos significativos, es decir, déficit de heterocigotos, mientras que la localidad LLANtep presentó un valor de F_{IS} negativo significativo, es decir, exceso de heterocigotos para gran parte de los SNPs en la mayoría de los individuos muestreados (Tabla 4).

Cinco de las localidades estudiadas se encontraban fuera del equilibrio de HW (LLU, CAQ, PISBL, BIO y TLSesc). En el caso de LLU, CAQ y PISBL podría explicarse por el pequeño número de individuos muestreados.

Diversidad genética de SNPs:

Los resultados del porcentaje de SNPs polimórficos, H_o , H_e y RA se presentan en la Tabla 4. Los valores de polimorfismo van desde 55,17% en LLU hasta 100% en LLANbar, siendo el promedio de polimorfismo de toda el área de estudio 80,6%. Los valores promedio de H_o , H_e y RA de todas las localidades fueron 0,286, 0,276 y 1,624 respectivamente.

Se observa que los mayores valores de polimorfismo (sobre el 90%), y del resto de los estimadores de diversidad genética se encuentran en las localidades del Lago LLAN y en PISBL. Tres localidades presentan un polimorfismo menor al 70%, LLU, TOP y BIO. Además se puede observar que LLU presentó valores de H_o , H_e y RA muy bajas en comparación al total de las localidades muestreadas.

El boxplot que compara los valores de RA de las localidades de LLAN y PISBL (influenciadas por la piscicultura) y el resto de las localidades (no influenciadas por la piscicultura), mostró que la mediana de la RA de localidades con piscicultura es mayor que en las localidades que no presentan pisciculturas a gran escala. Esta diferencia es altamente significativa según el Test U de Mann-Whitney realizado ($p=0,007$) (Fig. 4).

Tabla 4: Estimadores de diversidad genética por localidad, n: Tamaño muestral; %P: Porcentaje de polimorfismo; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; RA: Riqueza alélica; Fis: Coeficiente de endogamia.

Localidad	n	%P	Ho	He	RA	Fis
LLU	7	55,17%	0,148	0,139	1,357	0,011
CAQ	5	86,21%	0,309	0,318	1,751	0,141*
LOA	8	70,11%	0,272	0,237	1,552	-0,080
PISBL	8	91,95%	0,285	0,342	1,773	0,234*
MAIrc	5	77,01%	0,306	0,291	1,682	0,058
MAlim	11	83,91%	0,332	0,311	1,690	-0,018
TOP	3	60,92%	0,295	0,242	1,609	-0,020
TINcl	4	72,41%	0,337	0,283	1,680	-0,045
TINa	4	75,86%	0,310	0,283	1,698	0,047
MAT	4	73,56%	0,299	0,274	1,672	0,052
MAU	33	82,76%	0,286	0,281	1,618	-0,001
NUB	15	80,46%	0,268	0,269	1,598	0,040
BIO	19	67,82%	0,225	0,222	1,488	0,017
CAU	28	75,86%	0,270	0,262	1,570	-0,010
LLANpes	40	98,85%	0,324	0,327	1,712	0,022
LLANtep	95	98,85%	0,342	0,327	1,705	-0,039*
LLANbla	88	98,85%	0,318	0,320	1,693	0,013
LLANyer	33	96,55%	0,361	0,348	1,739	-0,021
LLANbar	44	100,00%	0,338	0,337	1,726	0,010
TLSleo	63	78,16%	0,256	0,247	1,534	-0,025
TLScach	63	78,16%	0,235	0,239	1,518	0,024
TLScach	59	78,16%	0,240	0,245	1,537	0,028
TLScay	15	74,71%	0,251	0,241	1,541	-0,005
TLSpou	36	77,01%	0,253	0,247	1,543	-0,009

*Valores significativos $p < 0,05$

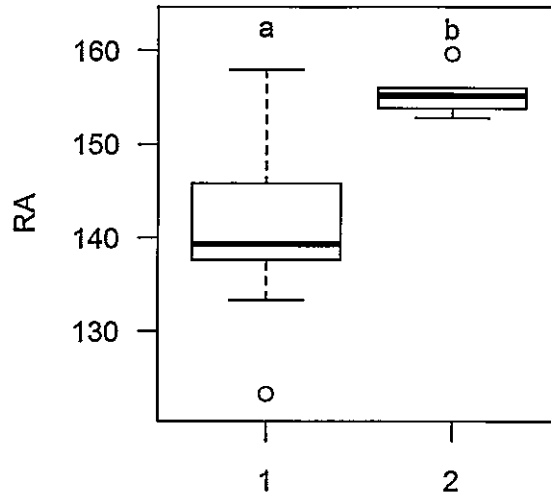


Fig. 4: Boxplot donde se compara las RA de las localidades que no presentan piscicultura a gran escala (1) con la RA de las cinco localidades de LLAN y PISBL (2). Las letras sobre los boxplots representan diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

Estructura genética poblacional:

Los resultados de la tabla de F_{ST} y el CA muestran que las localidades que más se diferencian del resto en el área de estudio son LLU en la Zona Norte, y las cinco localidades de la cuenca tributaria de TLS en Zona Sur. Al observar la matriz de los valores de F_{ST} pareados (Tabla 5), la mayoría de los valores fueron significativos, a excepción de: (1) las comparaciones de TOP vs. MAT, MAU o NUB; (2) LLANbar vs. LLANpes, ambas localidades pertenecientes a la cuenca tributaria del mismo lago.

Al observar los valores de F_{ST} y el CA, en conjunto, se puede ver que los valores de diferencia no presentan un patrón de geográfico claro (Fig. 5). Se observa que localidades muy lejanas geográficamente pueden presentar valores de F_{ST} muy bajos y que localidades dentro de una misma cuenca presentan valores de F_{ST} relativamente altos. En el caso de las localidades de las cuencas tributarias de los Lagos LLAN y TLS, estas presentaron valores bajos de F_{ST} dentro del sistema de cada lago pero valores de F_{ST} muy altos entre lagos a pesar de la cercanía entre ambos. Por otro lado, las localidades LLAN presentaron valores de F_{ST} bajos con localidades de la zona centro e incluso presentan valores de F_{ST} bajos con la localidad de CAQ de la Zona Norte.

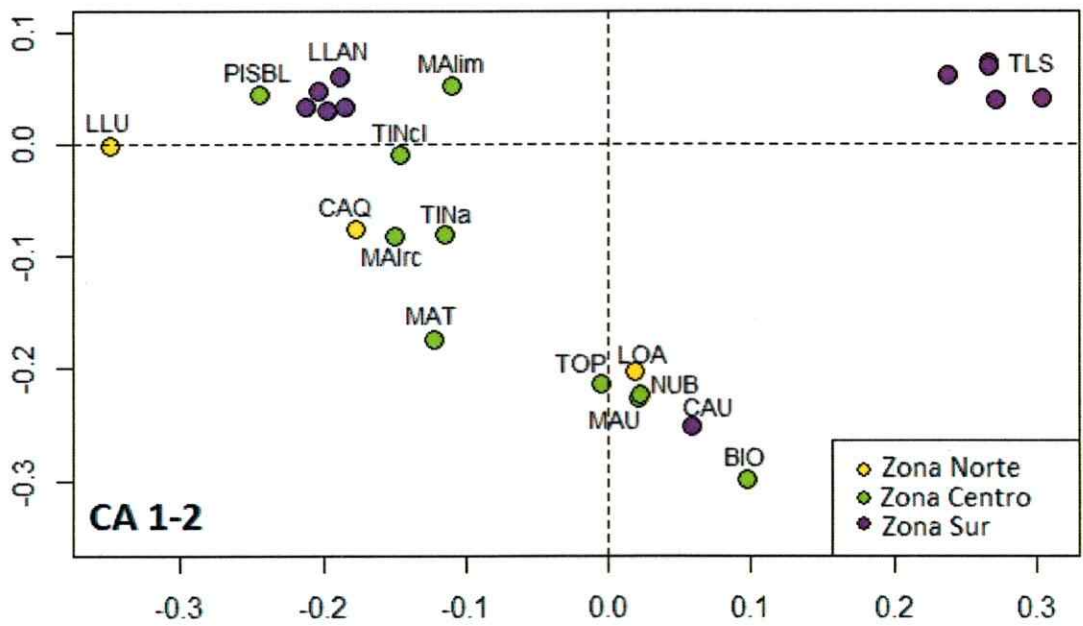


Fig. 5: Análisis de correspondencias (CA) para todas las localidades de las tres zonas.

Graficados PC 1 vs PC 2.

Tabla 5: Tabla de F_{ST} pareado entre todas las localidades. Bajo la diagonal valores de F_{ST} y sobre la diagonal valores de significancia para cada comparación.

Localidad	LLU	CAQ	LOA	PISBL	MAIrc	MAIim	TOP	TINcl	TINa	MAT	MAU	NUB
LLU	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CAQ	0,332	-	<0,001	0,014	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LOA	0,461	0,124	-	0,005	<0,001	<0,001	0,049	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
PISBL	0,370	0,062	0,159	-	0,003	<0,001	0,020	0,021	0,033	0,014	<0,001	<0,001
MAIrc	0,434	0,131	0,188	0,117	-	<0,001	<0,001	0,024	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MAIim	0,374	0,128	0,149	0,106	0,076	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TOP	0,458	0,103	0,042	0,115	0,124	0,097	-	<0,001	<0,001	0,128	0,267	0,885
TINcl	0,500	0,160	0,170	0,081	0,068	0,099	0,144	-	0,021	<0,001	<0,001	<0,001
TINa	0,454	0,098	0,110	0,074	0,089	0,072	0,082	0,054	-	<0,001	<0,001	<0,001
MAT	0,429	0,113	0,167	0,128	0,165	0,141	0,037	0,168	0,120	<0,001	<0,001	<0,001
MAU	0,356	0,101	0,051	0,137	0,169	0,142	0,011	0,177	0,094	-	<0,001	<0,001
NUB	0,380	0,107	0,038	0,143	0,176	0,133	-0,025	0,172	0,108	0,122	-	<0,001
BIO	0,446	0,210	0,192	0,220	0,238	0,193	0,142	0,274	0,180	0,141	0,029	-
CAU	0,368	0,131	0,080	0,179	0,175	0,156	0,070	0,219	0,142	0,244	0,103	0,126
LLANpes	0,286	0,067	0,070	0,098	0,108	0,083	0,041	0,115	0,071	0,158	0,066	0,064
LLANtep	0,283	0,089	0,081	0,097	0,122	0,076	0,039	0,126	0,077	0,111	0,070	0,066
LLANbla	0,280	0,085	0,072	0,104	0,129	0,083	0,034	0,134	0,071	0,113	0,071	0,074
LLANyer	0,277	0,071	0,095	0,050	0,096	0,067	0,049	0,095	0,066	0,079	0,080	0,068
LLANbar	0,271	0,059	0,079	0,079	0,104	0,067	0,039	0,104	0,050	0,105	0,066	0,076
TLSleo	0,414	0,173	0,141	0,193	0,213	0,161	0,124	0,232	0,183	0,208	0,066	0,066
TLScach	0,413	0,176	0,144	0,204	0,225	0,152	0,135	0,230	0,184	0,229	0,107	0,123
TLSesc	0,405	0,170	0,136	0,190	0,222	0,144	0,112	0,230	0,174	0,209	0,117	0,123
TLScay	0,436	0,177	0,152	0,199	0,228	0,164	0,135	0,230	0,180	0,219	0,100	0,107
TLSpeu	0,410	0,157	0,144	0,195	0,219	0,149	0,129	0,234	0,171	0,218	0,128	0,117

Valores en negrita, no significativos ($p>0,05$)

Localidad	BIO	CAU	LLANpes	LLANtep	LLANbla	LLANyer	LLANbar	TLsleo	TLscach	TLsesc	TLscay	TLspeu
LLU	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CAQ	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LOA	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
PISBL	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MAIrc	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MAIim	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TOP	0,008	0,003	0,017	0,012	0,023	0,008	0,016	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TINcl	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TINa	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MAT	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MAU	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
NUB	0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
BIO	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CAU	0,136	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LLANpes	0,164	0,102	-	0,002	0,042	<0,001	0,052	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LLANtep	0,151	0,105	0,005	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LLANbla	0,149	0,100	0,003	0,007	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LLANyer	0,147	0,113	0,028	0,030	0,029	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
LLANbar	0,148	0,106	0,004	0,007	0,007	0,018	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TLsleo	0,172	0,124	0,134	0,125	0,127	0,132	0,131	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TLscach	0,172	0,130	0,130	0,119	0,122	0,134	0,130	0,017	-	0,001	<0,001	0,007
TLsesc	0,165	0,126	0,115	0,103	0,106	0,118	0,114	0,017	0,007	-	<0,001	<0,001
TLscay	0,199	0,131	0,145	0,139	0,143	0,140	0,144	0,030	0,022	0,028	-	0,034
TLspeu	0,179	0,128	0,125	0,116	0,121	0,130	0,123	0,017	0,007	0,010	0,011	-

Valores en negrita, no significativos (p>0,05)

El DAPC realizado determinó que el número óptimo de clústers genéticos es $K=8$ (Fig. 6). Se observó que en el DA 1, el cual explica el mayor porcentaje de las diferencias entre clústers, separa dos grupos de clústers; uno que agrupa a los clústers 1 y 2, los cuales contienen casi exclusivamente individuos colectados en la cuenca tributaria del Lago TLS; y un grupo que contiene a los clústers 4, 5, 6 y 7. Los individuos colectados desde PISBL y las cuencas del MAI, TIN y LLAN pertenecen a los clústers 4 y 6, siendo el clúster 4, el clúster que agrupa individuos del mayor número de localidades. Los individuos pertenecientes al clúster 5 fueron colectados principalmente en LLAN y una muestra de TIN. El clúster 7, el cual se separa claramente en el DA 3, presentó individuos provenientes de la cuenca de LLU en su totalidad. Los clústers 3 y 8 se separan del resto en el DA 2; el clúster 3 agrupa casi exclusivamente muestras de BIO, siendo el que más se separa del resto en este eje. El clúster 8 incluye todos los individuos de LOA e individuos muestreados en CAQ, TOP, MAT, MAU, NUB, CAU, BIO y algunos individuos de TLS. Es importante indicar que sólo se logró tipificar cuatro individuos desde la localidad MAT, cada uno asignado a un clúster genético (Fig. 6; Fig. 7).

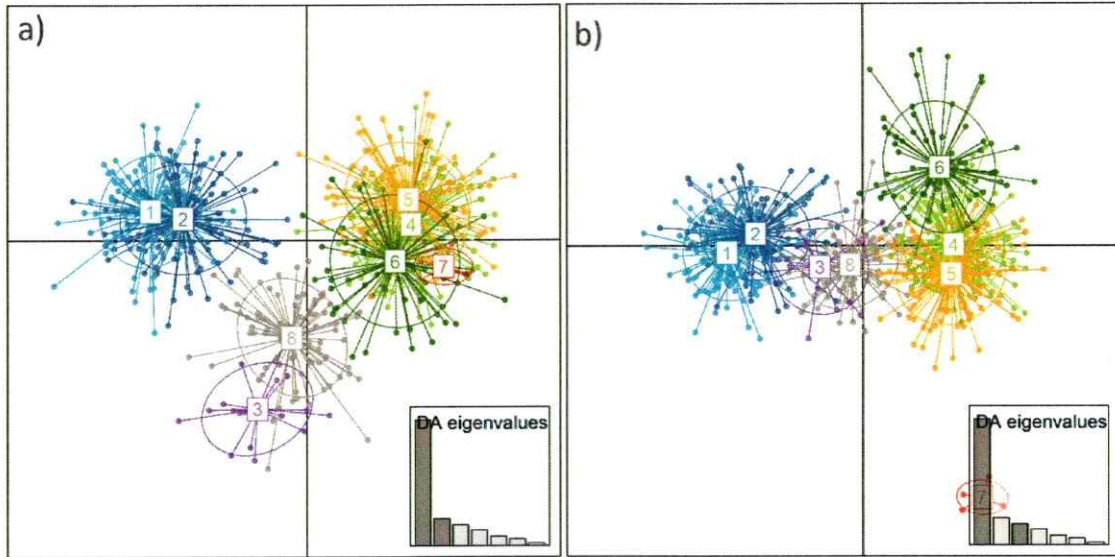


Fig. 6: DAPC realizado con ocho clústers encontrados. a) Gráfico DA 1 vs DA 2, b) Gráfico DA 1 vs DA 3.

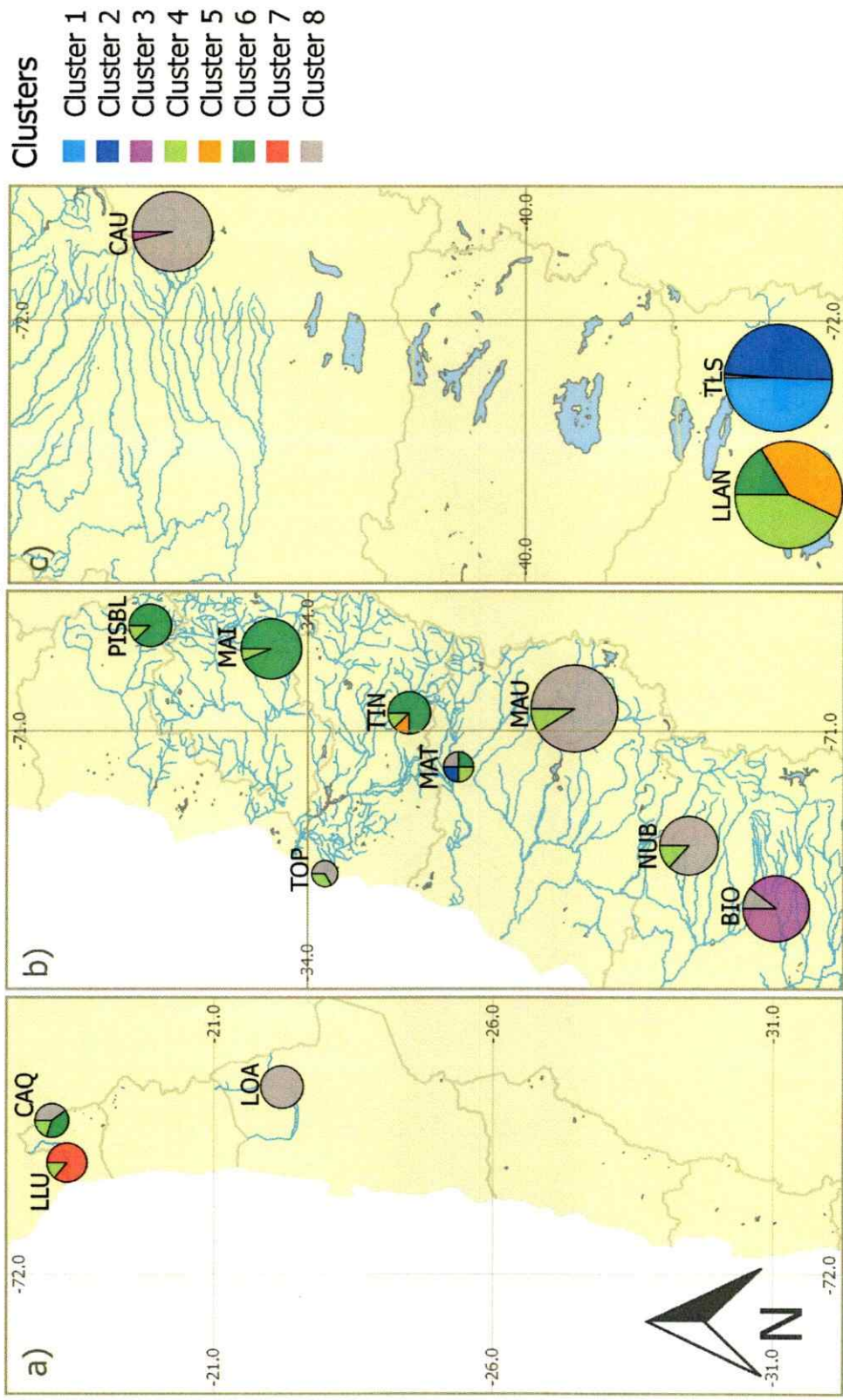


Fig. 7: Mapa con la proporción de individuos asignados a cada clúster del DAPC, por localidad. Tamaño del círculo es proporcional a tamaño muestral por localidad.

DISCUSIÓN

Tanto los resultados de los análisis de secuencias de mtDNA como los obtenidos de los análisis de SNPs no permiten rechazar las hipótesis planteadas. En el caso del mtDNA se encontraron cinco haplotipos, uno de estos solo presente en los ríos altiplánicos de la Zona Norte; mientras que los análisis de SNPs muestran que la diversidad y la estructura genética de la especie están más influenciadas por la presencia de pisciculturas comerciales y movimientos antrópicos, que por un patrón geográfico claro. Los ríos de Chile han sido repoblados constantemente con distintas cepas de trucha arcoíris, por lo que se esperaba que la mezcla constante de individuos impidiera la generación de estructura genética entre las distintas cuencas. A pesar de esto, se encontró cierto grado de estructuración espacial dado por diferencias en haplotipos y en frecuencia de los alelos de SNPs a lo largo de Chile.

Origen de poblaciones introducidas:

De los cinco haplotipos encontrados en Chile los más comunes fueron los haplotipos MYS01 y MYS03. El haplotipo MYS01 además de ser el más común en Chile, es el más frecuente en el rango nativo de la especie, siendo común en los ríos de la costa Pacífica de Estados Unidos y Canadá, presente también en algunas localidades de Rusia (Graziano et al. 2005; Brunelli et al. 2010). Mientras que el haplotipo MYS03, se encuentra en el



rango nativo desde Alaska hasta California (Graziano et al. 2005; Brunelli et al. 2010), aunque parece solo ser común en California, donde es el haplotipo más frecuente en el centro del estado y es muy común en el sur de este (Nielsen 1999). Ambos haplotipos fueron los predominantes en las poblaciones asilvestradas en Europa (Stanković et al. 2016), patrón que también se encontró en la población de trucha arcoíris introducida en el Río Santa Cruz en la Patagonia argentina (Riva Rossi et al. 2004). Los haplotipos MYS01 y MYS03 son los más comunes en las pisciculturas de California, incluyendo a la Baird Station, piscicultura de donde vienen las cepas de las primeras truchas introducidas en Europa (MacCrimmon 1971; Nielsen 1996; Stankovic et al. 2015, 2016), cepas a partir de las cuales se comenzó a sembrar los ríos de Chile (Basulto 2003), lo que explicaría la predominancia de ambos haplotipos tanto en las poblaciones europeas como chilenas.

Los haplotipos MYS01G y MYS10, raros en Chile, son poco comunes en el rango nativo, encontrándose en Brunelli et al. (2010) casi exclusivamente en pisciculturas de Estados Unidos. Aun así, son comunes en las poblaciones de trucha europeas (Stankovic et al. 2016). En Chile, dichos haplotipos solo se encontraron en localidades influenciadas por la piscicultura lo que podría deberse a introducciones posteriores con fines comerciales, de investigación y/o repoblamiento (Consuegra et al. 2011; Cárcamo et al. 2015).

Las primeras truchas sembradas en los ríos del altiplano chileno provienen de una piscicultura peruana, cuyos peces, a diferencia de las pisciculturas chilenas, no provienen

de pisciculturas europeas sino que de Estados Unidos (Loubens 1991; Vila et al. 2007). Esto explicaría la presencia del haplotipo MYS12 solo en estos ríos, ya que dicho haplotipo, no fue encontrado en Europa (Stankovic et al. 2016). El origen del haplotipo MYS12 es un linaje costero presente en el estado de British Columbia en Canadá y en Alaska en Estados Unidos (Nielsen 1999; Brunelli et al. 2010).

Saber el origen de las truchas arcoíris asilvestradas en Chile es el primer paso para comparar las poblaciones asilvestradas en el país con las poblaciones del rango nativo (Dlugosch & Parker 2008; Stankovic et al. 2016). Existen estudios en otros países donde se ha introducido la especie, que han encontrado que poblaciones europeas presentan una diversidad genética similar a la presente en el rango nativo (Gross et al. 2007). Otro estudio realizado en Australia muestra que la diversidad genética de las truchas asilvestradas en el país ha disminuido en relación al rango nativo (Ward et al. 2003); estas diferencias parecen deberse al mayor esfuerzo de repoblamiento en los países europeos donde además ha habido hibridación de individuos de más orígenes geográficos (Gross et al. 2007; Stankovic et al. 2016) como parece ser el caso de Chile.

Influencia de pisciculturas en diversidad genética en SNPs:

Se encontró mayor diversidad genética en las muestras obtenidas de piscicultura (PISBL) y en localidades donde hay pisciculturas comerciales a gran escala (LLAN). Múltiples

introducciones de una especie aumentan la diversidad genética de las poblaciones asilvestradas de esta (Roman & Darling 2007; Dlugosch & Parker 2008), el aumento es más drástico si las introducciones son a partir de individuos de orígenes geográficos distintos (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Rius & Darling 2014).

Las pisciculturas chilenas, tanto comerciales como las usadas para estudio y repoblamiento, como la de Río Blanco, importan cepas desde varios países, siendo incierto el origen de las cepas en el rango nativo (Monzón-Argüello et al. 2014; Cárcamo et al. 2015). Esto fue corroborado por los datos obtenidos de las secuencias de mtDNA, donde se encontró haplotipos que parecen ser exclusivos de piscicultura en PISBL y LLAN, y donde la cuenca tributaria de LLAN es la cuenca que presenta más haplotipos de origen ($n = 4$). Una alta diversidad genética suele ser la marca de múltiples introducciones e hibridación entre linajes (Ellstrand & Schierenbeck 2000), la mezcla de distintos linajes dentro de las pisciculturas así como la hibridación de peces fugitivos con truchas asilvestradas, introducidas para la pesca recreativa, estaría aumentando la diversidad genética en las localidades donde hay centros de cultivo a gran escala (Arismendi et al. 2009; Consuegra et al. 2011). Por otro lado, los bajos valores en los estimadores de diversidad genética en las localidades de LLU y TOP, podrían deberse a los bajos tamaños muestrales en ambas localidades.

A pesar de que existen pisciculturas en otras de las cuencas estudiadas (Basulto 2003; Diario El Llanquihue 2004), es posible que al ser instalaciones a menor escala, no haya un número tan masivo de individuos fugitivos y no afecten en tal magnitud la diversidad genética de las poblaciones asilvestradas.

Las cuencas estudiadas presentan valores muy distintos de diversidad genética, a pesar de esto, todas presentan poblaciones de trucha arcoíris, muchas especies invasoras logran sobreponerse a cuellos de botella y expandirse en el rango introducido (Novak & Mack 2005; Ayres et al. 2010). Estudios que analicen como el aumento de la diversidad genética de la especie puede afectar el fitness de esta en las cuencas del país, ayudarían a determinar si el aumento de la diversidad genética y la hibridación de individuos de diversos orígenes contribuyen al potencial invasor de la trucha arcoíris (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Kolbe et al. 2004; Verhoeven et al. 2011; Monzón-Argüello et al. 2014). Por otra parte, la adaptación local es de vital importancia para los salmónidos en su rango nativo (Fraser et al. 2011), así la generación de genotipos híbridos podría eliminar adaptaciones locales beneficiosas para las poblaciones asilvestradas disminuyendo el fitness en el rango introducido. Los estudios de la diversidad genética neutral suelen tomarse como un proxy a la diversidad adaptativa, pero faltan estudios que efectivamente se centren en genes con potencial adaptativo en la especie en el rango introducido (Dlugosch et al. 2015).

Estructura poblacional: Ríos altiplánicos

La localidad de LLU presenta los valores más bajos de diversidad genética en este estudio, lo que podría ser evidencia de un cuello de botella muy marcado sucedido al ser introducida la trucha en la cuenca, donde posiblemente no ha habido repoblamiento recientes. Los individuos de LLU se diferenciaron incluso de los de CAQ, a pesar de ser localidades cercanas geográficamente, con una historia de invasión supuestamente similar (Loubens 1991; Vila et al. 2007) y compartir la presencia del haplotipo MYS12. Nuestros datos sugieren que los individuos de CAQ tienen una mayor relación con la Zona Centro de Chile.

Estructura poblacional: Cuenca tributaria del Lago Todos los Santos

La cuenca tributaria del Lago TLS a diferencia del resto de las localidades estudiadas, está aislada dentro de un área protegida por el estado, Parque nacional Vicente Pérez Rosales, donde los repoblamientos con salmónidos son ilegales, y no tiene contacto con otros ríos de la Zona Sur por lo que las truchas presentes en el lago no están influenciadas por los escapes desde centros de cultivo ni por repoblamientos recientes (Arismendi et al. 2009). Las truchas de TLS fueron sembradas por pescadores deportivos y pobladores locales desde otras cuencas, hace varios tiempos generacionales para la especie (Basulto 2003), por lo que, las truchas de estas localidades pueden haber sufrido una disminución

de su diversidad genética y un cambio azaroso de sus frecuencias génicas debido a un efecto fundador y posterior deriva génica, varias generaciones; siendo posible también que las cepas que se usaron en la siembra y repoblamiento hayan sido diferentes a los usados en la actualidad en otras localidades.

Estructura poblacional: Río Biobío

BIO se diferencia del resto de las localidades con la excepción de CAU. Los individuos de BIO podrían pertenecer a una cepa de trucha arcoíris distinta a las encontradas en otras localidades. Considerando la cercanía geográfica y genética de BIO con CAU, podría ser una cepa proveniente de la Piscicultura de Lautaro, pudiendo ser las diferencias con otras localidades efecto de siembras anteriores sin repoblamiento recientes.

Estructura poblacional: Localidades que no presentan estructura poblacional con un patrón geográfico claro

Los salmónidos generan estructura poblacional en pocas generaciones (Hendry et al. 2000), dicha estructura suele presentar un patrón de aislamiento por distancia. No encontrar este patrón en Chile, se explicaría por causas antrópicas (Pearse et al. 2011), como el movimiento de individuos entre cuencas y las siembras y repoblamiento con cepas de distintos orígenes.

Los resultados muestran que el resto de las localidades estudiadas se agrupan en dos grupos; uno agrupa las localidades de PISBL y LLAN con localidades de la Zona Centro y CAQ; y otro grupo que agrupa a CAU con el resto de las localidades de la Zona Centro y LOA.

El primer grupo de localidades mencionado incluye las muestras obtenidas de la Piscicultura de Río Blanco (PISBL). Actualmente, PISBL usa cepas comerciales (Cárcamo et al. 2015), lo que explicaría la similitud entre PISBL y LLAN. Por otro lado, las semejanzas entre PISBL y el resto de las localidades del grupo, podrían deberse a que los repoblamientos en estas localidades sean a partir de cepas que actualmente se cultivan en PISBL, habiendo repoblamientos recientes, no documentados oficialmente en las cuencas estudiadas (Calderón Flores 2010).

El otro grupo de localidades mencionadas incluye a la localidad de CAU, correspondiente a una localidad del Río Cautín, donde se encuentra la Piscicultura de Lautaro (Basulto 2003); siendo esta piscicultura el posible origen de cepas con las que se realizaron siembras y repoblamientos, tanto históricos como contemporáneos, en el resto de las localidades de este grupo. La falta de diferencias significativas entre TOP vs. MAT, MAU o NUB, presentes en este grupo, podría ser efecto del pequeño tamaño muestral en TOP (n=3).

Posible utilidad de herramientas moleculares en el manejo de la trucha arcoíris en Chile:

A pesar de los impactos de la trucha arcoíris en los ecosistemas nativos, la erradicación de la especie no es prioridad en Chile, habiendo aún repoblamiento tanto oficiales como no documentados por fuentes oficiales (Arismendi & Nahuelhual 2007; Calderón Flores 2010; Habit et al. 2014). Idealmente, se debería buscar equilibrar la conservación de los ecosistemas nativos con los beneficios económicos de la pesca recreativa y la salmicultura. Sería importante manejar mejor las poblaciones actuales de la especie, regularizando y documentando los repoblamiento que se realizan a lo largo del país. Además de intentar la erradicación de la especie en cuencas de importancia para la conservación, como se está haciendo en el Lago Chungará (Habit et al. 2014). Estudios que caractericen las poblaciones de trucha arcoíris tanto ecológica como genéticamente podrían ayudar a generar planes de manejo efectivos, particularmente estimar la diversidad genética y estructura poblacional puede servir para definir unidades de manejo de la especie (Lecis et al. 2008; Reusch et al. 2010) y servir como línea de base para determinar el estado de las poblaciones invasoras antes de iniciar planes de control o erradicación (Fraser et al. 2013). Además, una línea de base genética de las cepas cultivadas tanto en pisciculturas comerciales como de repoblamiento ayudaría a fiscalizar los repoblamiento ilegales y los escapes de peces desde las pisciculturas comerciales, estrategias como esta se han implementado con éxito en Noruega donde la trucha arcoíris también es cultivada masivamente con fines comerciales (Glover 2010).

CONCLUSIONES

La invasión de la trucha arcoíris en Chile ha sido un proceso con una historia compleja. En este trabajo se pudo determinar que la estructura genética no es homogénea, donde las distintas cepas con que se han poblado los ríos de Chile provienen de más de un origen en el rango nativo de la especie. Un claro patrón es la presencia de truchas provenientes de los estados de British Columbia en Canadá y Alaska en Estados Unidos en los ríos altiplánicos y no de pisciculturas europeas como es el caso de las truchas del Centro y Sur del país. Los análisis realizados con SNPs reflejan cómo los múltiples orígenes, presencia de pisciculturas a gran escala y movimientos antrópicos estarían moldeando la diversidad genética y estructura poblacional en las cuencas estudiadas; observándose que las localidades influenciadas por pisciculturas presentan mayores valores de diversidad y que la estructura poblacional en las zonas Centro y Sur no presenta un patrón geográfico claro.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadía-Cardoso, A., Anderson, E.C., Pearse, D.E., Garza, C.J. (2013) Large-scale parentage analysis reveals reproductive patterns and heritability of spawn timing in a hatchery population of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology* 22(18): 4733–4746.
- Aljanabi, S.M. y Martínez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22): 4692–4693.
- Amigo, J. y Ramírez, C. (1998) A bioclimatic classification of Chile: woodland communities in the temperate zone. *Plant Ecology*. 136: 9-26.
- Arismendi, I., González, J., Soto, D., Penaluna, B. (2012) Piscivory and diet overlap between two non-native fishes in southern Chilean streams: Trout diets in Chilean streams. *Austral Ecology* 37(3): 346–354.
- Arismendi, I. y Nahuelhual, L. (2007) Non-native Salmon and Trout Recreational Fishing in Lake Llanquihue, Southern Chile: Economic Benefits and Management Implications. *Reviews in Fisheries Science* 15(4): 311–325.
- Arismendi, I., Soto, D., Penaluna, B., Jara, C., Leal, C., León-Muñoz, J. (2009) Aquaculture, non-native salmonid invasions and associated declines of native fishes in Northern Patagonian lakes. *Freshwater Biology* 54(5): 1135–1147.

- Ayres, R.M., Pettigrove, V.J., Hoffmann, A.A. (2010) Low diversity and high levels of population genetic structuring in introduced eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) in the greater Melbourne area, Australia. *Biological Invasions* 12(11): 3727–3744.
- Basulto, S. (2003) *El largo viaje de los salmones: Una crónica olvidada, propagación y cultivo de especies acuáticas en Chile*, Santiago, Chile: Maval Limitadas Editores.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Catch, F. (2004) GENETIX 4.05, software under Windows™ for the genetics of populations, *University of Montpellier. Montpellier, France*.
- Benavente, J.N., Seeb, L.W., Seeb, J.E., Arismendi, I., Hernández, C.E., Gajardo, G., Galleguillos R., Cádiz, M.I., Musleh, S.S., Gomez-Uchida, D. (2015) Temporal Genetic Variance and Propagule - Driven Genetic Structure Characterize Naturalized Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from a Patagonian Lake Impacted by Trout Farming. *PLOS ONE* 10(11): e0142040.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2013) GenBank. *Nucleic acids research* 41(D1): D36–D42.
- Brunelli, J.P., Steele, C.A., Thorgaard, G.H. (2010) Deep divergence and apparent sex-biased dispersal revealed by a Y-linked marker in rainbow trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56(3): 983–990.
- Brunelli, J.P., Thorgaard, G.H., Leary, R.F., Dunnigan, J. L. (2008) Single-nucleotide

polymorphisms associated with allozyme differences between inland and coastal rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 137(5): 1292-1298.

Calderón Flores, H. (2010) Historias de un huaso arriero: Siembra de alevines de truchas. *Versión electrónica de la Revista Dedal de Oro* (54), Retrieved from http://www.dedaldeoro.cl/ed54-40-41_huaso-arriero.html

Cárcamo, C.B., Diaz, N.F., Winkler, F.M. (2015) Genetic diversity in Chilean populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(1): 59–70.

Consuegra, S., Phillips, N., Gajardo, G., de Leaniz, C.G. (2011) Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout: Winning the invasion roulette. *Evolutionary Applications* 4(5): 660–671.

Crawford, S.S. y Muir, A.M. (2008) Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18(3): 313–344.

Croxton, M.D., Andreu, M.A., Williams, D.A., Overholt, W.A., Smith, J.A. (2011) Geographic Origins and Genetic Diversity of Air-Potato (*Dioscorea bulbifera*) in Florida. *Invasive Plant Science and Management* 4(1): 22–30.

DGA (1989) *Gestión de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Jose* (Informe final). Santiago, Chile: Dirección General de Aguas.

DGA (2004a) *Cuenca Río Loa* (Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad). Dirección General de Aguas.

DGA (2004b) *Cuenca del Río Maullín* (Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad). Chile: Dirección General de Aguas.

DGA (2004c) *Cuenca del Río Imperial* (Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad). Chile: Dirección General de Aguas.

Diario El Llanquihue (2004) Lista de Pisciculturas en operación. *Salmonicultura: El pulso de la industria mes a mes*, Diario online, Retrieved from <http://www,diariollanquihue,cl/site/apg/salmonicultura/pags/20040802194013,html>

Dlugosch, K.M., Anderson, S.R., Braasch, J., Cang, F.A., Gillette, H.D. (2015). The devil is in the details: genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Molecular Ecology* 24(9): 2095–2111.

Dlugosch, K.M. y Parker, I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17(1): 431–449.

Ellstrand, N.C. y Schierenbeck, K.A. (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13): 7043–7050.

Facon, B., Pointier, J.P., Jarne, P., Sarda, V., David, P. (2008) High Genetic Variance in Life-History Strategies within Invasive Populations by Way of Multiple Introductions. *Current Biology* 18(5): 363–367.

Figueroa, R., Ruiz, V.H., Berrios, P., Palma, A., Villegas, P., Andreu-Soler, A (2010) Trophic ecology of native and introduced fish species from the Chillán River, South-Central Chile. *Journal of Applied Ichthyology* 26(1): 78–83.

Foll, M, (2012), BayeScan v2, 1 user manual, *Ecology* 20: 1450–1462,

Frankham, R. (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126(2): 131–140.

Fraser, D.J., Weir, L.K., Bernatchez, L., Hansen, M.M., Taylor, E.B. (2011) Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: review and meta-analysis. *Heredity* 106(3): 404–420.

Fraser, E.J., Macdonald, D.W., Oliver, M.K., Piernney, S., Lambin, X. (2013) Using population genetic structure of an invasive mammal to target control efforts – An example of the American mink in Scotland. *Biological Conservation* 167: 35–42.

García-Berthou, E. (2007) The characteristics of invasive fishes: What has been learned so far?. *The Fisheries Society of the British Isles* (71): 33–55.

Gaskin, J.F., Zhang, D.Y., Bon, M.C. (2005) Invasion of *Lepidium draba* (Brassicaceae) in the western United States: distributions and origins of chloroplast DNA haplotypes.

Molecular Ecology 14(8): 2331–2341.

Glover, K. (2010) Forensic identification of fish farm escapees: the Norwegian experience. *Aquaculture Environment Interactions* 1: 1–10.

Gomez-Uchida, D., Seeb, J.E., Smith, M.J., Habicht, C., Quinn, T.P., Seeb, L.W. (2011) Single nucleotide polymorphisms unravel hierarchical divergence and signatures of selection among Alaskan sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) populations. *BMC Evolutionary Biology* 11(1): 1.

Goudet, J. (2001) *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*.

Gozlan, R.E. (2008) Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad?. *Fish and Fisheries* 9(1): 106–115.

Gozlan, R.E., Britton, J.R., Cowx, I., Copp, G.H. (2010) Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology* 76(4): 751–786.

Graziano, S.L., Brown, K.H., Nielsen, J.L. (2005) Nomenclature of Mitochondrial DNA Haplotypes for *Oncorhynchus mykiss*. *Transactions of the American Fisheries Society* 134(5): 1271–1273.

Gross, R., Lulla, P., Paaver, T. (2007) Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. *Aquaculture* 272:

S139–S146.

Habit, E., González, J., Ortiz-Sandoval, J., Elgueta, A., Sobenes, C. (2014) Effects of salmonid invasion in rivers and lakes of Chile. *Ecosistemas* 24(1): 43–51.

Habit, E., Piedra, P., Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Belk, M.C., Cussac, V.E., Gonzalez, J., Colin, N. (2010) Changes in the distribution of native fishes in response to introduced species and other anthropogenic effects: Distribution patterns of native fish in Chile. *Global Ecology and Biogeography* 19: 697–710.

Hale, M.C., Thrower, F.P., Berntson, E.A., Miller, M.R., Nichols, K.M. (2013) Evaluating adaptive divergence between migratory and nonmigratory ecotypes of a salmonid fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Genes/Genomes/Genetics* 3(8): 1273–1285.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41).

Harrison, R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4(1): 6–11.

Hecht, B.C., Campbell, N.R., Holecek, D.E., Narum, S.R. (2013) Genome-wide association reveals genetic basis for the propensity to migrate in wild populations of rainbow and steelhead trout. *Molecular Ecology* 22(11): 3061–3076.

Hendry, A.P., Wenburg, J.K., Bentzen, P., Volk, E.C., Quinn, T.P. (2000) Rapid Evolution of

Reproductive Isolation in the Wild: Evidence from Introduced Salmon. *Science* 290(5491): 516–518.

Huey, R.B., Gilchrist, G.W., Hendry, A.P. (2005) Using invasive species to study evolution. *Species invasions: Insights to ecology, evolution and biogeography* 139–164.

Iriarte, J.A., Lobos, G.A., Jaksic, F.M. (2005) Invasive vertebrate species in Chile and their control and monitoring by governmental agencies. *Revista Chilena de Historia Natural* 78(1): 143–154.

Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11): 1403–1405.

Jombart, T. y Collins, C. (2015) *A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0*. Retrieved from <http://adegenet.r-forge.r-project.org/files/tutorial-dapc.pdf>

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 11(1): 1.

Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R., Lara, A.C., Larson, A., Losos, J.B. (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431(7005): 177–181.

Lecis, R., Ferrando, A., Ruiz-Olmo, J., Mañas, S., Domingo-Roura, X. (2008) Population genetic structure and distribution of introduced American mink (*Mustela vison*) in Spain, based on microsatellite variation. *Conservation Genetics* 9(5): 1149–1161.

Lee, C.E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* 17(8): 386–391.

Leigh, J. W. y Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110-1116.

León-Muñoz, J., Tecklin, D., Farías, A., Díaz, S. (2007) Salmonicultura en los lagos del sur de Chile-Ecorregión Valdiviana. *Historia, tendencias e impactos mediambientales Sociedad Chilena de Limnología* 40. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.549.8406&rep=rep1&type=pdf>

Limborg, M.T., Blankenship, S.M., Young, S.F., Utter, F.M., Seeb, L.W., Hansen, M.H.H., Seeb, J.E. (2012) Signatures of natural selection among lineages and habitats in *Oncorhynchus mykiss*: Local adaptation in *Oncorhynchus mykiss*. *Ecology and Evolution* 2(1): 1–18.

Loubens, G. (1991) Especies introducidas: *Salmo gairdneri* (trucha arcoíris). *Rev. Hydrobiol. trop.* 22 (2): 157-177.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M. (2004) 100 de las Especies Exóticas

Invasoras más dañinas del mundo. *The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN)*.

Luebert, F. y Pliscoff, P. (2006). Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Editorial Universitaria.

MacCrimmon, H.R. (1971) World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 28(5): 663–704.

Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A. (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological applications* 10(3): 689–710.

Meza, F.J., Wilks, D.S., Gurovich, L., Bambach, N. (2012) Impacts of climate change on irrigated agriculture in the Maipo Basin, Chile: reliability of water rights and changes in the demand for irrigation. *Journal of water resources planning and management* 138(5): 421–430.

Monzón-Argüello, C., Consuegra, S., Gajardo, G., Marco-Rius, F., Fowler, D.M., DeFaveri, J., García de Leaniz, C. (2014) Contrasting patterns of genetic and phenotypic differentiation in two invasive salmonids in the southern hemisphere. *Evolutionary Applications* 7(8): 921–936.

Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K., the SNP workshop group (2004) SNPs in ecology,

evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19(4): 208–216.

Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R. (1975) The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution* 29(1): 1.

Nielsen, J.L. (1996) Using mitochondrial and nuclear DNA to separate hatchery and wild stocks of rainbow trout. In *Aquaculture Biotechnology Symposium Proceedings, International Congress on the Biology of Fishes. San Francisco State University.*

Nielsen, J.L. (1999) The evolutionary history of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) along the US Pacific Coast: developing a conservation strategy using genetic diversity. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 56(4): 449–458.

Nielsen, J.L., Fountain, M.C., Favela, J.C., Cobble, K., Jensen, B.L. (1998) *Oncorhynchus* at the southern extent of their range: a study of mtDNA control-region sequence with special reference to an undescribed subspecies of *O. mykiss* from Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 51(1): 7–23.

Novak, S. y Mack, R. (2005) Genetic bottlenecks in alien plant species: influence of mating systems and introduction dynamics. *Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography* 201–228.

Peakall, R. y Smouse, P. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.

Pearse, D.E., Martinez, E., Garza, J.C. (2011) Disruption of historical patterns of isolation by distance in coastal steelhead. *Conservation Genetics* 12(3): 691–700.

Quinn, T.P. (2011). *The behavior and ecology of Pacific salmon and trout*. UBC press.

R Core Team (2016) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>

Reusch, T.B.H., Bolte, S., Sparwel, M., Moss, A.G., Javidpour, J. (2010) Microsatellites reveal origin and genetic diversity of Eurasian invasions by one of the world's most notorious marine invader, *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora). *Molecular Ecology* 19(13): 2690–2699.

Rius, M. y Darling, J.A. (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations?. *Trends in Ecology & Evolution* 29(4): 233–242.

Riva Rossi, C.M., Lessa, E.P., Pascual, M.A. (2004) The origin of introduced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Santa Cruz River, Patagonia, Argentina, as inferred from mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61(7): 1095–1101.

Roman, J. y Darling, J. (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 22(9): 454–464.

Rousset, F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8(1): 103–106.

Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19(18): 2496–2497.

Sala, O.E. (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287(5459): 1770–1774.

Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics* 5(1): 63–69.

Seeb, J., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S., Seeb, L. (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources* 11(s1): 1–8.

Seeb, J.E., Pascal, C.E., Ramakrishnan, R., Seeb, L.W. (2009) SNP genotyping by the 5'-nuclease reaction: advances in high-throughput genotyping with nonmodel organisms. *Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols* 277–292.

Simon, K.S. y Townsend, C.R. (2003) Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organization, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater biology* 48(6): 982–994.

Soto, D., Arismendi, I., Di Prinzio, C., Jara, F. (2007) Establishment of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Pacific basins of southern South America and its potential ecosystem implications. *Revista Chilena de Historia Natural* 80(1): 81–98.

Soto, D., Arismendi, I., González, J., Sanzana, J., Jara, F., Jara, C., Guzmán E., Lara, A. (2006) Southern Chile, trout and salmon country: Invasion patterns and threats for native species. *Revista Chilena de Historia Natural* 79(1): 97–117.

Stanković, D., Crivelli, A.J., Snoj, A. (2015) Rainbow trout in Europe: Introduction, naturalization, and impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23(1): 39–71.

Stanković, D., Stephens, M.R., Snoj, A. (2016) Origin and introduction history of self-sustaining rainbow trout populations in Europe as inferred from mitochondrial DNA and a Y-linked marker. *Hydrobiologia* 770(1): 129–144.

SUBPESCA (2014) *Informe sectorial de pesca y acuicultura* (Informe sectorial). Chile: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

Thulin, C.G., Simberloff, D., Barun, A., Mccracken, G., Pascal, M., Islam, M.A. (2006) Genetic divergence in the small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*), a widely distributed invasive species: Mongoose genetic divergence. *Molecular Ecology* 15(13): 3947–3956.

Vargas, P.V., Arismendi, I., Gomez-Uchida, D. (2015). Evaluating taxonomic homogenization of freshwater fish assemblages in Chile. *Revista Chilena de Historia*

Natural 88(1): 16.

Verhoeven, K.J., Macel, M., Wolfe, L.M., Biere, A. (2011) Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278(1702): 2–8.

Vila, I., Pardo, R., Scott, S. (2007) Freshwater fishes of the Altiplano. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10(2): 201–211.

Ward, R.D., Jorstad, K.E., Maguire, G.B. (2003) Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia. *Aquaculture* 219(1): 169–179.

Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1358–1370.