

UCH-FC
Biotecnología
M 967
C.I



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE LA DISRUPCIÓN FÍSICA PROVOCADA POR LOS
EMBALSES EN LA ESTRUCTURA GENÉTICO POBLACIONAL DEL
PEJERREY *Basilichthys microlepidotus*. CASO DE ANÁLISIS:
EMBALSE RECOLETA Y CORRALES**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular



PABLO ANDRÉS MUÑOZ ROJAS

Director de Seminario de Título:

Dr. David Véliz B.

Marzo, 2011

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

**EFFECTO DE LA DISRUPCIÓN FÍSICA PROVOCADA POR LOS
EMBALSES EN LA ESTRUCTURA GENÉTICO POBLACIONAL DEL
PEJERREY *Basilichthys microlepidotus*. CASO DE ANÁLISIS:
EMBALSE RECOLETA Y CORRALES**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PABLO ANDRÉS MUÑOZ ROJAS

Dr. David Véliz Baeza
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Elie Poulin
Presidente Comisión

MSc. Irma Vila Pinto
Evaluadora



Santiago de Chile, abril de 2011

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago el 4 de Octubre de 1987. Desde pequeño he vivido siempre en mi querida comuna de Maipú rodeado de un muy grato calor hogareño, cuando niño ingrese 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 en 4° medio el año 2005. El 2006 ingrese a la U. de Chile y finalmente en este presente año 2011 estoy obteniendo mi título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Aún me quedan por delante muchos desafíos, el primero de ellos es realizar el Magister al cual ingrese también este año. Durante estos 23 años de vida agradezco el apoyo incondicional de mi familia que siempre me ha apoyado en todas mis decisiones.

*A todos aquellos que me
ayudaron con su granito de arena a
que este sueño se hiciese realidad*



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradeceré el apoyo incondicional de mi familia, a mis padres les doy gracias por entregarme una de las grandes enseñanzas de mi vida: “Lo único que nosotros podemos entregarte es una educación de calidad”, a mis hermanas, Alejandra , eres como mi segunda mama sin ti nada de esto sería posible, y Tamara gracias por acogerme en tu casa esas innumerables noches y por tus consejos, a mis cuñados, Manuel eres como el hermano mayor que nunca tuve, gracias por orientarme en la vida y Diego gracias por mostrarme lo simple que es la vida cuando uno sabe lo que lo hace realmente feliz, y a mi pequeña sobrina Bárbara, me llenas de energía cada vez que te veo. Junto con ellos debo agradecer la dedicación, paciencia, cariño, afecto y amor de mi polola Rocío, sin duda has sido el pilar fundamental durante los últimos 4 años de mi carrera, aguantándome, apoyándome y aconsejándome, eres la mejor.

Quiero agradecer de forma especial a una persona que ha marcado profundamente mi vida y que desde Abril de 2007 me cuida desde el cielo, a mi tío, Fernando Garrido, sin tus sabios consejos no hubiese sido posible hallar el camino de la vida. Estoy seguro que el día de mi titulación estarás orgulloso que tu sobrino regalón haya cumplido uno de sus grandes objetivos en la vida, ese del que tantas veces hablamos, siempre estás presente en mí.



Agradezco también, a los académicos con los que me he involucrado a lo largo de mi desarrollo profesional, a la profesora Carezza muchas gracias por todo el tiempo dedicado a enseñarme lo importante de ser ordenado, sin duda usted dejó su marca registrada de la palabra responsabilidad en mí. A mi tutor David Véliz, simplemente decir que gracias a él entendí lo que es sentir pasión por lo que uno hace, gracias por enseñarme todas las técnicas moleculares que estoy seguro aprendí del “maestro”. Junto con ellos quiero agradecer a mis revisores, el profesor Elie Poulin y la profesora Irma Vila ya que me ayudaron mucho con sus críticas constructivas en la corrección de esta tesis, realmente les agradezco la buena disposición para sentarse a conversar conmigo las sugerencias al trabajo. También agradezco al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) y al proyecto Fondecyt # 1100341 por financiar mi tesis.

No puedo dejar de mencionar mis agradecimientos hacia las personas que trabajan en el LEM, Angie, Coni, Jime, Fabi, Claudia, Claudio, Karin, Jose, Christian, Marce, Cristóbal, Andrea. Junto con ellos, también agradezco a la gente del laboratorio de Limnología, Claudio, Juan Pablo y Caren, gracias por todos los consejos. En especial agradezco a Caren por toda la dedicación que ha brindado a esta tesis, su apoyo ha sido muy importante para mí.

Por último, agradecer también a mis grandes amigos de la Universidad, Juanma, Mario, Jose, Vale, Pancho, Miguel, Pedro, Chiki, Lore, JP, Juan, Karlita y tantos más. Sin ustedes estos últimos 5 años de vida hubiesen sido muy aburridos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción	1
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	9
4. Materiales y Métodos	10
4.1 Sitio de estudio	10
4.2 Obtención de muestras	11
4.3 Marcadores moleculares utilizados	12
4.4 Amplificación de fragmentos	13
4.5 Visualización de fragmentos	14
4.6 Análisis estadísticos	15
5. Resultados	18
5.1 Estructura Poblacional	21
5.2 Flujo Génico	23
5.3 Estimación de tamaños efectivos poblacionales.....	24
6. Discusión	26
7. Conclusión	33
8. Bibliografía	35
9. Anexos	39



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores microsatélites utilizados en el presente estudio. Se indica además el fluoróforo utilizado, temperatura touchdown de la PCR y el rango de tamaño de los alelos encontrados.

Tabla 2. Resumen del Número de individuos analizados (N), número de alelos (A), Heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O), f_{is} y su respectivo estadígrafo. - = presencia de sólo un alelo. * = desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Cálculo global de EHW se realizó con los microsatélites OD 02, OD 07, OD 09, OD 38 y OD 39.

Tabla 3. Desequilibrio de ligamiento de marcadores microsatélites. * Microsatélites que presentan ligamiento estadísticamente significativo.

Tabla 4. Diferenciación poblacional en los cuatro sitios de estudio utilizando GENETIX. Valores de F_{ST} (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) se muestran para cada interacción de poblaciones. * Representa los valores significativos de F_{ST} .

Tabla 5. Valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada sitio de estudio estimados en el programa LDNe. * Valores indican tamaños efectivos negativos. Se incluye además el intervalo de confianza en cada caso.

Anexo I. Resumen de las frecuencias alélicas encontradas en los sitios de estudio. El análisis se realizó en el programa GENETIX considerando 5 loci polimórficos.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del lugar de muestreo. Embalse Recoleta, Cuarta Región. Chile.

Figura 2. Mapa del lugar de muestreo. Embalse Corrales, Cuarta Región. Chile.

Figura 3. Análisis de asignación poblacional considerando un número de grupos de referencia a construir mediante FLOCK ($k = 2$), y un valor de LLOD = 0.6. Para ambos grupos diferenciados se considera los individuos correctamente asignados (C.A) y los incorrectamente asignados (I.A).

Figura 4. Valores porcentuales representativos de las reasignaciones de todos los individuos realizadas en el programa FLOCK para (a) embalse Recoleta y (b) embalse Corrales. C.A: Individuos correctamente asignados, I.A: Individuos incorrectamente asignados, N.A: individuos no asignados.

Figura 5. Estimación de las tasas de migración entre cada sitio de estudio utilizando el programa BAYESASS. Se realizaron análisis independientes para cada embalse. Se muestran los valores con la respectiva desviación estándar.

RESUMEN

Las represas son consideradas uno de los grandes impactos producidos por el ser humano sobre el medio ambiente debido a que destruyen los circuitos biológicos propios del lugar en que se emplazan amenazando la biodiversidad de los sistemas naturales. En los ecosistemas dulceacuícolas las represas impiden la libre circulación de los peces bloqueando el flujo génico normal incrementando el aislamiento reproductivo entre las poblaciones naturales ubicadas río arriba y río abajo de los embalses. Sin embargo, esto no es una regla general, otros estudios no encuentran diferencias provocadas por los embalses, por lo cual es prioritario el estudio caso a caso en nuestro país.

En el presente trabajo se estudió el posible efecto provocado por los embalses Recoleta y Corrales sobre la estructura genético poblacional del pejerrey *Basilichthys microlepidotus*. En consecuencia, el objetivo principal del trabajo fue determinar el efecto disruptivo sobre la diversidad genética, migración y estructura de las poblaciones de *B. microlepidotus* ubicadas río arriba y río abajo de los embalses Recoleta y Corrales.

Para tal efecto, en el procedimiento experimental se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando partidores microsatélites (altamente recomendado para estudios de genética de poblaciones) descritos primero para especies de pejerreyes del género *Odontesthes*, y amplificado con éxito en nuestro laboratorio en especies del género *Basilichthys*.

Se amplificaron 8 microsatélites, sin embargo 2 no fueron polimórficos y uno posiblemente presenta alelos nulos. Los resultados mostraron que utilizando 5

marcadores microsatélites fue posible diferenciar notoriamente las poblaciones de pejerreyes entre las hoyas hidrográficas del Limarí (Embalse Recoleta) y Choapa (Embalse Corrales) reafirmando el potencial que presentan estos microsatélites para delinear poblaciones de *B. microlepidotus*. A pesar de esto, no fue posible determinar una discontinuidad poblacional dentro de cada cuenca. La mayor evidencia encontrada fue la marcada diferencia en los tamaños efectivos poblacionales al comparar los sitios río arriba y río abajo de cada embalse. Este hecho evidenció que las poblaciones ubicadas río arriba tienen menor diversidad génica atribuible a un menor tamaño poblacional o mayores periodos de cuellos de botella, por lo cual la deriva sobre ellas actúa con mayor fuerza. Junto con esto, análisis de asignación poblacional mostraron una notoria diferenciación poblacional entre los organismos presentes alrededor del embalse Recoleta comparado con los del embalse Corrales. Esto puede asociarse a la migración asimétrica detectada entre los ríos, donde un mayor número de individuos de la cuenca del Choapa es asignado junto con los individuos de la cuenca del Limarí.

Por lo tanto, si bien se obtuvo resultados que evidencian algunos efectos ocasionados por los embalses sobre las poblaciones naturales de *B. microlepidotus*, estos se reflejarían principalmente en el tamaño efectivo de las poblaciones, factor clave en la mantención y persistencia de las poblaciones en el tiempo.

ABSTRACT

Dams are considered one of the major impacts caused by humans on the lotic environments because they would disrupt natural populations. In freshwater ecosystems, dams avoid the free movement of fishes and obstruct natural gene flow by increasing the reproductive isolation between natural populations located upstream and downstream of the dams. However this is not a rule, other studies do not found differences shaped by dams, and then is priority a detailed study case by case in our country.

In this study, the possible effect caused by both Recoleta and Corrales reservoirs on population genetic structure of the riverine silverside *Basilichthys microlepidotus* was studied. Consequently, the main objective was to determine the disruptive effect on genetic diversity, migration and population structure of *B. microlepidotus* located upstream and downstream of both Recoleta and Corrales reservoirs.

In order to determine the dams effect on silverside fish, the polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify microsatellites (highly recommended for population genetics studies). These microsatellite markers used were described for *Odontesthes* silversides and amplified later with successful results in *Basilichthys* silverside in our laboratory.

Eight microsatellites were amplified; two were monomorphic and one deviates from Hardy Weinberg Equilibrium. Therefore, five microsatellites were used for the statistical analyses. Results showed significant differences between fishes located in the Limarí (Recoleta reservoir) and Choapa basin (Corrales reservoir) confirming the

potential of these microsatellites to delineate silverside populations. Despite this, it was not possible to detect statistical differences between upstream and downstream of each basin. Interestingly, differences in effective size of population were observed. Fish populations upstream showed smallest effective size than those located downstream of both reservoirs. This fact could be explained by the smaller population size or larger bottleneck periods in the populations located upstream, thus the effect of the genetic drift will be more evident. Finally, population assignment analysis showed a marked population differentiation in the Recoleta reservoir compared with Corrales that may be associated with asymmetric migration detected from Limarí to Choapa basin.

Overall, results showed some effects caused by dams on natural populations of *B. microlepidotus*, affecting mainly the effective size, a key on the maintenance and persistence of populations in time.

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de agua dulce representan el 0,01% del agua del mundo y aproximadamente el 0,8% de la superficie de la Tierra. A pesar de ello, esta pequeña fracción de agua a nivel mundial sostiene al menos 100.000 especies de un total de aproximadamente 1,8 millones, es decir, cerca del 6% de todas las especies descritas (Dudgeon y col., 2006). Por este motivo, las aguas continentales y la biodiversidad de agua dulce son un valioso recurso natural en términos económicos, culturales, estéticos, científicos y educativos por tanto su conservación y manejo son fundamentales para los intereses de los seres humanos y las naciones. Sin embargo, su gran importancia contrasta con su actual estado de conservación, ya que las especies de agua dulce y sus hábitats se encuentran entre los más amenazados del mundo (Saunders y col., 2002).

En las últimas décadas, la sobreexplotación, presencia de especies exóticas, degradación y fragmentación del hábitat se han transformado en las principales amenazas a la biodiversidad (Myers, 1995; Fahrig, 1997; Sala y col., 2000; Mora y col., 2007). Sumado a esto, los efectos de la actividad humana han reducido los tamaños de las poblaciones naturales, produciendo una disminución de diversidad genética y pérdida de la capacidad de adaptación a nuevos cambios ambientales. La fragmentación del hábitat afectaría la estructura genética de las poblaciones naturales, generando grupos aislados y una alta probabilidad de pérdida de variabilidad dado la deriva génica. El tamaño de las poblaciones y el potencialmente bajo flujo génico entre ellas explica porqué los peces de agua dulce exhiben la más baja variabilidad genética comparado con

peces marinos y anádromos (ver DeWoody & Avise, 2000). Aún con todos estos antecedentes a la vista es poca la importancia que se ha dado a los organismos restringidos a sistemas de agua dulce en comparación con organismos terrestres.

Actualmente se reconoce que existe una gran cantidad de ríos que han sufrido de fragmentación por instalación de represas que limitan la libre circulación de organismos en corredores fluviales (Dynesius & Nilsson, 1994; Nilsson y col., 2005), y desconectan las redes vitales interactivas en las cuencas de los ríos (McCully, 2001). Una de las estadísticas alarmantes de los impactos de las represas a nivel mundial, mencionado por la Comisión Mundial de Represas muestra que el 60% de los grandes ríos del mundo se encuentra mediana o altamente fragmentado por represas (Revengea y col., 2000). Además, es sabido que en todo el mundo los embalses tienen una capacidad global de almacenamiento del orden de los 6.000 km³, lo cual corresponde a más del triple del volumen de agua de todos los ríos del planeta (B.F Chao, 1995).

Otros datos muestran que cerca de cuatro quintos de la descarga total de los mayores ríos de Estados Unidos, Canadá, Europa y Rusia se encuentran fuerte o al menos moderadamente afectados por la regulación del flujo, derivaciones y fragmentación de los canales de los ríos por instalación de represas (Dynesius & Nilsson, 1994). Debido a lo anterior y a gran cantidad de información que se ha generado a partir de diversos estudios con respecto al impacto de embalses, se ha concluido que los embalses tienden a fragmentar el ecosistema, aislando grupos de

organismos que viven río arriba y abajo de las represas, interrumpiendo migraciones y otros movimientos propios de las especies.

El establecimiento de las represas no produce sólo la fragmentación sino además la degradación del hábitat, lo que genera nuevas presiones selectivas sobre los organismos del sistema afectando su diversidad genética. Dado que ocurre una reducción en el tamaño de la población, la degradación limita la capacidad para adaptarse a este hábitat y a nuevos regímenes selectivos (Stockwell y col., 2003). En efecto, se sabe que los embalses son los principales culpables de que la quinta parte de los peces de agua dulce del planeta hoy se encuentren en categoría de amenazados o extinguidos. Por lo tanto, sin duda alguna la fragmentación de los ecosistemas hídricos ha conducido a la masiva reducción del número de especies en las cuencas de los ríos de todo el planeta. (McCully, 2001).

Considerando los aspectos expuestos, podemos ordenar los principales impactos de las represas bajo dos categorías. La primera de ellas guarda relación con la construcción del embalse, en este caso los daños más evidentes son cambios en el río aguas arriba de la represa como por ejemplo alteraciones en la morfología del lecho, la ribera, el delta, el estuario y la costa aguas abajo debido a la carga alterada del sedimento; corriente abajo ocurren cambios en la temperatura del río, la carga de nutrientes, la turbidez, los gases disueltos, y la concentración de metales pesados y minerales, y por último, ocurre también reducción de la biodiversidad debido al bloqueo del movimiento de especies.

La segunda categoría se basa en el modo de operación particular que presenta cada represa según el diseño de funcionamiento implementado en cada caso. Con respecto a esto, podemos mencionar la ocurrencia de alteraciones en la hidrología aguas abajo como cambios en el ritmo estacional del caudal, fluctuaciones a corto plazo de los caudales, alteración en los extremos de los caudales mínimos y máximos, cambios en la morfología del río y fluctuaciones en la calidad del agua provocados por los patrones alterados del caudal, reducción de la diversidad ribereña, costera y de la llanura aluvial principalmente debido a la eliminación de las crecidas. (McCully, 2001).

Sin embargo, los embalses no se construyen con la finalidad de no afectar el curso natural de los sistemas vivos en que se involucran, sino más bien, se construyen como una opción valiosa y de gran viabilidad económica para aprovechar los recursos hídricos de nuestro país logrando un incremento en la generación energética o un aumento en la capacidad de irrigar suelos lo cual es fundamental para mantener una tasa de crecimiento que se condice con nuestras políticas de desarrollo económico. Por lo tanto, debido a los requerimientos propios de una nación en vías de desarrollo, se han construido estos reservorios de agua principalmente para fines de riego y generación de electricidad.

Pero debido al impacto que produce la construcción y posterior funcionamiento de las represas no causa extrañeza que durante los últimos 20 años haya habido un considerable aumento en la calidad y cantidad de información generada a partir de estudios que por motivos económicos, biológicos o sociales ha sido necesario realizar.

Por su parte, la literatura evidencia que cambios en la calidad del agua y del hábitat se producen en lugares en que existen represas (Vila et al 2000), por lo cual no cabe duda que deben considerarse como un importante foco de estudio.

Dado que las represas son una barrera física que impide el flujo natural de las poblaciones y afecta la migración natural de peces entre río arriba y río abajo, resulta interesante corroborar dicha afirmación mediante el análisis de patrones de migración ya que si no hubiese un efecto negativo debiese encontrarse que los individuos de la población se comportan como un grupo individual y no como dos poblaciones aisladas.

Para demostrar con evidencias moleculares el grado en que se está afectando el hábitat de las especies de agua dulce debido a la instalación de embalses en la zona norte de Chile, se utilizó como organismo modelo el pejerrey *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns) perteneciente a la Familia Atherinopsidae. Las poblaciones naturales de pejerreyes se distribuyen geográficamente desde la III a la X Región (Véliz y col., en revisión). Habitan sistemas dulceacuícolas con aguas bastante oxigenadas, transparentes y de baja velocidad con zonas de refugio producto de la vegetación acuática. Su periodo reproductivo abarca el periodo entre los meses de agosto y enero, considerando además que en algunos casos presentan desoves fraccionados lo cual sugiere una mayor fecundidad (Comte & Vila, 1987). Su dieta alimenticia consiste en su etapa juvenil de microorganismos planctónicos y en la adultez de moluscos, insectos acuáticos y algunos vegetales.

El trabajo considera el estudio de poblaciones naturales de *Basilichthys microlepidotus* río arriba y río abajo de dos embalses. Uno de ellos, el Corrales se encuentra ubicado en la cuenca hidrográfica del río Choapa, Cuarta región. Este embalse inició su funcionamiento el año 2002. De hecho, estudios realizados en otras zonas de la cuenca del Choapa evidencian la presencia de una enorme población de pejerreyes con una gran extensión geográfica dentro de la hoya hidrográfica (Quezada-Romegialli y col., 2010), por lo cual el embalse Corrales podría causar una discontinuidad de dicha población. Recoleta, el segundo embalse en estudio se ubica en la cuenca hidrográfica del río Limarí, Cuarta Región, y fue construido hace más de 70 años. Observaciones directas de nuestro grupo de investigación muestran que varios periodos de sequía y alta irrigación de suelos agrícolas han reducido al mínimo el caudal del agua río abajo, provocándose evidentes discontinuidades físicas producto del embalse.

Para llevar a cabo los estudios genéticos en las poblaciones de pejerreyes se utilizarán microsatélites, uno de los marcadores más usados en el desarrollo de investigación asociada a 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 y col., 2002). Para funcionar como marcador molecular el polimorfismo debe encontrarse dentro del motivo repetitivo, y por el contrario, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas dentro de cada especie. Debido a su nivel de polimorfismo resultan ser un excelente marcador molecular (Hearne y col., 1992) para llevar a cabo estudios de conservación biológica. Estos marcadores son descritos como neutros y con

segregación mendeliana (Jarne & Lagoda, 1996), por lo que poseen grandes ventajas al estudiar las poblaciones (Selkoe & Toonen, 2006).

Finalmente, con el desarrollo del presente proyecto se espera obtener evidencia del efecto disruptivo que tanto el embalse Recoleta como el Corrales provocan en los ecosistemas de agua dulce de la Cuarta región, con lo que se podrá diseñar estrategias de conservación. Además, estos microsátélites serán útiles en futuros planes de conservación genética, pudiéndose monitorear cambios en las frecuencias de los alelos en el tiempo, así como complementar estudios de dispersión dentro y entre cuencas, y estructura espacial de las poblaciones (Muñoz y col., enviado).

2. HIPÓTESIS

Los embalses constituyen una barrera física que impide el flujo génico entre las poblaciones naturales de *Basilichthys microlepidotus*. Casos de estudio: Embalses Recoleta y Corrales.

3. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Determinar la diversidad genética, migración y estructura de poblaciones de *B. microlepidotus* ubicadas río arriba y río abajo de los embalses Recoleta y Corrales

Objetivos Específicos

- ✓ Optimizar 8 microsatélites descritos para *Odontesthes perugiae* y *O. argentinensis*, mejorando su uso para *B. microlepidotus*
- ✓ Caracterizar la diversidad genética analizando estimadores genético poblacionales como polimorfismos, heterocigocidades y la presencia de desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg en los sitios de estudio
- ✓ Estimar estructuración poblacional entre los sitios de estudio, utilizando estadística genético poblacional tradicional y de asignación poblacional
- ✓ En base a la estructuración poblacional encontrada, estimar tasas de migración recientes entre los distintos sitios, observando asimetrías de migración y posible impacto de las represas sobre el flujo génico
- ✓ Estimar valores de tamaño efectivo poblacional para cada sitio de estudio

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Para determinar el efecto que producen los embalses en la discontinuidad de las poblaciones naturales de pejerreyes se estudiaron dos de estos reservorios de agua que se encuentran en la zona norte de Chile, el embalse Recoleta ubicado al noreste de la ciudad de Ovalle, en la cuenca hidrográfica del río Limarí ($30^{\circ}29'S$ $71^{\circ}06'O$), región de Coquimbo, el cual tiene 75 años de antigüedad (Figura 1), y el embalse Corrales ubicado en la comuna de Salamanca, cuenca hidrográfica del río Choapa ($31^{\circ}30'-32^{\circ}S$ $70^{\circ}40'-71^{\circ}30'O$), región de Coquimbo, que fue construido recientemente y puesto en marcha el año 2002 (Figura 2).

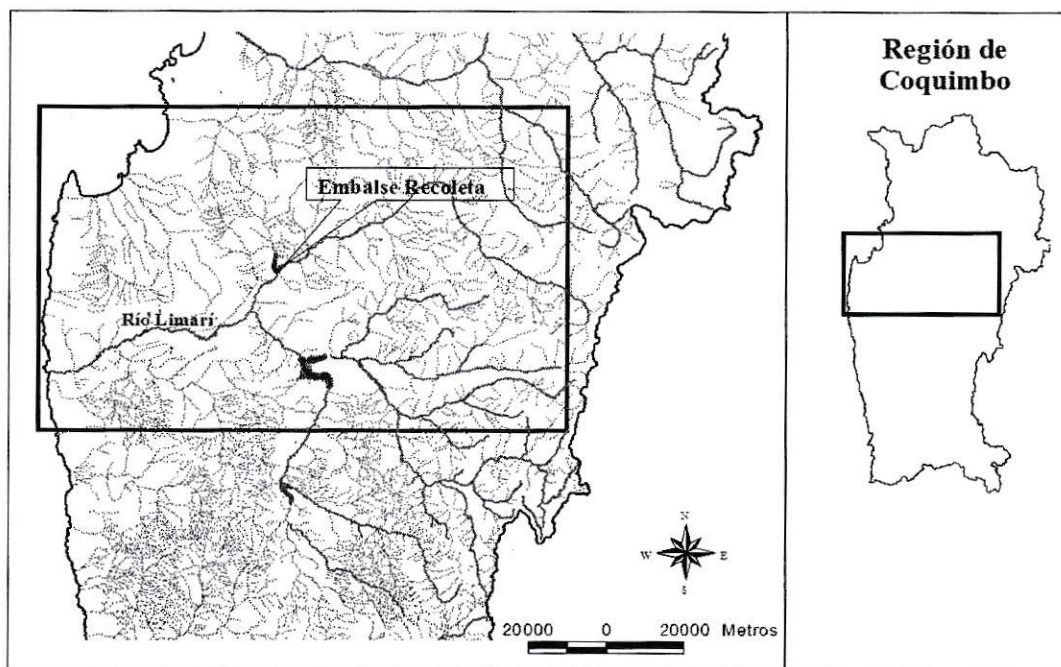


Figura 1. Mapa del lugar de muestreo. Embalse Recoleta, Cuarta Región. Chile.

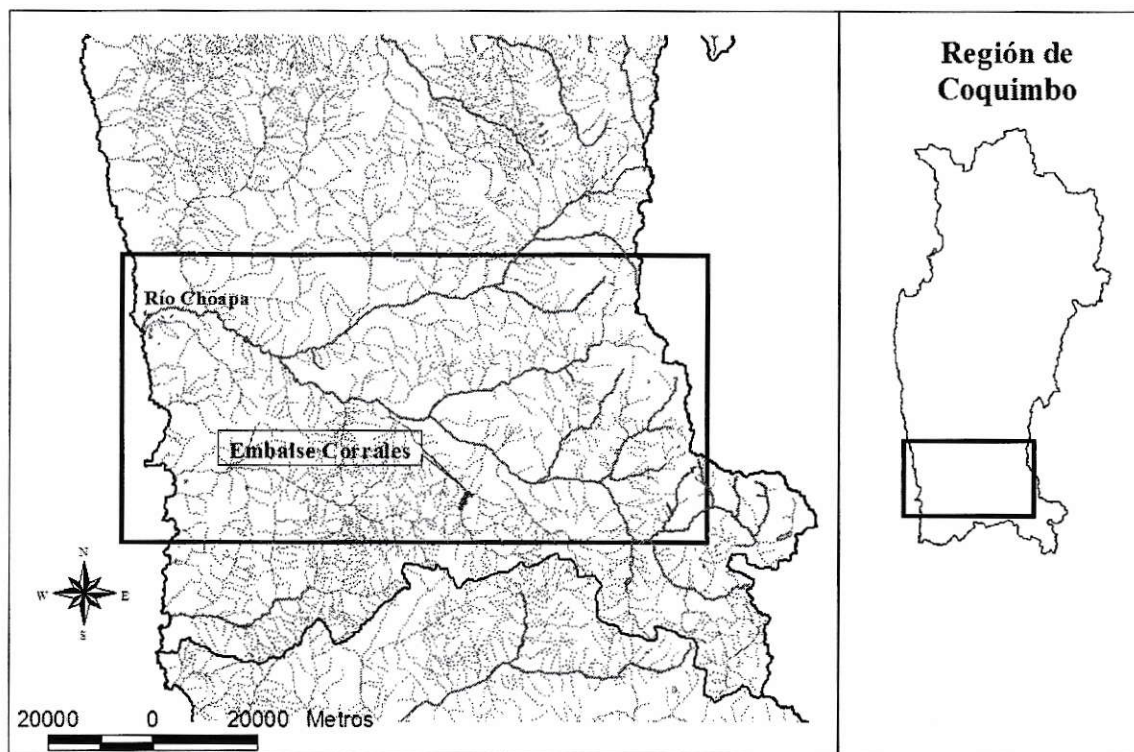


Figura 2. Mapa del lugar de muestreo. Embalse Corrales, Cuarta Región. Chile.

Obtención de muestras

El muestreo se realizó en dos etapas: Noviembre de 2006 en el embalse Corrales y Abril de 2007 en el embalse Recoleta. En cada embalse se definieron dos zonas: sección del río antes de la represa (río arriba) y sección del río después de la represa (río abajo). De esta forma se conformaron cuatro lugares de muestreo, desde ahora llamados Embalse Recoleta río arriba (RECarriba; N = 30 individuos muestreados), Embalse Recoleta río abajo (RECabajo; N = 30 individuos), Embalse Corrales río arriba

(COarriba; N = 30 individuos) y Embalse Corrales río abajo (COabajo; N = 27 individuos). En cada uno de los sitios se obtuvo 30 muestras de aleta de pejerrey, luego la mayoría de los peces fueron liberados en el mismo lugar de muestreo. A partir de las muestras de aleta obtenidas se realizó el protocolo de extracción salina de DNA descrito por Aljanabi & Martínez (1997), posteriormente las muestras fueron conservadas a una temperatura de -20 °C.

En la etapa posterior a la extracción se determinó la pureza del DNA resultante utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. A partir de estas mediciones se realizaron diluciones de las muestras para obtener una concentración de DNA de trabajo de 50 ng/μl aproximadamente.

Marcadores moleculares utilizados: microsatélites

Para llevar a cabo el estudio genético poblacional, se utilizó los partidores microsatélites descritos por Beheregaray & Sunnucks (2000) para *Odontesthes perugiae* y *O. argentinensis*. Los autores obtuvieron buenos alelos en otras especies de *Odontesthes* y en la especie *Basilichthys semotilus* por lo cual era factible una buena amplificación en *B. microlepidotus*. Los partidores microsatélites sin fluorescencia fueron sintetizados en la empresa Invitrogen Inc. (www.invitrogen.com). En una etapa inicial hubo disponibles 12 microsatélites de los cuales 8 fueron optimizados dado que presentaban un mayor polimorfismo y reproducibilidad. Posteriormente fueron enviados a marcar con fluoróforo las secuencias de los 8 partidores reverse en su extremo 5' (Tabla 1) a la empresa Applied Biosystems Inc. (www.appliedbiosystems.com).

Tabla 1. Partidores microsatélites utilizados en el presente estudio. Se indica además el fluoróforo utilizado, temperatura touchdown de la PCR y el rango de tamaño de los alelos encontrados.

Locus	Secuencia del primer (5'→3') (fluoróforo)	Ta (°C)	Rango de tamaño (pb) observado en este estudio
OD 02	F:CGGTCACCTGATGGTTGGTC R:AACCCTCAACCCGGCGCATC (VIC)	61→53	120-124
OD 07	F:GTCTGAAAGCATCGAGTGAC R:TCTTTTTCTACATCCCAAGC (FAM)	55→47	167-177
OD 08	F:TTTCTTTATCCCGCTATGTC R:TGCTCTTGCCCTTGTGTATG (NED)	55→47	123
OD 09	F:CCCCACAGAGATAGGCACAC R:GGAGGGAAAAGGTCCAACAG(NED)	59→51	140-162
OD23	F:TAAGATGGAGGTGCTG R:TTCTCCCCTTCGTCCATAAC (PET)	59→51	103-123
OD 27	F:CCTAATGAAGGTGAAATGC R:GTAAAGGGAGAGGATGGAG (FAM)	59→51	174
OD 38	F:ACTAAACGCCCTGATTGTCC R:TCAGTCCATCCATCCAAGAG (VIC)	61→53	96-110
OD 39	F:CTCCCACTAATCCCATTG R:TACGTGAGCATGTGTGTTG (PET)	59→51	153-161

Amplificación de fragmentos

La amplificación de los fragmentos para cada microsatélite se realizó de forma independiente mediante el método Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los termocicladores Px2 Thermal Cycler, PxE Thermal Cycler, iCycler Thermal Cycler, Multigene Thermal Cycler. El protocolo de PCR touchdown utilizado fue el descrito por Beheregaray & Sunnucks (2000). Comienza con un ciclo de denaturación inicial a 94 °C

durante 3 min, seguido de un ciclo con 3 etapas: 94 °C por 20 s, luego la temperatura mayor del touchdown por 45 s y a continuación 72 °C durante 1 min. Le sigue 4 ciclos de touchdown: 94 °C por 20 s, temperatura media del touchdown disminuyendo 2 °C por ciclo y finalmente 72 °C por 1 min. A continuación siguen 27 ciclos con: 94 °C por 20 s, temperatura menor del touchdown por 45 s, 72 °C por 1 min. Por último, 1 ciclo de 72 °C durante 4 min. 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 µl MgCl₂ 50mM, 0.5 µl del partidore forward 50 ng/µl, 0.5 µl del partidore reverse 50 ng/µl, 2.4 µl dNTP's 2.5 mM, 4.68 µl H₂O₂, 0.12 µl Taq polimerasa. Finalmente, se agrega 1.5 µl de DNA a 50ng/µl.

Visualización de fragmentos

Los fragmentos amplificados mediante PCR touchdown correspondientes a los 8 microsatélites optimizados fueron analizados inicialmente en geles de agarosa al 1.5% utilizando bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización positiva de los productos de PCR. En una etapa final, se armaron dos placas de PCR, cada una con 4 microsatélites marcados con distinta fluorescencia (fluoróforos FAM, VIC, NED, PET). Para el análisis de ambas placas se utilizó un secuenciador automático de DNA (ABI 3730) mediante el servicio GeneScan ofrecido por la empresa Coreana Macrogen Inc (www.macrogen.com). Para el análisis de los resultados entregados por Macrogen Inc se utilizó el programa de análisis de fragmentos de DNA GeneMarker (SoftGenetics

Inc.). Una vez realizado estos análisis se construyó la matriz de datos alélicos, elemento fundamental para continuar con los análisis estadísticos pertinentes.

Análisis Estadísticos

Estimadores genético poblacionales como polimorfismos y heterocigocidades se calcularon a partir de matrices de datos alélicos utilizando el programa GENETIX (Belkhir y col., 2000). Para determinar si existen desviaciones en el equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), se estimó el índice F_{IS} y su significancia estadística con 5000 permutaciones. Para determinar la presencia de marcadores ligados físicamente, se estimó el desequilibrio de ligamiento de los marcadores microsatélites usando el mismo programa GENETIX.

Para estimar diferencias significativas entre los grupos de peces estudiados se realizó el cálculo de F_{ST} , estimando su significancia con 5000 permutaciones. Se utilizó además un análisis de asignación poblacional implementado en el programa FLOCK (Duchesne & Turgeon, 2009). Este análisis de asignación poblacional no requiere conocer la procedencia de las muestras, 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 método no bayesiano que difiere bastante de los algoritmos clásicos, se basa en repetidas reasignaciones de los individuos según un número supuesto de grupos de referencia (k) construidos por FLOCK en donde cada

reassegnación es mejor que la anterior, aumentando su efectividad linealmente con el tamaño muestral. Además del parámetro (k) se considera un valor de mínima probabilidad de diferencia para asignar individuos a dos grupos de referencia ($LLOD$), por tanto, un alto valor de $LLOD$ permite reducir la probabilidad de una asignación errónea. Al comparar FLOCK con otros algoritmos de estructuración poblacional se observa que éste presenta significativamente mejor funcionamiento en ausencia de genotipos puros.

Una vez estimado el número de poblaciones significativamente diferenciables, se estimó las tasas de migración recientes entre los 4 sitios de estudio utilizando el programa BAYESASS (Wilson & Rannala, 2003). Este programa estima tasas de migración recientes entre poblaciones utilizando la teoría de asignación individual, decimándose estadísticamente con estadística bayesiana y algoritmos de cadena de Markov Monte Carlo ($MCMC$). El programa asume relativamente bajos niveles de migración, y que la proporción de migrantes hacia una población no puede exceder un tercio de la población total en cada generación (Wilson & Rannala, 2003). El método permite desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg, junto con ello, las estimaciones son más precisas al utilizar un gran número de loci variables, un tamaño muestral grande, y una alta diferenciación en las poblaciones.

Por último, se utilizó el programa LDNe (Waples, 2006) para estimar el tamaño efectivo poblacional en cada sitio de estudio a partir de datos genotípicos basados en el

desequilibrio de ligamiento. Este análisis consideró como alelos válidos aquellos que presentaron una frecuencia mayor al 1% en los sitios estudiados.

5. RESULTADOS

En el presente estudio se utilizó un análisis multilocus a partir de 117 individuos para un total de 8 microsatélites.

Al analizar el número de alelos se observa que los marcadores microsatélites OD 08 y OD 27 son monomórficos para los 4 sitios de estudio, por lo tanto, para posteriores análisis estadísticos no fueron considerados. En cuanto a la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg se observó que el microsatélite OD 23 presentó déficit significativo de heterocigotos en COarriba, COabajo y RECabajo. Los microsatélites restantes no mostraron un déficit significativo de heterocigotos. Dado que el microsatélite OD 23 no cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg tampoco fue considerado para los análisis posteriores. Por lo tanto, se continuó el trabajo con 5 microsatélites (OD 02, OD 07, OD 09, OD 38 y OD 39), los cuales evidenciaron un cumplimiento global del equilibrio de Hardy-Weinberg. Al analizar de forma general la diversidad genética se observa que es considerablemente baja tanto río arriba como río abajo en ambos embalses, alcanzando un número promedio de 2.6 alelos por locus (Tabla 2). Adicionalmente, en el Anexo 1 se muestra la frecuencia de los alelos para cada uno de los microsatélites polimórficos.

Tabla 2. Resumen del Número de individuos analizados (N), número de alelos (A), Heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O), f_{is} y su respectivo estadígrafo. - = presencia de sólo un alelo. * = desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Calculo global de EHW se realizó con los microsátélites OD 02, OD 07, OD 09, OD 38 y OD 39

Locus		Embalse Recoleta		Embalse Corrales	
		RECarriba	RECabajo	RECarriba	RECabajo
OD 02	N	29	30	30	27
	A	3	2	3	3
	H_E	0.53	0.486	0.625	0.528
	H_O	0.552	0.567	0.533	0.593
	f_{is}	-0.023	-0.149	0.163	-0.102
	P	0.372	0.112	0.082	0.22
OD 38	N	30	30	29	27
	A	1	1	3	3
	H_E	0	0	0.099	0.106
	H_O	0	0	0.103	0.111
	f_{is}	-	-	-0.024	-0.026
	P	-	-	0	0
OD 08	N	29	30	30	27
	A	1	1	1	1
	H_E	0	0	0	0
	H_O	0	0	0	0
	f_{is}	-	-	-	-
	P	-	-	-	-
OD 09	N	30	30	30	27
	A	4	3	4	4
	H_E	0.497	0.383	0.447	0.527
	H_O	0.4	0.333	0.567	0.482
	f_{is}	0.211	0.146	-0.251	0.105
	P	0.069	0.148	0	0.152
OD 23	N	29	27	7	26
	A	2	2	3	4
	H_E	0.158	0.324	0.602	0.487
	H_O	0.172	0.259	0.149	0.308
	f_{is}	-0.077	0.219	0.793	0.386
	P	0.086	0.041*	0*	0.004*
OD 39	N	28	21	22	18
	A	2	3	3	3
	H_E	0.499	0.534	0.385	0.434
	H_O	0.464	0.429	0.409	0.556
	f_{is}	0.088	0.221	-0.038	-0.255
	P	0.196	0.084	0.269	0
OD 07	N	29	28	27	26
	A	6	4	4	5
	H_E	0.623	0.515	0.706	0.678
	H_O	0.586	0.607	0.63	0.654
	f_{is}	0.077	-0.162	0.126	0.056
	P	0.178	0.05	0.107	0.238

Continuación Tabla 2

OD 27	N	29	26	26	24
	A	1	1	1	1
	H _E	0	0	0	0
	H _O	0	0	0	0
	f _{is}	-	-	-	-
	P	-	-	-	-
TOTAL	f _{is}	0.077	0.01	0.028	-0.033
(5 loci polim)	P	0.166	0.447	0.337	0.337

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los microsatélites muestra que los valores no son significativos en las respectivas poblaciones, por lo cual, no existiría ligamiento físico entre dichos marcadores moleculares, pudiendo afirmar que estos microsatélites segregan independientemente (Tabla 3). Aunque se observó valores significativos de ligamiento para ciertos pares de microsatélites, en ningún caso dicha significancia ocurre para el mismo par de marcadores en los cuatro sitios de estudio.

Tabla 3. Desequilibrio de ligamiento de marcadores microsatélites. * Microsatélites que presentan ligamiento estadísticamente significativo.

Locus – Locus	EMBALSE RECOLETA		EMBALSE CORRALES	
	RECarriba	RECabajo	COarriba	COabajo
OD02 – OD07	0.463	0.928	0.039*	0.899
OD02 – OD38	---	---	0.975	0.68
OD02 – OD09	0.442	0.717	0.161	0.737
OD02 – OD39	0.229	0.339	0.103	0.155
OD07 – OD38	---	---	0.201	0.002*
OD07 – OD09	0.682	0.041*	0.068	0.161
OD07 – OD39	0.269	0.265	0.079	0.398
OD38 – OD09	---	---	0.004*	0.52
OD38 – OD39	---	---	0.59	0.192
OD09 – OD39	0.31	0.875	0.902	0.594

Estructura Poblacional

El análisis de estructura poblacional nos muestra claramente una diferenciación significativa de los grupos de peces ubicados en diferente hoyo hidrográfica (RECarriba-RECabajo vs COarriba-COabajo) (Tabla 4). De la misma forma, no es posible establecer como poblaciones distintas los sitios de estudio RECarriba de RECabajo ni COarriba de COabajo dado que el valor de F_{ST} no es significativo.

Tabla 4. Diferenciación poblacional en los cuatro sitios de estudio utilizando GENETIX. Valores de F_{ST} (sobre la diagonal) y su valor de significancia (bajo la diagonal) se muestran para cada interacción de poblaciones. * Representa los valores significativos de F_{ST} .

EMBALSE	SITIO	RECarriba	RECabajo	COarriba	COabajo
Recoleta	RECarriba	---	0.002	0.037 *	0.039 *
	RECabajo	0.363	---	0.046 *	0.050 *
Corrales	COarriba	0.009	0.005	---	0.003
	COabajo	0.004	0.005	0.339	---

El análisis de asignación poblacional realizado con el programa FLOCK corroboró los resultados del índice F_{ST} . Esta asignación poblacional indica que el número más probable de poblaciones es $k = 2$ ($p = 0.003$), asignando individuos de los sitios COarriba y COabajo separados del grupo compuesto por RECarriba-RECabajo. Al igual que el F_{ST} , este análisis no logra detectar diferencias entre sitios río abajo y río arriba en los embalses (Figura 3).

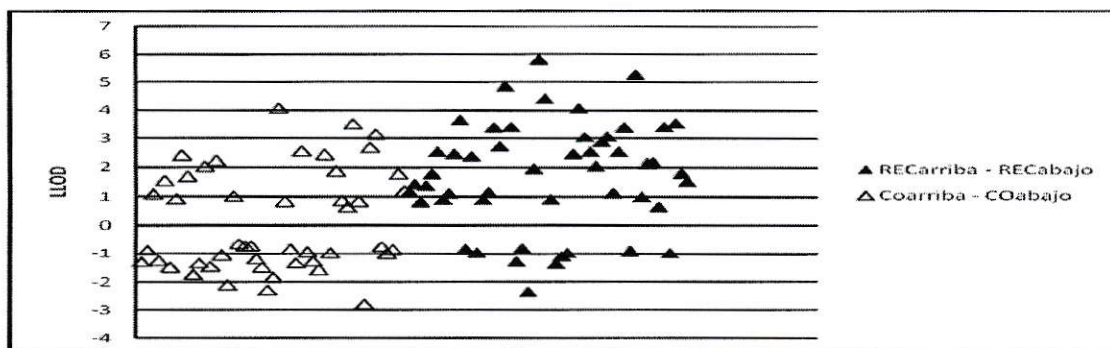


Figura 3. Análisis de asignación poblacional considerando un numero de grupos de referencia a construir mediante FLOCK ($k = 2$), y un valor de $LLOD = 0.6$. Para ambos grupos diferenciados se considera los individuos correctamente asignados (C.A) y los incorrectamente asignados (I.A).

Al considerar un $k = 2$ y un $LLOD = 0.6$ se observa que la población RECarriba-RECabajo se diferencia con bastante claridad respecto a la población Coarriba-COabajo lo cual se refleja en los valores de individuos correctamente asignados, individuos incorrectamente asignados, e individuos asignados a ninguna población debido a que su nivel de semejanza con cualquiera de ambos grupos fue menor al umbral impuesto como condición ($LLOD = 0.6$). En el Embalse Recoleta los individuos correctamente asignados alcanzaron un 70%, lo cual indica una alta diferenciación del grupo mientras que en el Embalse Corrales los individuos correctamente asignados apenas alcanzó valores cercanos al 50%. Si bien en ambos casos el porcentaje de individuos no asignados fue similar, al mirar valores de individuos incorrectamente asignados se observó que el grupo correspondiente al Embalse Corrales presentó un alto error en la asignación de individuos (Figura 4).

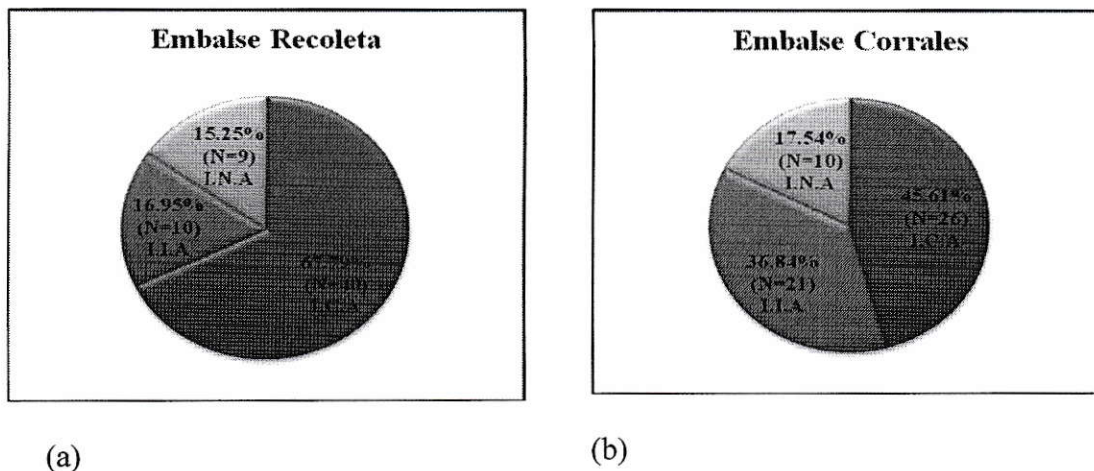


Figura 4. Valores porcentuales representativos de las reasignaciones de todos los individuos realizadas en el programa FLOCK para (a) Embalse Recoleta y (b) Embalse Corrales. C.A: Individuos correctamente asignados, I.A: Individuos incorrectamente asignados, N.A: individuos no asignados.

Flujo Génico

La tasa de migración contemporánea de individuos en los cuatro sitios de muestreo se estimó con el programa BAYESASS, indicando que el mayor flujo génico se presenta entre las zonas río arriba y río abajo de cada embalse (Figura 5). A su vez, puede observarse un flujo asimétrico desde el Recoleta, cuenca del Limarí hacia la cuenca de Choapa, además las tasas de autoreclutamiento en cada sitio de estudio son los valores más altos de migración observados. Aunque si bien, los datos arrojan bastante información, es importante recalcar que cualquier interpretación a partir de ellos debe observarse con cuidado dado que gran parte de los datos presentan una desviación estándar suficientemente grande como para realizar consideraciones erróneas.

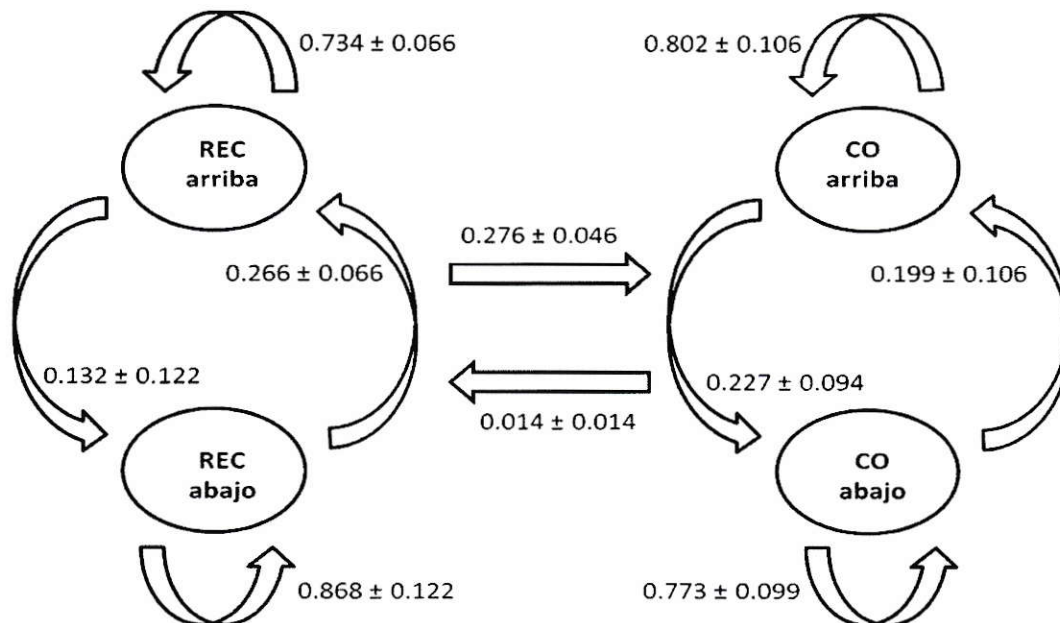


Figura 5. Estimación de las tasas de migración recientes entre cada sitio de estudio utilizando el programa BAYESASS. Se realizaron análisis independientes para cada embalse. Se muestran los valores con la respectiva desviación estándar.

Estimación de tamaños efectivos poblacionales

Los valores estimados por el programa LDNe muestran que los dos sitios de estudio que se encuentran río arriba de los embalses (REC arriba y CO arriba) tienen un tamaño efectivo poblacional menor que los ubicados río abajo (Tabla 5). Analizando los Ne estimados por el programa se puede deducir que en ambos sitios de estudio río abajo la diversidad genética de las poblaciones es similar y tiende a ser alta en comparación a los observados en las zonas río arriba.

Tabla 5. Valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada sitio de estudio estimados en el programa LDNe. * Valores indican tamaños efectivos negativos. Se incluye además el intervalo de confianza en cada caso.

EMBALSE	SITIO	N_e , (Intervalo de confianza 95%)
Recoleta	RECarriba	-102, (13.6 - infinito) *
	RECabajo	38.6 , (2.4 – infinito)
Corrales	COarriba	7.6 , (2.2 - 29.1)
	COabajo	38.6 , (6.9 - infinito)

6. DISCUSION

Las represas son consideradas uno de los grandes impactos producidos por el ser humano sobre el medio ambiente debido a que destruyen los circuitos biológicos propios del lugar en que se emplazan amenazando la biodiversidad de los sistemas naturales (Dynesius & Nilsson, 1994), de hecho la presencia de represas es el factor más importante en la determinación del estado de conservación de los peces (Clavero y col., 2004). En los ecosistemas dulceacuícolas las represas impiden la libre circulación de los peces (Leclerc y col., 2008) bloqueando el flujo génico normal incrementando el aislamiento reproductivo entre las poblaciones naturales ubicadas río arriba y río abajo de los embalses. Sin embargo esto no es una regla general, otros estudios no encuentran diferencias provocadas por los embalses (Reid y col., 2008) por lo que es prioritario el estudio caso a caso en nuestro país.

Efecto en la discontinuidad de las poblaciones

Al utilizar 5 microsatélites polimórficos no fue posible detectar una discontinuidad entre poblaciones ubicadas río arriba y río abajo en los embalses Recoleta y Corrales. Sin embargo, los marcadores microsatélites permitieron distinguir claramente los pejerreyes de la hoya hidrográfica del Limarí y del Choapa, por lo que poseen el potencial de delinear poblaciones. Los resultados de F_{ST} muestran una diferenciación evidente entre cada embalse ($F_{ST} = 0.043$; $p = 0.006$), pero al considerar la posible diferenciación dentro de cada embalse se obtienen valores no significativos ($p = 0.35$). De hecho, trabajos realizados con ADN mitocondrial en poblaciones de

B. microlepidotus también revelan una baja diferenciación dentro de cada cuenca y una evidente diferenciación entre cuencas (Quezada-Romegialli y col., 2010).

Estos resultados fueron confirmados por los análisis de asignación poblacional, donde se observa que los individuos de cada embalse se comportan como una sola población: RECarriba-RECabajo y COarriba-COabajo, detectándose además que la población RECarriba-RECabajo presenta una mejor asignación poblacional que la población COarriba-COabajo (ver Fig. 3 y 4). Esto puede asociarse a la migración asimétrica detectada entre las cuencas, donde un mayor número de individuos de la cuenca del Limarí se observa en la cuenca del Choapa.

La nula diferenciación de las poblaciones observada río arriba y río abajo de los embalses podría deberse a diversas causas: la primera es que no exista un efecto de los embalses sobre las poblaciones naturales de *B. microlepidotus*, la segunda es que, de existir un efecto éste no sería detectado mediante el uso de estos marcadores microsatélites, y una tercera causa es que no ha transcurrido el tiempo suficiente desde que los embalses fueron construidos lo cual no ha permitido que detectemos el aislamiento de las poblaciones. Sin embargo, los cálculos de tamaño efectivo muestran ciertas diferencias entre río arriba y río abajo de los embalses. En ambos casos la zona río arriba presentó valores de tamaño efectivo algo menores a los observados río abajo. Esto se debería a que las zonas río arriba tienen menor diversidad génica dado un menor tamaño poblacional o mayores periodos de cuellos de botellas por lo cual la deriva sobre ellas actúa con mayor fuerza, sin embargo, los datos de diversidad genética obtenidos no

corroboran del todo esta afirmación. La explicación a estos resultados se basa en la ubicación geográfica de las represas (ver Fig.1 y 2) ya que si bien el embalse separa las zonas río arriba y río abajo, las primeras son de menor tamaño físico, quedando totalmente aisladas del sistema natural con el que se encontraban comunicadas anteriormente a la construcción de la represa. Por otro lado, las zonas río abajo mantienen contacto con el sistema original y otros tributarios del cauce central, por lo tanto, el flujo génico es mayor. Otros estudios realizados en peces con marcadores microsatélites demuestran que la fragmentación de los ríos producto de embalses reduce considerablemente los tamaños efectivos de las poblaciones actuales comparados con las estimaciones de tamaños efectivos históricos, los que pueden llegar a ser varios órdenes de magnitud mayores que los recientes (ejemplo: Alo & Turner, 2005).

Los resultados de migraciones recíprocas entre los diferentes sitios nos muestran dos claras evidencias. Primero, al agrupar los genotipos por cuenca se observa una fuerte migración asimétrica desde la cuenca del Limarí (Embalse Recoleta) hacia la cuenca del Choapa (embalse Corrales). Esta migración entre cuencas no resulta ser imposible si consideramos que el Grupo de pejerreyes (Familia Atherinidae) tiene una historia filogenética que lo vincula tanto a sistemas marinos como dulceacuícolas (Dyer, 1998).

Junto con ello, se sabe que ha experimentado múltiples transiciones del océano a los ríos y viceversa durante la historia evolutiva del grupo (Bamber & Henderson, 1988). Además, hay evidencias que *B. microlepidotus* tendría la capacidad de migrar entre los ríos de Chile central utilizando rutas costeras (Quezada-Romegialli y col., 2010) ya que

toleran aguas salinas (Dyer, B. comunicación personal). Sumado a esto, estudios recientes evidencian la presencia de pejerreyes en aguas marinas Sudamericanas (Strussmann y col., 2010), por lo tanto, se plantea la posibilidad que durante los años que se presenta el fenómeno de El Niño la mayor cantidad de precipitaciones aumenta las descargas de agua al mar disminuyendo la salinización (Sievers & Vega, 2000), permitiendo el flujo génico de los peces entre las diferentes hoyas hidrográficas.

Segundo, era esperable que si existiese flujo dentro de cada embalse fuese preferentemente desde los sitios río arriba hacia río abajo. Sin embargo, esta situación no parece clara con los resultados obtenidos, detectándose en uno de los casos un poco más de migración desde río abajo hacia río arriba. En este caso, es necesario tomar con cuidado los resultados de migraciones recíprocas ya que los autores de BAYESASS indican que este programa no realiza buenos cálculos en ciertas condiciones de baja dispersión y bajo número de loci (Wilson & Rannala, 2003). Además, el cálculo del flujo génico en poblaciones naturales suele ser desconocido debido a que los estimadores de tasas de migración pueden ser parciales y altamente imprecisos ya que la estructura genética poblacional es más que un simple balance entre deriva y flujo génico (Bohonak, 1999).

Limitaciones del análisis

Se comenzó a trabajar con 8 microsatélites de los cuales 5 resultaron ser polimórficos, mientras 2 fueron monomórficos y uno no cumplió el equilibrio Hardy-Weinberg, razón por la cual 3 de ellos no se utilizaron en los análisis. Si bien se puede

pensar que 5 microsátelites polimórficos es un número acotado para realizar el estudio, hay trabajos realizados en peces de agua dulce que demuestran que es suficiente para llevar a cabo estudios poblacionales (ej: Rogers & Curry, 2004). Por otro lado, es importante considerar que utilizar pocos marcadores moleculares subestima la diversidad génica real esperada en las poblaciones naturales (Selkoe & Toonen, 2006) y por tanto es difícil entender a cabalidad que sucede con ellas. De hecho, los marcadores polimórficos aquí utilizados presentaron en promedio un número de alelos por locus bajo ($A = 2.6$) en comparación al rango descrito para peces de agua dulce ($A = 7.5$) (Dewoody & Avise, 2000). Lo anterior nos indica que independiente del posible efecto provocado por los embalses, la diversidad genética de los peces de agua dulce es bastante baja en el área de estudio. De hecho, trabajos realizados en otros ríos de la zona norte de Chile que no están intervenidos por embalses también muestran una baja diversidad genética (Quezada-Romegialli y col., 2010). Por lo tanto, la diversidad genética reducida estimada para *B. microlepidotus* puede tener un carácter histórico, lo cual puede influenciar nuestra percepción acerca del posible efecto producido por los embalses en esta zona.

Por lo tanto, para mejorar este trabajo es importante considerar un mayor número de loci polimórficos, dado que en la mayoría de los casos es una condición determinante para que los programas estadísticos presenten un óptimo funcionamiento. Junto con ello sería recomendable aumentar el tamaño muestral para mejorar la representatividad poblacional.

Perspectivas e investigaciones futuras

El 64% de los peces dulceacuícolas de Chile están con problemas de conservación (Habit y col., 2006; Vila y col., 2006). Es por esta razón que es necesario realizar nuevos planes para conservar las especies y sus poblaciones. Paralelo a esto, es importante contar con estudios que demuestren los cambios ecológicos y evolutivos que sufren las poblaciones naturales junto con el aislamiento reproductivo que ocurre principalmente en los sitios río arriba generando una alta probabilidad de pérdida de variabilidad debido a la fragmentación y degradación del hábitat a nivel local por la instalación de embalses en los sistemas naturales de la zona norte de Chile. En el caso de las poblaciones, la utilización de marcadores moleculares microsátélites suele ser de gran ayuda (Desalle & Amato, 2004), ya que permitirán monitorear cambios en las frecuencias de los alelos en el tiempo, así como complementar estudios de dispersión dentro y entre cuencas, y estructura espacial de las poblaciones.

Trabajos futuros debiesen estar orientados hacia el estudio de otras especies de peces, ya que si se observa un comportamiento similar al presentado para el caso de *B. microlepidotus* se podría contar con valiosa información que evidencie el efecto disruptivo de los embalses. Además, se debería analizar la variable tiempo, realizando estudios y simulaciones en distintos años para observar el efecto temporal en la diferenciación de las poblaciones.

Finalmente, uno de los objetivos del presente trabajo es considerar la información generada a partir de él junto con los estudios complementarios propuestos

para realizar planes de conservación, como por ejemplo diseñar áreas protegidas de sistemas dulceacuícolas (Saunders y col., 2002). Esto permitirá mitigar, proteger y conservar posibles sistemas límnicos que serán interrumpidos por embalses.

7. CONCLUSIÓN

A la luz del presente trabajo, no se observan evidencias claras y suficientes que permita afirmar que los embalses Recoleta y Corrales constituyen una barrera física que impide el flujo génico entre las poblaciones naturales de *Basilichthys microlepidotus* ubicadas río arriba y río abajo de las represas.

El cálculo de tamaños efectivos poblacionales en los 4 sitios de estudio nos lleva a pensar que las poblaciones de *Basilichthys microlepidotus* posiblemente se están diferenciando, por lo tanto, resulta interesante estudiar este fenómeno considerando la variable tiempo. Los tamaños efectivos de las zonas río arriba podrían ser la primera evidencia del efecto sobre la diversidad génica de las poblaciones.

La estimación de flujos génicos recientes muestra migraciones asimétricas desde la cuenca del Limarí a la cuenca del Choapa, pero no permite evidenciar efectos notorios de los embalses sobre las migraciones. Debido a esto, se considerará en trabajos posteriores el cálculo de tasas de migración históricas, de esta forma podrá compararse ambas determinando así cual es el efecto disruptivo real que provocan los embalses como barrera física.

Por último, es necesario considerar trabajos complementarios con mayor número de marcadores moleculares, más sitios y en la eventualidad otras especies locales para dar mayor robustez a los resultados obtenidos. De esta forma será posible disponer de

información que nos permita generar planes de conservación en las especies dulceacuícolas que en la eventualidad serán amenazadas por el efecto disruptivo de la construcción de nuevos embalses.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, S., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. **25**: 4692 – 4693.
- Alo, D., Turner, T. 2005. Effects of Habitat Fragmentation on Effective Population Size in the Endangered Rio Grande Silvery Minnow. *Conservation Biology*. **19**: 1138–1148.
- Bamber, R., Henderson, P. 1988. Pre-adaptive plasticity in atherinids and the estuarine seat of teleost evolution. *J Fish Biol* **33**:17–23.
- 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, P Borsa, L Chikki, J Goudet & F Bonhomme. 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.
- Bohonak, A. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The quarterly review of biology*. **74**: 21 – 45.
- Chao, B.F. 1995. Anthropological impact on global geodynamics due to reservoir water impoundment. *Geophysical Research Letters*. **22**: 3533 – 3536.
- Clavero, M., Blanco-Garrido, F., Prenda, J. 2004. Fish fauna in Iberian Mediterranean river basins: biodiversity, introduced species and damming impacts. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*. **14**: 575–585.
- Comte, S., Vila, I. 1992. Spawning of *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns). *Journal of Fish Biology*. **41**: 971-981.
- Desalle, R., Amato, G. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature*. **5**: 702 – 712.

- DeWoody, J., Avise, J. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* . **56**: 461- 473.
- Duchesne, P., Turgeon, J. 2009. FLOCK: a method for quick mapping of admixture without source samples. *Molecular Ecology Resources*. **9**: 1333 – 1344.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., et al.. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* **81**: 163–182.
- Dyer, B. 1998. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical silverside family Atherinopsidae (Teleostei, Atheriniformes). En: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (eds) *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. pp 519–536. EDIPUCRS. Porto Alegre.
- Dynesius, M., Nilsson, C. 1994. Fragmentation and Flow Regulation of River Systems in the Northern Third of the World. *Science*. **266**: 753 – 762.
- Fahrig, L. 1997. Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold: a synthesis. *Ecological applications*. **12**: 346 – 353.
- Habit, E., Dyer, B., Vila I. 2006. Current state of knowledge of freshwater fishes of Chile. *Gayana* **70**: 100 - 113.
- Hearne, C., Ghosh, S., Todd, J. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*. **8**: 288 – 294.
- Jarne, P., Lagoda, P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol*, **11**: 424–429.
- 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.
- McCully, P. 2001. 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.

- Mora, C., Metzger, R., Rollo, A., Myers, R. 2007. Experimental simulations about the effects of overexploitation and habitat fragmentation on populations facing environmental warming. *Proc. R. Soc. B.* **274**: 1023–1028.
- Muñoz, PA., Quezada-Romegialli, C., Veliz, D. Cross-amplification of microsatellites from the silverside *Odontesthes perugiae* and *O. argentinensis* to the Chilean silversides of the Genus *Odontesthes* and *Basilichthys*. *Revista Gayana* (Enviado).
- Myers, N. 1995. Environmental unknowns. *Science.* **269**: 358 – 360.
- Nilsson, C., Reidy, C., Dynesius, M., Revenga, C. 2005. Fragmentation and Flow Regulation of the World's Large River Systems. *Science.* **308**: 405 – 408.
- 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 Fish.* **89**:173 – 186.
- Reid, SM., Wilson, CC., Mandrak, NE., Carl, LM. 2008. Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. *Conservation Genetics* **9**: 531-546.
- Revenga, C., Brunner, J., Henninger, N., Kassem, K., Payne, R. 2000. Pilot analysis of global ecosystem: Freshwater system. Washington, D.C; World Resources Institute. pp 65.
- Rogers, SM & Curry RA. 2004. Genetic population structure of brook trout inhabiting a large river Watershed. *Transactions of the American Fisheries Society.* **133**: 1138-1149.
- Sala, O., Stuart Chapin III, F., Armesto, J., et al. 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.
- Selkoe, K., Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters.* **9**: 615–629.

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

Sievers, H., Vega, S. 2000. Physical-chemical response of Valparaíso Bay to upwelling generated at Point Curaumilla and to El Niño Phenomenon. *Rev Biol Mar Oceanogr* **35**:153–168.

Strussmann, C.A., Conover, D.O., Somoza, G.M. 2010. Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family Atherinopsidae). *Journal of Fish Biology*. **77**: 1818–1834.

Véliz D., Pardo R., Acuña P., et al. The genus *Basilichthys* (Teleostei: Atherinopsidae) in Chile: use of mtDNA for taxonomy and species recognition. *Revista Chilena de Historia Natural*. (En revisión).

Vila, I., Contreras, M., Montecino, V., Pizarro, J., Adams, D. 2000. Rapel: A 30 years temperate reservoir. Eutrophication or contamination?. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* **55**: 31 – 44.

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.

Waples, R. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*. **7**: 167 - 184.

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

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

9. ANEXOS

Anexo I. Resumen de las frecuencias alélicas encontradas en los cuatro sitios de estudio.

El análisis se realizó en el programa GENETIX considerando cinco loci polimórficos

Locus		Embalse Recoleta		Embalse Corrales	
		REC arriba	REC abajo	CO arriba	CO abajo
OD 02	120	0.448	0.583	0.417	0.426
	122	0.517	0.417	0.417	0.537
	124	0.035	0	0.167	0.037
OD 38	100	1	1	0.948	0.944
	102	0	0	0.017	0
	104	0	0	0	0.019
	110	0	0	0.035	0.037
OD 09	140	0.017	0	0	0
	154	0.617	0.75	0.717	0.648
	156	0	0	0.067	0
	158	0.35	0.233	0.183	0.204
	160	0	0	0.033	0.093
	162	0.017	0.017	0	0.056
OD 39	153	0	0.048	0.023	0.083
	159	0.482	0.405	0.227	0.194
	161	0.518	0.548	0.75	0.722
OD 07	167	0.224	0.196	0.222	0.039
	169	0.138	0.071	0.315	0.346
	171	0.017	0	0	0.058
	173	0.052	0.071	0.093	0.135
	175	0.552	0.661	0.370	0.423
	177	0.017	0	0	0