

UOH-FC.
MAG-B
S 161
C. 1

**Alcances de la introducción de *Cheirodon interruptus*
(Ostariophysi: Characiformes) en Chile y herramientas
para su discriminación del resto de carácidos chilenos**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Daniel Emilio Salas Johnson

Diciembre, 2016



Director de Tesis: Dr. David Véliz Baeza

Co-Director de Tesis: Dr. Sergio Scott Alarcón

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

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

Daniel Emilio Salas Johnson

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de diciembre de 2015.

Director de Tesis:

- **Dr. David Véliz**



.....

Co-Director de Tesis

- **Dr. Sergio Scott**

.....

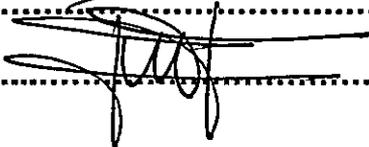
Comisión de Evaluación de la Tesis

- **Dr. Elie Poulin**



.....

- **Dr. Marco Méndez**



.....

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, esta tesis no hubiera sido posible sin el gran apoyo de mis tutores David Véliz y Sergio Scott. Ambos tuvieron una enorme paciencia con mis discontinuos avances, permitiéndome siempre (tratar de) compatibilizar mis actividades laborales con el desarrollo de esta tesis. También agradezco al Laboratorio de Limnología, comenzando por la profesora Irma Vila, quienes me brindaron un grato ambiente de trabajo todo este tiempo. Gracias a Claudio y Pablo por su amistad.

Debo agradecer a Elie Poulin y Marco Méndez, miembros de mi comisión evaluadora, por mejorar este trabajo con sus valiosos comentarios. De la misma forma, Gustavo Bizama y Ramiro Bustamante fueron cruciales para el desarrollo de uno de los capítulos de esta tesis.

Este trabajo tampoco hubiese finalizado sin el apoyo de todo el equipo de GESAM Consultores, especialmente Cristián Andrade y Rodrigo Valenzuela, quienes alentaron y facilitaron todas mis actividades académicas.

No puedo olvidar a mis amigos, compañeros de carrera y ahora colegas, que me acompañaron de una u otra forma a lo largo de este inesperado largo proceso.

Finalmente, no estaría escribiendo esto si no fuera por el apoyo incondicional de mi familia, quienes me han entregado toda mi vida el amor y las condiciones para desarrollar mis intereses. Este trabajo es para ustedes.

Por último, quiero agradecer al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), a la Universidad de Chile y a CONICYT por financiar parte de mi maestría.

ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO 1. DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DEL GÉNERO <i>CHEIRODON</i> (OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES) EN CHILE	8
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Obtención de muestras	14
Morfometría tradicional.....	18
Morfometría geométrica	20
Análisis molecular.....	22
RESULTADOS	24
Morfometría tradicional.....	24
Morfometría geométrica	29
Análisis molecular.....	36

DISCUSIÓN.....	39
CAPÍTULO 2. INVASIÓN DE <i>CHEIRODON INTERRUPTUS</i> (JENYNS, 1842) EN CHILE.....	46
INTRODUCCIÓN.....	46
OBJETIVOS	52
Objetivo general	52
Objetivos específicos.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS	52
Datos de ocurrencia	52
Variables ambientales	55
Nichos climáticos.....	56
Distribuciones potenciales.....	56
RESULTADOS	57
Nichos climáticos.....	57
Distribuciones potenciales.....	59
DISCUSIÓN.....	60
DISCUSIÓN GENERAL	65
BIBLIOGRAFÍA	68
APÉNDICE	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de muestreo para la morfometría tradicional y geométrica. N, número de individuos examinados.....	15
Tabla 2. Matriz de clasificación correcta utilizando las funciones del LDA para morfometría tradicional.	29
Tabla 3. Distancias de Mahalanobis entre especies utilizando morfometría geométrica. Para todas las comparaciones pareadas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$)	31
Tabla 4. Caracteres morfológicos que diferencian las especies de <i>Cheirodon</i> estudiadas utilizando relaciones de extensión de las aletas respecto al origen	36
Tabla 5. Diferencias promedio de bases nucleotídicas dentro y entre las especies estudiadas.	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cladograma del género *Cheirodon* dispuesto sobre los rangos de distribución de las especies. La distribución de *C. kiliani* no está representada. *C. ibicuhiensis* sólo se localiza en la costa atlántica y no ha sido reportada en Chile. Tomado de Dyer (2000).....10
- Figura 2. Mapa de Chile con los códigos de los sitios de muestreo. Los detalles se muestran en la Tabla 1.17
- Figura 3. Plano lateral de *Cheirodon* sp. Las medidas morfológicas tomadas se indican en el texto. La medida Nº 14 (distancia interorbital) no aparece en este esquema. Tomado de Salas et al. (2012).....19
- Figura 4. Plano lateral de *Cheirodon* sp. Los hitos anatómicos definidos se detallan en el texto. Tomado de Salas et al. (2012).21
- Figura 5. Análisis de Componentes Principales utilizando las medidas morfológicas. (A) Gráfico de los dos primeros componentes principales del análisis de morfometría tradicional, los cuales explican el 59.44% de la varianza. (B) Gráfico con la contribución de las variables que explican la varianza de los datos.....26
- Figura 6. Análisis Discriminante Lineal utilizando las medidas morfológicas. (A) Gráfico combinado de las tres funciones discriminantes. Las letras y

colores se refieren a *C. australe* (A en negro), *C. galusdae* (B en rojo), *C. interruptus* (C en verde) y *C. pisciculus* (D en azul). (B) Curvas de densidad con los valores de la primera función discriminante (LD1) para todos los individuos agrupados por especie.28

Figura 7. Morfometría geométrica. Gráfico de los dos primeros componentes principales (relative warps) que explican el 38% de la varianza.....30

Figura 8. Morfometría geométrica. Gráfico de las dos primeras varianzas canónicas que explican el 91.10% de los datos.32

Figura 9. Grillas de transformación comparativas entre las especies estudiadas.33

Figura 10. Árbol Neighbour-Joining (NJ) basado en distancias K2P, utilizando 31 secuencias de COI para las especies de *Cheirodon* identificadas morfológicamente. Los colores hacen referencia a *C. australe* (en gris), *C. galusdae* (en rojo), *C. interruptus* (en verde) y *C. pisciculus* (en azul).40

Figura 11. Representación esquemática de los caracteres relevantes para un fácil reconocimiento de las especies de *Cheirodon*; las respuestas se muestran en la Tabla 4. Tomado de Salas et al. (2012).....43

Figura 12. Localidades de ocurrencia de *C. interruptus* en su rango nativo e introducido (puntos rojos) y ocurrencias de *C. pisciculus* (puntos verdes) según literatura utilizadas para la modelación de nicho ecológico. Se ha omitido los registros del Capítulo 1 (Tabla 1) para facilitar su visualización,

pero se aclara que sí fueron incorporados en los análisis del presente capítulo.54

Figura 13. Nichos ecológicos de las especies de *Cheirodon* en el espacio climático en Chile. Los gráficos (A) y (B) muestran los nichos de las especies con los dos primeros componentes del PCA para *C. pisciculus* y *C. interruptus* en Chile, respectivamente. El sombreado gris muestra la densidad de ocurrencias de las especies. El contorno de líneas sólidas y punteadas muestran el 100% y 50% del ambiente disponible en Chile, respectivamente. (C) La contribución de las variables climáticas en los dos primeros componentes del PCA. Los histogramas (D) y (E) muestran el índice D de solapamiento de nicho observado entre ambas especies (línea roja con diamante) y los nichos simulados (barras grises), para los cuales se calculó la similitud de nicho de *C. interruptus* a *C. pisciculus* (D), y similitud de nicho de *C. pisciculus* a *C. interruptus* (E). Bajo cada histograma se muestra la significancia de los tests.....58

Figura 14. Modelos de distribución de las especies de *Cheirodon* en la zona centro-norte de Chile. (A) Distribución potencial de *C. pisciculus*. (B) Distribución potencial de *C. interruptus* en Chile a partir de las ocurrencias en su rango introducido y (C) a partir de su rango nativo más el introducido.60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
COI	Citocromo oxidasa subunidad I
CVA	Análisis canónico de varianza
DFA	Análisis de función discriminante
ENM	Modelamiento de nicho ecológico
K2P	Kimura 2-parámetros
LDA	Análisis discriminante lineal
NJ	Neighbour joining
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RWA	Análisis relative warp
TPS	Función de placa delgada

RESUMEN

La baja cantidad de caracteres taxonómicos válidos observados para la ictiofauna chilena y la presencia de cuencas hidrográficas aisladas desde hace varios millones de años ha generado dudas sobre el estatus taxonómico de un gran número de especies. El género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characiformes) se encuentra representado en Chile por cuatro especies nativas y una introducida desde Argentina (*C. interruptus*). Estas especies muestran una alta similitud fenotípica que dificulta su identificación. Las especies nativas presentan serios problemas de conservación, por lo que se hace necesario analizar en mayor profundidad la diversidad morfológica y genética dentro del género. Además, considerando que en la zona centro-norte se ha observado un aumento en la distribución de la especie introducida, es importante conocer el rango potencial de establecimiento de esta especie aparentemente invasora.

En el primer capítulo de esta tesis examiné 400 individuos de *Cheirodon*, analizando diferentes medidas morfológicas mediante morfometría tradicional, hitos anatómicos mediante morfometría geométrica, y diferencias genéticas utilizando secuencias parciales del gen mitocondrial *citocromo oxidasa subunidad I* (COI). Por una parte, a partir del análisis genético se obtuvo una separación clara entre un grupo compuesto por todas las especies nativas chilenas y otro grupo con la especie introducida. Por otro lado, los resultados de

morfometría tradicional y geométrica mostraron que las especies presentarían algunas diferencias morfológicas aplicables a su reconocimiento, aun cuando persiste una notoria similitud externa. Estos caracteres morfológicos podrían ayudar al reconocimiento de las especies en terreno de forma simple, lo cual se espera pueda ser puesto a prueba por otros investigadores.

En el segundo capítulo de esta tesis realicé un modelo de nicho ecológico (ENM) para predecir la distribución geográfica potencial de la especie introducida *C. interruptus* en Chile, tomando en cuenta que esta especie estaría compartiendo su distribución con una de las especies nativas (*C. pisciculus*). Los resultados mostraron un alto solapamiento del nicho climático entre la especie nativa (*C. pisciculus*) y la especie introducida (*C. interruptus*).

En esta tesis concluyo, en primer lugar, que el desafío para la conservación del género *Cheirodon*, y en general de la ictiofauna nacional, pasa primero por un buen reconocimiento de las especies utilizando varias aproximaciones metodológicas.

En segundo lugar, respecto a la introducción de especies exóticas, se debe prestar atención a la similitud taxonómica con especies nativas y a los nuevos espacios climáticos que pueden ocupar las especies introducidas y que no se encuentran disponibles en su rango nativo. Así también, se requiere con urgencia actualizar tanto el marco regulatorio como la institucionalidad asociados al ingreso y manejo de peces exóticos al país.

ABSTRACT

The low number of valid taxonomic characters observed for the Chilean fish fauna and the presence of watersheds isolated for several million years ago has raised questions about the taxonomic status of many species. Genus *Cheirodon* (Ostariophysi: Characiformes) is represented in Chile by four native species and one introduced from Argentina (*C. interruptus*). These species show high phenotypic similarity that difficult their identification. Native species present serious conservation problems, so it is necessary to analyze more deeply the morphological and genetic diversity within the genus. Furthermore, considering that in the north-central area has been observed an increased distribution of the introduced species, it is important to know the potential establishment range of this seemingly invasive species.

In the first chapter of this thesis I examined 400 individuals of *Cheirodon*, analyzing different morphological measurements using traditional morphometric, anatomical landmarks using geometric morphometric and genetic differences using partial sequences of mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* (COI) gene. On one hand, from the genetic analysis was obtained a clear separation between a group composed of the Chilean native species and other group with the introduced species. Furthermore, the results of traditional and geometric morphometric showed that species present some morphological differences

applicable to recognition, even though a noticeable external similarity persists. These morphological characters could help species recognition in the field simply, which is expected to be tested by other researchers.

In the second chapter of this thesis I made an ecological niche modelling (ENM) to predict the potential geographic distribution of introduced species *C. interruptus* in Chile, considering that this species would be sharing distribution with one of the native species (*C. pisciculus*). The results showed a high climatic niche overlap between native (*C. pisciculus*) and introduced (*C. interruptus*) species.

In this thesis I conclude, first, that the challenge for the conservation of *Cheirodon* genus, and overall national ichthyofauna, depends of a good recognition of species using several methodological approaches.

Second, regarding the introduction of exotic species, attention must be paid to the taxonomic similarity with native species and to new climatic spaces that can occupy introduced species that are not available in their native range. Also, it is required to update both the regulatory framework and the institutions associated with entrance and management of exotic fish.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fauna íctica de aguas continentales de Sudamérica se compone principalmente de peces de los órdenes Siluriformes y Characiformes (Moyle & Cech 1995). Constituye una fauna altamente endémica, cuya diferenciación en el Terciario se habría producido desde las latitudes más tropicales a las más australes (Vila et al. 2006), y también en un sentido longitudinal este-oeste con el levantamiento de la Cordillera de los Andes durante los últimos 20 Ma (Albert & Reis 2011, Quezada-Romegialli 2014).

Con cerca de 1.100 especies en el mundo, la familia Characidae representa el 58% del orden Characiformes (Nelson 2006). Sus representantes habitan la mayoría de los sistemas límnicos de América Central y del Sur. En Chile, la familia se encuentra representada por cuatro especies del género *Cheirodon* Girard, las cuales se distribuyen de norte a sur: *Cheirodon pisciculus* Girard 1855 desde el río Huasco al río Rapel, *C. galusdae* Eigenmann 1927 desde el río Maule al río Imperial, *C. australe* Eigenmann 1927 desde el río Valdivia a la Isla de Chiloé, y *C. kiliani* Campos 1982, junto con *C. australe* desde el lago Lanalhue al río Valdivia (Dyer 2000, Habit et al. 2006).

Todas las especies de *Cheirodon* chilenas ("pochas") están listadas con problemas de conservación. Por Decreto Supremo N° 51 (MINSEGPRES 2008)

se determinó que las especies *C. australe*, *C. galusdae* y *C. pisciculus* se encuentran en categoría "Vulnerable" en todo el país. *C. kiliiani* se clasifica como "En Peligro y Rara" debido a su distribución restringida (MMA 2014), pero cabe aclarar que no existen nuevos registros de captura desde la descripción de Hugo Campos en 1982 (Möller 2008, Peredo-Parada et al. 2009, GESAM 2014).

Además de las cuatro especies nativas, se lista *Cheirodon interruptus* (Jenyns, 1842) ("mojarrita" en Argentina) como el quinto representante del género en Chile. Esta especie fue introducida, presumiblemente de forma accidental, desde Argentina en la década de 1960 junto con larvas del pejerrey argentino *Odontesthes bonariensis*, en el Lago Peñuelas y el río Aconcagua (Campos 1982, Malabarba 1994). No obstante, se desconoce el impacto de su introducción sobre la distribución original de la especie nativa *C. pisciculus* (Dyer 2000) o de las otras especies de *Cheirodon* en el país.

Respecto a la taxonomía dentro del género *Cheirodon*, diversos autores coinciden en que su clasificación es compleja (revisión en Malabarba 1998). La identificación de las especies es difícil debido a que se presenta una alta similitud en la morfología externa de las especies. En efecto, tal como se ha documentado para Chile, poblaciones presentes en las cuencas de los ríos Maule, Biobío, Imperial, Cautín, entre otras, y aquellas entre los ríos Huasco y Aconcagua no han sido satisfactoriamente definidas, pues presentan estados intermedios en los caracteres diagnósticos de *C. galusdae* y *C. australe*, y de *C. pisciculus* y *C. interruptus*, respectivamente (Campos 1982, Malabarba 1994).

En estas poblaciones geográficamente vecinas la combinación de caracteres diagnósticos se hace difusa y los individuos no pueden ser identificados fácilmente (Campos 1982). Esta situación tiene mayor importancia para la conservación en el caso de *C. pisciculus* (nativa) y la detección de la presencia de *C. interruptus* (introducida), pues ambas especies presentarían un rango de distribución similar en la zona centro-norte del país.

Cuando se comparan las descripciones taxonómicas del género (Eigenmann 1927, Campos 1982) se observa una importante sobreposición de los caracteres morfológicos utilizados. Esta sobreposición es evidente en caracteres como el número de cúspides dentarias, escamas predorsales y rayos prorrecurrentes del pedúnculo caudal (Campos 1982).

Históricamente, la falta de una adecuada clasificación taxonómica y la dificultad de utilizar distintos caracteres morfológicos para identificar las especies son dos razones que frecuentemente dificultan el manejo de especies con problemas de conservación, especialmente en el caso de *Cheirodon* donde además se presenta una especie introducida congénérica. Experiencias internacionales indican que estas incertezas sistemáticas pueden provocar la aplicación de medidas de protección erróneas, con dramáticas consecuencias para las especies amenazadas (Frankham et al. 2002, Fratini et al. 2005).

Una investigación en nuestro laboratorio (Salas et al. 2012) mostró que aun cuando existe similitud fenotípica, las especies de *Cheirodon* podrían ser reconocidas externamente utilizando relaciones morfológicas basadas en

morfometría geométrica, una aproximación estadística utilizada en peces chilenos (e.g. Pardo et al. 2005).

Sin embargo, las diferencias morfométricas encontradas por Salas et al. (2012) no pueden ser asociadas a patrones de divergencia históricas ni ecológicas. Por ello, se sugirió ampliar la caracterización de las especies de *Cheirodon* respecto a la divergencia temporal y/o espacial que explicaría el patrón de formas y biogeografía del género (Dyer 2000, Salas et al. 2012).

Al respecto, un importante antecedente para abordar este problema es el estudio de la diversidad genética a lo largo del rango geográfico del género. Este análisis, además, reviste especial relevancia considerando que gran parte de la ictiofauna chilena presenta problemas de conservación (Habit et al. 2006), por cuanto es útil para establecer futuras medidas de protección. Por lo demás, históricamente se ha utilizado una aproximación estrictamente morfológica para los estudios taxonómicos, por lo que una combinación de este tipo de análisis con estudios genéticos puede entregar mejores argumentos para generar planes de conservación efectivos.

En el caso del género *Cheirodon*, la mayoría de los estudios genéticos han utilizado sólo una especie del género. Por ejemplo, Calcagnotto et al. (2005), Javonillo et al. (2010), Oliveira et al. (2011), Rosso et al. (2012) y Mariguela et al. (2013) analizan solo a *C. interruptus*. En el caso de las especies chilenas, sólo se cuenta con el trabajo de Victoriano (1997) quien analiza la variabilidad de alozimas en *C. galusdae*.

Así también, en el caso de la especie introducida *C. interruptus*, se requiere analizar su rango de distribución actual y su relación con la aparente reducción del rango geográfico de *C. pisciculus* (Dyer 2000, Habit et al. 2006), para lo cual una primera aproximación puede ser el modelamiento de los nichos ecológicos (ENM). Estos modelos se basan en métodos correlativos que utilizan asociaciones entre variables ambientales y registros de ocurrencia conocidos de especie(s) para predecir áreas potenciales donde probablemente se establezca(n) (Guisan & Thuiller 2005, Elith et al. 2006).

En consecuencia, considerando que existe una escasa bibliografía de *Cheirodon* utilizando técnicas moleculares, y que no existen estudios sobre el proceso de introducción de *C. interruptus* en Chile, la identificación de grupos morfológica y genéticamente divergentes resulta un paso fundamental para el éxito de cualquier esfuerzo en la conservación del género.

Por lo tanto, los objetivos generales planteados en esta tesis son:

- i) Analizar las diferencias morfológicas y genéticas entre poblaciones de *Cheirodon* provenientes de diferentes cuencas hidrográficas.
- ii) Comparar los nichos climáticos de *C. pisciculus* y *C. interruptus*, y predecir la distribución potencial de *C. interruptus* en Chile.



HIPÓTESIS

Antecedente 1

Considerando que las especies de *Cheirodon* en Chile tienen una alta similitud morfológica y una distribución alopátrica, se espera que:

Hipótesis 1

Existan unidades morfológicas y genéticas que se relacionen con las especies descritas y su extensión geográfica.

Antecedente 2

Dado que los antecedentes bibliográficos sugieren una disminución del rango de distribución de la especie nativa *C. pisciculus* y un aumento del rango de la especie introducida *C. interruptus* en la zona centro-norte de Chile, se espera que:

Hipótesis 2

Los nichos climáticos de ambas especies se superpongan y que la distribución potencial de *C. interruptus* abarque el rango de *C. pisciculus*.

Considerando los antecedentes e hipótesis presentados anteriormente, en esta tesis se han desarrollado dos capítulos:

Capítulo 1: Diferenciación morfológica y genética del género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characiformes) en Chile

A partir de ejemplares recolectados a lo largo del rango de distribución del género en Chile se utilizaron métodos morfológicos, morfométricos y genéticos con el objetivo de encontrar grupos de organismos que se relacionen *a posteriori* con las especies descritas por Campos (1982).

Capítulo 2: Invasión de *Cheirodon interruptus* (Jenyns, 1842) en Chile

A partir de registros de ocurrencia de los carácidos presentes en la zona centro-norte de Chile (*C. pisciculus* y *C. interruptus*) combinados con información ambiental, se generaron modelos de nicho ecológico (ENM) con los objetivos de determinar el grado de sobreposición de los nichos climáticos entre ambas especies y el rango de distribución potencial de la especie introducida en Chile.

CAPÍTULO 1. DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DEL GÉNERO *CHEIRODON* (OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES) EN CHILE

INTRODUCCIÓN

En Chile la familia Characidae (Ostariophysi: Characiformes) se encuentra representada por cuatro especies del género *Cheirodon* ("pochas"), distribuidas de norte a sur: *Cheirodon pisciculus* desde el río Huasco al río Rapel, *C. galusdae* desde el río Maule al río Imperial, *C. australe* desde el río Valdivia a la Isla de Chiloé, y *C. kiliani*, especie rara, localizada junto con *C. australe* desde el lago Lanalhue al río Valdivia (Campos 1982, Dyer 2000).

Estas especies son típicas de los remansos de los ríos y las zonas costeras bajas de los lagos (Campos 1970), por cuanto se les encuentra preferentemente cerca de la orilla, en la zona superficial de los cursos de agua, sobre sustratos compuestos de fango, arena, grava y/o rocas. Tienden a formar cardúmenes que se establecen en zonas de poca profundidad, en estrecho contacto con la vegetación acuática (Ruiz & Marchant 2004). Se alimentan principalmente de comunidades de microalgas epilíticas (auwfuchs) (Vila et al. 1999), aunque estudios de contenido estomacal en especímenes de *C. galusdae* y *C. pisciculus* indican que no se alimentan exclusivamente de perifiton, sino que pueden ser peces típicamente carnívoros, consumiendo

diversos taxa de insectos y crustáceos pequeños (Fischer 1963, De La Hoz & Aldunate 1985, Aldunate & De La Hoz 1993, Ruiz 1993).

Todas las especies de *Cheirodon* están listadas con problemas de conservación, debido principalmente a la fragmentación de hábitat y modificación de los cursos de agua por efecto antrópico, como son la construcción de represas, centrales hidroeléctricas, canalización, contaminación por residuos industriales e introducción de especies exóticas (Campos et al. 1998, Habit et al. 2006). De acuerdo al Decreto Supremo N° 51 (MINSEGPRES 2008) las especies *C. australe*, *C. galusdae* y *C. pisciculus* se encuentran listadas en la categoría "Vulnerable" en todo el país, y *C. kiliani* como "En Peligro y Rara", debido a su distribución restringida y los escasos antecedentes que se disponen sobre ella (Möller 2008, Peredo-Parada et al. 2009).

Además de las cuatro especies nativas antes mencionadas, se lista *C. interruptus* como el quinto representante del género en Chile. Esta especie fue introducida accidentalmente desde Argentina en la década de 1960 (Arratia 1978, Campos 1982, Malabarba 1994), junto con larvas del pejerrey argentino *Odontesthes bonariensis*. De hecho, los primeros registros de *C. interruptus* en Chile corresponden al Lago Peñuelas, un embalse artificial donde *O. bonariensis* aparentemente fue cultivado por primera vez (Riegel 1960).

Las cinco especies de *Cheirodon* forman un grupo monofilético y sus relaciones filogenéticas fueron estudiadas por Malabarba (1994) usando caracteres morfológicos, cuyos resultados coinciden con el dendrograma de

relaciones fenéticas presentado por Campos (1982) y que fueron tratados someramente por Dyer (2000) como una hipótesis biogeográfica (Figura 1).

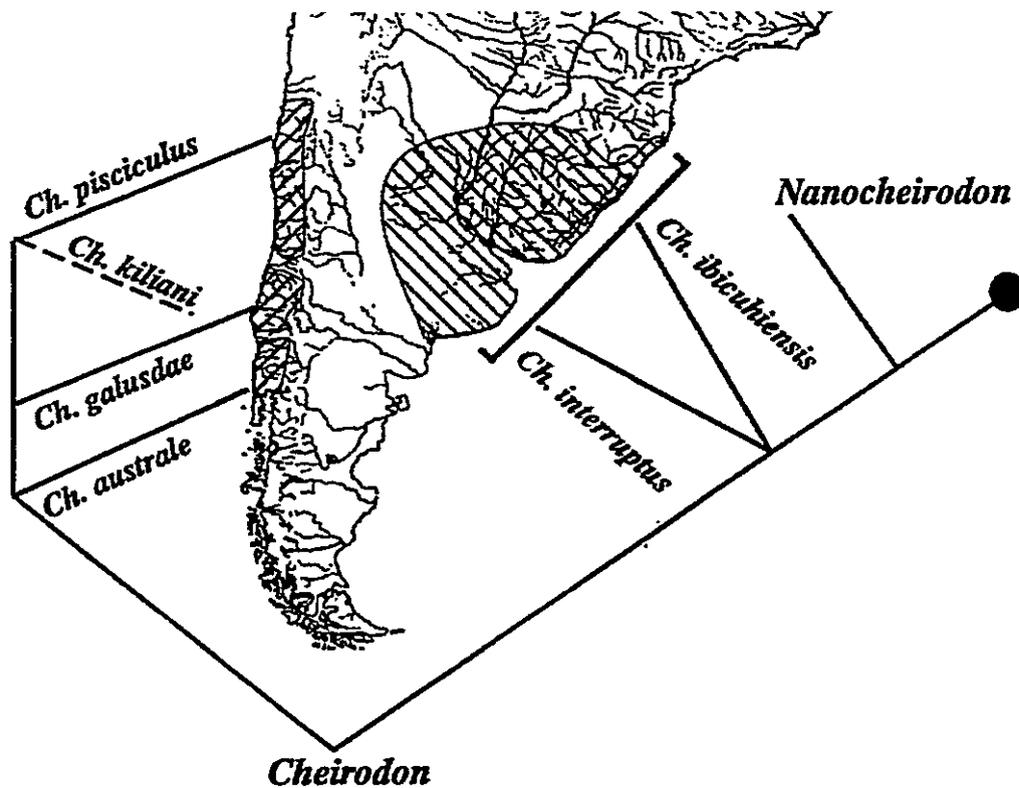


Figura 1. Cladograma del género *Cheirodon* dispuesto sobre los rangos de distribución de las especies. La distribución de *C. kiliani* no está representada. *C. ibicuiensis* sólo se localiza en la costa atlántica y no ha sido reportada en Chile. Tomado de Dyer (2000).

No obstante, poblaciones de *Cheirodon* presentes en la cuenca del río Biobío y entre los ríos Huasco y Aconcagua no han sido satisfactoriamente definidas, pues presentan estados intermedios en los caracteres diagnósticos de *C. galusdae* con *C. australe*, y de *C. pisciculus* con *C. interruptus* (Malabarba 1994).

Una aproximación metodológica para esclarecer la distinción taxonómica de las especies es la morfometría, que estudia la variación de la forma y su covarianza con otras variables (Bookstein 1991). Dentro de esta disciplina, la morfometría clásica o tradicional combina la estadística multivariada y la morfología cuantitativa, analizando la covarianza entre variables como longitudes, anchos y alturas (Adams et al. 2004). La morfometría geométrica, por otro lado, captura información adicional a la morfometría tradicional, pues permite estudiar la geometría de las estructuras de interés (Zelditch et al. 2004, Slice 2007). Esta última técnica ha incentivado el desarrollo de procedimientos estadísticos que permiten evaluar la cantidad de diferencia entre las conformaciones morfométricas y que facilitan la representación gráfica de los resultados (Bookstein 1991, Rohlf & Marcus 1993, Slice 2007).

Alternativamente, diferentes técnicas moleculares han sido desarrolladas para complementar la determinación morfológica de las especies y/o la presencia de poblaciones aisladas de una misma especie (Parson et al. 2000, Hebert et al. 2003, Wiens & Penkrot 2003, DeSalle et al. 2005, Rubinoff 2006). Diversos marcadores moleculares han sido utilizados para diferenciar especies de peces, ya que tienden a mostrar patrones filogenéticos claros y guardan relación con la historia de los cursos fluviales (Johns & Avise 1998, Avise 2000, Ward et al. 2005, Schlei et al. 2008, Rosso et al. 2012). En particular, el gen mitocondrial *citocromo c oxidasa subunidad I* (COI) ha sido ampliamente utilizado para el análisis y comparación de grupos taxonómicos, donde las

distancias genéticas entre las secuencias nucleotídicas pueden ser usadas para determinar la divergencia dentro y entre las especies (Kartavtsev & Lee 2006). Así también, el gen COI ha sido utilizado en peces dulceacuícolas, donde se ha evidenciado su utilidad en la identificación de especies en correspondencia con la morfología (Ward et al. 2005, Schlei et al. 2008, Lara et al. 2010, Rosso et al. 2012).

En este primer capítulo, ampliando el número de especímenes utilizados por Salas et al. (2012), se evalúa la utilidad de la morfometría geométrica para la diferenciación externa de los individuos, como un complemento práctico a las medidas morfológicas tradicionales. Además, usando secuencias parciales de ADN mitocondrial (gen COI), se evalúa cómo se distribuye la diversidad genética a lo largo del rango de distribución del género.

El estudio presentado en este capítulo tiene el propósito de facilitar la identificación de especímenes en nuevas investigaciones, como por ejemplo aquellas conducentes a esclarecer el patrón actual de distribución e historia biogeográfica del género (Dyer 2000, Salas et al. 2012). Además, un correcto reconocimiento en terreno es fundamental si se quiere aprender sobre la ecología del grupo y desarrollar planes de conservación efectivos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar las diferencias morfológicas y genéticas entre poblaciones de *Cheirodon* provenientes de diferentes cuencas hidrográficas.

Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente los individuos siguiendo las descripciones de Campos (1982).
- Caracterizar morfométricamente los individuos de *Cheirodon* utilizando morfometría tradicional y geométrica.
- Caracterizar la diversidad genética del género *Cheirodon* a lo largo del rango de distribución en Chile utilizando el gen mitocondrial COI.
- Deteminar la existencia de unidades genéticas y su correspondencia con las unidades morfológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se utilizaron 400 individuos provenientes de 46 localidades de muestreo, correspondientes a las especies nativas *C. australe*, *C. galusdae* y *C. pisciculus* y la especie introducida *C. interruptus*, identificadas según las descripciones de Campos (1982), y que comprenden el rango de distribución del género en Chile (Tabla 1, Figura 2). Sólo se utilizaron ejemplares adultos (>2,5 cm de longitud total). Dado que en *Cheirodon* no hay dimorfismo sexual externo (Arratia 1987) no se realizaron análisis separados por sexo.

Se analizaron 55 ejemplares de *C. australe* provenientes de las cuencas de los ríos Cautín, Cruces, Valdivia, Callecalle, Petrohué y Maullín, 113 individuos de *C. galusdae* de las cuencas de los ríos Mataquito, Maule, Itata, Andalién, Biobío y Renaico, 116 individuos de *C. pisciculus* de las cuencas de los ríos Aconcagua, Maipo, Yali y Cachapoal, y 116 individuos de *C. interruptus* provenientes desde la cuenca del río Limarí hasta el río Andalién.

Tabla 1. Localidades de muestreo para la morfometría tradicional y geométrica. N, número de individuos examinados.

Localidad/Estación	Código	Cuenca	Longitud O	Latitud S	N
Río Paloma 5	PAL	Limari	-71.048	-30.690	3
Río Cogoti 6	COG	Limari	-71.048	-30.937	15
Río Illapel	ILL	Choapa	-71.032	-31.585	5
Río Choapa	CHP	Choapa	-71.337	-31.648	5
Río Choapa 101	CHP1	Choapa	-71.097	-31.762	5
Estero Camisas 4	CAM	Choapa	-70.922	-31.903	6
Estero Puchuncavi	PCH	Aconcagua	-71.432	-32.750	3
Río Aconcagua Sn Fco.	ACO	Aconcagua	-70.912	-32.797	15
Estero Marga Marga	EMM	Aconcagua	-71.494	-33.057	7
Lago Penueles	PEN	Aconcagua	-71.542	-33.148	38
Puangué Colliguay	CGY	Maipo	-71.173	-33.181	1
Puangué E2	PUA	Maipo	-71.116	-33.285	17
Estero El Sauce	EES	Maipo	-71.615	-33.609	8
Estero El Yali	YAL	Yali	-71.653	-33.824	10
Estero Maitenlahue	MTL	Maipo	-71.688	-33.900	10
Estero Alhue	ALH	Cachapoal	-71.097	-34.026	18
Río Cachapoal	SJ	Cachapoal	-70.970	-34.456	9
Estero Rigolemo	RIG	Cachapoal	-70.969	-34.458	10
Estero Limahue	LMH	Cachapoal	-70.905	-34.466	3
Estero Zamorano	RPL	Cachapoal	-70.964	-34.483	12
Nilahue 1 104	NLH1	Cachapoal	-71.968	-34.536	6
Nilahue 2 103	NLH2	Cachapoal	-71.682	-34.714	3

Localidad/Estación	Código	Cuenca	Longitud O	Latitud S	N
Estero La Fortaleza	FOR	Cachapoal	-71.595	-34.717	14
Río Mataquito	MAT	Mataquito	-71.873	-34.992	5
Huenschullami 101	HUE	Maule	-71.988	-35.194	20
Maule 2 201	MAU2	Maule	-72.101	-35.439	8
Río Maule	MAU1	Maule	-72.020	-35.446	8
Río Bullileo	BUL	Maule	-71.415	-36.282	2
Río Lonquen	LQN	Itata	-72.346	-36.361	12
Río Niblinto	NBL	Itata	-71.762	-36.647	1
Río Andalién	AND	Andalien	-72.948	-36.797	7
Estero Palomares	PLM	Andalien	-72.995	-36.821	27
Estero Nonguén	ENN	Andalien	-73.005	-36.834	5
Río Claro	RCL	Andalien	-72.523	-37.009	17
Río Itata	ITA	Itata	-72.182	-37.054	4
Río Quilque	QUQ	Biobio	-72.343	-37.464	1
Río Biobío	BB	Biobio	-72.267	-37.611	3
Río Bureo	BUR	Biobio	-72.214	-37.734	1
Río Renaico	REN	Renaico	-72.142	-37.953	1
Estero Pichitemuco	BTH	Cautin	-72.606	-38.710	4
Río Cruces	LCO	Cruces	-72.776	-39.447	2
Estero Leña Seca	ELS	Valdivia	-73.199	-39.832	6
Río Callecalle	CC	Callecalle	-73.211	-39.816	1
Río Petrohué	PTH	Petrohue	-72.357	-41.368	22
Río Cebadal	CEB	Mauillin	-73.415	-41.615	9
Río Tambor	TAM	Mauillin	-73.299	-41.644	11

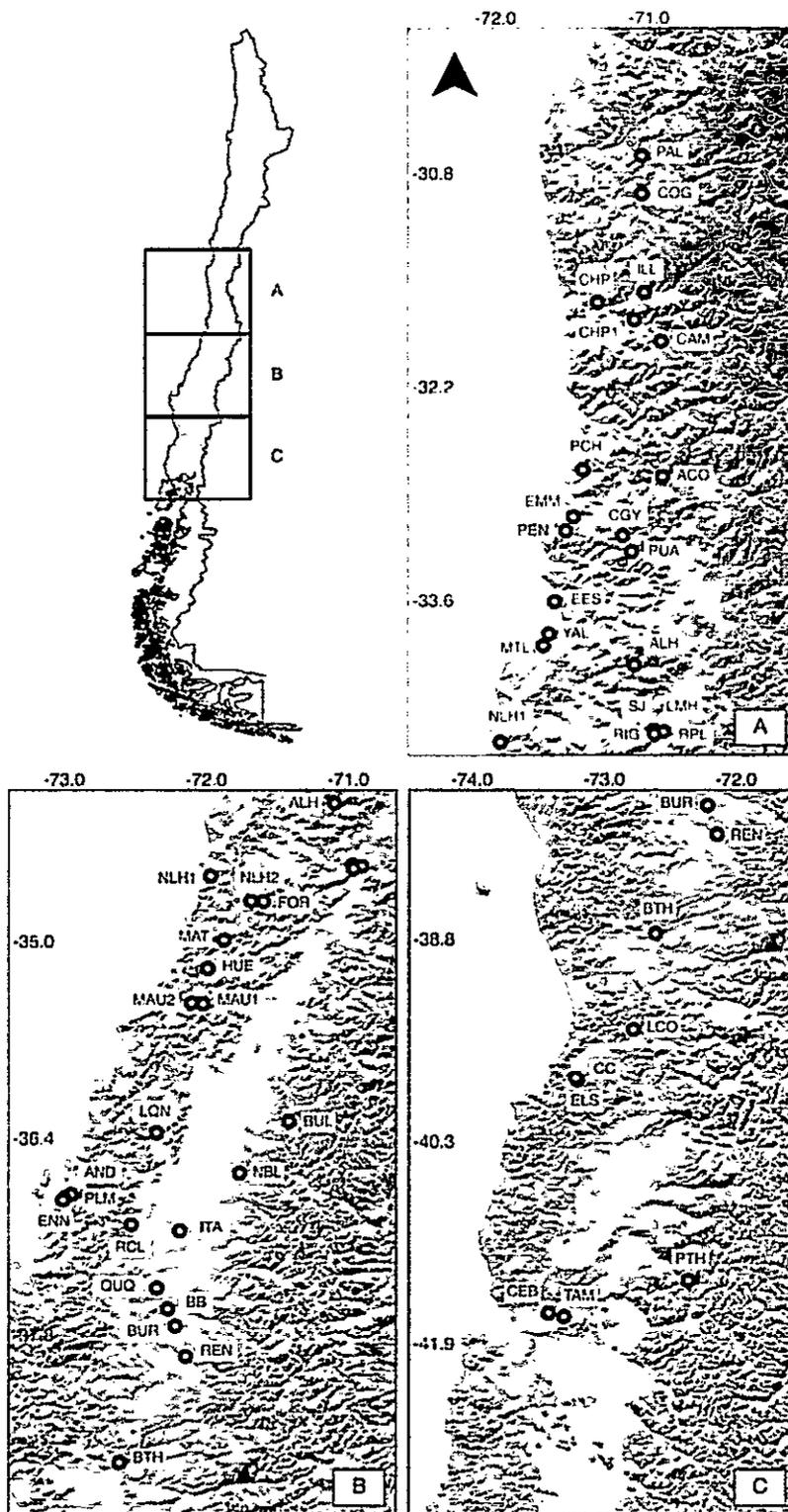


Figura 2. Mapa de Chile con los códigos de los sitios de muestreo. Los detalles se muestran en la Tabla 1.

El material biológico se obtuvo con pesca eléctrica de bajo impacto durante los años 2008-2013 y fijado en etanol 95%. Para todas las colectas se contó con los permisos de pesca de investigación respectivos, otorgados por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Chile).

Morfometría tradicional

De cada ejemplar se obtuvieron 14 medidas morfológicas (estandarizadas por la longitud estándar) usando un vernier electrónico de precisión 0.01 mm. Las medidas tomadas fueron: (1) longitud total (LT), (2) longitud estándar (LS), (3) longitud predorsal (Pre.D), (4) longitud prepectoral (Pre.Pec), (5) longitud prepélvica (Pre.Pel), (6) longitud preanal (Pre.A), (7) altura del cuerpo (Alt.cpo), (8) altura pedúnculo caudal (Alt.PC), (9) longitud pedúnculo caudal (L.PC), (10) longitud preocular (Pre.O), (11) diámetro horizontal del ojo (Diam.O), (12) longitud cabeza (L.cab), (13) altura de la cabeza (Alt.cab) y (14) distancia interorbital (Inter.O) (Figura 3).

Con la matriz obtenida se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para establecer los patrones de variación morfológica entre las cuatro especies e identificar aquellas medidas que contribuyen a la distinción de grupos dentro del espacio multivariado. Un valor umbral de λ (eigenvalue) > 1 fue utilizado para determinar los factores relevantes que explican la mayoría de la varianza observada.

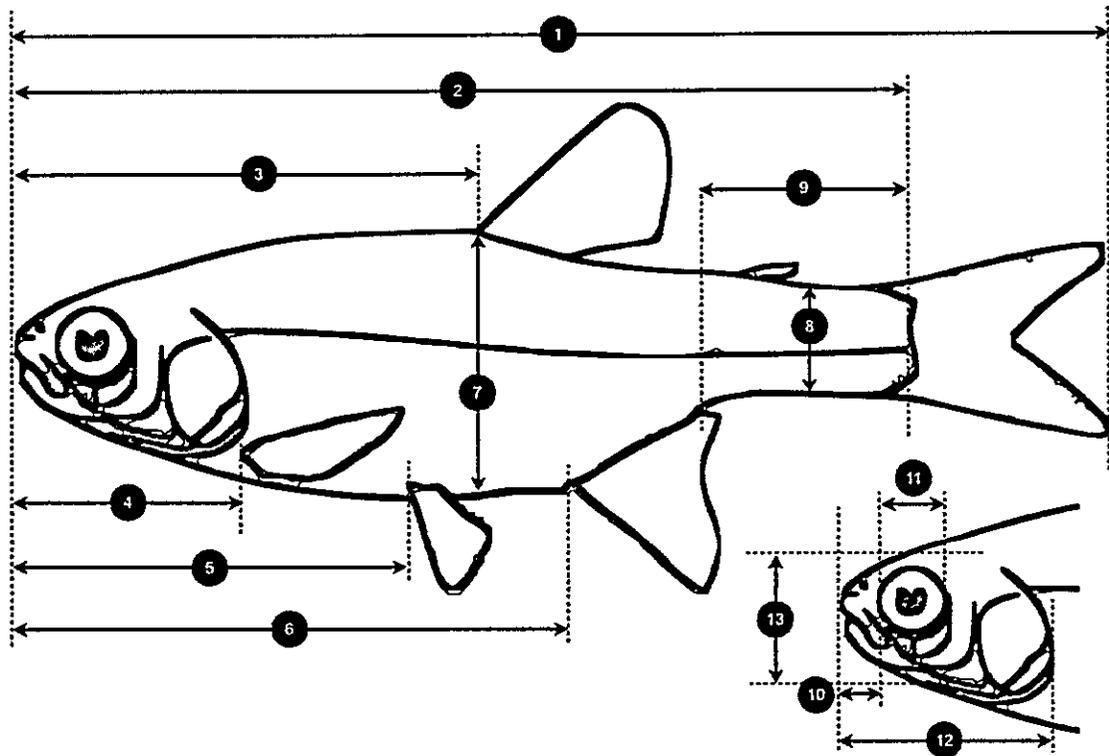


Figura 3. Plano lateral de *Cheirodon* sp. Las medidas morfológicas tomadas se indican en el texto. La medida N° 14 (distancia interorbital) no aparece en este esquema. Tomado de Salas et al. (2012).

Se realizó un Análisis Discriminante Lineal (LDA) para determinar el nivel de discriminación del conjunto de caracteres utilizados y para evaluar su posibilidad de ser utilizados en la identificación de ejemplares recolectados desde otras localidades.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computacional R versión 3.1.2 (R Core Team 2015), siguiendo los pasos prácticos que se presentan en el Apéndice al final de esta tesis.

Morfometría geométrica

Los individuos analizados fueron fotografiados en vista lateral con una cámara de alta resolución (Canon PowerShot SX 150 IS). A partir de las imágenes obtenidas se definió la ubicación de 17 hitos anatómicos, atendiendo que la selección describiera aquellas estructuras de interés para identificar externamente los individuos (Salas et al. 2012): (1) hocico, (2) proyección anterior de la primera abertura nasal, (3) supraoccipital, (4) inicio y (5) término de la aleta dorsal, (6) inicio de la aleta adiposa, (7) extremo dorsal y (8) ventral del pedúnculo caudal, (10) inicio y (9) término de la aleta anal, (12) inicio y (11) término de la aleta pélvica, (13) sínfisis mentoniana, (14) origen aleta pectoral, (15) división opérculo-subopérculo, (16) origen opérculo y (17) centro interior del ojo (Figura 4). La digitalización de los hitos se realizó con los programas computacionales tpsUtil versión 1.46 y tpsDig2 versión 2.16 (Rohlf 2015).

Los hitos anatómicos fueron convertidos en coordenadas de forma mediante una superimposición de Procrusto con el programa MorphoJ (Klingenberg 2010). Este procedimiento remueve la información de localización y orientación de las coordenadas originales, y estandariza cada espécimen a su centroide. Los resultados de la superimposición son analizados con la función de placa delgada o thin-plate spline (TPS), con el objetivo de ilustrar de manera gráfica el grado de deformación necesaria para que hitos de una especie coincidan con los de otra (Bookstein 1991). Luego, las coordenadas Procrusto de los especímenes (*partial warps*) fueron analizadas mediante un Análisis

Relative Warp (RWA) usando el programa MorphoJ. El RWA es análogo a un Análisis de Componentes Principales (PCA), siendo los *relative warps* los componentes principales de las variables de forma y reflejando los patrones generales de variación entre las especies (Rohlf & Marcus 1993).

La significancia de las diferencias de forma fue examinada a través de un Análisis de Función Discriminante (DFA) y un Análisis Canónico de Varianza (CVA), realizados sobre la matriz de *partial warps* en MorphoJ. El DFA es un análisis discriminante que comienza con un agrupamiento inicial definido, y determina cuántos descriptores cuantitativos pueden explicar eficientemente este agrupamiento, mientras que el CVA identifica aquellos atributos de forma que mejor distinguen a los grupos definidos *a priori*.

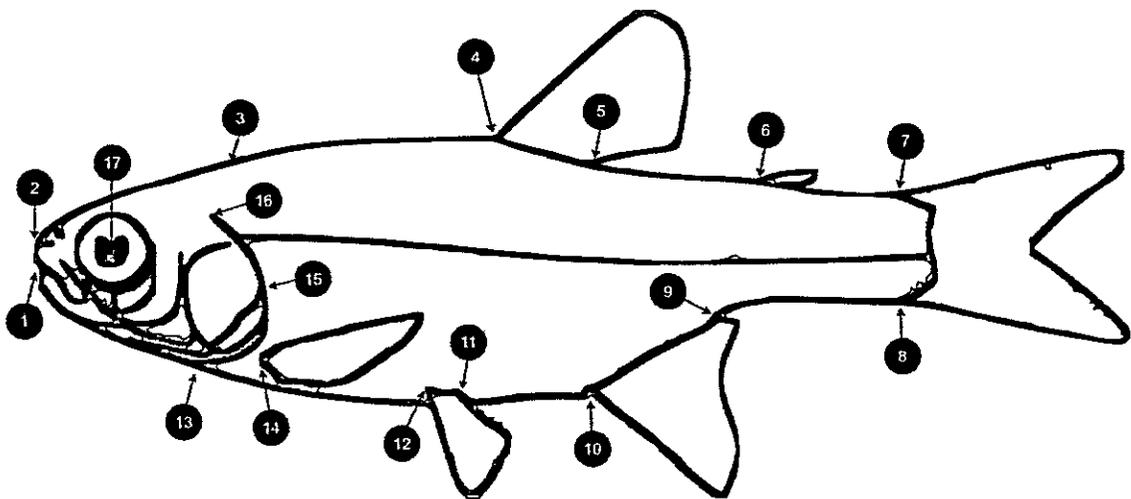


Figura 4. Plano lateral de *Cheirodon* sp. Los hitos anatómicos definidos se detallan en el texto. Tomado de Salas et al. (2012).

Todos los análisis de morfometría geométrica fueron realizados en el programa computacional MorphoJ versión 1.05 (Klingenberg 2010).

Análisis molecular

Extracción, amplificación, secuenciación y edición de secuencias parciales de ADN mitocondrial

Se obtuvo ADN genómico usando el método de extracción salino (Aljanabi & Martínez 1997) a partir de tejido de especímenes preservados en etanol. Se utilizó un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) para medir la concentración y pureza de las muestras extraídas. Para aquellas muestras con concentraciones de ADN subóptimas (<50 ng/μL), se realizaron extracciones con tejido nuevo utilizando distintos kits comerciales (QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit, Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit y Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit). Luego, el ADN extraído fue almacenado a -20°C en 50 μL de agua nanopura hasta su procesamiento.

Secuencias parciales del gen mitocondrial *citocromo oxidasa subunidad I* (COI) fueron amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando combinaciones de los cuatro primers descritos por Ward et al. (2005) y alternativamente usando los partidores universales de Folmer et al. (1994).

Se probó la amplificación con la mayoría de los 400 ejemplares utilizados en este capítulo. Sin embargo, el diseño de este estudio consideraba una categorización previa que requería al menos de 12 individuos por cuenca (para *C. galusdae* y *C. interruptus*) y 16 individuos por cuenca (para *C. australe* y *C. pisciculus*), para obtener un total óptimo de 196 secuencias distribuidas entre las cuatro especies.

Para todas las amplificaciones, la reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 μL y que corresponde a 2.5 μL buffer PCR 10X (50 mM KCL, 10mM tris-HCL, pH 8), 1.6 μL MgCl_2 50mM, 1.5 μL del partidor forward 50 ng/ μL , 1.5 μL del partidor reverse 50 ng/ μL , 2.0 μL dNTPs 2.5 mM, 12.6 μL H_2O y 0.3 μL Taq polimerasa (Invitrogen). Finalmente, se agregó 3.0 μL de DNA a 50-80 ng/ μL . Las condiciones de amplificación de COI fueron 94° C por 2 min, 35 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 40 s y 72° C por 1 min, con una extensión final de 72° C por 10 min.

Los productos amplificados fueron analizados por el servicio de secuenciación MacroGen Inc. en Corea del Sur (<http://www.macrogen.com>). Posteriormente, las secuencias fueron editadas y alineadas mediante inspección visual utilizando el software BioEdit (Hall, 1999), y luego revisadas usando la plataforma Clustal Omega (Sievers et al. 2011, <http://www.clustal.org/omega/>).

Análisis de la información genética

Para obtener una representación del agrupamiento de haplotipos se construyó un árbol Neighbour-Joining (NJ) con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura et al. 2013), basado en distancias Kimura-2-parámetros (K2P) (Kimura 1980). Para determinar la consistencia del ordenamiento de las ramas se utilizó un bootstrap de 1,000 réplicas. En el mismo programa computacional se determinaron las diferencias promedio de bases dentro y entre especies.

RESULTADOS

Morfometría tradicional

Si bien se tomaron 14 medidas morfológicas (Figura 3) para el análisis de morfometría tradicional se estandarizaron todos los valores en función de la longitud estándar (LS). La longitud total (LT) corresponde al largo del cuerpo desde la punta de la cabeza hasta el rayo más largo de la aleta caudal, pero dado que la calidad de los individuos es distinta (por ejemplo si presentan rayos rotos o maltratados), para todas las muestras no es posible medir correctamente LT. Por lo anterior se prefirió excluir las medidas LT y LS en los análisis, y el resto de medidas fueron estandarizadas por LS.

Preliminarmente, se probó la normalidad de cada variable mediante el test de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$). Luego, se analizaron aquellas variables que estuvieran asociadas entre sí mediante un test de correlación, donde se obtuvo que la longitud prepectoral (Pre.Pec) está altamente correlacionada con la longitud de la cabeza (L.cab) (70.89%) y también con la longitud prepélvica (Pre.Pel) (64.76%).

En el análisis de PCA fueron identificados cuatro ejes de variación principales, los cuales explican en conjunto el 77.51% de la varianza total de los datos. De forma cualitativa, el primer eje posiciona a *C. interruptus* en cuadrantes diferentes a *C. pisciculus*, *C. australe* no presenta asociación con algún componente, mientras que *C. galusdae* se presenta más similar a *C. pisciculus* (Figura 5A).

La mayoría de las variables son importantes dentro de los primeros cuatro componentes, destacando la asociación al primer eje (PC1, 43.29% de la varianza) las variables Pre.Pel, Pre.Pec, Pre.A y Pre.D, y al segundo eje (PC2, 16.16% de la varianza) las variables Alt.cpo y L.PC (Figura 5B).

Si se analiza el segundo (PC2) y tercer eje (PC3, 9.54% de la varianza), se observa una separación entre los ejemplares de *C. interruptus* y *C. pisciculus*, mientras que *C. galusdae* se presenta nuevamente muy similar a *C. pisciculus*, lo que coincide con los resultados de Campos (1982).

Por otro lado, el análisis discriminante lineal (LDA) mostró que las trazas de las tres funciones discriminantes son 0.669, 0.224 y 0.107. Esto quiere decir que la primera función (LD1) alcanza un porcentaje de separación de 66.9%. Respecto a los coeficientes de contribución por variable, se encontró que Alt.cpo, Diam.O e Inter.O son los factores más importantes dentro del primer discriminante, mientras que para la segunda función discriminante los factores más importantes son las variables Alt.PC, Inter.O y y Pre.Pec.



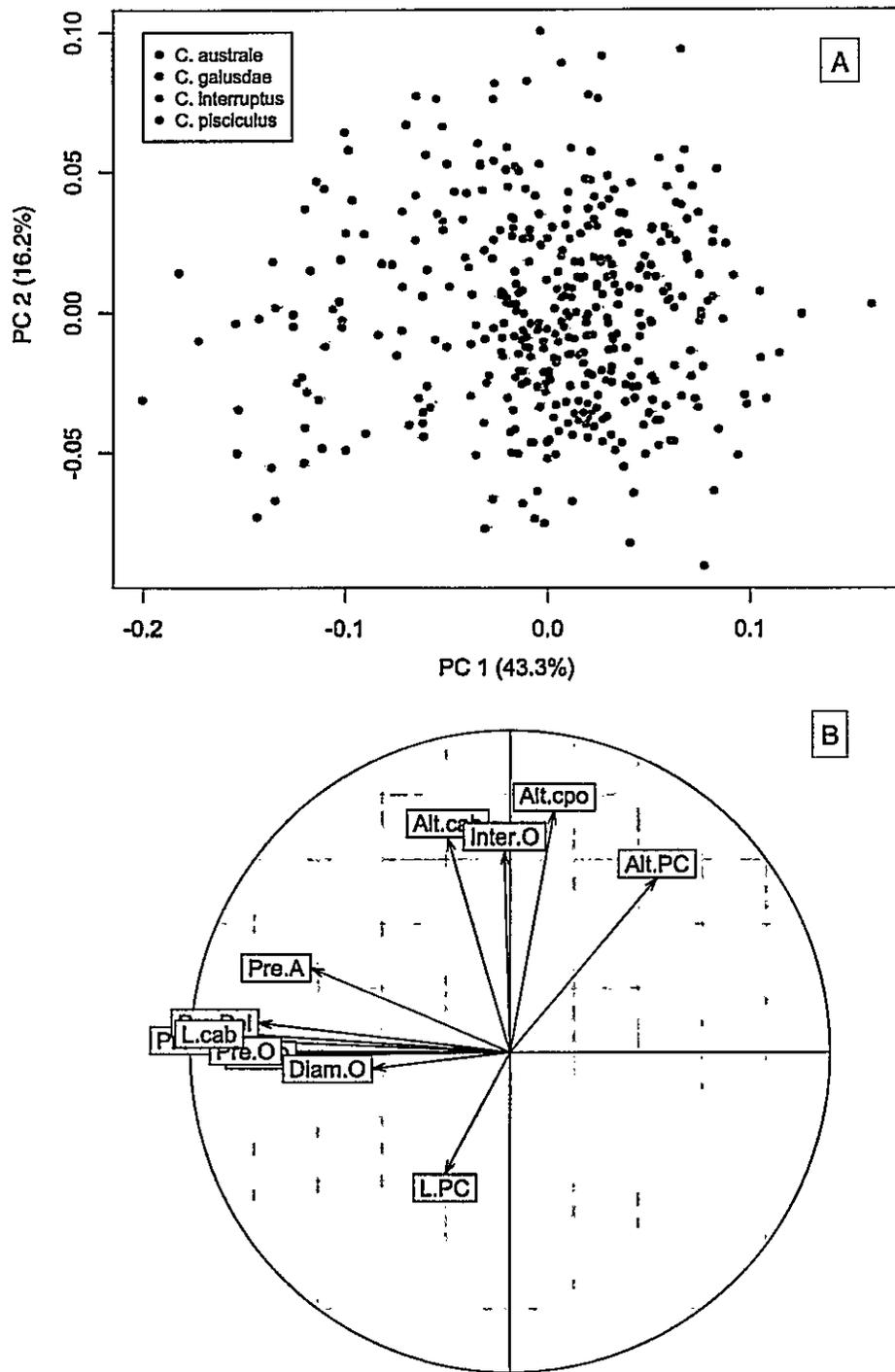


Figura 5. Análisis de Componentes Principales utilizando las medidas morfológicas. (A) Gráfico de los dos primeros componentes principales del análisis de morfometría tradicional, los cuales explican el 59.44% de la varianza. (B) Gráfico con la contribución de las variables que explican la varianza de los datos.

La Figura 6A muestra que el Discriminante Lineal 1 (LD1) separa claramente a *C. interruptus* de *C. pisciculus*, y que LD2 muestra diferencias entre *C. australe* y el resto de especies. Por otro lado, si se analizan los valores (loadings) obtenidos para todos los individuos utilizando la función LD1, se observa que efectivamente se presentan diferencias entre *C. interruptus* y *C. pisciculus*, pero no es posible distinguir a *C. australe* de *C. interruptus*. Por su parte, si bien *C. galusdae* parece diferenciarse de *C. australe* y *C. interruptus*, mantiene su similitud con los ejemplares de *C. pisciculus* (Figura 6B).

Finalmente, en la Tabla 2 se muestra la matriz de clasificación por especie, mostrando que a partir del análisis del LDA es posible clasificar con éxito por sobre el 50% de los individuos.

Sin embargo, ninguno de los dos análisis (PCA y LDA) permitió diferenciar los individuos de *C. australe* del resto de especies. Así también, para cada especie no se obtuvieron asociaciones entre las distintas localidades de muestreo y cuencas hidrográficas, por lo que no se presentan diferencias a nivel intraespecífico que puedan ser asociadas a un componente espacial.

Estos resultados indican que los caracteres asociados a la disposición de las aletas y con proporciones relacionadas con medidas de la cabeza y el pedúnculo caudal pueden ser relevantes para la diferenciación, al menos entre las especies contiguas en sus rangos de distribución.

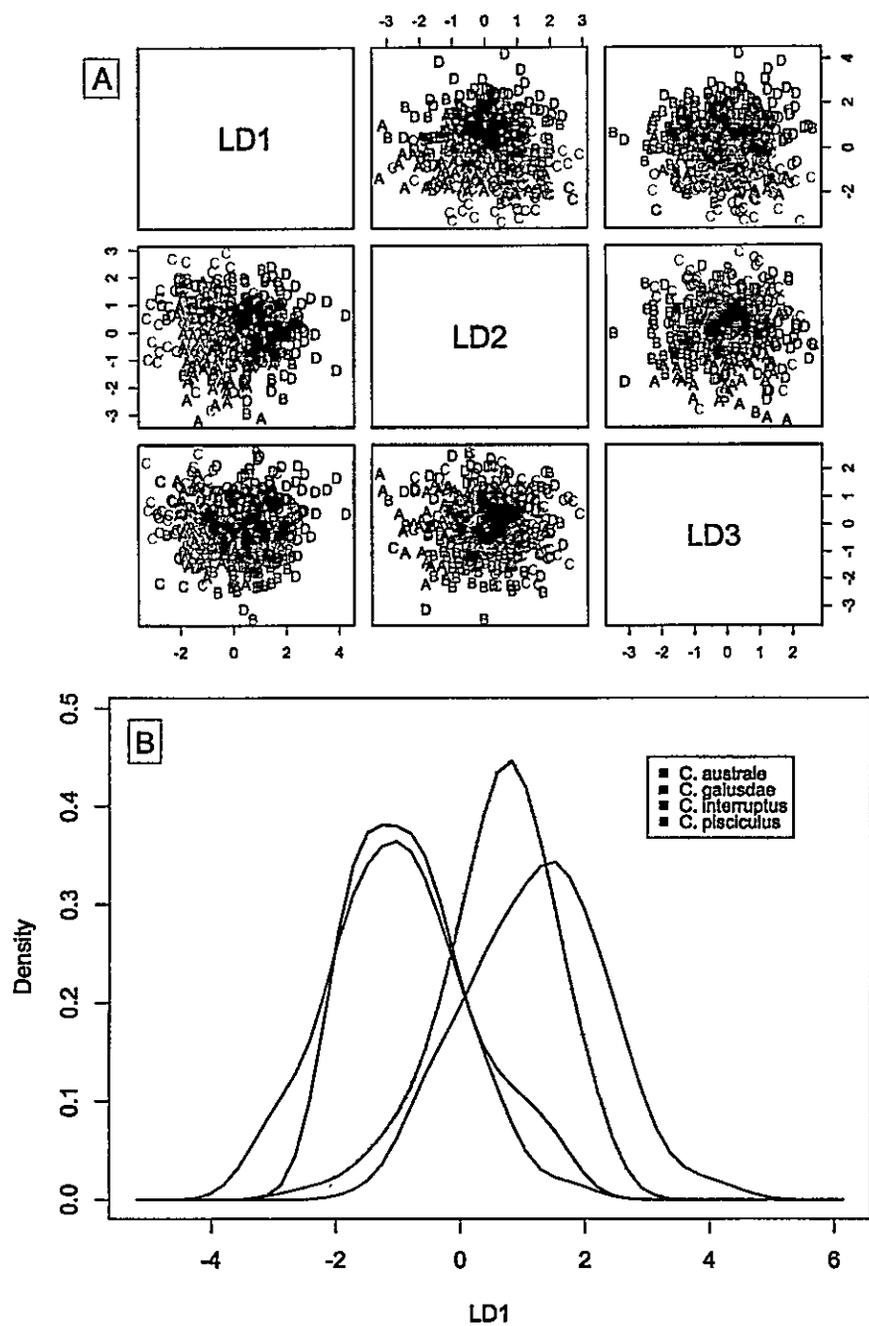


Figura 6. Análisis Discriminante Lineal utilizando las medidas morfológicas. (A) Gráfico combinado de las tres funciones discriminantes. Las letras y colores se refieren a *C. australe* (A en negro), *C. galusdae* (B en rojo), *C. interruptus* (C en verde) y *C. pisciculus* (D en azul). (B) Curvas de densidad con los valores de la primera función discriminante (LD1) para todos los individuos agrupados por especie.

Tabla 2. Matriz de clasificación correcta utilizando las funciones del LDA para morfometría tradicional.

Especie	<i>C. australe</i>	<i>C. galusdae</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. pisciculus</i>
<i>C. australe</i>	63.64	6.19	18.97	12.93
<i>C. galusdae</i>	10.91	58.41	6.90	15.52
<i>C. interruptus</i>	20.00	8.85	66.38	6.90
<i>C. pisciculus</i>	5.45	26.55	7.76	64.65

Morfometría geométrica

Preliminarmente, se realizó una prueba de aproximación al espacio tangente utilizando el programa tpsSmall (Rohlf 2015). La pendiente de la regresión de las distancias Euclidianas en el espacio tangente dentro del espacio de las distancias de formas Procrusto fue 0.999215 con una correlación de 1.000. Por tanto, la aproximación es óptima y válida para los análisis estadísticos posteriores.

De acuerdo al análisis de componentes principales sobre los resultados de la superimposición de Procrusto (RWA), los primeros 10 componentes explicaron el 87.26% de la varianza. Como se ilustra en la Figura 7 se observa una agrupación por especie al analizar los dos primeros componentes principales, aun cuando *C. australe* presenta la mayor dispersión.

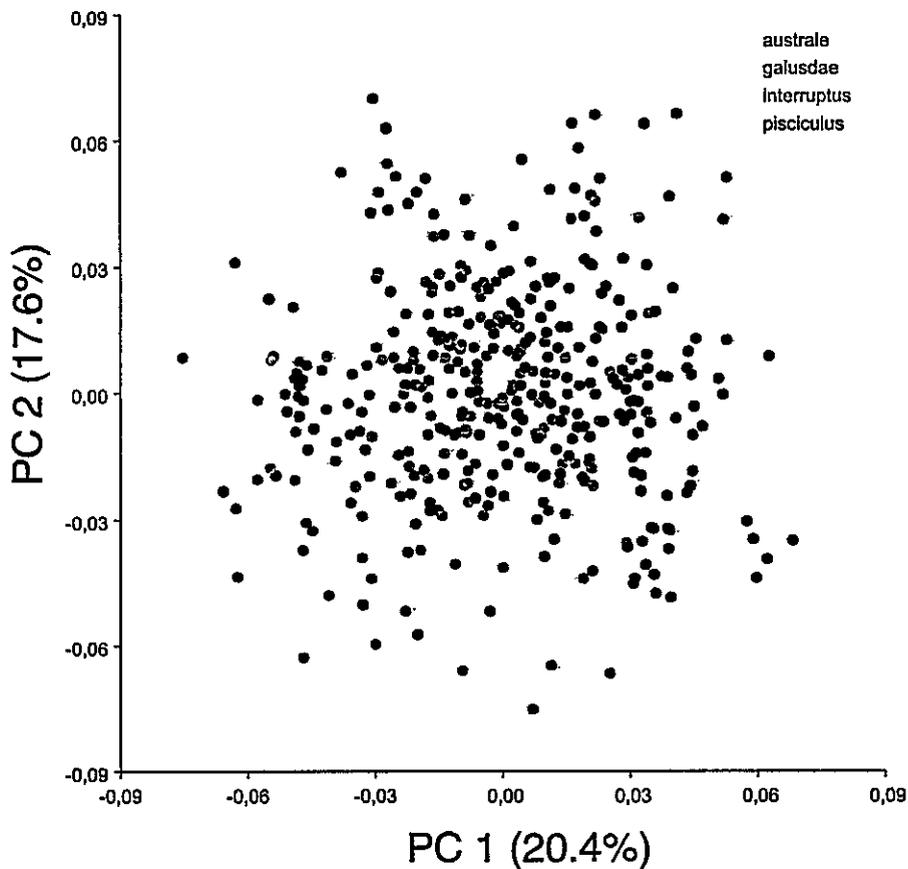


Figura 7. Morfometría geométrica. Gráfico de los dos primeros componentes principales (relative warps) que explican el 38% de la varianza.

El ANOVA sobre las coordenadas de Procrusto mostró que las especies difieren significativamente tanto en la forma corporal ($F=20.40$, $gl=90$, $p<0.0001$) y en el tamaño del centroide ($F=5.86$, $gl=3$, $p<0.0006$).

A partir del Análisis de Función Discriminante (DFA) se detectaron diferencias significativas entre todas las parejas de especies ($p<0.0001$) (Tabla 3). A partir del análisis del DFA es posible clasificar con éxito sobre el 90% de los individuos.

Tabla 3. Distancias de Mahalanobis entre especies utilizando morfometría geométrica. Para todas las comparaciones pareadas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$)

Especie	<i>C. australe</i>	<i>C. galusdae</i>	<i>C. interruptus</i>	<i>C. pisciculus</i>
<i>C. australe</i>	-	3.0488	2.6935	4.3741
<i>C. galusdae</i>	-	-	3.4739	3.8377
<i>C. interruptus</i>	-	-	-	2.9401

Adicionalmente, se realizó un Análisis Canónico de Varianza (CVA), cuyo objetivo es encontrar aquellos atributos de forma que mejor distinguen los grupos en estudio. De esta forma, así como en el LDA con las medidas morfológicas, el CVA también requiere un agrupamiento *a priori*.

De este análisis se detectó que la posición del término de la aleta pélvica (landmark 11), de la proyección anterior de la primera abertura nasal (landmark 2) y del hocico (landmark 1) son los factores más importantes dentro del primer componente canónico (CV1), que explica el 51.46% de la varianza. Por su parte, el componente CV2 explica el 39.65% de la varianza.

En la Figura 8 se muestra un gráfico de dispersión con los valores obtenidos del CVA para todos los individuos agrupados por especie, donde se observa una clara distinción entre todas las especies.

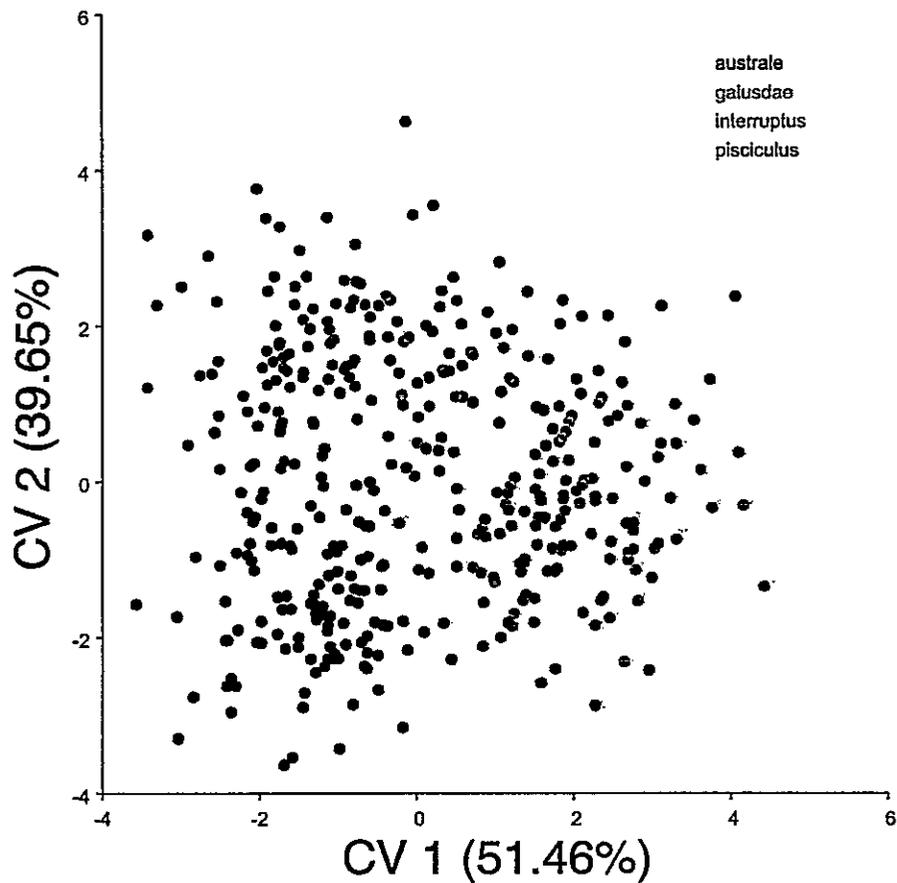


Figura 8. Morfometría geométrica. Gráfico de las dos primeras varianzas canónicas que explican el 91.10% de los datos.

El análisis de las diferencias morfométricas también fue abordado de manera gráfica mediante la función de placa delgada (TPS), la cual permite observar el grado de deformación de la conformación morfométrica de una especie respecto a otra (Bookstein 1991). En la Figura 9 se muestra la grilla de deformación entre las especies.

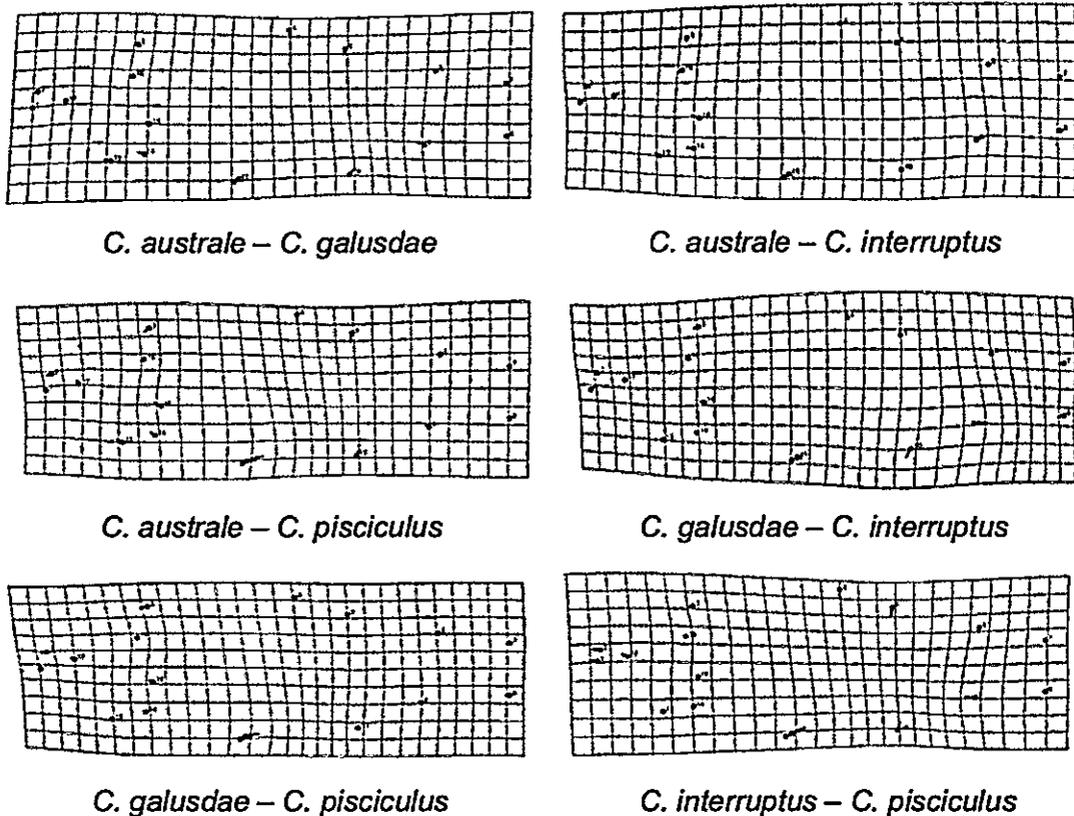


Figura 9. Grillas de transformación comparativas entre las especies estudiadas.

Para todas las especies se obtuvo que los caracteres relevantes para su caracterización son los mismos sugeridos por la morfometría tradicional: la disposición de las aletas y relaciones generales de la cabeza, altura del cuerpo y del pedúnculo caudal.

Comparativamente, se observó que *C. australe* presenta una deformación de la cabeza y altura del cuerpo mayores que *C. galusdae*, por cuanto esta última suele presentarse como un individuo más alargado. No

presentan diferencias respecto a la extensión y altura del pedúnculo caudal, aunque en *C. galusdae* el pedúnculo puede presentarse más deformado en la porción ventral. No obstante, este carácter no fue observado en todos los especímenes. Una diferencia leve es la posición del origen de la aleta adiposa, la cual es opuesta al origen del último radio de la aleta anal en *C. australe*, y en *C. galusdae* se presenta contraria al pedúnculo caudal, levemente alejada del término de la aleta anal. En *C. galusdae* se observa que la distancia entre la inserción de la aleta pectoral y la pélvica es mayor que en *C. australe*, por cuanto al extender horizontalmente la aleta pectoral esta no alcanza el origen de la pélvica. En *C. australe* este espacio es menor o bien puede no presentarse, coincidiendo el rayo más largo de la pectoral con el origen de la aleta pélvica.

Entre *C. interruptus* y *C. pisciculus* se observa que la primera presenta una deformación corporal significativamente mayor que *C. pisciculus*. Esto produce que los ejemplares de *C. interruptus* sean descritos como peces más altos y menos alargados que las especies de *Cheirodon* chilenas. Además, el pedúnculo caudal se inicia más adelante que en *C. pisciculus*, lo que contribuye a que se observe como una especie con una menor deformación relativa a los caracteres corporales generales. Entre *C. interruptus* y *C. pisciculus* casi no hay diferencias entre la inserción de la aleta pectoral, pero sí difieren significativamente en el origen de la aleta pélvica, en que *C. pisciculus* presenta una inserción de la pélvica cercana a la porción central del cuerpo, opuesta a la

aleta dorsal, mientras que en *C. interruptus* se presenta más cercana a la aleta pectoral. Esto produce que se observe un espacio entre el rayo más largo extendido de la aleta pectoral y el origen de la pélvica en *C. pisciculus*, mientras que en *C. interruptus* la aleta pectoral usualmente sobrepasa el origen de la pélvica. Así también, este mismo espacio puede observarse en *C. pisciculus* entre la aleta pélvica y el origen de la aleta anal, mientras que en *C. interruptus* este intervalo es menor o puede no existir, coincidiendo el rayo más largo de la pélvica extendido con la inserción de la aleta anal.

Las comparaciones entre aquellas especies con distribución alopátrica (e.g. *C. australe* y *C. pisciculus*) responden a un reconocimiento basado en las proporciones asociadas al origen de las aletas pélvica y anal respecto de la extensión horizontal de las aletas pectoral y pélvica, respectivamente.

En la Tabla 4 se resumen las características importantes desprendidas de la morfometría tradicional y geométrica para un fácil reconocimiento de las especies del género *Cheirodon* de Chile. Si bien se pudo distinguir grupos morfométricos correspondientes a las distintas especies, no se observó una agrupación por localidad de muestreo o cuenca hidrográfica. Así también, la mayoría de las especies pudieron ser discriminadas usando las características morfométricas obtenidas en este capítulo, con excepción de *C. australe* y *C. interruptus* que comparten caracteres. Para estas dos especies los análisis estadísticos no son concluyentes, y por el momento sólo se sugiere la comparación del perfil de la aleta anal, en que en *C. interruptus* el rayo más

largo alcanza al último rayo de la anal, formando un perfil vertical, mientras que en *C. australe* el rayo más largo no alcanza al último y se observa un perfil diagonal (Campos 1982).

Tabla 4. Caracteres morfológicos que diferencian las especies de *Cheirodon* estudiadas utilizando relaciones de extensión de las aletas respecto al origen

Especie	<i>C. australe</i>	<i>C. galusdae</i>	<i>C. pisciculus</i>	<i>C. interruptus</i>
El rayo más largo extendido horizontalmente de la aleta pectoral alcanza el origen de la aleta pélvica	Sí	Sí	No	Sí
La aleta pélvica extendida horizontalmente alcanza el origen de la aleta anal	No	Sí	No	No
Perfil de la aleta anal al comparar el rayo más largo extendido con el último	transversal	vertical	vertical	vertical

Análisis molecular

Cabe hacer la aclaración que se aplicó el procedimiento descrito en Materiales y Métodos con todos los individuos utilizados en este estudio (400 ejemplares), aun cuando el diseño preliminar consideraba la secuenciación de algunos individuos por especie, con una categorización previa que requería entre 12 y 16 individuos por cuenca hidrográfica y por especie (12 individuos por cuenca para *C. galusdae* y *C. interruptus* y 16 individuos por cuenca para *C. australe* y *C. pisciculus*).

Lo anterior no fue posible, especialmente en los ejemplares de *C. australe* donde sólo se obtuvo una (1) secuencia. Para el resto de especies, se obtuvo éxito con ejemplares de algunas localidades de muestreo, pero dado que se requería analizar la diversidad genética en distintas localidades, los objetivos específicos de este capítulo no fueron logrados. Al respecto, cabe señalar las numerosas pruebas que se realizaron, utilizando diferentes combinaciones de primers (Folmer et al. 1994, Ward et al. 2005), diferentes gradientes de concentración de ADN (entre 10 y 100 ng/ μ L). Además, se realizaron diferentes pruebas modificando las condiciones iniciales de PCR, usando un gradiente de temperatura de annealing entre 50 y 60 °C y variando los gradientes de MgCl₂. Todas las amplificaciones fueron verificadas mediante geles de agarosa al 1%. Sin embargo, el posterior proceso de secuenciación en Macrogen Inc. no fue satisfactorio. Del total de especímenes analizados, a partir de la amplificación del gen COI se obtuvo un fragmento de 505 nucleótidos para 31 individuos.

Dado que no se logró secuenciar una cantidad suficiente de ejemplares, esto no permitió utilizar esta información para la obtención de parámetros de diversidad genética entre localidades de muestreo y cuencas hidrográficas.

A partir de la información disponible, se calcularon las diferencias promedio de bases nucleotídicas dentro de cada especie y la comparación de las diferencias promedio entre especies (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencias promedio de bases nucleotídicas dentro y entre las especies estudiadas.

Espece	Nº Bases diferentes	<i>C. australe</i>	<i>C. galusdae</i>	<i>C. interruptus</i>
<i>C. australe</i>	-	x		
<i>C. galusdae</i>	4.53	8.67 ± 2.53	x	
<i>C. interruptus</i>	6.87	16.93 ± 3.38	18.60 ± 3.47	x
<i>C. pisciculus</i>	0.67	9.80 ± 2.97	3.33 ± 1.12	18.91 ± 3.64

Si bien se contó con sólo una secuencia de *C. australe*, el análisis de las 31 secuencias totales mostró que las diferencias de bases nucleotídicas son mayores dentro de *C. interruptus*, luego en *C. galusdae* y finalmente en *C. pisciculus*. Respecto a las comparaciones de diferencias promedio entre especies, las mayores diferencias se presentan entre *C. interruptus* y *C. pisciculus*, mientras que las especies menos distantes en número de diferencias promedio de bases son *C. galusdae* y *C. pisciculus*.

De manera complementaria, se construyó un árbol Neighbour-Joining (NJ) basado en distancias K2P (Kimura 1980) para proveer una representación gráfica del patrón de divergencia entre los ejemplares (Figura 10), donde se observó que los miembros de la especie introducida (*C. interruptus*) se agruparon juntos, en un grupo diferente al conformado por las especies chilenas. Lo anterior también se verifica en la Tabla 2, donde las diferencias promedio de bases nucleotídicas entre *C. interruptus* y las especies chilenas son mayores

(18.15 bases promedio) a lo observado dentro de las especies chilenas (7.27 bases promedio).

El segundo grupo representado por las especies chilenas contiene a *C. australe* en la base del cluster, seguido de un grupo formado por secuencias de *C. galusdae* y *C. pisciculus*, las cuales son indistinguibles entre sí pero no compartidas.

Finalmente, si bien el análisis molecular resultó simple y carente de poder resolutivo para los objetivos específicos de este capítulo, destaca la obtención de un grupo diferenciado de las especies chilenas respecto a la especie introducida (*C. interruptus*).

DISCUSIÓN

Si bien las especies de *Cheirodon* en Chile tienen distribuciones geográficas continuas y tendencia a la alopatría, presentan una similitud interespecífica que impide la presencia de caracteres morfométricos externos de diagnóstico que permitan clasificar las poblaciones con claridad. Como ya lo manifestara Campos (1982), los caracteres de diagnóstico son una combinación de características que se asocian en cada especie con la presencia o ausencia de una de ellas. Tanto para Campos (1982) y Malabarba (1994) la combinación de caracteres se hace difusa en algunas poblaciones.

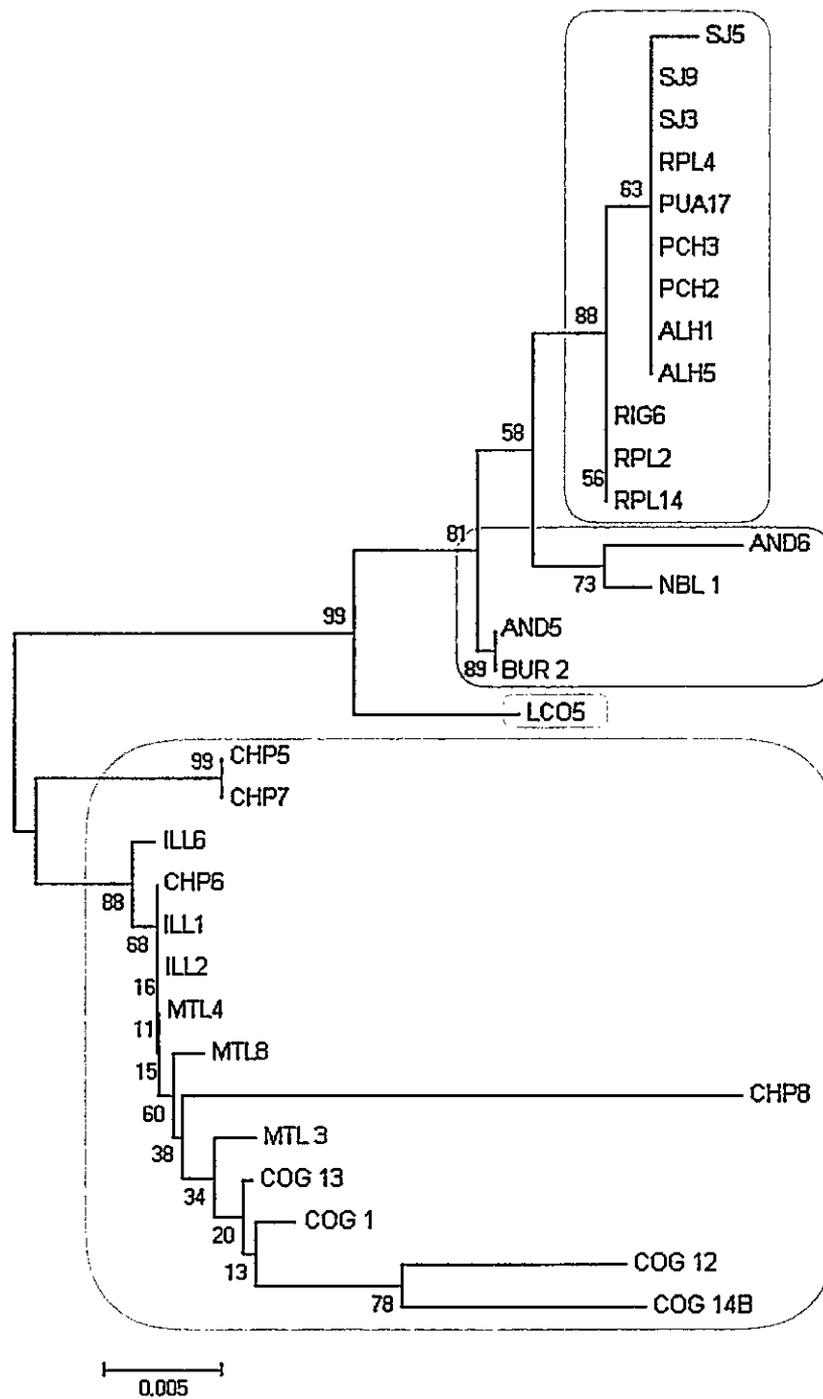


Figura 10. Árbol Neighbour-Joining (NJ) basado en distancias K2P, utilizando 31 secuencias de COI para las especies de *Cheirodon* identificadas morfológicamente. Los colores hacen referencia a *C. australe* (en gris), *C. galusdae* (en rojo), *C. interruptus* (en verde) y *C. pisciculus* (en azul).

Los estudios referidos a la discriminación de especies del género *Cheirodon* asocian el número de cúspides de los dientes como un carácter significativo. No obstante, las cúspides en los dientes varían tanto inter- como intraespecíficamente, por cuanto suele llevar a error una identificación basada en esta característica (Campos 1982). Un caso similar ocurre con los rayos prorrecurrentes de la porción dorsal y ventral del pedúnculo caudal, los cuales presentan un escaso desarrollo y su número es semejante en todas las especies, correspondiendo además a un carácter de dimorfismo sexual (Arratia 1987). No obstante, en especímenes en buen estado suele ser un carácter de diagnóstico la longitud del pedúnculo caudal que es ocupada por los rayos prorrecurrentes. Estos antecedentes indican que la discriminación de especies se fundamenta más en caracteres merísticos que morfológicos, cuya aplicación requiere conocimiento y experiencia en el tratamiento de los especímenes, dificultando la identificación a personas ajenas a la ictiología. En efecto, Campos (1982) insiste en que la diferenciación depende en primer lugar de caracteres merísticos y posteriormente en modificaciones corporales que parecen más estables.

En este primer capítulo reanalicé varias de las características examinadas por Campos (1982) y Malabarba (1994) utilizando morfometría tradicional, y encontré relaciones de forma utilizando morfometría geométrica, técnica aplicada en peces chilenos (e.g. Pardo 2002, Pardo et al. 2005, Gacitúa et al. 2008), con el objetivo de facilitar el reconocimiento de las especies de

Cheirodon en trabajos de campo. Sin embargo, con estos análisis se logró separar parcialmente las especies pero no localidades de muestro ni cuencas hidrográficas. Adicionalmente, traté de analizar, sin éxito, las diferencias genéticas utilizando secuencias parciales del gen mitocondrial COI. Sin embargo, a partir de las secuencias obtenidas se observó una diferenciación genética clara entre las especies chilenas y la especie introducida (*C. interruptus*). Esto confirmaría la divergencia Este-Oeste de los carácidos sudamericanos atribuible al levantamiento de la Cordillera de Los Andes en el Mioceno, lo que también se observa en otros peces como los pejerreyes de la tribu Sorgentini (Teleostei: Atherinopsidae) (Dyer 1998). Respecto a los carácidos chilenos, la resolución del análisis genético no permitió su discriminación. Lo anterior podría deberse a que las especies chilenas probablemente hayan divergido sólo recientemente, o bien constituyan poblaciones de una misma especie distribuidas a lo largo del rango del género. Esto ha sido observado en otras especies de ictiofauna chilena, con poblaciones que habitan distintas cuencas hidrográficas pero que no constituyen especies genéticamente diferentes (e.g. género *Basilichthys*, Veliz et al. 2012). No obstante, no es posible descartar que la baja resolución del análisis genético para discriminar las especies de *Cheirodon* se deba a la elección de las cuencas hidrográficas estudiadas o bien al número de individuos utilizados, tal como se ha detectado en el género *Orestias* presente en el Altiplano chileno (Lüssen et al. 2003, Vila et al. 2013).

En los análisis morfométricos realizados (tradicional y geométrica) se encontró que las características asociadas a la posición de las aletas, sus relaciones respecto a las inserciones, y caracteres relacionados a la forma del cuerpo podrían ser útiles para la identificación de las especies de *Cheirodon*. Tanto la longitud prepélvica, altura del cuerpo, longitud del pedúnculo caudal, longitud de la cabeza, son caracteres relevantes para la descripción de los especímenes, aun cuando la descripción puede reducirse a una serie de características de fácil observación (Figura 11). Estas mismas regiones corporales fueron identificadas tanto con la morfometría tradicional y geométrica.

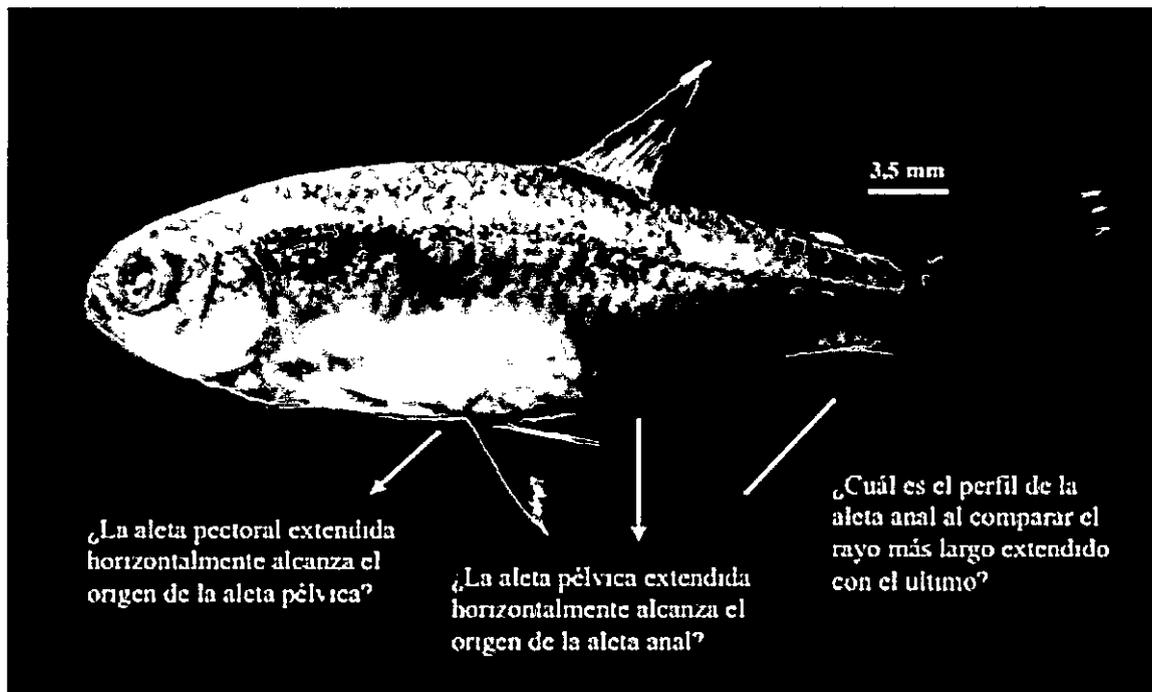


Figura 11. Representación esquemática de los caracteres relevantes para un fácil reconocimiento de las especies de *Cheirodon*; las respuestas se muestran en la Tabla 4. Tomado de Salas et al. (2012)

Las relaciones entre las especies respecto a los caracteres analizados son relevantes en tanto coinciden parcialmente con las relaciones presentadas por Campos (1982) y Malabarba (1994). Se encontró un primer grupo conformado por *C. australe* y *C. interruptus* (Figura 6B), los cuales comparten una serie de características, pero que pueden ser fácilmente distinguidos por la altura corporal y el perfil de la aleta anal respecto al rayo más largo (Campos 1982). *C. galusdae* presenta como características principales la ausencia del espacio entre el rayo más largo de la aleta pectoral y el origen de la aleta pélvica, y la ausencia del espacio entre el rayo más largo de la pélvica y el origen de la aleta anal. Finalmente, *C. pisciculus* presenta ambos espacios entre los rayos extendidos de la pectoral (y pélvica) respecto al origen de la pélvica (y anal).

Los análisis estadísticos separaron las especies *C. galusdae* y *C. pisciculus*. Si bien estas especies se distribuyen de forma continua en sentido latitudinal, no presentarían dificultad en su identificación en razón de sus aparentemente diferentes localidades tipo (Vila et al. 2006). No obstante, los resultados morfométricos permiten establecer distinciones asociadas a la posición en la inserción de las aletas y relaciones entre la cabeza y el pedúnculo caudal respecto a la longitud estándar, cuyas comparaciones pueden realizarse indistintamente en cada individuo y no requieren ser presentadas mediante la consideración de los holotipos del resto de especies.

De esta forma, las relaciones presentadas en este trabajo responden a una recomendación preliminar para facilitar la identificación de estas especies, en especial para su uso en campo, debido a que todos los caracteres que sirven para su diferenciación corresponden a caracteres externos (Figura 11). Estas características deben ser puestas a prueba por otros investigadores.

En este primer capítulo, las diferencias morfológicas encontradas no se relacionaron a un patrón asociado a las distintas localidades de muestreo ni a las cuencas hidrográficas donde habitan las especies (Vila et al. 1999), por lo que aparentemente las diferencias morfológicas no tendrían un componente espacial. En consecuencia, los análisis morfométricos sólo permitieron discriminar parcialmente las distintas especies estudiadas, mientras que el análisis genético sólo mostró una clara diferenciación entre las especies chilenas y la especie introducida.

CAPÍTULO 2. INVASIÓN DE *CHEIRODON INTERRUPTUS* (JENYNS, 1842)

EN CHILE

INTRODUCCIÓN

La introducción de especies más allá de su rango nativo ya sea resultado de la acción humana directa o indirecta genera cambios en los ecosistemas receptores (Kolar & Lodge 2001, Dudgeon et al. 2006, Cusherousset et al. 2011, Jeschke et al. 2014). En algunos casos, esos cambios son dramáticos y pueden resultar en la extinción de especies nativas o en cambios en el funcionamiento del ecosistema (Jeschke & Strayer 2005, Ricciardi & Cohen 2006, Gozlan et al. 2010, Cusherousset et al. 2011). Sin embargo, para la mayoría de las especies introducidas no existe información sobre las consecuencias de sus introducciones (Zenni & Nuñez 2013, Simberloff et al. 2013, Jeschke et al. 2014). En los ecosistemas acuáticos continentales, el panorama es que las especies introducidas son virtualmente imposibles de erradicar (Jeschke & Strayer 2005, Dudgeon et al. 2006, Lockwood et al. 2007).

Esto tiene especial relevancia puesto que es sabido que los impactos de las especies introducidas generalmente aumentan si la especie logra establecerse y aumentar su distribución en el nuevo ambiente (Colautti & MacIsaac 2004), convirtiéndose en especie invasora (*sensu* Gozlan et al. 2010).

Este escenario se vuelve más complejo cuando las especies que efectivamente logran establecerse y aumentar sus poblaciones y extensión geográfica utilizan espacio y recursos de especies originarias (Gozlan et al. 2010, Cusherousset et al. 2011). Esto es particularmente conocido en Chile respecto a la introducción de salmónidos (Macchi et al. 1999, Soto et al. 2001, 2006, 2007, Correa & Gross 2008, Arismendi et al. 2009, Peñaluna et al. 2009, Pardo et al. 2009, Young et al. 2009, Habit et al. 2010, Vargas et al. 2010, De García de Leaniz et al. 2010, Consuegra et al. 2011, Correa & Hendry 2012, Vanhaecke et al. 2012, Elgueta et al. 2012, entre otros). Sin embargo, el efecto de la presencia de especies invasoras en lugares habitados por especies nativas congénéricas con características de nicho similar es un escenario poco conocido.

Generalmente, ante la introducción de especies que pueden llegar a ser invasoras, la única medida de manejo práctica es predecir el rango de distribución de la especie y adoptar medidas para detener su dispersión en otros sistemas acuáticos (Cucherousset et al. 2011, Zengeya et al. 2012, Dextrase et al. 2014, Guisan et al. 2014). Al respecto, el modelamiento de nicho ecológico (ENM) ha demostrado ser una herramienta efectiva para predecir las potenciales distribuciones de las especies. Estos modelos se basan en métodos correlativos que utilizan asociaciones entre variables ambientales y ocurrencias conocidas de la(s) especie(s) para predecir potenciales áreas donde una especie determinada probablemente se establezca (Guisan & Thuiller 2005,

Elith et al. 2006, Broennimann et al. 2011). Sin embargo, para su correcta aplicación se requiere conocer con certeza las localidades de ocurrencia de la especie de interés, lo que se vuelve complejo cuando: i) la especie invasora comparte distribución con una especie congénérica nativa, ii) las especies no poseen caracteres morfológicos claros que las diferencien, es decir, no son distinguibles entre sí, y iii) las especies nativas presentan problemas de conservación. En Chile se presenta un único caso que cumple con estos tres criterios.

En los ríos de Chile se reportan 27 especies de peces dulceacuícolas no-nativos o introducidos (Vila et al. 2006, Quezada-Romegialli et al. 2009, Habit et al. 2015), desconociéndose para muchos de ellos el impacto que tienen en los ecosistemas invadidos, aun cuando han sido denunciados tempranamente como importantes amenazas para los peces nativos (De Buen 1959, Campos 1970, Arratia 1978). Los principales motivos para la introducción de peces en Chile ha sido para su uso en acuicultura, actividades deportivas, uso ornamental y también como agentes de control biológico (Iriarte et al. 2005). Sin embargo, existe un pequeño grupo de peces cuyo motivo de introducción es desconocido, situación que es agravada por la falta de información respecto de los eventos de dispersión en otros sistemas hidrográficos del país.

Afortunadamente, la mayoría de estas especies puede ser fácilmente distinguida del resto de especies locales (Arratia 1978, Ruiz & Marchant 2004, Soto et al. 2007, Quezada-Romegialli et al. 2009), por cuanto una posterior

actualización de sus distribuciones solo requiere trabajos de campo que amplíen los registros de captura.

Sin embargo, en Chile existe un único caso de una especie introducida que presenta una alta similitud morfológica con las especies nativas. *Cheirodon interruptus* es un carácido endémico de Argentina que también se encuentra en Brasil y Uruguay (Mantinian 2011). Se le reconoce como una especie eurioica (Menni et al. 1996), lo que le permitiría soportar diversas condiciones ambientales que explicarían su amplia distribución. Esta especie, junto con el resto de representantes del género, es típica de los remansos de los ríos y las zonas costeras de los lagos (Ringuelet et al. 1967), y se encuentra preferentemente cerca de la orilla en estrecho contacto con la vegetación (Ruiz & Marchant 2004). Por su pequeño tamaño y gran resistencia, *C. interruptus* (denominada "mojarrita" en Argentina) es comercializada como carnada viva en Argentina (Miquelarena et al. 2008, Maiztegui et al. 2009).

En Chile, todas las especies de *Cheirodon* ("pochas") están listadas con problemas de conservación. *Cheirodon pisciculus* está catalogada "Vulnerable" (MINSEGPRES 2008), y hace 30 años se citaba con distribución continua desde el río Huasco al río Rapel (Arratia 1981, Campos 1982). La noticia de la introducción accidental desde Argentina de *C. interruptus* en el Lago Peñuelas y el río Aconcagua en la década de 1960 (Campos 1982, Dyer 2000) generó incertezas en la distribución de la especie nativa. En efecto, registros posteriores en localidades intermedias como los ríos Choapa, Quilimarí, La

Ligua y estero Catapilco corresponden en su totalidad a *C. interruptus* (Malabarba 2003, Zunino et al. 2009), considerando que colecciones tomadas hace 20 años en el río Choapa fueron identificadas como *C. pisciculus* (Dyer 2000). Al respecto, se ha discutido esta discontinuidad en la distribución de *C. pisciculus* (Malabarba 1994), si acaso la especie nativa efectivamente está presente entre los ríos Huasco y Maipo (Habit et al. 2006), y si es así, si puede considerarse la presencia de *C. interruptus* como una de las causas de la disminución de las poblaciones de *C. pisciculus*.

Por otro lado, debido a que los representantes del género *Cheirodon* presentan una alta similitud morfológica externa (Campos 1982, Salas et al. 2012), los esfuerzos han sido insuficientes para dilucidar esta posible, y aparentemente evidente, reducción del rango geográfico de *C. pisciculus* y la expansión de *C. interruptus*, debido a sus caracteres diagnósticos difusos. Esto contribuye sin duda a explicar el escaso conocimiento de este grupo de peces, de los cuales se desconocen aspectos básicos de su biología y cuyos mayores aportes se han realizado para poblaciones de *C. interruptus* en Argentina¹.

En un primer esfuerzo, se determinó con caracteres morfométricos la posibilidad de diferenciar morfológicamente estas especies en terreno (Salas et al. 2012), lo que se puso a prueba en el Capítulo 1 de esta tesis utilizando un mayor número de individuos. Esto es relevante, porque dada la sistemática actual del género *Cheirodon*, cuyas únicas revisiones para las especies

¹ Una completa revisión bibliográfica se presenta en Ferriz et al. (2011).

chilenas corresponden a Campos (1982) y Malabarba (1994), no es posible identificar los ejemplares colectados sin su extracción y análisis en laboratorio, lo que evidentemente tiene efectos en la conservación del género.

Adicionalmente, y probablemente con mayores consecuencias ambientales, la situación de amenaza para *C. pisciculus* deriva también de las actividades productivas humanas, entre las que destacan la descarga de contaminantes al agua, extracción de áridos, explotación forestal, embalsamiento de ríos, entre otros (Campos et al. 1998, Habit et al. 2006).

En este Capítulo 2 he abordado dos preguntas: i) ¿qué relación tienen los nichos climáticos de *C. interruptus* (introducida) y *C. pisciculus* (nativa)? y ii) ¿es posible predecir el rango de distribución potencial de *C. interruptus* en Chile?

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar los nichos climáticos de *C. pisciculus* (nativa) y *C. interruptus* (introducida) y predecir la distribución potencial de *C. interruptus* en Chile.

Objetivos específicos

- Comparar los nichos climáticos de ambas especies con el fin de evaluar el grado de sobreposición en el espacio climático.
- Predecir la distribución potencial de *C. interruptus* en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos de ocurrencia

El área de estudio comprende la distribución nativa de *Cheirodon interruptus* en Argentina, Brasil y Uruguay, entre los paralelos 24 y 40° S (Figura 12). Para producir el modelo de nicho ecológico para la distribución nativa de *C. interruptus* se reunieron registros de ocurrencia georreferenciados, los cuales se localizaron en Argentina, Brasil y Uruguay. Se obtuvo un total de 307 registros después de remover los datos repetidos o incorrectamente georreferenciados, los cuales fueron submustrados a 5 km para reducir la autocorrelación espacial. Finalmente se utilizó un total de 255 registros filtrados que fueron usados para calibrar los modelos, de los cuales 203 son de *C. interruptus* y 52 de *C. pisciculus*. Los registros fueron obtenidos de las bases de

datos Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org>), FishNet (<http://www.fishnet2.net>) y FishBase (<http://www.fishbase.org>). Las ocurrencias en Chile de *C. pisciculus* y *C. interruptus* incluyeron los registros de Duarte et al. (1971), Dazarola (1972), Campos (1982), Malabarba (1994, 2003) y Zunino et al. (2009), de los cuales los primeros han servido como únicos antecedentes para los listados de la ictiofauna de la zona centro-norte de Chile. En esta revisión no se incluyó literatura gris proveniente principalmente de proyectos de inversión sometidos al Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental de Chile (SEIA, <http://www.sea.gob.cl>), por encontrarse la mayoría de los casos sin referencias a las claves de identificación utilizadas, considerando que recientemente los permisos de pesca de investigación otorgados por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Chile) no permiten la extracción de peces nativos, y que con Campos (1982) las especies de *Cheirodon* no pueden ser reconocidas en el campo. En la modelación de los nichos ecológicos también se incluyeron los registros de *C. interruptus* y *C. pisciculus* generados en esta tesis (Capítulo 1), pero fueron omitidos en la representación gráfica de la Figura 12 para facilitar su visualización.

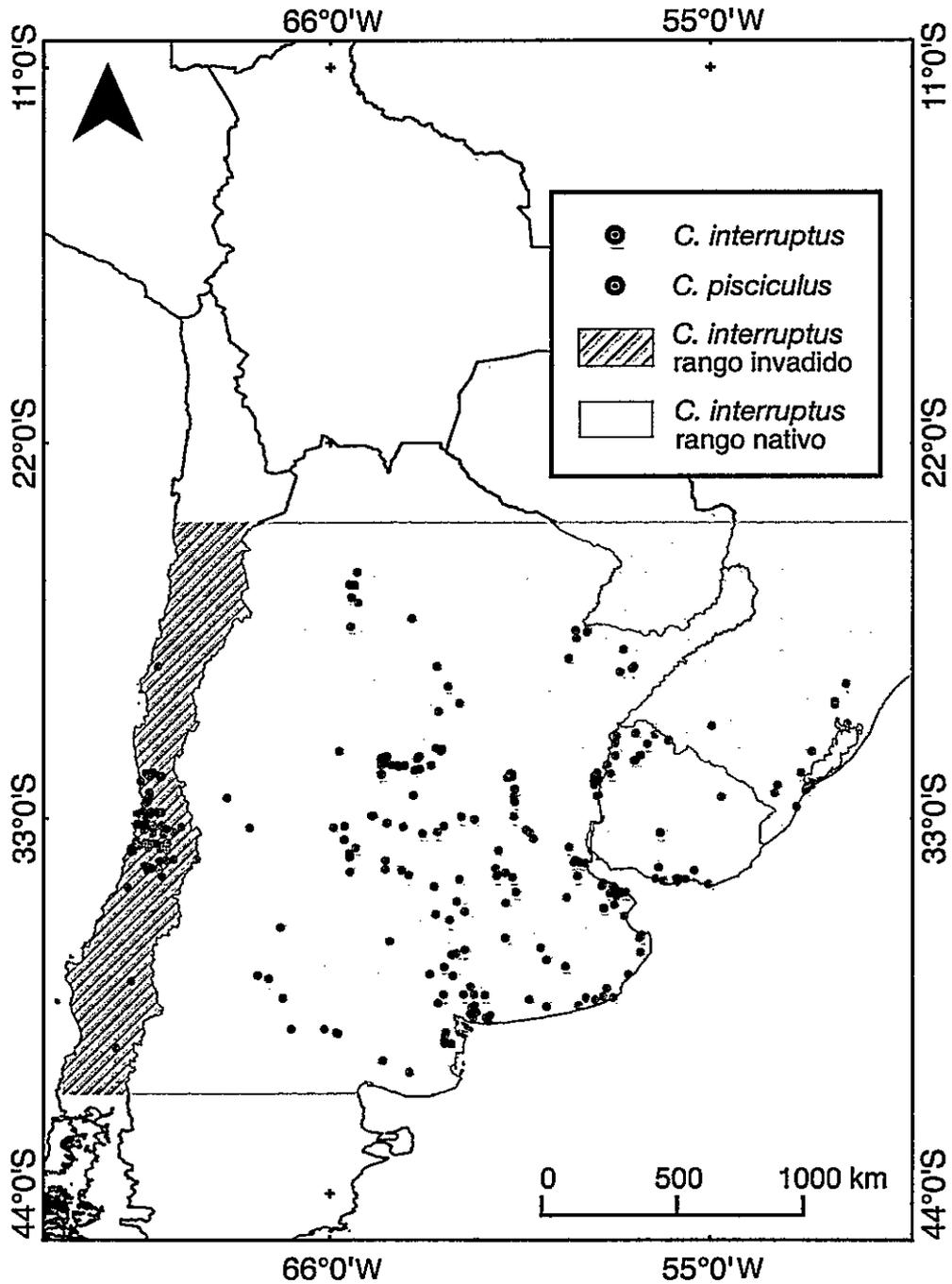


Figura 12. Localidades de ocurrencia de *C. interruptus* en su rango nativo e introducido (puntos rojos) y ocurrencias de *C. pisciculus* (puntos verdes) según literatura utilizadas para la modelación de nicho ecológico. Se ha omitido los registros del Capítulo 1 (Tabla 1) para facilitar su visualización, pero se aclara que sí fueron incorporados en los análisis del presente capítulo.

Variables ambientales

Las variables bioclimáticas fueron obtenidas desde la base de datos WorldClim (Hijmans et al. 2005, <http://www.worldclim.org>), con una resolución espacial de 30 arco-segundos (~1 km). Este set de datos incluye un total de 19 variables bioclimáticas, las cuales resumen información principalmente de temperatura y precipitación.

Estas variables ambientales han sido ampliamente utilizadas en modelación de nicho ecológico en sistemas dulceacuícolas (Igushi et al. 2004, McNyset 2005, Chen et al. 2006, Zengeya et al. 2012, Montecino et al. 2014).

Dado que la colinearidad de las variables puede llevar a modelos altamente complejos (Beaumont et al. 2005), se escogió una sub-muestra de todas las variables ambientales mediante un test de correlación de Pearson: sólo una variable de aquellos pares altamente correlacionados ($r > 0.70$) fueron incluidos en el modelo. Las cinco capas finalmente utilizadas fueron: temperatura media anual (BIO1), rango de temperatura anual (BIO7), temperatura media del trimestre más seco (BIO9), precipitación anual (BIO12) y altura geográfica (ALT). Este procedimiento se realizó con el programa ENMtools (Warren et al. 2008). También se incorporó las coberturas dirección de flujo y acumulación de flujo desde la base de datos USGS HydroSHEDS (<http://hydrosheds.cr.usgs.gov>) utilizando la misma resolución espacial que las capas WorldClim.

Nichos climáticos

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) a partir de la información generada para Chile, la que incluyó las localidades de ocurrencia de *C. interruptus* y *C. pisciculus*. Este análisis fue realizado para comparar el nicho climático de ambas especies usando las variables ambientales seleccionadas. Para analizar la similitud de los nichos climáticos se evaluó el índice de solapamiento D de Schoener (Warren et al. 2008), el cual varía entre 0 (no hay solapamiento) y 1 (solapamiento completo).

Distribuciones potenciales

Los nichos ecológicos realizados (Guisan et al. 2014) de *C. interruptus* y *C. pisciculus* fueron modelados en Chile usando el programa MaxEnt versión 3.3.2 (Phillips et al. 2006), el cual estima las distribuciones geográficas a partir de registros de ocurrencia encontrando la distribución de máxima entropía. Los datos de ocurrencia fueron divididos en dos partes. Aleatoriamente seleccionamos el 75% de los datos para la modelación y el resto (25%) para la evaluación. El modelo fue evaluado con la Receiver Operating Characteristics Curve (ROC), calculando el área bajo la curva (AUC), un índice de umbral independiente ampliamente utilizado en estudios ecológicos. El modelo resultante fue proyectado en el rango introducido de *C. interruptus* (Chile) para analizar su potencial distribución geográfica, utilizando i) su rango nativo más el introducido, y ii) sólo el rango introducido. El mismo procedimiento fue realizado

para *C. pisciculus*. Probabilidades por debajo del valor umbral fueron transformadas a cero.

RESULTADOS

Nichos climáticos

El análisis de los nichos de *C. interruptus* y *C. pisciculus* a partir del PCA utilizando variables climáticas, que corresponde al método más preciso para detectar solapamiento de nicho (Broennimann et al. 2011), mostró que los nichos de ambas especies presentan un alto solapamiento ($D=0.761$) (Figura 13). Además, el nicho de *C. interruptus* en el rango introducido muestra una evidente expansión respecto al nicho de *C. pisciculus*. Interesantemente, se observó dos regiones de altas densidades de ocurrencia de *C. interruptus*, lo cual es coherente con las aparentemente dos áreas de invasión, que corresponderían a las cuencas de la IV Región (Limarí y Choapa) (Dyer 2000) y de la V Región (Aconcagua y Maipo) (Zunino et al. 2009). A partir del PCA, se observó que las variables climáticas que más contribuyen a la varianza son la altura geográfica (ALT), temperatura media anual (BIO1) y la temperatura media del trimestre más seco (BIO9) en el primer componente, y el rango de temperatura anual (BIO 7) y la precipitación anual (BIO12) en el segundo componente (Figura 13C). Los porcentajes de inercia explicados por los primeros dos componentes son 56.37% y 26.31%, respectivamente.

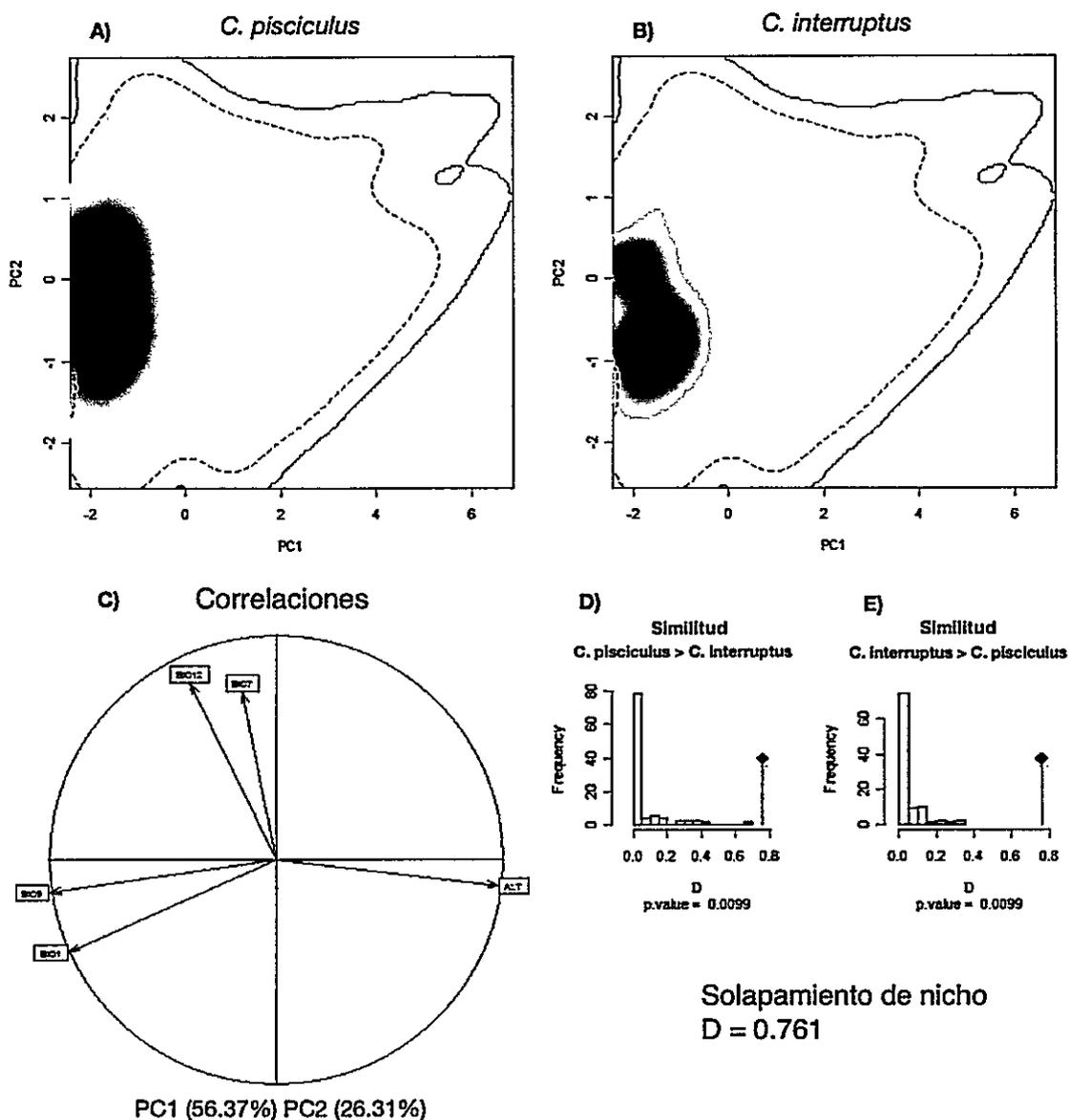


Figura 13. Nichos ecológicos de las especies de *Cheirodon* en el espacio climático en Chile. Los gráficos (A) y (B) muestran los nichos de las especies con los dos primeros componentes del PCA para *C. pisciculus* y *C. interruptus* en Chile, respectivamente. El sombreado gris muestra la densidad de ocurrencias de las especies. El contorno de líneas sólidas y punteadas muestran el 100% y 50% del ambiente disponible en Chile, respectivamente. (C) La contribución de las variables climáticas en los dos primeros componentes del PCA. Los histogramas (D) y (E) muestran el índice D de solapamiento de nicho observado entre ambas especies (línea roja con diamante) y los nichos simulados (barras grises), para los

cuales se calculó la similitud de nicho de *C. interruptus* a *C. pisciculus* (D), y similitud de nicho de *C. pisciculus* a *C. interruptus* (E). Bajo cada histograma se muestra la significancia de los tests.

Distribuciones potenciales

Las distribuciones predichas por MaxEnt para *C. pisciculus* y *C. interruptus* se muestran en la Figura 14. Para *C. interruptus* se realizó una proyección utilizando sólo los registros en su rango introducido, y también considerando su rango nativo más el rango introducido. Al comparar las proyecciones se observa que prácticamente la totalidad de la distribución potencial de la especie nativa *C. pisciculus* se encuentra contenida en la distribución de *C. interruptus*, tanto si consideramos la modelación utilizando sólo registros en Chile como también incluyendo el rango nativo de *C. interruptus*. Sólo en el caso de la especie introducida se observa una expansión en el rango de distribución, especialmente hacia la zona norte del país, lo que confirma las preocupaciones de Dyer (2000) y Habit et al. (2006). Esto es aún más preocupante cuando para la modelación se utiliza el rango nativo más el rango introducido (Figura 14C).

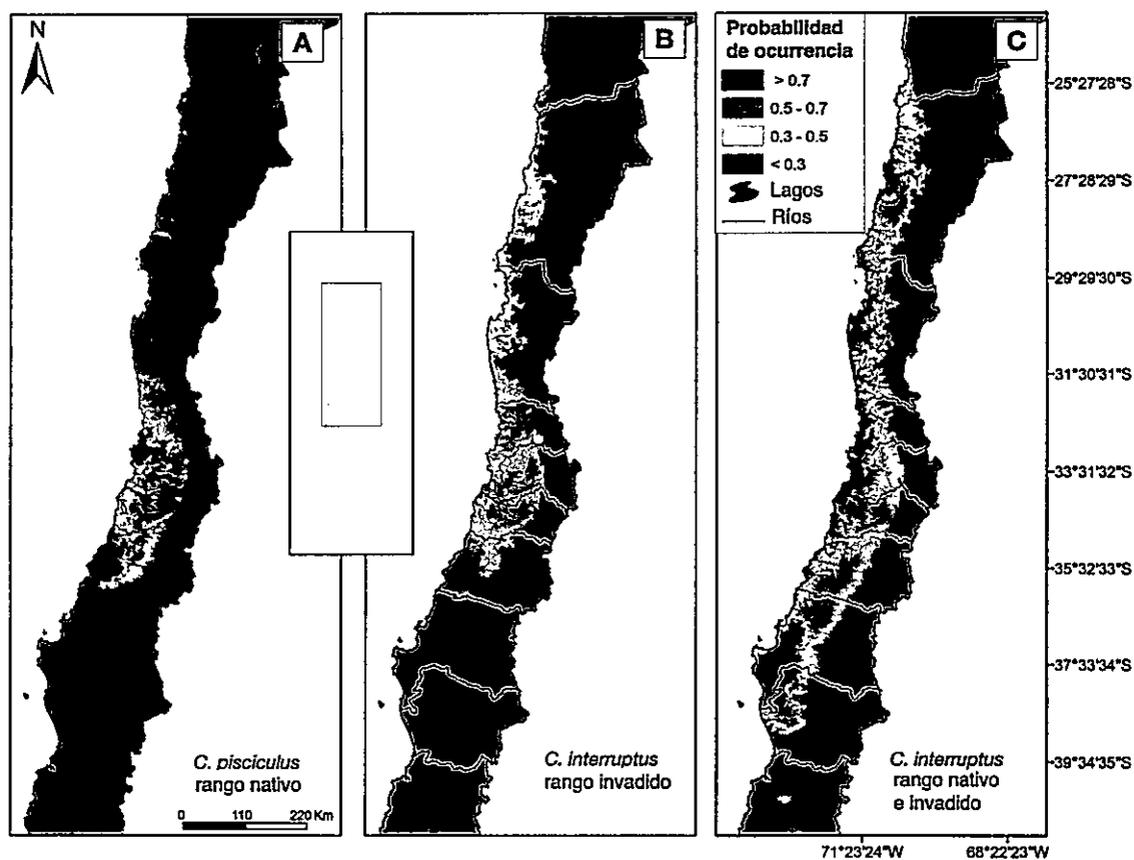


Figura 14. Modelos de distribución de las especies de *Cheirodon* en la zona centro-norte de Chile. (A) Distribución potencial de *C. pisciculus*. (B) Distribución potencial de *C. interruptus* en Chile a partir de las ocurrencias en su rango introducido y (C) a partir de su rango nativo más el introducido.

DISCUSIÓN

Los resultados del modelo de distribución de especies mostraron que *C. interruptus* podría estar presente en localidades previamente no identificadas, lo que aumenta la preocupación por el desconocimiento de la distribución real de esta especie introducida. Al considerar el espacio climático disponible en su rango nativo, la modelación de la distribución potencial mostró que *C.*

interruptus podría establecerse potencialmente casi en la totalidad de la zona centro-norte de Chile (Figura 14C), especialmente en las zonas costeras, tal como encontraran Zunino et al. (2009) en la V Región.

Si bien se reconoce que *C. interruptus* es una especie eurioica (Menni et al. 1996), lo que le permitiría soportar diversas condiciones ambientales, es importante aclarar que esto no explica cuál es el mecanismo que estaría utilizando para su dispersión entre cuencas. Dado que las especies de *Cheirodon* presentan escasa movilidad para la colonización de nuevas cuencas (Menni 2004) y que en Argentina son intensivamente capturadas para ser utilizadas por acuaristas locales y como carnada en la pesca recreativa (Maiztegui et al. 2009), es importante reconocer si los posibles motivos de su introducción y dispersión en Chile se deben a intereses minoritarios.

Respecto al análisis de los nichos climáticos, los resultados mostraron que *C. interruptus* en Chile estaría ocupando el mismo espacio que la especie chilena *C. pisciculus*, con un alto grado de solapamiento, lo que dificulta aun más reconocer los alcances de la introducción de *C. interruptus* en el país. En efecto, si consideramos que históricamente se ha descrito la discontinuidad en la distribución de *C. pisciculus* entre los ríos Huasco y Aconcagua (Campos 1982, Malabarba 1994), pero *C. interruptus* ha colonizado cuencas intermedias en sólo 50 años, es importante aclarar si efectivamente *C. pisciculus* está o estuvo presente entre los ríos Huasco y Maipo (Habit et al. 2006), o bien si puede considerarse a *C. interruptus* como una de las causas de la disminución

de poblaciones de *C. pisciculus* (Dyer 2000). Al respecto, es importante tener en cuenta que la disponibilidad de hábitat en el ambiente invadido puede ser distinto a las condiciones del rango nativo, por lo que entender cómo se distribuyen las especies invasoras no necesariamente pasa por asumir los procesos de expansión, estabilidad y vacío de los nichos climáticos (Broennimann et al. 2011).

Es sabido que los hábitats acuáticos soportan números relativamente altos de especies exóticas (Mergeay et al. 2005), y que esas introducciones pueden ser o no intencionales. El mercado de los acuarios es uno de los más importantes, y aun cuando se ha subestimado esta actividad, es probable que los acuaristas puedan ser transportadores efectivos de especies alóctonas (Kolar & Lodge 2001, Gozlan et al. 2010, Cusherousset et al. 2011). En Chile, a pesar de los escasos estudios sobre el tema (Iriarte et al. 2005), hay antecedentes de especies dulceacuícolas que probablemente llegaron al país a través del mercado de los acuarios (e.g. *Jenynsia multidentata*, Quezada-Romegialli et al. 2009). No obstante, en estos casos la discriminación del resto de especies locales es simple (Ruiz & Marchant 2004, Quezada-Romegialli et al. 2009), a diferencia de lo que ocurre con *C. interruptus* y sus congéneres chilenos. En general, en sistemas dulceacuícolas las invasiones crípticas se presentan en mayor número en invertebrados (Geller et al. 1997, Mergeay et al. 2005, Lockwood et al. 2007), y la mayoría probablemente permanece sin detectarse dados los escasos estudios sobre el tema.

Sobre la introducción de peces exóticos en Chile, actualmente las actividades de este tipo están reguladas legalmente. Sin embargo, el gran número de especies ya introducidas (Quezada-Romegialli et al. 2009) cuentan con escaso manejo y control administrativo real en el país. El caso de *Cheirodon interruptus* no es la excepción. Al respecto, actualmente la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Chile), autoridad competente que regula las actividades pesqueras y de conservación en aguas marinas y continentales, permite y propicia la erradicación de especies introducidas que no tengan uso comercial, aun cuando no existe una ley específica para ello. Sin embargo, dado que en el caso de *C. interruptus*, esta especie presenta una alta similitud morfológica externa con *C. pisciculus*, este tipo de actividades debieran ser debidamente fiscalizadas para evitar que en la práctica se apliquen medidas en las especies equivocadas.

Es por estas razones que la importancia de identificar especies crípticas para la conservación no debiera ser subestimada. Las especies invasoras introducidas son una de las principales causas de la disminución de poblaciones nativas en sistemas acuáticos, como lo expusieran tempranamente Campos (1970) y Arratia (1978). Usualmente, hacer conservación se ha centrado en prevenir la pérdida de hábitats y priorizar hábitats donde su riqueza y endemismo de especies sean singulares (Bickford et al. 2007, Lockwood et al. 2007, Simberloff et al. 2013). Sin embargo, las especies crípticas requieren una especial consideración en los planes de conservación, porque la prevalencia de

complejos crípticos donde existan especies locales que ya tienen problemas de conservación significa un doble problema, que se presenta en el caso de *C. interruptus* y *C. pisciculus*: (i) la especie nativa se está confundiendo con la especie invasora (Malabarba 2003, Zunino et al. 2009), y (ii) la especie nativa puede requerir estrategias diferentes de conservación respecto a la invasora.

DISCUSIÓN GENERAL

El principal obstáculo para dilucidar los rangos de distribución de las especies del género *Cheirodon* en Chile ha sido la falta de caracteres diagnóstico claros (Campos 1982), lo que contribuye a postular la invasión críptica de *C. interruptus* en la zona centro-norte de Chile.

La identificación y descripción de especies crípticas tiene una gran importancia taxonómica y además contribuye a la conservación de la biodiversidad (Bickford et al. 2007). Cuando no existen caracteres taxonómicos claros, la identificación puede realizarse con otras técnicas como la morfometría geométrica, que permite cuantificar y analizar directamente las formas biológicas (Rohlf & Marcus 1993). En efecto, la morfometría geométrica se ha utilizado para evaluar la variación morfológica en caracteres aparentemente idénticos, y en consecuencia ha sido de utilidad para discriminar especies crípticas (Villemant et al. 2007, Tofilski 2008). En un primer esfuerzo, Salas et al. (2012) determinó con caracteres morfométricos la posibilidad de diferenciar las especies de *Cheirodon* en terreno, lo que se puso a prueba en este trabajo utilizando un mayor número de ejemplares, pero que necesariamente deben ser aplicados por otros investigadores para su validación.

Si bien el estudio del Capítulo 2 permitió establecer que la especie invasora *C. interruptus* está colonizando las cuencas de la zona centro-norte de Chile, y que de acuerdo a la modelación de distribución de especies se espera que pueda establecerse en un amplio rango, también pude entregar en el Capítulo 1 una herramienta de fácil aplicación para discriminar la especie nativa de la invasora mediante morfometría geométrica, que no requiere el sacrificio de los individuos y por tanto contribuye a la conservación del género.

Sin embargo, muchas preguntas permanecen sin responder, y deben ser atendidas en el futuro: ¿qué procesos ecológicos y evolutivos pueden explicar la distribución de las especies de *Cheirodon* ante la ausencia de una diferenciación morfológica evidente? ¿cuántas especies de *Cheirodon* tenemos realmente en Chile? ¿la especie invasora puede estar hibridando con las especies nativas? ¿cómo los diferentes conceptos de especie pueden influenciar el manejo de estas invasiones crípticas? ¿qué tipo de evidencia es necesaria para describir formalmente una invasión críptica? Entender y cuantificar la diversidad biológica es imperativo si queremos ser capaces de conocer, y en último término, conservar nuestras especies.

Finalmente, me sumo al llamado urgente de mejorar las actuales medidas de gestión asociadas a las especies introducidas en Chile para proteger la biodiversidad de los sistemas límnicos (Habit et al. 2015). Actualmente se encuentra en discusión el Proyecto de Ley de Servicio de

Biodiversidad y Áreas Protegidas, el cual, de ser aprobado, promete incluir el control y erradicación de especies exóticas invasoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams DC, Rohlf FJ & Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Albert JS & Reis RE (2011) Historical biogeography of neotropical freshwater fishes, 1st Edition. University of California Press, London.
- Aldunate R & De La Hoz E (1993) Diversidad trófica de *Cheirodon pisciculus* G. (Ostariophysi: Characidae): ¿consecuencia de una versatilidad del mecanismo alimentario? *Revista Chilena de Historia Natural* 66: 177-184.
- Aljanabi SM & Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Arismendi I, Soto D, Peñaluna B, Jara CG, Leal C & León-Muñoz J (2009) Aquaculture, non-native salmonid invasions and associated declines of native fishes in Northern Patagonian lakes. *Freshwater Biology* 54: 1135-1147.
- Arratia G (1978) Comentario sobre la introducción de peces exóticos en aguas continentales de Chile. *Ciencias Forestales* 1: 21-30.

- Arratia G (1981) Géneros de Peces de Aguas Continentales de Chile. Publicación Ocasional del Museo Nacional de Historia Natural 34: 157-164.
- Arratia G (1987) Sexual dimorphism in the caudal skeleton of *Cheirodon* (Characidae, Teleostei). *Cybium* 11: 375-387.
- Awise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Beaumont LJ, Hughes L & Poulsen M (2005) Predicting species distributions: use of climatic parameters in BIOCLIM and its impact on predictions of species current and future distributions. *Ecological Modelling* 186: 250–269.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK & Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Bookstein FL (1991) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Broennimann O, Fitzpatrick MC, Pearman PB, Petitpierre B, Pellissier L & Yoccoz NG (2011) Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography* 21: 481-497.

- Calcagnotto D, Schaefer SA & DeSalle R (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 135–153.
- Campos H (1970) Introducción de especies exóticas y su relación con los peces de agua dulce de Chile. *Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Chile* 14: 3-9.
- Campos H (1982) Sistemática del género *Cheirodon* (Pisces: Characidae) en Chile con descripción de una nueva especie. Análisis de multivarianza. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 17: 129-162.
- Campos H, Dazarola G, Dyer B, Fuentes L, Gavilán JF, Huaquín L, Martínez G, Meléndez R, Pequeño G, Ponce F, Ruiz VH, Siefeld W, Soto D, Vega R & Vila I (1998) Categorías de conservación de peces nativos de aguas continentales de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* 47: 101-122.
- Colautti RI & MacIsaac HJ (2004) A neutral terminology to define “invasive” species. *Diversity and Distributions* 10: 135–141.
- Consuegra S, Phillips N, Gajardo G & De Garcia de Leaniz C (2011) Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout. *Evolutionary Applications* 4: 660–671.

- Correa C & Gross MR (2008) Chinook salmon invade southern South America. *Biological Invasions* 10: 615–639.
- Correa C & Hendry AP (2012) Invasive salmonids and lake order interact in the decline of puye grande *Galaxias platei* in western Patagonia lakes. *Ecological Applications* 22: 828–842.
- Cucherousset J & Olden JD (2011) Ecological Impacts of Nonnative Freshwater Fishes. *Fisheries* 36: 215–230.
- Chen P, Wiley EO & McNyset KM (2006). Ecological niche modeling as a predictive tool: silver and bighead carps in North America. *Biological Invasions* 9: 43–51.
- Dazarola G (1972) Contribution à l'étude de la faune ichthyologique de la région Valparaiso, Aconcagua (Chili). *Annales de Limnologie* 8: 87-100.
- De Buen F (1959) Lampreas, tiburones, rayas y peces en la Estación de Biología Marina de Montemar, Chile. *Revista de Biología Marina* 9: 3-196.
- De García De Leaniz C, Gajardo G & Consuegra S (2010) From Best to Pest: changing perspectives on the impact of exotic salmonids in the southern hemisphere. *Systematics and Biodiversity* 8: 447–459.
- De La Hoz E & Aldunate R (1985) Mecanismo mandibular en *Cheirodon pisciculus* Girard, 1854 (Ostariophysi: Characidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 58: 139-155.

Decreto Supremo N° 51 (2008) Aprueba y oficializa nómina para el tercer proceso de clasificación de especies según su estado de conservación. Ministerio Secretaría General de la Presidencia. Santiago, Chile. Diario Oficial, 30 de junio de 2008.

DeSalle R, Egan MG & Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1905–1916.

Dextrase AJ, Mandrak NE & Schaefer JA (2014) Modelling occupancy of an imperilled stream fish at multiple scales while accounting for imperfect detection: implications for conservation. *Freshwater Biology* 59: 1799–1815.

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

Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata Z, Knowler DJ, Lévêque CL, Naiman RJ, Prieur-Richard A, Soto D, Stiassny MLJ & Sullivan CA (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163–182.

Dyer BS (1998) Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical silverside family Atherinopsidae (Teleostei, Atheriniformes). En *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Malabarba LR,

- RE Reis, RP Vari, ZM Lucena & CAS Lucena (Eds). Porto Alegre, Edipucrs, pp. 519-536.
- Dyer BS (2000) Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos* 19: 77–98.
- Eigenmann CH (1927) The fresh-water fishes of Chile. *Memories of the National Academy of Sciences*, 22, 1-63.
- Elgueta A, González J, Ruzzante DE, Walde SJ & Habit EM (2012) Trophic interference by *Salmo trutta* on *Aplocheilichthys zebra* and *Aplocheilichthys taeniatus* in southern Patagonian lakes. *Journal of Fish Biology* 82: 430–443.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudik M & Ferrier S (2006) Novel methods improve predictions of species distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129–151.
- Fischer W (1963) Die fische des Brackwassergebietes Lenga bei Concepción (Chile). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 48: 419-511.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrikenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge.

- Fratini S, Zaccara S, Barbaresi S, Grandjean F, Souty-Grosset C, Crosa G, & Gherardi F (2005) Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 94: 108-118.
- Gacitúa S, Oyarzún C & Veas R (2008) Análisis multivariado de la morfometría y merística del robalo *Eleginops maclovinus* (Cuvier, 1830). *Revista de biología marina y oceanografía* 43: 491-500.
- Geller JB, Walton ED, Grosholz ED & Ruiz GM (1997) Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Molecular Ecology* 6: 901-906.
- GESAM Consultores (2014) Actualización del registro de especies ícticas y de la flora y fauna bentónica existente en aguas continentales de Chile. Proyecto 2013-95-DAC-51, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.
- Gozlan RE, Britton JR, Cowx IG & Copp GH (2010) Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology* 76: 751–786.
- Guisan A & Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009.
- Guisan A, Petitpierre B, Broennimann O, Daehler C & Kueffer C (2014) Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 260–269.

- Habit E & Victoriano P (2005) Peces de agua dulce de la Cordillera de la Costa. Smith-Ramírez, C., J. Armesto & C. Valdovinos (eds.) Biodiversidad y Ecología de la Cordillera de la Costa de Chile. Editorial Universitaria. pp. 392-403.
- Habit E, Dyer BS & Vila I (2006) Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 100–113.
- Habit E, González J, Ortíz-Sandoval J, Elgueta A & Sobenes C (2015) Efectos de la invasión de salmónidos en ríos y lagos de Chile. *Ecosistemas* 24(1): 43-51.
- Habit EM, Piedra P, Ruzzante DE, Walde SJ, Belk MC & Cussac VE (2010) Changes in the distribution of native fishes in response to introduced species and other anthropogenic effects. *Global Ecology and Biogeography* 19: 697–710.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hebert PDN, Ratnasingham S & De Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: S96–S99.

- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG & Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Igushi K, Matsuura K, McNyset KM, Peterson AT, Scachetti-Pereira R, Powers K, Vieglais D, Wiley EO, Yodo T (2004) Predicting invasion of basses in Japan. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 845–854.
- Iriarte JA, Lobos G & Jaksic FM (2005). Invasive vertebrate species in Chile and their control and monitoring by governmental agencies. *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 143–154.
- Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH & Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 498-511.
- Jeschke JM & Strayer DL (2005) Invasion success of vertebrates in Europe and North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7198–7202.
- Jeschke JM, Bacher S, Blackburn TM, Dick JTA, Essl F & Evans T (2014) Defining the Impact of Non-Native Species. *Conservation Biology* 28: 1188–1194.

- Kartavtsev YP & Lee JS (2006) Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species and genus levels. *Russian Journal of Genetics* 42: 341-362.
- Kimura M (1980) A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klingenberg CP (2010) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, PääBo S, Villablanca FX & Wilson A (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6196-6200.
- Kolar CS & Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 199-204.
- Lara A, Ponce-De-León JL, Rodríguez R, Casane D, Cote G, Bernatchez L & García-Machado E (2010) DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources* 10: 421-430.
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-2.

Lockwood JL, Hoopes MF & Marchetti MP (2007) Invasion ecology. Blackwell Publishing, Oxford.

Lüssen A, Falk TM & Villwock W (2003) Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 151-160.

Macchi PJ, Cussac VE, Alonso M & Denegri MA (1999) Predation relationships between introduced salmonids and the native fish fauna in lakes and reservoirs in northern Patagonia. *Ecology of Freshwater Fishes* 8: 227–236.

Maiztegui T, Campanella D & Colautti DC (2009) Avances en el desarrollo del cultivo de la mojarra (*Cheirodon interruptus*) como alternativa a la explotación de poblaciones silvestres. *Biología Acuática* 26: 143-149.

Malabarba LR (1994) Sistemática e filogenia de Cheirodontinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Tesis Doutorado, Universidade de Sao Paulo, Brasil, 287 pp.

Malabarba LR (1998) Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). En: *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Malabarba L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena, C.A.S. Lucena (Eds). Porto Alegre, Edipucrs, pp. 193-233.

- Malabarba LR (2003) Subfamily Cheirodontinae (Characins, tetras) (pp. 215-221). In: Reis, R. E., Kullander, S. y Ferraris, C. J. (Editors). 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDI-PUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Mantianan JE (2011) Sistemática y distribución de peces de la subfamilia Cheirodontinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) de la Argentina. Tesis Doctorado, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 214 pp.
- Mariguela TC, Ortí G, Avelino GS, Abe KT & Oliveira C (2013) Composition and interrelationships of a large Neotropical freshwater fish group, the subfamily Cheirodontinae (Characiformes: Characidae): A case study based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 1–12.
- McNyset KM (2005) Use of ecological niche modelling to predict distributions of freshwater fish species in Kansas. *Ecology of Freshwater Fishes* 14: 243–255.
- Menni RC (2004) Peces y ambientes en la Argentina continental. *Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 5: 1-316.
- Menni RC, Gómez SE & López F (1996) Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South America. *Hydrobiologia* 328: 173-197.

Mergeay J, Verschuren D & De Meester L (2005) Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa. *Limnology & Oceanography* 50(4): 1278–1283.

Ministerio del Medio Ambiente (2015) Clasificación de las especies según su estado de conservación. URL: <http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/> Accessed Octubre 23, 2015.

Miquelarena AM, Mantinian JE & López HL (2008) Peces de la Mesopotamia Argentina (Characiformes: Characidae: Cheirodontinae). *INSUGEO Miscelánea*, 17: 51-90.

Möller P (2008) Bibliografía sobre peces de aguas continentales de Chile. *Gestión Ambiental (Valdivia)* 16: 67-92.

Montecino V, Molina X, Kumar S, Castillo M & Bustamante R (2014) Niche dynamics and potential geographic distribution of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt, an invasive freshwater diatom in Southern Chile. *Aquatic Invasions* 9: 507–519.

Moyle PB & Cech Jr JJ (1995) *Fishes. An Introduction to Ichthyology*. Third Edition. Prentice Hall, Inc. USA. 612 pp.

Nelson JS (2006) *Fishes of the World*, 4th edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Oliveira C, Avelino GS, Abel KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Correa RM & Castro E (2011) Phylogenetic relationships within the

- speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11: 275.
- Pardo R (2002) Diferenciación morfológica de poblaciones de *Trichomycterus areolatus* Valenciennes 1846 (Pisces: Siluriformes: Trichomycteridae) de Chile. *Gayana* 66: 203-205.
- Pardo R, Scott S & Vila I (2005) Análisis de formas en especies chilenas del género *Trichomycterus* (Osteichthyes: Siluriformes) utilizando morfometría geométrica. *Gayana* 69(1): 180-183.
- Pardo R, Vila I & Capella JJ (2009) Competitive interaction between introduced rainbow trout and native silverside in a Chilean stream. *Environmental Biology of Fishes* 86: 353–359.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M & Steinlechner M (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23–28.
- Peñaluna B, Arismendi I & Soto D (2009) Evidence of Interactive Segregation between Introduced Trout and Native Fishes in Northern Patagonian Rivers, Chile. *Transactions of the American Fisheries Society* 138(4): 839–845.
- Peredo-Parada M, Martínez-Capel F, Garófano-Gómez V, Atenas A & Riestra F (2009) Base de datos eco-hidrológica de los ríos de Chile: una

- herramienta de gestión para los ecosistemas acuáticos. *Gayana* 73(1): 119-129.
- Phillips SJ, Anderson RP & Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190(3-4): 231–259.
- Quezada-Romegialli C (2010) La Compleja Historia de la Subfamilia Trichomycterinae como Modelo para la Dispersión y Colonización de Ictiofauna en Chile. Tesis Magister, Universidad de Chile, Chile, 89 pp.
- Quezada-Romegialli C (2014) Ecología de ríos mediterráneos: Historia, estructuración y funcionamiento. Tesis Doctorado, Universidad de Chile, Chile, 147 pp.
- Quezada-Romegialli C, Vila, I & Véliz D (2009) A new invasive freshwater fish species in Central Chile: *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes: Anablepidae). *Gayana* 73: 233–236.
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>
- Ricciardi A & Cohen J (2006) The invasiveness of an introduced species does not predict its impact. *Biological Invasions* 9: 309–315.
- Riegel H (1960) Observaciones sobre la fauna ictiológica de las aguas dulces chilenas. *Actas y Trabajos del Primer Congreso Sudamericano de Zoología*, La Plata, Tomo I: 141-144.

- Ringuelet RA, Arámburu RH & Arámburu A (1967) Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, 602 pp.
- Rohlf FJ (2015) SB Morphometrics. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> Accessed: October 23, 2015.
- Rohlf FJ & Marcus LF (1993) A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 129-132.
- Rosso JJ, Mabrugaña E, González Castro M (2012) DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources* 12: 999–1011.
- Rubinoff D (2006) Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology* 20: 1026–1033.
- Ruiz VH (1993) Ictiofauna del Río Andalién. *Gayana* 57: 109-278.
- Ruiz VH & Marchant M (2004) Ictiofauna de aguas continentales chilenas. Primera edición. Universidad de Concepción, Concepción. 356 pp.
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit EM & Zemplak TS (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2234–2244.

- Salas D, Véliz D & Scott S (2012) Diferenciación morfológica en especies del género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae) mediante morfometría tradicional y geométrica. *Gayana* 76: 142–152.
- Schlei OL, Crête-Lafrenière A, Whiteley AR, Brown RJ, Olsen JB & Bernatchez L (2008) DNA barcoding of eight North American coregonine species. *Molecular Ecology Resources* 8: 1212–1218.
- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD & Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539.
- Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, Courchamp F, Galil B, García-Borthou, E, Pascal M, Pysek P, Sousa R, Tabacchi E & Vila M (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution* 28: 58–66.
- Slice DE (2007) Geometric Morphometrics. *Annual Review of Anthropology* 36: 261–281.
- 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: 81–98.

- Soto D, Arismendi I, Gonzalez J, Sanzana J, Jara F & Jara CG (2006). Southern Chile, trout and salmon country: invasion patterns and threats for native species. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 97–117.
- Soto D, Jara F & Moreno CA (2001) Escaped salmon in the inner seas, southern Chile: Facing ecological and social conflicts. *Ecological Applications* 11: 1750–1762.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596-1599.
- Tofilski A (2008) Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* 39: 558–563.
- Vanhaecke D, De García de Leaniz C, Gajardo G, Thomas CJ & Consuegra S (2012) Metapopulation dynamics of a diadromous galaxiid fish and potential effects of salmonid aquaculture. *Freshwater Biology* 57: 1241–1252.
- Vargas PV, Arismendi I, Lara G, Millar J & Peredo S (2010) Evidencia de solapamiento de micro-hábitat entre juveniles del salmón introducido *Oncorhynchus tshawytscha* y el pez nativo *Trichomycterus areolatus* en el río Allipén, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45: 285–292.

- Vera-Escalona I, Habit EM & Ruzzante DE (2015) Echoes of a distant time: effects of historical processes on contemporary genetic patterns in *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology* 24(16): 4112–4128.
- Victoriano P (1997) Variabilidad genética en *Cheirodon galusdae* (Pisces, Characidae) en una cuenca hidrográfica, y su relación con factores ambientales. Tesis Doctorado en Ciencias Mención Zoología. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción. 230 pp.
- Vila I, Fuentes L & Contreras M (1999) Peces límnicos de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* 48: 61-75.
- Vila I, Veloso A, Schlatter R & Ramírez C (2006) Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile, Primera Edición. Editorial Universitaria, Santiago. 187 pp.
- Vila I, Morales P, Scott S, Poulin E, Véliz D, Harrod C & Méndez M (2013) Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology* 82: 927-943.
- Villemant C, Simbolotti G & Kenis M (2007) Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric

- morphometric analysis of wing venation. *Systematic Entomology* 32: 625–634.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR & Hebert PDN (2005) Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1847-1857.
- Warren DL, Glor RE & Turelli M (2008) Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* 62: 2868– 2883.
- Wiens J & Penkrot TA (2003) Delimiting Species Using DNA and Morphological Variation and Discordant Species Limits in Spiny Lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51: 69–91.
- Young KA, Stephenson J, Terreau A, Thailly AF, Gajardo G & De Garcia de Leaniz C (2009) The diversity of juvenile salmonids does not affect their competitive impact on a native galaxiid. *Biological Invasions* 11: 1955–1961.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD & Fink WL (2004) *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic Press. 443 pp.
- Zemlak TS, Habit EM, Walde SJ, Correa C & Ruzzante DE (2010) Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. *BMC Evolutionary Biology* 10:67.

- Zengeya TA, Robertson MP, Booth AJ & Chimimba CT (2012) Ecological niche modeling of the invasive potential of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in African river systems: concerns and implications for the conservation of indigenous congeners. *Biological Invasions* 15(7): 1507-1521.
- Zenni RD & Nuñez MA (2013) The elephant in the room: the role of failed invasions in understanding invasion biology. *Oikos* 122(6): 801–815.
- Zunino S, Aliaga C & Da Venezia P (2009) Comunidades de peces en desembocaduras de ríos y esteros de la Región de Valparaíso, Chile central. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(1): 123–130.

APÉNDICE

Apéndice: Script R Morfometría tradicional

Daniel Salas Johnson

23 de octubre de 2015

Contents

Primeros pasos	2
Lectura de datos y gráficos preliminares	2
Gráficos de dispersión (scatterplot)	2
Normalidad segun test Shapiro-Wilk	6
Perfiles de las variables (profile plot)	8
Promedios y varianzas	11
Calculando correlaciones para datos multivariados	13
Análisis de Componentes Principales (PCA)	14
Decidiendo cuántos componentes principales utilizar	15
Loadings de los componentes principales	16
Gráficos típicos PCA	17
Análisis Discriminante Lineal (LDA)	20
Loadings de las funciones discriminantes (utilizando <code>discr2</code>)	21
Histograma y gráfico densidad con los valores del LDA	22
Gráficos con las funciones discriminantes	24
Clasificación de muestras	26
Clasificación grupo desconocido	28
MANOVA	29
ANOVA	29
Gráficos PCA-LDA utilizando el paquete <code>dudi.pca</code>	31
PCA	31
LDA	32

Título tesis: Alcances de la introducción de *Cheirodon interruptus* (Ostariophysi: Characiformes) en Chile y herramientas para su discriminación del resto de carácidos chilenos

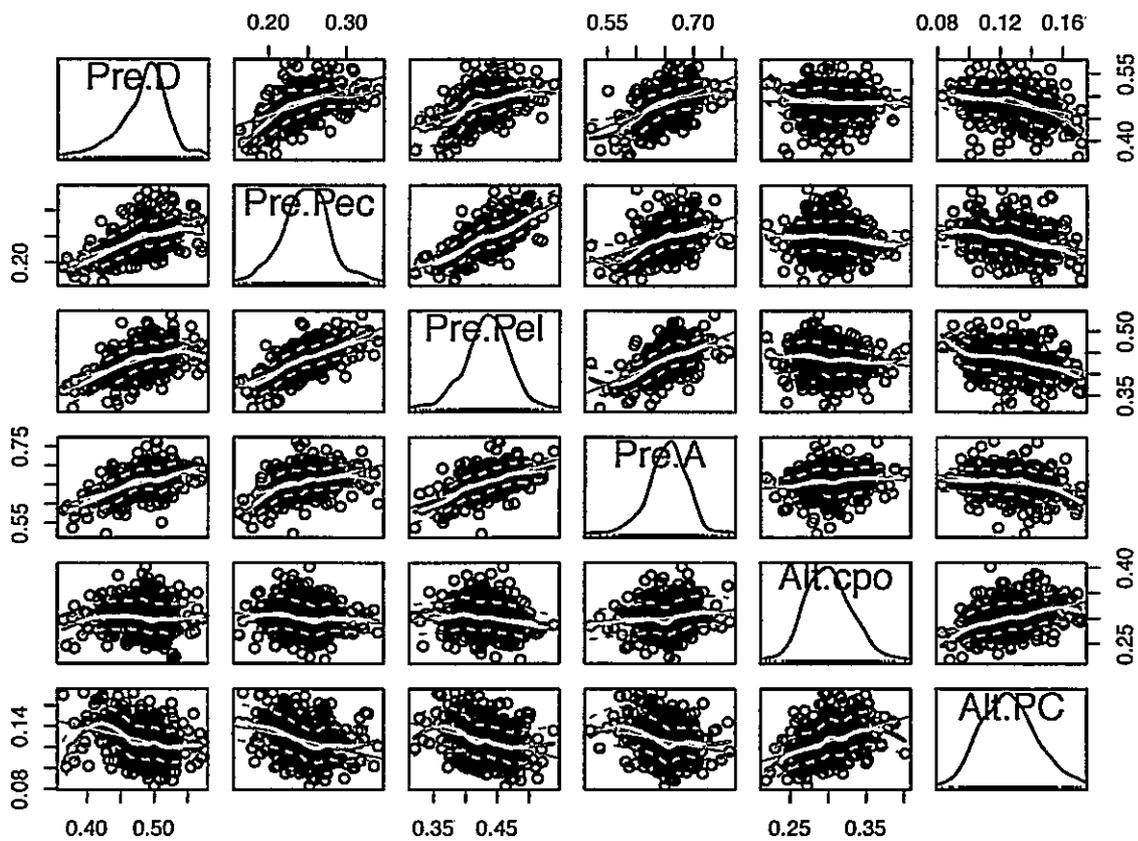
Capítulo 1: Diferenciación morfológica y genética del género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characiformes) en Chile

La gráficas que entrega corresponde a la variable para cada individuo. No es un histograma de frecuencias. Este tipo de gráficos se hace con la función `scatterplotMatrix()` del paquete `car`. Más adelante se probará la normalidad de cada variable mediante un test de Shapiro-Wilk. La hipótesis nula del test de Shapiro es que la muestra tiene distribución normal.

```
library(car) # cargara sus dependencias automaticamente
```

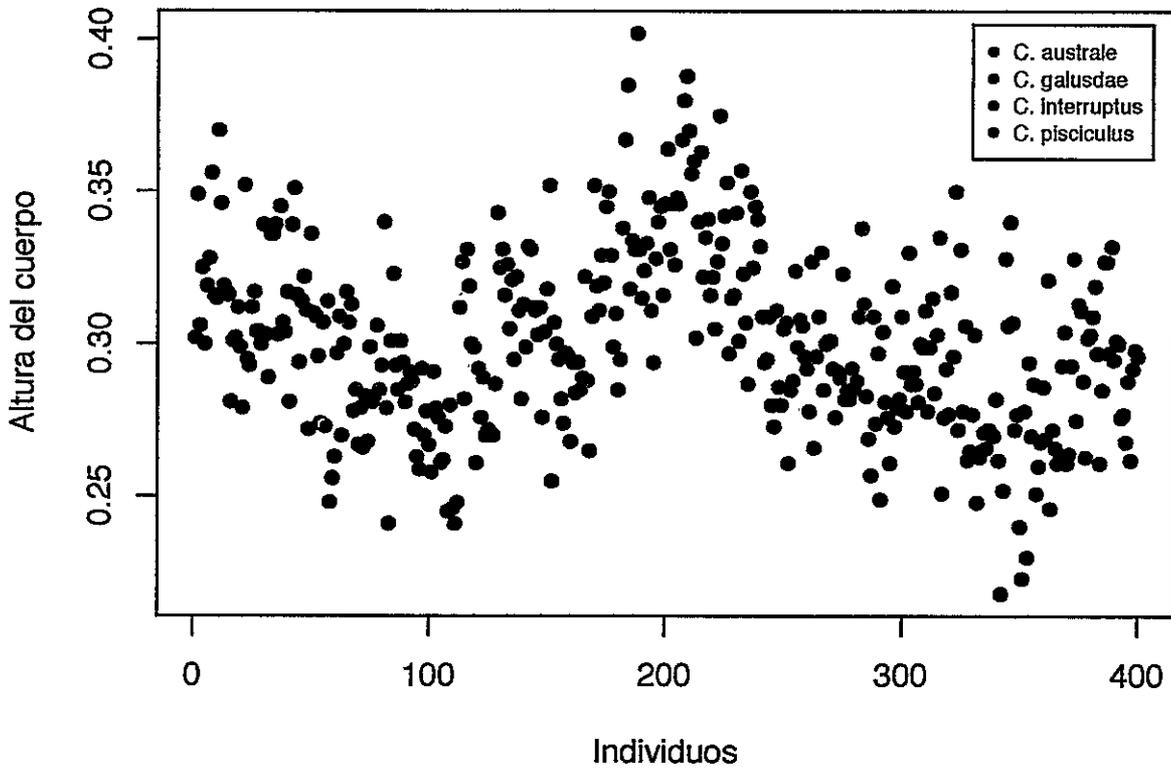
Para usar la función `scatterplotMatrix` se debe definir los datos de entrada. Recordar que las ultimas columnas (13 y 14) contienen los nombres de las especies (SP) y el código de cada individuo (ID).

```
scatterplotMatrix(pochas[1:6])
```



```
scatterplotMatrix(pochas[7:12])
```

Altura del cuerpo para todos los individuos



```
boxplot(aus$Alt.cpo, gal$Alt.cpo, int$Alt.cpo, pis$Alt.cpo, names = c("C. australe",  
"C. galusdae", "C. interruptus", "C. pisciculus"), ylab = "Altura del cuerpo",  
main = "Boxplot altura del cuerpo por especie")
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Pre.Pec
## W = 0.9938, p-value = 0.1016

shapiro.test(Pre.Pel) # Pre-pelvica
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Pre.Pel
## W = 0.99363, p-value = 0.09087

shapiro.test(Pre.A) # Pre-anal
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Pre.A
## W = 0.9863, p-value = 0.0007908
```

```
shapiro.test(Alt.cpo) # Altura del cuerpo
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Alt.cpo
## W = 0.99297, p-value = 0.05793
```

```
shapiro.test(Alt.PC) # Altura del pedunculo caudal
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: Alt.PC
## W = 0.99165, p-value = 0.02382
```

```
shapiro.test(L.PC) # Longitud del pedunculo caudal
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: L.PC
## W = 0.99636, p-value = 0.4983
```

```
shapiro.test(Pre.O) # Pre-orbital
```

```

colours <- brewer.pal(numvariables, "Set1")
# find out the minimum and maximum values of the variables:
mymin <- 1e+20
mymax <- 1e-20
for (i in 1:numvariables) {
  Valor_variable <- mylist[[i]]
  mini <- min(Valor_variable)
  maxi <- max(Valor_variable)
  if (mini < mymin) {
    mymin <- mini
  }
  if (maxi > mymax) {
    mymax <- maxi
  }
}
# plot the variables
for (i in 1:numvariables) {
  Valor_variable <- mylist[[i]]
  namei <- names[i]
  colouri <- colours[i]
  if (i == 1) {
    plot(Valor_variable, col = colouri, type = "l", ylim = c(mymin,
      mymax))
  } else {
    points(Valor_variable, col = colouri, type = "l")
  }
  lastxval <- length(Valor_variable)
  lastyval <- Valor_variable[length(Valor_variable)]
  text((lastxval - 10), (lastyval), namei, col = "black", cex = 0.6)
}
}

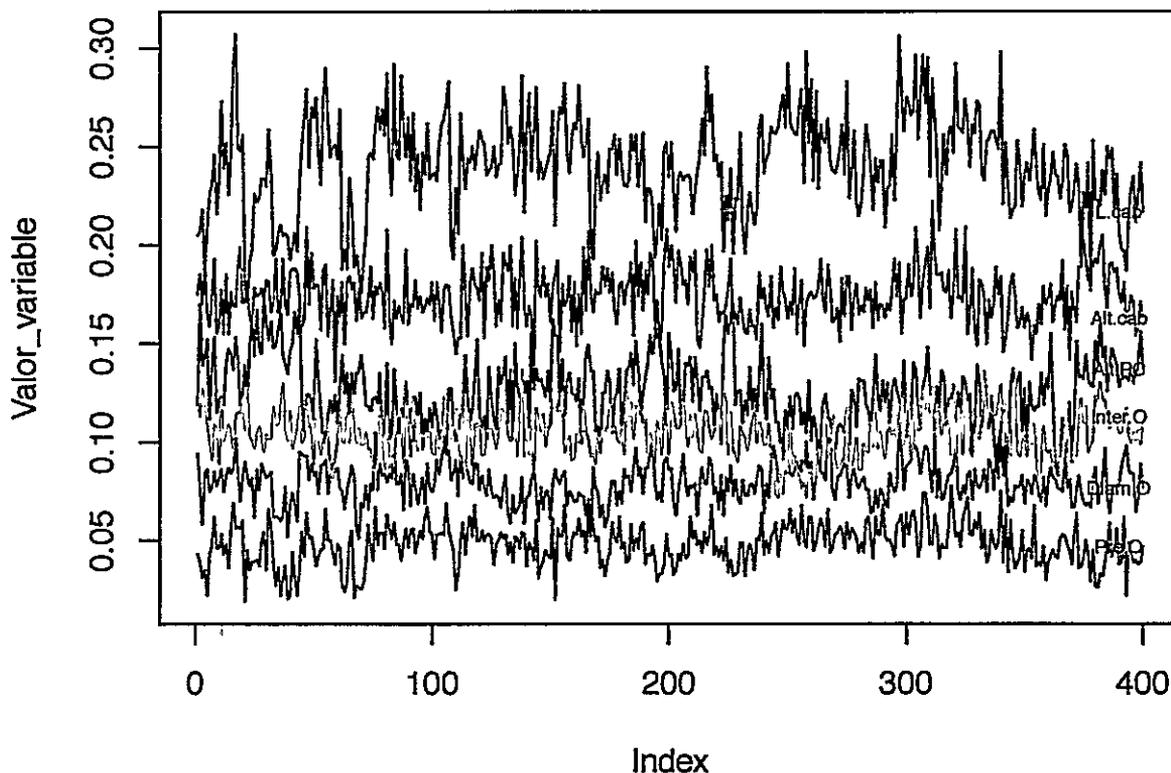
```

Los argumentos de la función son un vector que contenga los nombres de las variables que se quiere graficar. A continuación se muestran dos gráficos para cubrir todas las medidas de este estudio.

```

library(RColorBrewer) # Recordar cargar el paquete primero
names1 <- c("Pre.D", "Pre.Pec", "Pre.Pel", "Pre.A", "Alt.cpo", "L.PC")
names2 <- c("Alt.PC", "Pre.O", "Diam.O", "L.cab", "Alt.cab", "Inter.O")
mylist1 <- list(pochas$Pre.D, pochas$Pre.Pec, pochas$Pre.Pel, pochas$Pre.A,
  pochas$Alt.cpo, pochas$L.PC)
mylist2 <- list(pochas$Alt.PC, pochas$Pre.O, pochas$Diam.O, pochas$L.cab, pochas$Alt.cab,
  pochas$Inter.O)
makeProfilePlot(mylist1, names1)

```



Este tipo de gráfico sirve para explorar los valores extremos (outliers) que en realidad pueden estar mal transcritos y que significa que varias medidas de un mismo individuo estuvieran incorrectas (luego de la estandarización). Con ello se hace una doble revisión de todas las medidas registradas si fueron correctamente tomadas y transcritas.

Promedios y varianzas

A continuación se calculan algunos estadísticos como el promedio y la desviación estándar para cada una de las variables (medidas).

La función `sapply()` puede ser usada para aplicar cierta función a cada columna en un conjunto de datos. Ej. `sapply(mydataframe,sd)` calculará la desviación estándar de cada columna del conjunto `mydataframe`.

A continuación se calcula el promedio (mean) y desviación estándar (sd) para cada variable.

```
sapply(pochas[1:12], mean)
```

```
##      Pre.D  Pre.Pec  Pre.Pel   Pre.A  Alt.cpo   Alt.PC   L.PC
## 0.4844750 0.2482800 0.4337000 0.6560125 0.3007250 0.1260575 0.1754075
##      Pre.O   Diam.O   L.cab  Alt.cab  Inter.O
## 0.0478975 0.0795675 0.2409400 0.1743275 0.1046750
```

```
printMeanAndSdByGroup(pochas[1:12], pochas[13])
```

```
## [1] "Means:"
## SP Pre.D Pre.Pec Pre.Pel Pre.A Alt.cpo Alt.PC L.PC
## 1 A 0.4648727 0.2423818 0.4148727 0.6334364 0.3142727 0.1394545 0.1676545
## 2 B 0.4808053 0.2500354 0.4300531 0.6584956 0.2902478 0.1230973 0.1845664
## 3 C 0.4908793 0.2440690 0.4251983 0.6573017 0.3198448 0.1248017 0.1611724
## 4 D 0.4909397 0.2535776 0.4546810 0.6630086 0.2853879 0.1238448 0.1843966
## Pre.O Diam.O L.cab Alt.cab Inter.O
## 1 0.04314545 0.07963636 0.2311273 0.1756909 0.1080364
## 2 0.04853982 0.07767257 0.2439823 0.1729292 0.1040973
## 3 0.04841379 0.08071552 0.2416034 0.1742241 0.1009741
## 4 0.04900862 0.08023276 0.2419655 0.1751466 0.1073448
## [1] "Standard deviations:"
## SP Pre.D Pre.Pec Pre.Pel Pre.A Alt.cpo Alt.PC
## 1 A 0.03952498 0.04250468 0.04202427 0.03844321 0.02171828 0.01844192
## 2 B 0.03653249 0.02556083 0.02965993 0.03629668 0.02371239 0.01447039
## 3 C 0.03190098 0.02477050 0.02635880 0.02952441 0.02856955 0.01702950
## 4 D 0.02858497 0.02850603 0.03057467 0.02944161 0.02500531 0.01597259
## L.PC Pre.O Diam.O L.cab Alt.cab Inter.O
## 1 0.02422213 0.012468357 0.011049323 0.03069024 0.01235864 0.009973973
## 2 0.02063366 0.010489821 0.009838375 0.02497462 0.01494377 0.011096947
## 3 0.02145542 0.008857391 0.009230202 0.02132191 0.01337167 0.012240674
## 4 0.02288454 0.011257844 0.009514618 0.02408172 0.01506522 0.011667199
## [1] "Sample sizes:"
## SP Pre.D Pre.Pec Pre.Pel Pre.A Alt.cpo Alt.PC L.PC Pre.O Diam.O L.cab
## 1 A 55 55 55 55 55 55 55 55 55 55
## 2 B 113 113 113 113 113 113 113 113 113 113
## 3 C 116 116 116 116 116 116 116 116 116 116
## 4 D 116 116 116 116 116 116 116 116 116 116
## Alt.cab Inter.O
## 1 55 55
## 2 113 113
## 3 116 116
## 4 116 116
```

Esta función también imprime el número de individuos por muestra. Para el análisis de esta tesis se utilizaron 55 *C. australe* (A), 113 *C. galusdae* (B), 116 *C. interruptus* (C) y 116 *C. pisciculus* (D).

Calculando correlaciones para datos multivariados

Se podría analizar si existen variables que estén altamente correlacionadas. No se hace una regresión porque se desconocen *a priori* las relaciones dependientes entre las variables. Así también, se utiliza la correlación de Pearson ya que de acuerdo a los test de Shapiro-Wilk todas las variables tienen distribución normal.

Para calcular la correlación entre un par de variables, se utiliza la función `cor.test()`, siendo el último valor `cor` el coeficiente de correlación.

Ej. en este caso calculamos la correlación entre las longitudes prepélvica (`Pre.Pel`) y preanal (`Pre.A`).

```
cor.test(Pre.Pel, Pre.A)
```

```
##
```

```
summary(pca <- prcomp(pochas[, 1:12]))
```

```
## Importance of components:
```

```
##          PC1      PC2      PC3      PC4      PC5      PC6
## Standard deviation  0.05618 0.03432 0.02637 0.02494 0.02149 0.01946
## Proportion of Variance 0.43285 0.16157 0.09536 0.08532 0.06331 0.05195
## Cumulative Proportion 0.43285 0.59442 0.68978 0.77511 0.83841 0.89037
##          PC7      PC8      PC9      PC10     PC11     PC12
## Standard deviation  0.01473 0.01401 0.01255 0.009864 0.008622 0.007539
## Proportion of Variance 0.02977 0.02692 0.02161 0.013340 0.010190 0.007790
## Cumulative Proportion 0.92014 0.94706 0.96867 0.982010 0.992210 1.000000
```

Para obtener sólo las desviaciones estándar de cada componente principal:

```
pca$sdev
```

```
## [1] 0.056180570 0.034324596 0.026369756 0.024943455 0.021485496
## [6] 0.019463643 0.014734396 0.014010268 0.012552396 0.009864466
## [11] 0.008621903 0.007539198
```

Decidiendo cuántos componentes principales utilizar

Para decidir cuántos componentes principales debieran ser representativos del set de datos, es común resumir los resultados en un gráfico de las varianzas:

```
screeplot(pca, type = "líneas", main = "Varianzas componentes principales")
```

Por ejemplo, para obtener los loadings del primer componente principal:

```
pca$rotation[, 1]
```

```
##      Pre.D      Pre.Pec      Pre.Pel      Pre.A      Alt.cpo      Alt.PC
## 0.46785297 0.41831419 0.51272561 0.45073955 -0.03937861 -0.11773220
##      L.PC      Pre.O      Diam.O      L.cab      Alt.cab      Inter.O
## 0.06358730 0.10563786 0.04437871 0.32501620 0.04158871 0.01114746
```

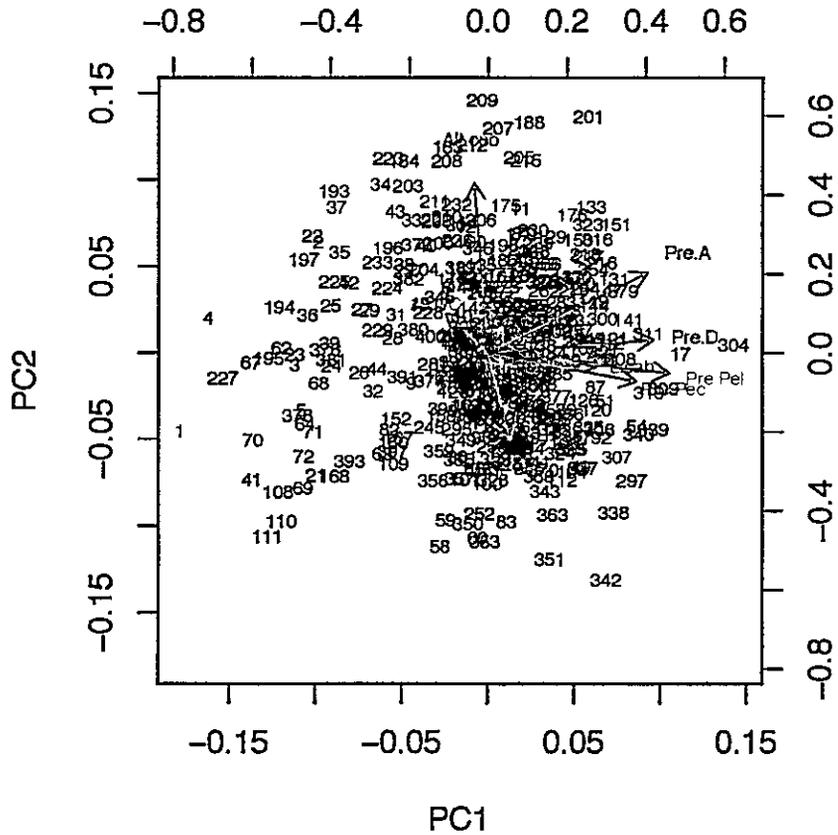
Notar que el PC 1 tiene los loadings más altos (en valor absoluto) para las variables Pre.Pel (0.51), Pre.D (0.47) y Pre.A (0.45).

Notar que los cuadrados de los loadings suman 1.

Los valores de los componentes principales para cada individuo son entregados por la función `prcomp()` con el comando `pca$x[,#PC]`.

Gráficos típicos PCA

```
plot(pca$x[, 1], pca$x[, 2], col = unclass(pochas[, 13]), pch = 16, cex = 0.8,
      xlab = "PC 1 (43.3%)", ylab = "PC 2 (16.2%)", title("PC1 vs PC2"))
legend(-0.21, 0.103, legend = c("C. australe", "C. galusdae", "C. interruptus",
                                "C. pisciculus"), cex = 0.7, pch = 16, col = c("black", "red", "green",
                                "blue"))
```



```

plot(pca$x[, 2], pca$x[, 3], col = unclass(pochas[, 13]), pch = 16, cex = 0.8,
     xlab = "PC 2 (16.2%)", ylab = "PC 3 (9.5%)", title("PC2 vs PC3"))
legend(0.073, 0.083, legend = c("C. australe", "C. galusdae", "C. interruptus",
                                "C. pisciculus"), cex = 0.6, pch = 16, col = c("black", "red", "green",
                                "blue"))

```

```
library(MASS)
pochas2 <- pochas[, 1:13] # Estoy eliminando la ultima columna ID
discr <- lda(SP ~ ., pochas2)
```

Aqui se está utilizando las frecuencias iniciales de cada grupo (Prior probabilities of groups). Para decidir uno mismo agregar argumento prior=c(). Ej.

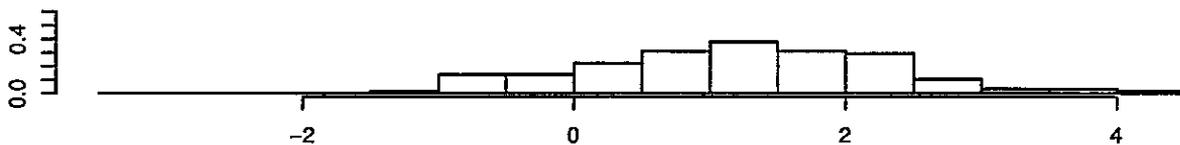
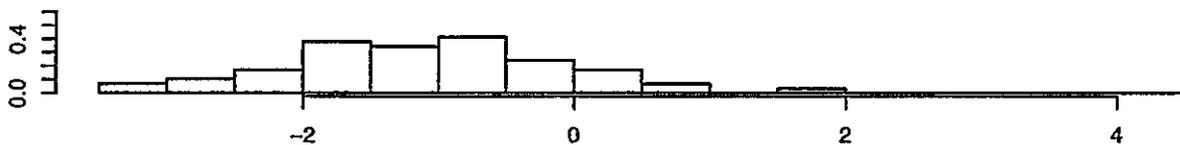
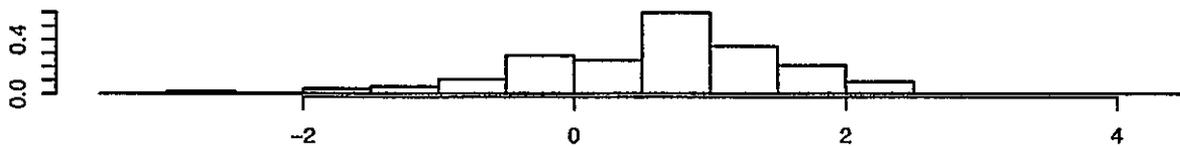
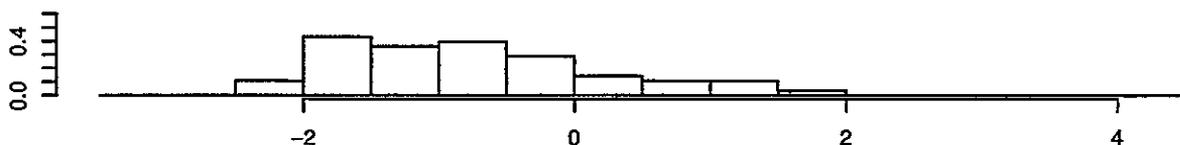
```
discr2 <- lda(SP ~ ., pochas2, prior = c(0.25, 0.25, 0.25, 0.25))
```

Loadings de las funciones discriminantes (utilizando discr2)

Para obtener los valores de los loadings de las funciones discriminantes, utilizar:

```
discr2 # Con las probabilidades dadas de 0.25 por grupo
```

```
## Call:
## lda(SP ~ ., data = pochas2, prior = c(0.25, 0.25, 0.25, 0.25))
##
## Prior probabilities of groups:
##   A   B   C   D
## 0.25 0.25 0.25 0.25
##
## Group means:
##   Pre.D   Pre.Pec   Pre.Pel   Pre.A   Alt.cpo   Alt.PC   L.PC
## A 0.4648727 0.2423818 0.4148727 0.6334364 0.3142727 0.1394545 0.1676545
## B 0.4808053 0.2500354 0.4300531 0.6584956 0.2902478 0.1230973 0.1845664
## C 0.4908793 0.2440690 0.4251983 0.6573017 0.3198448 0.1248017 0.1611724
## D 0.4909397 0.2535776 0.4546810 0.6630086 0.2853879 0.1238448 0.1843966
##   Pre.0   Diam.0   L.cab   Alt.cab   Inter.0
## A 0.04314545 0.07963636 0.2311273 0.1756909 0.1080364
## B 0.04853982 0.07767257 0.2439823 0.1729292 0.1040973
## C 0.04841379 0.08071552 0.2416034 0.1742241 0.1009741
## D 0.04900862 0.08023276 0.2419655 0.1751466 0.1073448
##
## Coefficients of linear discriminants:
##           LD1          LD2          LD3
## Pre.D    -4.238005  11.829730   9.681380
## Pre.Pec  -6.807963 -24.035749 -11.668308
## Pre.Pel  17.328166   1.763751  35.326032
## Pre.A     8.545195  10.268447 -10.600243
## Alt.cpo  -33.729629   7.834435   6.130463
## Alt.PC    4.059948 -36.409173  12.256968
## L.PC     19.077307  -4.248008 -11.959801
## Pre.0     7.799565  16.455179  -1.559344
## Diam.0  -28.445801   2.412681  49.747124
## L.cab    -2.930919   8.493545 -26.085075
## Alt.cab   5.612666   5.134125   3.846507
## Inter.0  27.424430 -32.105978  -1.917264
##
## Proportion of trace:
##   LD1   LD2   LD3
## 0.6690 0.2239 0.1071
```



```
library(sm) # Grafico de densidad
```

```
## Package 'sm', version 2.2-5.4: type help(sm) for summary information
```

```
##
```

```
## Attaching package: 'sm'
```

```
##
```

```
## The following object is masked from 'package:MASS':
```

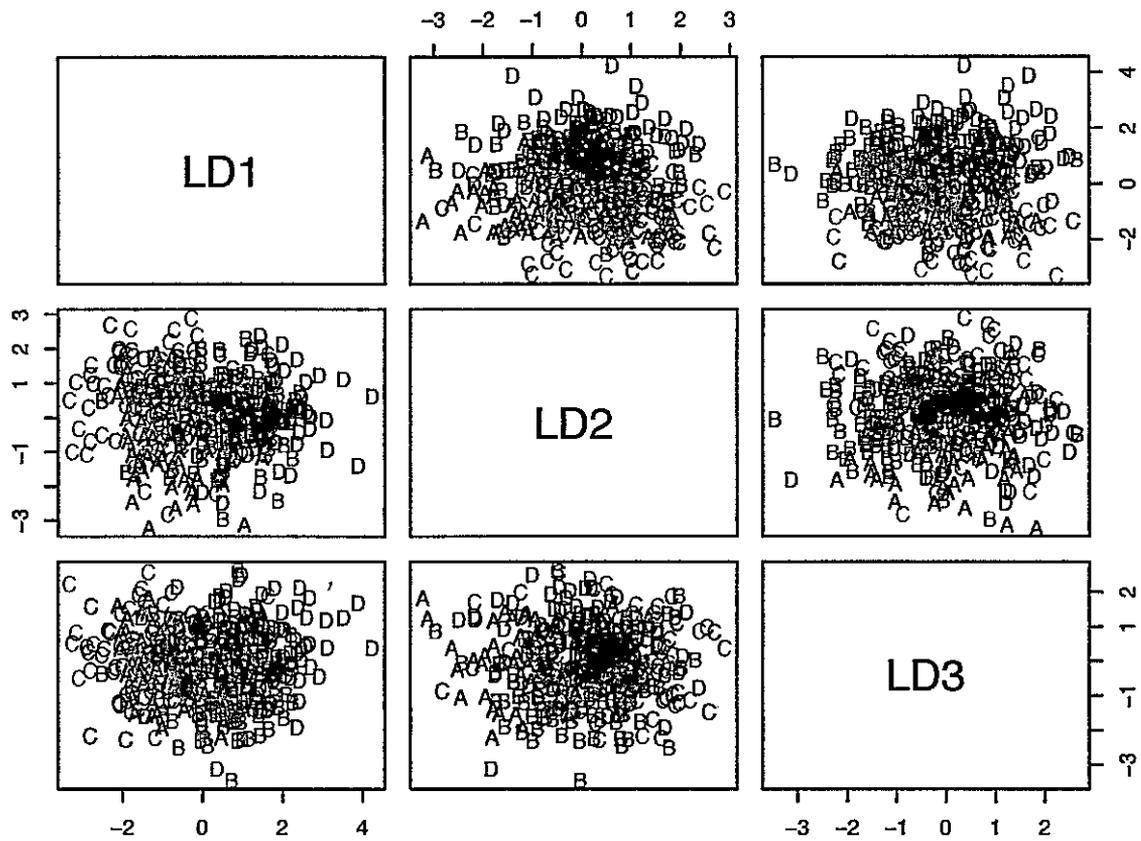
```
##
```

```
## muscle
```

```
g <- factor(pochas2$SP, labels = c("C. australe", "C. galusdae", "C.interruptus",  
"C. pisciculus"))
```

```
sm.density.compare(discr2.values$x[, 1], g, xlab = "LD1", col = c("black", "red",  
"darkgreen", "blue"), lty = c(1, 1, 1, 1), lwd = c(1.5, 1.5, 1.5, 1.5))
```

```
legend(3, 0.45, legend = c("C. australe", "C. galusdae", "C. interruptus", "C. pisciculus"),  
cex = 0.8, pch = 15, col = c("black", "red", "darkgreen", "blue"))
```



```

plot(discr2.values$x[, 1], discr2.values$x[, 2], col = unclass(pochas[, 13]),
     cex = 0.8, pch = 16, xlab = "LD1", ylab = "LD2")
legend(3, 2.8, legend = c("C. australe", "C. galusdae", "C. interruptus", "C. pisciculus"),
      pch = 16, col = c("black", "red", "green", "blue"), cex = 0.6)

```

```
## [316] A D D D B C D C D B D D B D B B D D B D D D D D D D D C A A B D B B
## [351] D D D B B B D B D D D C D D D D D D C D D D C D D A D D D A A A D D D
## [386] D A D C D D D A A D D B A A A
## Levels: A B C D
```

Por lo tanto, puede ser útil separar ese listado por especie, y luego contar el número de individuos que fueron clasificados en los distintos grupos. A continuación se presentan los scripts para separar por especie, calculando al mismo tiempo el porcentaje de clasificación (pues conocemos el número de individuos por especie *a priori*).

```
# Si quisieramos confirmar el n por especie
ta <- length(predict(discr2)$class[1:55]) # aus = A
tb <- length(predict(discr2)$class[56:168]) # gal = B
tc <- length(predict(discr2)$class[169:284]) # int = C
td <- length(predict(discr2)$class[285:400]) # pis = D

# Porcentajes de clasificacion aus
aa <- length(which(predict(discr2)$class[1:55] == "A"))/55
ab <- length(which(predict(discr2)$class[1:55] == "B"))/55
ac <- length(which(predict(discr2)$class[1:55] == "C"))/55
ad <- length(which(predict(discr2)$class[1:55] == "D"))/55
australe <- c(aa, ab, ac, ad) * 100
# Porcentajes de clasificacion gal
ba <- length(which(predict(discr2)$class[56:168] == "A"))/113
bb <- length(which(predict(discr2)$class[56:168] == "B"))/113
bc <- length(which(predict(discr2)$class[56:168] == "C"))/113
bd <- length(which(predict(discr2)$class[56:168] == "D"))/113
galusdae <- c(ba, bb, bc, bd) * 100
# Porcentajes de clasificacion int
ca <- length(which(predict(discr2)$class[169:284] == "A"))/116
cb <- length(which(predict(discr2)$class[169:284] == "B"))/116
cc <- length(which(predict(discr2)$class[169:284] == "C"))/116
cd <- length(which(predict(discr2)$class[169:284] == "D"))/116
interruptus <- c(ca, cb, cc, cd) * 100
# Porcentajes de clasificacion pis
da <- length(which(predict(discr2)$class[285:400] == "A"))/116
db <- length(which(predict(discr2)$class[285:400] == "B"))/116
dc <- length(which(predict(discr2)$class[285:400] == "C"))/116
dd <- length(which(predict(discr2)$class[285:400] == "D"))/116
pisciculus <- c(da, db, dc, dd) * 100
```

Finalmente, con estos valores es posible crear la matriz de clasificación. En este formato de presentación, los resultados del modelo se muestran en las columnas.

```
as.matrix(data.frame(australe, galusdae, interruptus, pisciculus, row.names = c("australe",
"galusdae", "interruptus", "pisciculus")))
```

```
##           australe galusdae interruptus pisciculus
## australe  63.636364  6.194690  18.965517  12.931034
## galusdae  10.909091 58.407080   6.896552  15.517241
## interruptus 20.000000  8.849558  66.379310   6.896552
## pisciculus  5.454545 26.548673   7.758621  64.655172
```

MANOVA

Primero se definen las variables de clase y las medidas, y luego se ejecuta el MANOVA.

```
especies = as.factor(as.matrix(pochas[, 13]))
medidas = as.matrix(pochas[, 1:12])
man <- manova(medidas ~ especies)
summary(man, test = "Wilks")

##           Df  Wilks approx F num Df den Df   Pr(>F)
## especies    3 0.36209   12.974    36 1138.3 < 2.2e-16 ***
## Residuals 396
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA

Se calcula para cada medida por separado.

```
summary.aov(man)

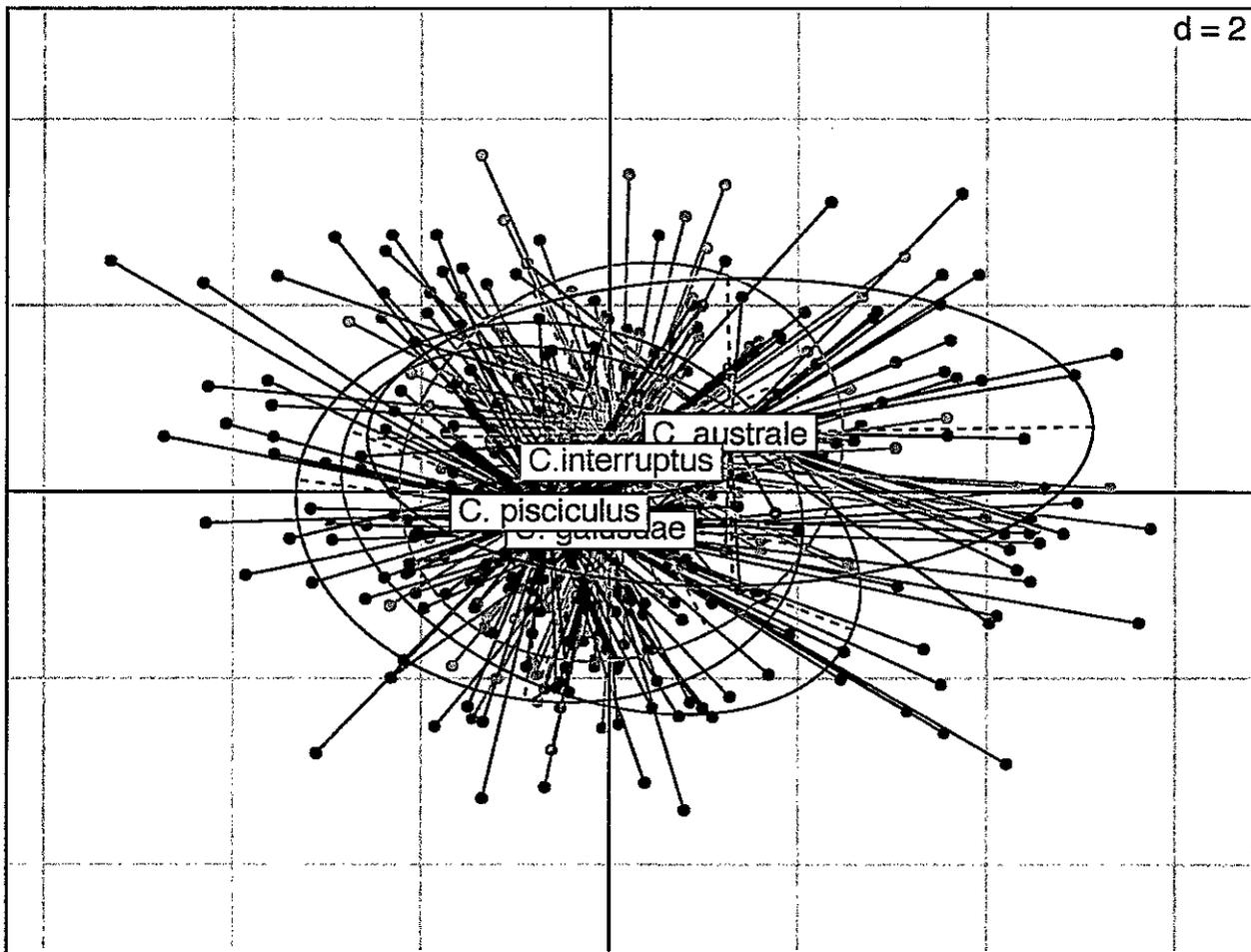
## Response Pre.D :
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## especies    3 0.03226 0.0107537  9.5731 4.078e-06 ***
## Residuals 396 0.44484 0.0011233
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Response Pre.Pec :
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## especies    3 0.00757 0.00252468  2.9867 0.03105 *
## Residuals 396 0.33474 0.00084531
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Response Pre.Pel :
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## especies    3 0.08045 0.0268155  27.849 2.323e-16 ***
## Residuals 396 0.38130 0.0009629
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Response Pre.A :
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## especies    3 0.03460 0.011533  10.689 9.042e-07 ***
## Residuals 396 0.42729 0.001079
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Response Alt.cpo :
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## especies    3 0.092191 0.030730  47.87 < 2.2e-16 ***
```

Gráficos PCA-LDA utilizando el paquete `dudi.pca`

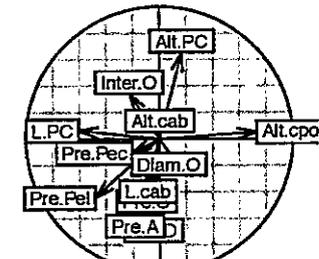
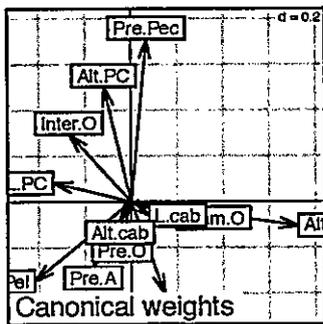
```
library(MASS) # Para hacer el LDA
library(lattice) # Graficos
library(ade4) # Contiene discrimin y dudi.pca
```

PCA

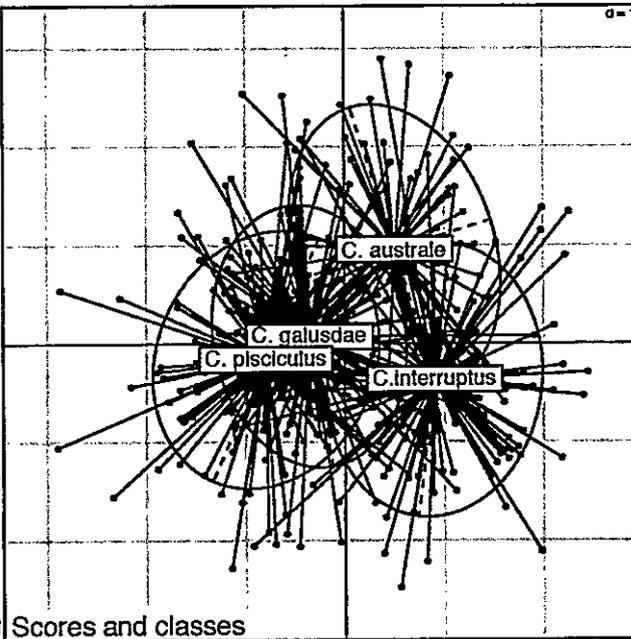
```
pochas3 <- dudi.pca(pochas[, 1:12], center = TRUE, scale = TRUE, scan = FALSE)
s.class(pochas3$li, fac = g, cpoint = 1, col = c("blue", "green", "orange",
"red"))
```



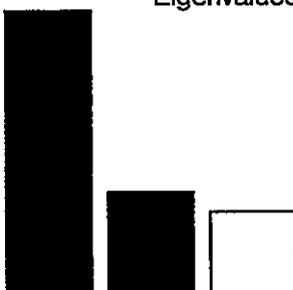
```
s.corcircle(pochas3$co, lab = names(pochas[, 1:12]), full = TRUE, box = FALSE)
```



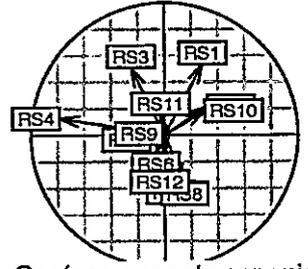
Cos(variates, canonical variates)



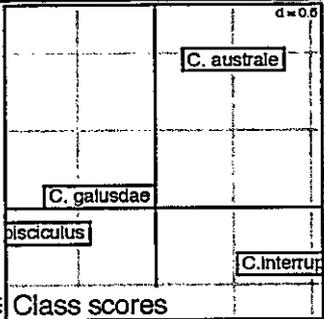
Scores and classes



Eigenvalues



Cos(components, canonical variates)



Class scores