



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

PROFESORA PATROCINANTE:

Dra. Leyla Cárdenas T.
Instituto de Ciencias Ambientales
y Evolutivas.

PROFESOR CO-PATROCINANTE:

Dr. Cristián Correa G.
Instituto de Conservación,
Biodiversidad y territorio &
Instituto de Ciencias Marinas y
Limnológicas.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALIZADAS DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN RÍOS Y LAGOS DE LAS REGIONES DE LOS RÍOS Y AYSÉN, CHILE.

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

PATRICIA VÉLIZ VERA
VALDIVIA – CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su esfuerzo, abnegación, apoyo y amor.

A la Dra. Leyla Cárdenas porque en ella encontré, además de una excelente investigadora, a una gran persona; siempre dispuesta a enseñar y a ayudar con la mejor disposición.

A Fernando y Paulina por su buena disposición para ayudarme en el laboratorio.

A mis amigos y a mi hermano por sus consejos y por su ánimo.

A Jonathan por su alegría, sus ideas, su paciencia y su ánimo.

Espero que con estas palabras pueda expresar mi cariño y sincero agradecimiento a todas las personas han colaborado en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Invasión, establecimiento y conservación de trucha arcoíris	3
1.2 Introducción de salmónidos en Chile, cultivo y consecuencias ambientales	5
1.3 Estudios genéticos en salmónidos	6
1.4. Características generales de trucha arcoíris	8
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVO GENERAL	9
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Área de estudio y colecta de muestras	10
5.2 Análisis Genéticos	11
5.2.1 Extracción de ADN	11
5.2.2 Marcador molecular	11
5.2.3 Amplificación de Citocromo Oxidasa c, subunidad I (COI)	12
5.2.4 Secuenciación	12
5.3 Análisis de datos	13
5.3.1 Determinación de índices de diversidad	13
5.3.2 Determinación de la estructuración poblacional	13
5.3.3 Redes de haplotipos	14
5.3.4 Test de neutralidad	14
6. RESULTADOS	15
6.1 Diversidad Genética	15
6.2 Estructura genética	18
6.3 Relaciones haplotípicas	20
7. DISCUSIÓN	24
7.1 Implicancias para el manejo y conservación de la especie	28
8. BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

Las invasiones biológicas se refieren al proceso de introducción, establecimiento y expansión de especies exóticas procedentes de otras zonas biogeográficas; y pueden darse por colonizaciones naturales o por invasiones antropogénicas. Las invasiones antropogénicas tienden a involucrar individuos de diversos orígenes, que pueden albergar relativamente altos niveles de diversidad genética. Un caso particular es el de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que fue introducida en Chile a principios del siglo XX, dando origen a las primeras poblaciones naturalizadas. Estas poblaciones naturalizadas pueden verse afectadas por los individuos escapados de las pisciculturas. Se ha observado que los peces escapados de los centros de cultivo entran en los ríos y se reproducen con sus congéneres salvajes, lo que podría contribuir de manera significativa a la diversidad genética de las poblaciones naturalizadas. Por consiguiente, es de esperar que estas poblaciones tengan alta variabilidad genética y carezcan de estructura genética espacial, ya que los continuos escapes de peces de centros de cultivo agregarían nuevos genes a las poblaciones de manera aleatoria. Se analizó la diversidad y estructura genética de diez poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) en Chile (seis de la región de Los Ríos y cuatro de la región de Aysén), mediante el uso del marcador mitocondrial COI. Los análisis basados en 114 secuencias, revelaron que la diversidad genética fue de $H_e=0,60$ para la región de los ríos y $H_e=0,47$ para la región de Aysén, promediando un total de $H_e=0,55$. También revelaron que el 14,4% del total observado de la variación genética se puede explicar por las diferencias entre poblaciones ($F_{ST} = 0,144$). Diferencias de diversidad genética entre regiones puede ser explicada por adaptaciones al ambiente, hibridaciones entre truchas naturalizadas y truchas escapadas de centros de cultivo y diferencias en el proceso de introducción de la especie.

ABSTRACT

Biological invasions refer to the process of introduction, establishment and spread of exotic species from other biogeographic regions; and may be given natural or anthropogenic invasions colonization. Anthropogenic invasions tend to involve individuals from diverse origins, which can hold relatively high levels of genetic diversity. A particular case is that of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which was introduced in Chile in the early twentieth century, giving rise to the first naturalized populations. These naturalized populations may be affected by the escaped individuals from fish farms. It has been observed that escapees from fish farms enter the rivers and reproduce with their wild relatives, which could contribute significantly to the genetic diversity of naturalized populations. Therefore, it is expected that these populations have high genetic variability and lack of spatial genetic structure, as continuous releases of fish farms would add new genes to populations at random. An analysis of diversity and genetic structure 10 naturalized populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Chile (six in the region of the Rivers and four of the Aysen region) was performed, using mitochondrial COI marker. Analyses based on 114 sequences revealed that genetic diversity was $H_e=0.60$ for the region of rivers and $H_e = 0.47$ for the Aysen region, averaging a total of $H_e = 0.55$. They also revealed that 14.4% of the total genetic variation observed can be explained by differences among populations ($F_{ST} = 0.144$). Differences in the pattern of genetic diversity among regions can be explained by adaptation to the environment, hybridizations between naturalized trout and getaways trout farms and differences in the process of introducing the species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Invasión, establecimiento y conservación de trucha arcoíris

Las invasiones biológicas pueden darse de dos maneras: Por colonizaciones naturales o por invasiones antropogénicas. Las colonizaciones naturales se producen generalmente, por el ingreso de pocos individuos que comparten un origen común. Estas colonizaciones dan lugar a efectos fundadores que se caracterizan por la deriva génica y la pérdida de la diversidad genética. Por otro lado, las invasiones antropogénicas tienden a involucrar individuos de diversos orígenes, que pueden albergar relativamente altos niveles de diversidad genética (Consuegra, 2011); y su éxito, en teoría, depende de tres factores: 1. La presión de propágulos, es decir, el número de individuos liberados y el número de eventos de liberación; 2. La invasividad de la especie, es decir, los rasgos que le permiten a una especie invadir nuevos hábitats; y 3. La invasibilidad de la comunidad receptora, es decir, la susceptibilidad de las comunidades para ser invadidas (Lockwood et al, 2005; Mozón-Argüello et al, 2014).

Oncorhynchus mykiss fue introducida en Chile por medio de invasiones antropogénicas. Éstas invasiones dieron lugar a las primeras poblaciones naturalizadas, que se establecieron con éxito gracias a la gran plasticidad fenotípica de la especie, la baja resistencia de los ecosistemas, y a la presión de propágulos (Arismendi, 2014). Estas poblaciones pueden verse afectadas por los individuos escapados de las pisciculturas, ya que se ha observado que los peces escapados de los centros de cultivo entran en los ríos y se reproducen con sus congéneres salvajes (Hansen, 1991; Cussac et al, 2014). Los peces escapados se caracterizan por presentar una reducción en la variabilidad genética y anomalías de comportamiento, por lo que esta hibridación puede amenazar la aptitud de los peces silvestres que ya están adaptados al medio ambiente local (Cussac et al, 2014). Sin embargo, los organismos escapados también se caracterizan por una alta presión de propágulos y por elevadas tasas de crecimiento, rasgos que tienden a aumentar el éxito del establecimiento. Consuegra et al (2011) realizaron un estudio en poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris de la X región, concluyendo que los peces que se escapan de las pisciculturas no sólo sobreviven y entran en los arroyos a desovar, sino que también

contribuyen de manera significativa a la diversidad genética de las poblaciones naturalizadas. Por eso es importante caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones naturalizadas de *O. mykiss*, ya que contar con esa información permitiría monitorear las poblaciones en el tiempo, observando si la variabilidad genética aumenta o disminuye debido a la hibridación de las especies naturalizadas con los individuos escapados, y dependiendo de cuál sea el caso, tomar medidas adecuadas para su control y manejo.

Por otro lado, es importante manejar las poblaciones naturalizadas de *O. mykiss*, porque es una especie de gran interés en la pesca recreativa. Ésta es una actividad de gran importancia económica para los países en que se practica. En Chile hay un ingreso cercano a MM US\$ 20 anuales por este deporte (Sernapesca, 2008); sin embargo, podría alcanzar ingresos anuales cercanos a MM US\$150 hasta MM US\$800, como ocurre en Argentina y nueva Zelanda (SERNATUR, 2005). Estas cifras nos indican que, a pesar de que Chile cuenta con un gran potencial para el desarrollo de la pesca recreativa, debido a la gran diversidad y belleza de sus ecosistemas, ésta no ha logrado consolidarse como un producto turístico clave, principalmente debido a la falta de planes de manejo sobre las poblaciones silvestres de salmónidos.

Para generar planes de manejo adecuados, que permitan una mejor gestión de las especies es necesario conocer su biología, incluyendo su grado de variabilidad genética, ya que cuando hablamos de diversidad no sólo deberíamos hacer referencia a la riqueza de especies sino también, a las variaciones genéticas (genotipos) que las mismas presentan como respuesta a la heterogeneidad del medio ambiente (Redondo et al, 2003). Así, para preservar realmente la riqueza de las poblaciones naturalizadas de *O. mykiss*, expresada como variabilidad genética de la población, resulta crucial tener el máximo conocimiento de la misma. De esta forma se evitará la pérdida de parte de la diversidad que realmente existe y que no se puede evaluar a simple vista. Además los datos que se obtendrán serán un aporte en la creación de una base de datos, con el fin de lograr una mayor caracterización y/o seguimiento de poblaciones naturalizadas tal como lo sugiere Gajardo y colaboradores (1998).

1.2 Introducción de salmónidos en Chile, cultivo y consecuencias ambientales.

Las invasiones biológicas se refieren al proceso de introducción, establecimiento y expansión de especies exóticas procedentes de otras zonas biogeográficas. En Chile, la introducción de la trucha arcoíris se inicia en el año 1905, cuando se introdujeron las primeras especies con fines alimenticios y deportivos (Arratia, 1978). Un total aproximado de 198.000 peces, fueron introducidos en los ríos Aconcagua, Paine, Tinguiririca, Lingüemo, Maule, Cautín y Toltén. Posteriormente un segundo grupo de 168.000 peces, provenientes de Alemania, fue distribuido entre los ríos mencionados, y además en los ríos Angostura, Calle-calle y Bueno (Golusda, 1907). Estas introducciones dieron origen a las primeras poblaciones de truchas naturalizadas en Chile, es decir, poblaciones autosostenibles en el tiempo.

Posteriormente se inicia el cultivo de salmónidos, cuando a fines del año 1906 el gobierno Chileno firmó un proyecto que aprobaba la construcción e instalación de una piscicultura en La Dehesa (Golusda, 1907). Sin embargo, no fue hasta 1980 que se intensificó el cultivo de productos acuícolas a gran escala (Muñoz, 2009).

En 1952 se construyó una piscicultura en Polcura, región del Bío-bío. Ésta tuvo como objetivo producir principalmente ovas y alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha café, para el repoblamiento de la zona central de Chile (Claude y Oporto, 2000). Posteriormente en 1973 se instaló la piscicultura más grande de la época, en Pullinque, cerca del lago Panguipulli, región de Los Lagos (actualmente región de Los Ríos); y en 1974 la empresa Chilena Lago Llanquihue Ltda. entró en el cultivo comercial de la trucha en lagunas artificiales del Río Pescado, en la región de Los Lagos (Muñoz, 2009).

El rápido crecimiento del cultivo industrial se puede apreciar al comparar las cifras de producción que, a principios de los años 80 llegaban a 80 toneladas, en 1984 sumaban 500 toneladas, en 1988 eran 5.500 toneladas, y en 1997 llegaban a 247.970 toneladas (Claude y Oporto, 2000).

Según cifras de la FAO el cultivo de salmónidos en Chile alcanzó su mayor producción en 2006, con cerca de 640.000 toneladas por un valor de \$ 3.8 mil millones de

dólares. Esta producción corresponde principalmente al salmón del Atlántico *Salmo salar* (60,3%), salmón coho *Oncorhynchus kisutch* (17,5%) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (22%) (Sepúlveda, 2013).

Este explosivo crecimiento de la salmonicultura, ha implicado la introducción y/o liberación de nuevas cepas al medio ambiente, causando probablemente, un impacto negativo sobre las poblaciones de truchas naturalizadas (Gajardo, 1998). La organización WWF publicó en el año 2009 la investigación escapes de salmón en Chile, donde exponen que anualmente se han registrado escapes de salmónes por sobre el millón y medio de ejemplares. Por ejemplo, en el año 2007 se fugaron 1.726.919 ejemplares debido a siete eventos de escapes masivos, y durante el año 2008 se produjeron 19 episodios con un resultado de 1.646.817 salmónes escapados. En su área de distribución natural, los salmónidos tienden a estar localmente adaptados (García de Leaniz, 2007), y esto los hace particularmente vulnerables a la introgresión genética de individuos escapados de las pisciculturas (Boyer et al, 2008).

En Chile, las preocupaciones ambientales de los escapes de salmónidos se han centrado en los efectos depredadores de corto plazo sobre los peces nativos, los efectos a largo plazo vinculados con la probabilidad de que las poblaciones de salmónidos de piscicultura puedan volverse autosostenibles y la transferencia de enfermedades y patógenos (Sepúlveda, 2013). Otro factor importante, que no es considerado, es el efecto que produce la hibridación entre especies naturalizadas y de cultivo. El resultado, son nuevas generaciones de salmónes híbridos que no poseen las características necesarias para sobrevivir en condiciones silvestres (Einum, 2001).

1.3 Estudios genéticos en salmónidos

Para conocer las características de las poblaciones de truchas, se han realizado numerosos estudios en poblaciones de truchas nativas, principalmente en poblaciones europeas y norteamericanas. Estos abarcan desde la caracterización genética de poblaciones de truchas, relaciones genéticas y flujo genético entre poblaciones residentes y migratorias, comparaciones entre la diversidad genética de diferentes cepas de truchas, diferenciación

genética entre truchas de criadero y truchas salvajes, hasta estrategias genéticas para la rehabilitación de poblaciones de trucha en lagos europeos.

Con respecto a la caracterización genética de truchas en su hábitat nativo, los estudios indican que las poblaciones muestran altos niveles de variabilidad genética intrapoblacional y altos niveles de divergencia genética interpoblacional (Colihueque, 2003). Riffel (1995), por ejemplo, encontró alta variabilidad genética intrapoblacional entre poblaciones de once sistemas fluviales a lo largo de la cuenca de los ríos Rin y Danubio, en Europa.

En Chile hay muy pocos estudios que caractericen las poblaciones de truchas naturalizadas, pese a ser un recurso económico importante para el país, tanto en el turismo (pesca deportiva) como en la industria salmonera. Por ejemplo, Faúndez et al. (1997) estudiaron poblaciones naturalizadas de trucha café (*Salmo trutta*), en siete cuencas distribuidas entre el norte y el sur de Chile. Utilizando aloenzimas como marcadores moleculares, reportaron una diversidad genética de $H_T = 0,1274$ por lo que concluyeron que las poblaciones chilenas naturalizadas de trucha café muestran una baja variabilidad genética, con sólo dos variantes alélicas por locus. Similarmente, Colihueque et al. (2003) estudiaron 5 poblaciones naturalizadas de trucha café en ríos de las regiones de la Araucanía y de Los Lagos, usando aloenzimas y microsatélites, donde observó una diversidad genética $H_T = 0,1216$. Por otro lado, ambos autores encontraron un índice de diferenciación genética (G_{ST}) cercano a 10%, lo que indica que la divergencia genética entre las poblaciones chilenas es baja y, en consecuencia, que la mayor proporción de la variación genética reportada se distribuye dentro de las poblaciones.

Para trucha arcoíris, Gajardo et al. (1998) realizaron un estudio aloenzimático, que se llevó a cabo en poblaciones naturalizadas de tres ríos conectados a los lagos andinos Puyehue y Rupanco, región de Los Lagos. El análisis se basó en 32 loci presuntos, 10 de los cuales fueron variables, y reveló que la media del porcentaje de loci polimórficos ($P = 21,8\%$; rango = 15,6-28,1%), el número medio de alelos por locus ($n = 1,26$; rango = 1.2 a 1.3) y la media de la heterocigosidad observada ($H_o = 7,0\%$, rango = 6,0 a 8,2%) fueron elevados, aunque dentro del rango reportado para la trucha arcoíris. También reportó que la media de la distancia genética entre las muestras fue baja ($D = 0,003$), y que sólo el 5,2%

de la variación genética observada total puede ser explicada por las diferencias entre poblaciones ($F_{ST} = 0.052$).

1.4 Características generales de trucha arcoíris

La trucha arcoíris es un pez teleósteo perteneciente a la familia de los salmónidos (salmonidae), cuyo rango de distribución abarca aguas frías de América del norte, Asia y Europa. Tolerar temperaturas desde 0 a 25° C, con un rango óptimo de 10 a 12° C para mantenerse saludable, mientras que para obtener un excelente crecimiento, en condiciones de buena calidad de agua, prefiere temperaturas entre 15 y 20° C (Gall y Crander, 1992).

El ciclo de vida de la trucha arcoíris es muy variable en cuanto a sus patrones migratorios. Siempre desovan en ríos o arroyos y muchas completan su ciclo de vida en agua dulce. Sin embargo, algunas variedades, migran y pasan su vida adulta en el océano, y sólo vuelven al río donde nacieron para desovar. Este último se conoce como reproducción anádroma (Groot, 1996). Las formas anádromas migran al mar como juveniles y pueden viajar grandes distancias en el océano. Las formas de agua dulce (no anádromas) se mueven entre el afluente y el río principal, entre el río y el lago, o pasan toda su vida en un arroyo o río en particular (Groot, 1996). El crecimiento y maduración sexual de estos organismos puede ocurrir en agua dulce o agua de mar. Esta última fase puede durar entre 1,5 y 3 años de la vida del pez (Sepúlveda, 2009). El desove generalmente se produce en flujos de agua de ambos ríos o afluentes del cauce principal, sobre lechos de grava de ríos o costas de lagos, donde el agua se filtra a través de ella. La grava brinda protección a los huevos, hasta que emergen como alevines listos para comer y migrar (Groot, 1996).

La trucha arcoíris es altamente adaptable a su entorno, razón por la cual ha logrado una amplia distribución (Laird y Needham, 1988). Según estudios realizados por otros autores, dos truchas nacidas de una misma progenie pueden adaptarse a hábitats totalmente distintos. Una puede crecer, reproducirse y vivir en un pequeño arroyo, con unos pocos centímetros de agua sobre su cuerpo y la otra viajar una gran cantidad de kilómetros hasta el océano para alimentarse y crecer mucho más que la primera (Espinosa, 1995). Es por esto

que en un mismo curso de agua pueden encontrarse truchas residentes, migratorias de ríos y lagos, o anádromas (Espinosa, 1995).

2. HIPÓTESIS

Poblaciones de truchas en ríos y lagos de Chile, presentan una alta variabilidad genética y carecen de estructura genética espacial entre las poblaciones, debido a que continuos escapes desde centros de cultivo, agregan nuevos genes a las poblaciones de manera aleatoria.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad y estructura genética en poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en ríos y lagos de las regiones de Los Ríos y Aysén.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la variabilidad genética de trucha arcoíris, por medio del marcador mitocondrial (COI).
2. Determinar la estructura de las poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris.
3. Comparar patrones espaciales de diversidad genética para poblaciones de trucha arcoíris entre las regiones de Los Ríos y Aysén.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio y colecta de muestras

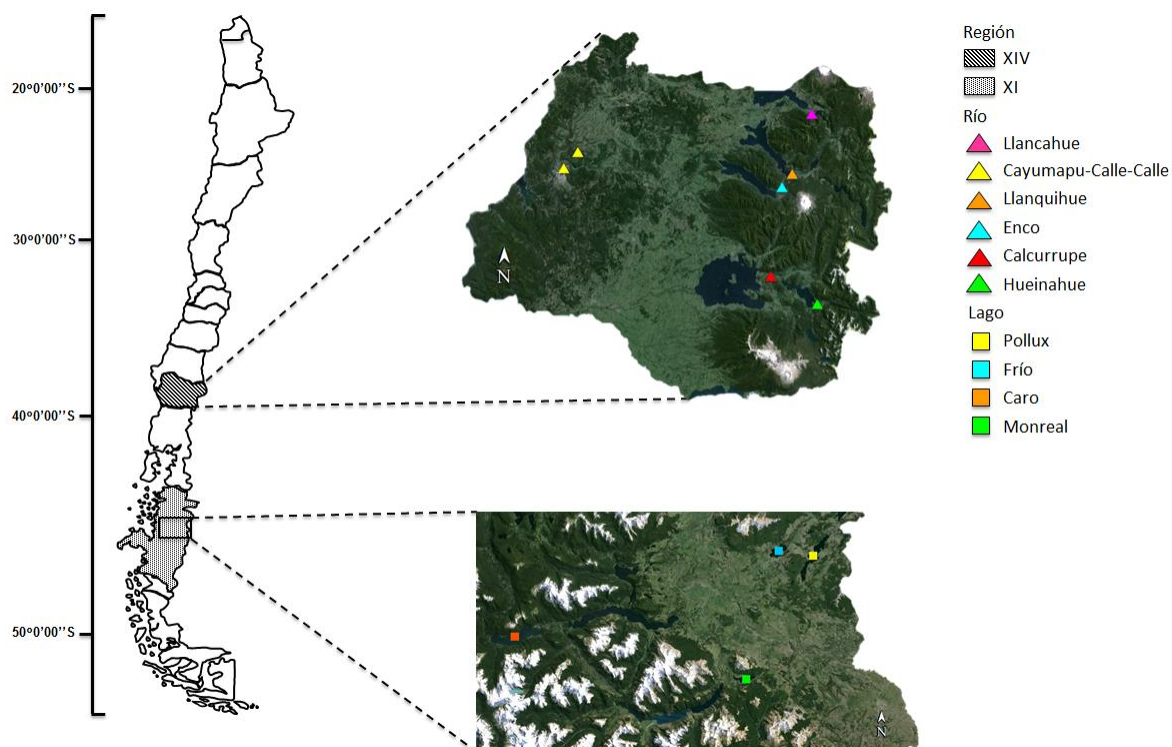


Figura 1. Mapa del área de estudio.

Las muestras de trucha arcoíris fueron obtenidas de siete ríos de la región de Los Ríos y 4 lagos de la región de Aysén. Estos son los ríos: Calle-Calle, Cayumapu, Llancahue, Llanquihue, Enco, Calcurrupe y Hueinahue; y los lagos: Frío, Caro, Monreal y Pollux (Figura 1). De cada localidad se extrajeron entre 10 y 15 ejemplares de *O. mykiss* y se les extrajo tejido de la aleta, el que fue almacenado en alcohol absoluto hasta su análisis en laboratorio. En la región de Los Ríos, las muestras de los ríos Llancahue, Llanquihue, Enco, Calcurrupe y Hueinahue, fueron colectadas por Jorge Oporto, en marzo de 2014 por medio de pesca eléctrica.; y en los ríos Calle-Calle y Cayumapu fueron colectadas con redes de 4 mm de abertura de malla, anzuelo y espinel, por Jonathan Vergara en junio de 2014. Todo esto con permiso de pesca de investigación, entregado por Sernapesca y

CONAF. En el caso de la región de Aysén, las muestras fueron colectadas por Cristián Correa, entre enero y mayo de 2007-2009, y el método de muestreo se describe en Correa & Hendry (2012).

5.2 Análisis Genéticos

5.2.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de individuos provenientes desde 6 localidades de la región de Los Ríos y desde 4 localidades de la región de Aysén. El ADN se obtuvo mediante el Kit comercial “E.Z.N.A.® Tissue DNA kit”, empresa OMEGA bio-tek (www.omegabiotek.com), según el protocolo descrito por el fabricante.

La concentración total y calidad de ADN genómico de cada individuo fue evaluado a través de un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000). Se determinó la absorbancia 260/280 para estimar el grado de pureza de la muestra con 1 nm de exactitud. Proporciones 260/280 de ~1,8 se consideraron de alta calidad para posterior amplificación. La integridad del ADN se corroboró a través de geles de agarosa al 1%, corridas a 100 voltios por 45 minutos, usando una solución amortiguadora TAE (1X). Las diluciones consideradas en este trabajo se estandarizaron a una razón de concentración 1:2 (ng/μl) (DNA: H₂O ultra-pura).

5.2.2 Marcador genético molecular

El marcador molecular seleccionado corresponde al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI). Éste fue amplificado utilizando una mezcla de partidores compuesta por el partidor universal descrito por Folmer et al. (1994) LCO_F (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y por el partidor universal para peces Fish_R2 (5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3') (Keskin y Atar, 2013)

5.2.3 Amplificación de Citocromo Oxidasa c, subunidad I (COI)

Previo a la secuenciación, el gen Citocromo Oxidasa subunidad I se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µl. Las cantidades de cada reactivo a usar consistieron de: 0,75µl de TaqDNA polimerasa Invitrogen (5U/µl), 2,25µl de Buffer (10x), 0,5 µl de dNTPs (10Mm), 0,75µl de MgCl₂ (50mM), 0,25 µl de cada partidor (ambos a concentración de 10 pmol/µl), 0,5µl de BSA (100x), 4 µl de DNA diluido (1:2) y 15,75 µl de H₂O ultra-pura para completar el volumen final.

El ciclo de amplificación del gen COI incluyó una desnaturalización inicial a 95°C (5 min), seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C (45 s), alineamiento a 52°C (45 s) y extensión a 72°C (1 min); para terminar con una fase de elongación final de 72°C (10 min).

5.2.4 Secuenciación

El producto final de PCR fue enviado a purificar y secuenciar a la Empresa MacroGen Inc. Seoul, Korea del Sur (www.macrogen.com) en el secuenciador automático modelo ABI PRISM 310. Para menor ambigüedad se secuenció la hebra forward y la hebra reverse de cada individuo, para posteriormente editarlas y alinearlas en el programa ProSeq v3.0 (Filatov, 2002). A partir de este análisis se construyó una hebra consenso para cada individuo secuenciado, la que fue utilizada en análisis posteriores.

Debido a la utilización de partidores universales, antes de someter los consensos a análisis genéticos, se verificó la secuencia a través de una búsqueda por similitud en la base de datos del National Center for Biotechnology Information NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando el programa Blast (Camacho et al., 2008).

5.3 Análisis de datos

5.3.1 Determinación de índices de diversidad

Los índices de diversidad genética tales como: número de haplotipos mitocondriales (Nhap), número de sitios polimórficos (S), diversidad de haplotipos (He), número promedio de diferencias entre pares de secuencias (π_1), así como diversidad de nucleótidos (π_2), fueron estimados para *Oncorhynchus mykiss* entre localidades con el programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier et al., 2010).

5.3.2 Determinación de la estructuración poblacional

La estructura genética se calculó considerando cada una de las localidades como una población. Para esto se estimaron los valores de diferenciación genética (F_{ST}), que mide el grado de diferenciación entre dos poblaciones, el cual puede ser afectado por diferentes procesos tales como conectividad entre las poblaciones, tamaño e historia de cada población. Estos cálculos se realizaron través del análisis de F_{ST} pareados. Para esto se realizó un análisis multilocus AMOVA, el cual es un análisis jerárquico de la varianza genética, donde la varianza se subdivide en la variación entre dos grupos (región de Los Ríos y región de Aysén; F_{CT}), entre localidades dentro de cada grupo (F_{SC}) y entre localidades (F_{ST}). Estas estimaciones se obtuvieron con el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010). Se realizaron 10000 permutaciones no paramétricas para asegurar precisión en la probabilidad final.

Para probar si las poblaciones naturalizadas de trucha siguen un modelo de aislamiento por distancia, se realizó un Test de Mantel, usando ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier et al., 2010).

5.3.3 Redes de haplotipos

Para determinar las relaciones entre los haplotipos del gen mitocondrial COI, se construyeron redes de haplotipos usando el algoritmo de Median Joining, el cual está implementado en el programa Network v 4.510 (Bandelt et al., 1999). Además, con el objetivo de obtener un panorama de la diversidad genética encontrada en los ríos de la región de Los Ríos y lagos de la región de Aysén, respecto de la diversidad genética en otras partes del mundo, se construyó una red de haplotipos, usando las secuencias obtenidas en este estudio y un total de 156 secuencias de COI extraídas de la base de datos del ncbi, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

5.3.4 Test de neutralidad

Para determinar si las secuencias analizadas siguen un modelo molecular neutral, o están afectadas por algún tipo de selección natural, se realizaron pruebas de neutralidad utilizando el test D de Tajima (1989) y el F_s de Fu (1997). El test de Tajima se fundamenta en el hecho que en un modelo neutral, las estimaciones del número de sitios segregantes y el número promedio de diferencias nucleotídicas están correlacionados. El test de Fu está basado en el modelo de sitios infinitos sin recombinación. Se estima la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de alelos iguales o menores que el valor observado, dado el nivel observado de la diversidad y la suposición de que todos los alelos son selectivamente neutrales.

Ambos estadígrafos fueron calculados en el programa el ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier et al., 2010)

6. RESULTADOS

6.1 Diversidad Genética

Para el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) se consideró un total de 114 secuencias de 599 pb cada una. Estas corresponden a diez localidades del sur de Chile, siendo seis localidades de la región de Los Ríos y cuatro de la región de Aysén (Tabla 1). En esta base de datos se registraron siete sitios polimórficos que conducen a definir siete haplotipos (Tabla 1). El haplotipo 1, presente en todas las localidades estudiadas, fue el más frecuente representando el 54,3% del total de los individuos analizados, el 48,8% de los individuos analizados para la región de Los Ríos y el 62,4% para la región de Aysén. Éste fue seguido por el haplotipo 2 presente en todas las localidades menos en el río Calcurrupe, representando el 41,1% del total de los individuos analizados, el 43,5% de los individuos analizados para la región de los Ríos y el 37,6% para la región de Aysén (Tabla 1, Figura 2).

La diversidad haplotípica (H_e) del total de individuos secuenciados fue de 0,55 presentándose el máximo en el río Enco ($H_e=0,62 \pm 0,09$), y el mínimo en el río Llancahue ($H_e=0,13 \pm 0,11$), ambos de la región de los Ríos (Tabla.1).

La diversidad nucleotídica (π_2) observada fue baja, oscilando entre 0,001 y 0,002. Para ambas regiones el valor promedio de este índice fue de 0,001; indicando que la diversidad nucleotídica es prácticamente igual para ambas regiones. Entre todas las localidades, el río Calcurrupe presenta el valor más alto en este índice (0,002).

Por otro lado para la región de los Ríos, en un total de 74 individuos analizados, se encontraron 7 Haplotipos (Nhap) y 7 sitios polimórficos (S); mientras que en la región de Aysén y 2 haplotipos y 1 sitio polimórficos para los 40 individuos analizados (Tabla 1).

Tabla 1. Diversidad genética del gen COI por localidades estudiadas según región.

Región	Localidad	LatS - LongW	N muestras	Nhap	S	He	π_1	π_2
XIV	1. Río Llancahue	39°34'S - 71°55'W	15	2	1	0,13	0,13	0,000
	2. Río Cayumapu- Calle Calle	39°42'S - 73°10'W 39°48'S - 73°12'W	10	3	3	0,51	0,87	0,001
	3. Río Llanquihue	39°49'S - 72°5'W	12	2	1	0,53	0,53	0,001
	4. Río Enco	39°52'S - 72°8'W	12	3	3	0,62	0,88	0,001
	5. Río Calcurrupe	40°12'S - 72°11'W	15	4	3	0,55	0,95	0,002
	6. Río Hueinahue	40°18'S - 72°56'W	10	2	1	0,56	0,56	0,001
<i>Total</i>			74	7	7	0,60	0,77	0,001
<i>Promedio</i>			12,3	2,7	2	0,48	0,65	0,001
XI	1. Lago Pollux	45°40'S - 71°56'W	13	2	1	0,38	0,39	0,001
	2. Lago Frío	45°40'S - 71°56'W	8	2	1	0,54	0,54	0,001
	3. Lago Caro	45°48'S - 72°32'W	8	2	1	0,54	0,54	0,001
	4. Lago Monreal	45°52'S - 72°2'W	11	2	1	0,44	0,44	0,001
<i>Total</i>			40	2	1	0,47	0,47	0,001
<i>Promedio</i>			10	2	1	0,48	0,47	0,001
TOTAL			114	7	7	0,55	0,67	0,001

Nhap: n° de haplotipos, **S:** n° sitios polimórficos, **He:** Diversidad haplotípica, **π_1 :** n° medio de diferencias pares; **π_2 :** Diversidad nucleotídica.

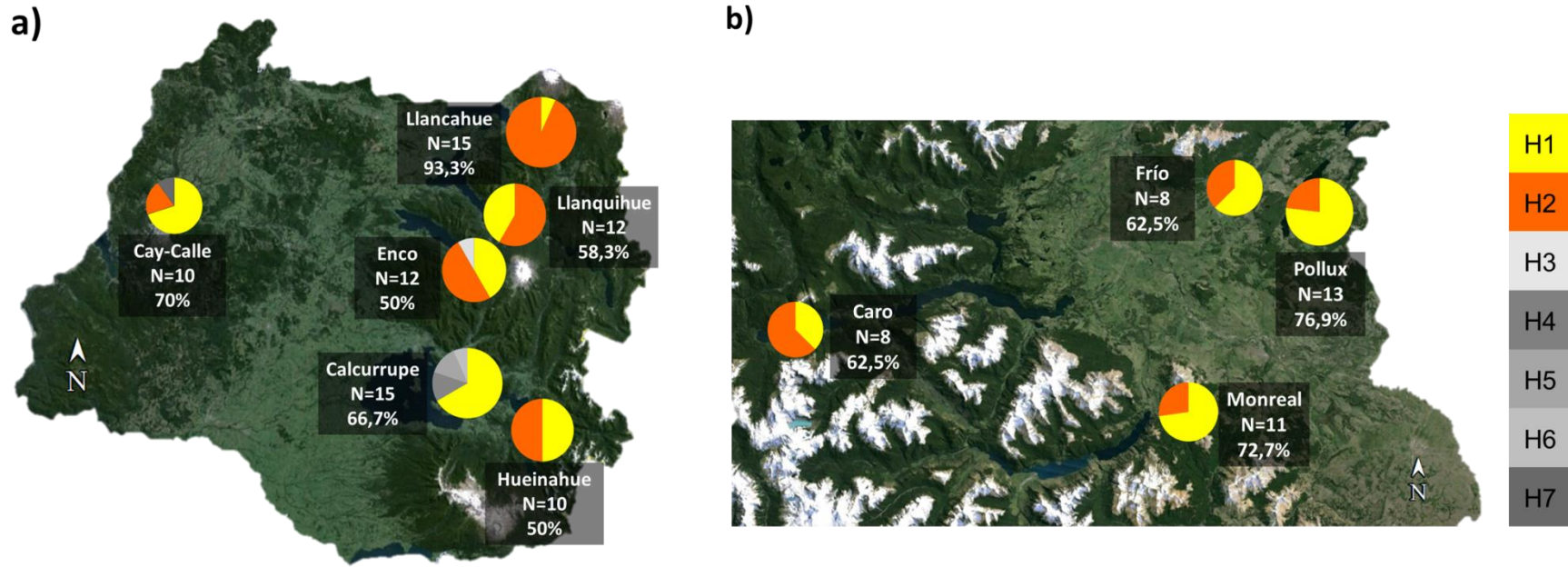


Figura 2. Distribución espacial de haplotipos encontrados en truchas *O. mykiss* de la región de los Ríos (a) y de la región de Aysén (b). En amarillo y naranja se indican haplotipos compartidos, mientras que en gris se señalan haplotipos únicos (simbología de haplotipos en la columna de la derecha). El área de los símbolos es proporcional al número de individuos secuenciados (N). También se indica el porcentaje de ocurrencia del haplotipo más recurrente.

6.2 Estructura genética

El análisis de estructuración genética AMOVA, reveló que la principal fuente de variación genética está dada entre poblaciones dentro de cada región ($F_{SC}=0,157$; $p=0,001$) y entre poblaciones en general ($F_{ST}=0,144$; $p=0,000$). Sin embargo, no se detectó diferenciación genética significativa entre regiones ($F_{CT}=-0,015$; $p=0,612$) (Tabla 2). Valores de F_{st} pareado fueron significativos entre Llancahue y Cayumapu-Calle-Calle, Llanquihue, Enco, Calcurrupe, Hueinahue, Pollux, Frio y Monreal; y entre Calcurrupe y Enco, Hueinahue y Cayumapu-Calle-Calle (Tabla 3).

Tabla 2. Análisis de varianza molecular (AMOVA jerárquico) para las dos regiones estudiadas (valores significativos marcados en rojo).

Structured tested		F statistic	P-values
(Llanc, CayC, Llanq, Enco, Calc, Huei) XIV	(Poll, Frio, Mon, Caro) XI	$F_{SC}=0,15712$	$0,001$
		$F_{ST}=0,14430$	$0,000$
		$F_{CT}=-0,01521$	$0,612$

Tabla 3. Matriz de distancia genética entre pares de poblaciones. Bajo la diagonal se presentan valores de F_{ST} ; sobre la diagonal valores de significancia. Las localidades fueron ordenadas de norte a sur.

	Llancahue	Cay - CC	Llanquihue	Enco	Calcurrupe	Hueinahue	Pollux	Frio	Caro	Monreal
Llancahue		0,00	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,13	0,00
Cay - CC	0,479		0,55	0,37	0,11	0,59	0,57	0,99	0,46	0,77
Llanquihue	0,442	-0,044		0,99	0,05	0,99	0,43	0,99	0,62	0,68
Enco	0,266	-0,007	-0,057		0,04	0,99	0,10	0,76	0,77	0,44
Calcurrupe	0,532	0,070	0,120	0,141		0,06	0,12	0,28	0,02	0,13
Hueinahue	0,353	-0,016	-0,086	-0,078	0,149		0,21	0,66	0,66	0,38
Pollux	0,656	-0,049	-0,004	0,056	0,088	0,065		0,60	0,18	0,99
Frio	0,517	-0,083	-0,112	-0,069	0,077	-0,092	-0,057		0,58	0,99
Caro	0,206	0,058	-0,023	-0,069	0,212	-0,092	0,201	-0,008		0,23
Monreal	0,616	-0,067	-0,047	0,011	0,078	0,009	-0,086	-0,094	0,132	

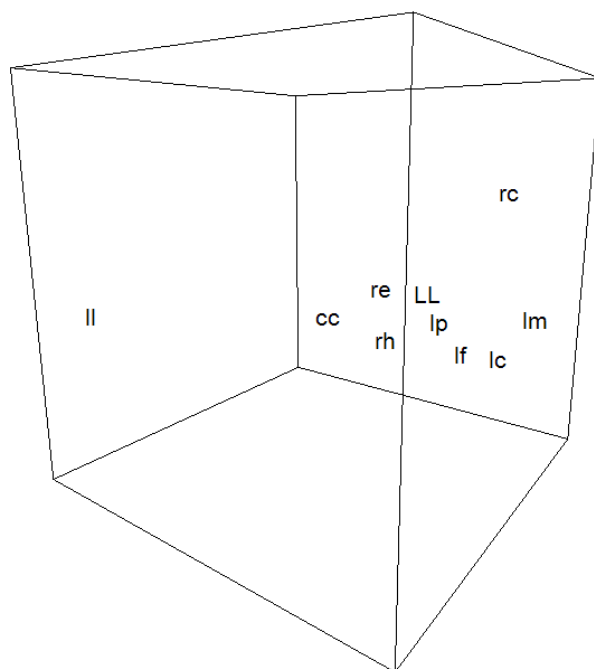


Figura 3. Escalamiento multidimensional (MDS) a partir de distancias genéticas (F_{ST} pareado del gen COI) entre poblaciones de trucha arcoíris. Los sitios de muestreo o poblaciones representadas corresponden a

Llancahue (ll), Cayumapu-Calle-Calle (cc), Llanquihue (LL), Enco (re), Calcurrupe (rc), Hueinahue (rh), Pollux (lp), Frio (lf), Caro (lc), Monreal (lm).

6.3 Relaciones haplotípicas

En las redes de haplotipos se identifican dos haplotipos de alta frecuencia (Figura 4). En total 61 individuos tienen el haplotipo 1 y 46 el haplotipo 2. El haplotipo 1 está presente en todas las localidades aunque con baja frecuencia en Llancahue, mientras el haplotipo 2 está presente en todas las localidades excepto en Calcurrupe (Figura 2, Figura 4). A partir de estos haplotipos surgen nuevos haplotipos de baja frecuencia exclusivos de tres localidades (Cayumapu-Calle-calle, Calcurrupe y Enco). La localidad que muestra

mayor diversidad haplotípica es Calcurrupe con 3 haplotipos únicos, distantes entre uno y dos pasos mutacionales del haplotipo 1.

Con respecto a la diversidad genética encontrada en Chile versus otras partes del mundo, se realizó un nuevo análisis de redes de haplotipos y el resultado es mostrado en la Figura 5. Como fue mencionado, se obtuvo un total de 156 secuencias de COI desde GenBank, que corresponden a: 17 individuos de Europa, 130 de América del norte, 3 de África, 5 de Asia, 1 de Oceanía. Como se observa los haplotipos más frecuentes en Chile (H_1 y H_2), están presentes en otras partes del mundo con alta frecuencia, situación que sugiere que ambos haplotipos corresponden a haplotipos ancestrales dentro de la especie. Además se identifican un alto número de haplotipos exclusivos de localidades de América del norte (H_10, H_11, H_12, H_13, H_14, H_15, H_16, H_17 y H_18) y también haplotipos exclusivos de Chile (H_3, H_4, H_5, H_6 y H_7) demostrando la presencia de nuevas variantes genéticas para la especie exclusivas de Chile. La diversidad genética global estimada para el conjunto completo de datos fue de $H_e = 0,55$, el número de sitios polimórficos $S=7$ y el número de haplotipos fue de $N_{hap}=7$.

Los análisis de neutralidad mostraron un valor de $D = 0,418$ ($p = 0,685$) y para $F_s = 0,498$ ($p = 0,486$), surgiendo que las poblaciones analizadas están bajo equilibrio deriva mutación y en crecimiento constante.

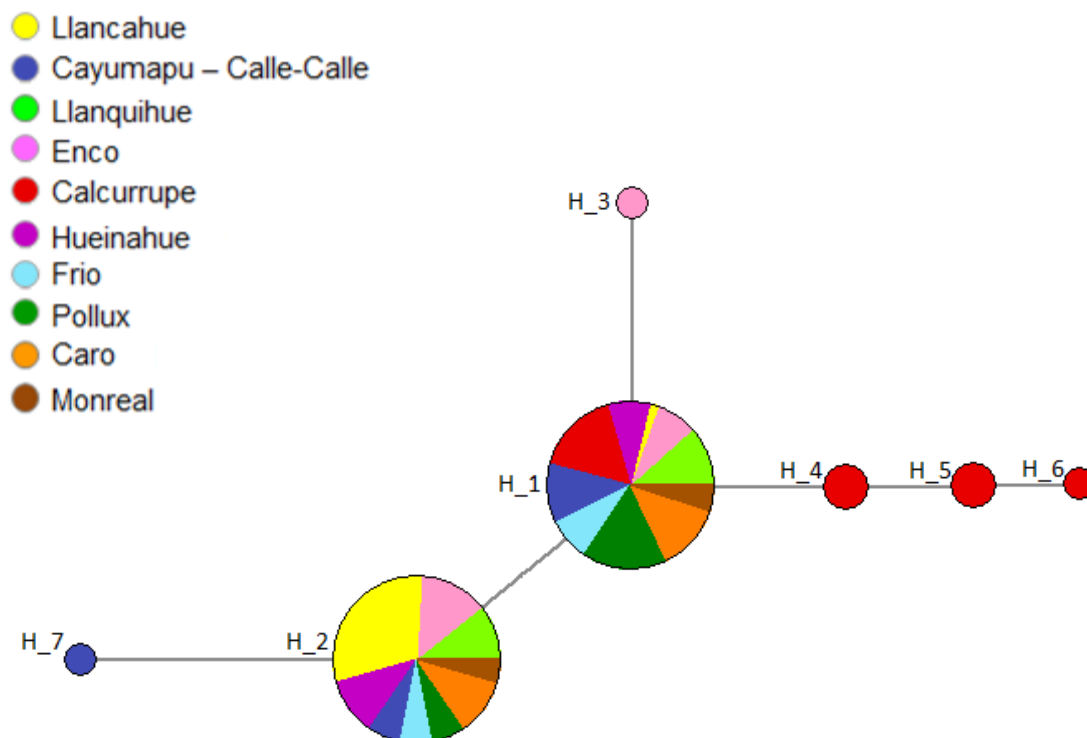


Figura 4. Red de Median joining para haplotipos del gen COI en trucha arcoíris. Las localidades se encuentran señaladas por color, el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y el largo de las líneas es proporcional a las mutaciones entre haplotipos conectados por las mismas.

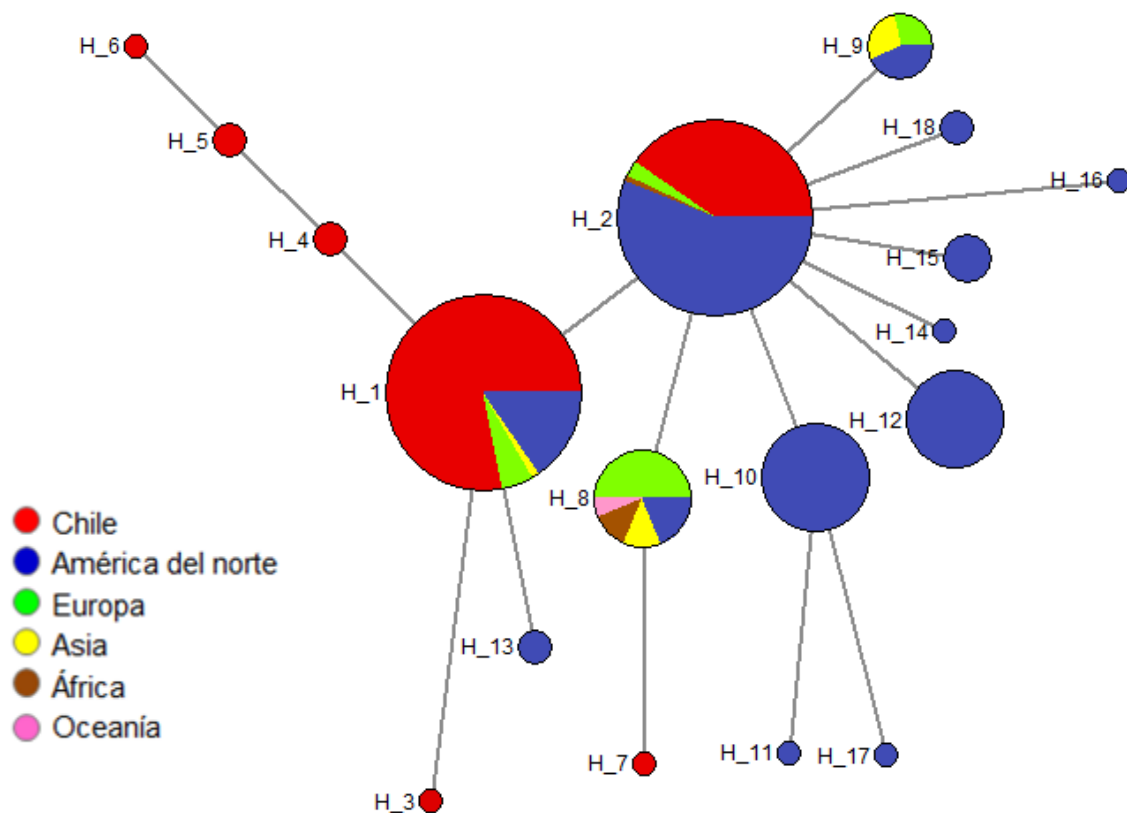


Figura 5. Red de Median joining para haplotipos del gen COI en trucha arcoíris con datos obtenidos en este trabajo (Chile) y datos obtenidos desde la base de datos de Genbank (Benson et al., 2013). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y el largo de las líneas es proporcional a las mutaciones entre haplotipos conectados por las mismas.

7. DISCUSIÓN

Este estudio muestra el primer análisis filogeográfico de las poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris en Chile. La trucha arcoíris es considerado como uno de los peces de agua dulce más común en nuestro país, y por lo tanto, tiene una historia de introducción y de invasión más larga en aguas chilenas que cualquier otra especie de salmónido (Wetzlar, 1979; Arismendi et al., 2014). Análisis de las secuencias de los haplotipos mitocondriales de trucha arcoíris en las regiones de Los Ríos y Aysén, muestran la presencia de dos haplotipos de alta frecuencia presentes en todos los ríos analizados, sugiriendo que corresponden a haplotipos ancestrales provenientes de las regiones nativas (Figura 2). Por otro lado, nuestros resultados muestran patrones de diversidad genética diferentes entre las dos regiones estudiadas. Primero, para la región de Los Ríos, donde se analizaron individuos provenientes de seis ríos se encontró una diversidad genética total de $H_e = 0,60$ con 7 sitios polimórficos (S) y un total de 7 haplotipos (Tabla 1), de los cuales 5 son exclusivos de la región. Segundo, para la región de Aysén, donde se analizaron individuos provenientes de 4 lagos, se encontró una diversidad genética $H_e = 0,47$, 1 sitio polimórfico (S) y 2 haplotipos (Tabla 1).

Aunque no existe un registro certero de las fechas y lugares de introducción de salmónidos en Chile, se ha documentado que la introducción de trucha arcoíris en la región de Los Ríos se inicia en 1907 aproximadamente, cuando 30.000 truchas juveniles fueron liberadas desde Santiago, en el río Calle-Calle, Valdivia (Golusda, 1907; Arismendi et al., 2014). Posteriormente, entre 1940–1960 cerca de 10.000 truchas juveniles fueron liberadas en ríos y lagos del centro sur de Chile (Arismendi et al., 2014). En la región de Aysén, las introducciones se iniciaron por primera vez en 1968, cuando 78.000 truchas arcoíris fueron liberadas en Lago Pollux (Sakai, 1989; citado en Correa et al., 2012). Esta especie se estableció y se propagó rápidamente (de forma natural o artificial) para colonizar la mayoría de los lagos de la región (Correa et al., 2012). Por otro lado, la ausencia de estructuración genética en la región de Aysén puede deberse a que las primeras introducciones de trucha arcoíris en esta región fueron casi 70 años después que las primeras introducciones en la región de los Ríos. Por lo que comparativamente, su

introducción es reciente y un origen reciente puede haber impedido el desarrollo de poblaciones adaptadas localmente. Además los lagos estudiados no tienen, ni conectan con pisciculturas. Esta información nos permite sugerir que en la región de Los Ríos hay mayor diversidad genética que en la región de Aysén, debido a que ha transcurrido más tiempo desde las primeras introducciones, lo que se traduce en un mayor número de generaciones desde la población ancestral, permitiendo la ocurrencia de mutaciones únicas a estas nuevas poblaciones. Aunque esto pudiera no estar bien reflejado debido a que COI es un marcador conservado y a pesar de que ha transcurrido un tiempo considerable desde las primeras introducciones, podría no ser suficiente para mostrar tal variación.

Otra posible explicación es que en Aysén, debido a que los escapes son más frecuentes (Consuegra et al., 2011), no se ha podido establecer una población con identidad genética propia a causa de las continuas hibridizaciones con los haplotipos ancestrales que se encontrarían en las salmoneras. Sin embargo, esta opción podría ser no tan factible debido a que los lagos estudiados no tienen conexión actual con centros de cultivo, por lo que es poco probable que los peces escapados de pisciculturas lleguen hasta esos cuerpos de agua a reproducirse con las poblaciones que allí habitan.

Se ha demostrado que poblaciones aisladas de trucha arcoíris no-anádromas (residentes) pueden ocurrir en simpatria con poblaciones de truchas anádromas con libre acceso al océano (Currens, 1990). Esta información nos permite elucubrar que la mayor diversidad genética encontrada en la región de Los Ríos, en Cayumapu-Calle-Calle particularmente, puede deberse a la reproducción de truchas anádromas con truchas residentes, ya que estos ríos tienen libre conexión con el océano. No obstante, para probar esto, sería necesario realizar estudios que comprueben la existencia de truchas arcoíris anádromas en la región.

Gran parte de las secuencias del gen COI extraídas desde GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), corresponden a secuencias de trucha arcoíris de seis estados de Estados Unidos (Alaska, Washington, Oregon, Idaho, Utah y California) y fueron utilizadas en la publicación de Rasmussen et al. (2009). En su estudio encontró que casi la mitad de los individuos de *O. mykiss* secuenciados compartieron un haplotipo (HAP54) que se detectó en todos los estados, y que en el presente estudio corresponde al

haplotipo 2 (Figura 5). Por otro lado, Rasmussen et al. (2009) detectó 11 haplotipos únicos en Washington, Oregon, Idaho o California. Lo anterior coincide con este estudio, por cuanto nosotros encontramos 5 haplotipos únicos para individuos de *O. mykiss* que habitan las localidades de la región de Los Ríos (Figura 2, Cayumapu-Calle-Calle, Enco y Calcurrupe).

Contrario a lo esperado, se encontraron haplotipos únicos de nuestro país en los ríos Cayumapu-Calle-Calle, Enco y Calcurrupe. Estos haplotipos únicos pueden haber surgido debido a adaptaciones locales al ambiente, en más de un siglo desde su introducción. Otro factor a considerar, es la hibridación de las truchas salvajes con peces escapados de pisciculturas, ya que como sugiere Consuegra et al. (2011) estos entran en los ríos para desovar y además contribuyen de manera significativa a la diversidad genética de las poblaciones. A pesar de que en las localidades estudiadas no existen instalaciones de centros de cultivo, los ríos se conectan de alguna forma con cuerpos de agua en los que se encuentran pisciculturas produciendo ovas, alevines y smolt de trucha arcoíris. Un caso es el del río Calcurrupe, el cual es afluente del lago Ranco. En este lago desembocan los ríos Iculpe y Pitreño, en los que se encuentran las pisciculturas Iculpe S.A y Caleta Bay S.A., respectivamente. Otro caso es el del río Calle-Calle que al llegar a la ciudad de Valdivia, pasa a llamarse río Valdivia, donde se encuentra la piscicultura Aquasan S.A. Por otro lado la ausencia de estructuración genética en la región de Aysén puede deberse a que las primeras introducciones de trucha arcoíris en esta región, fueron en el año 1968, casi 70 años después que las primeras introducciones en la región de Los Ríos. Por lo que comparativamente, su introducción es reciente y un origen reciente puede haber impedido el desarrollo de poblaciones adaptadas localmente. Además los lagos estudiados no tienen, ni conectan con pisciculturas.

Valores de distancia genética indican que la mayoría de las poblaciones se encuentran en una estrecha relación genética, salvo por el río Llancahue que presenta una relación genética más distante (Figura 3). Lo que podría ser explicado debido a que este río nace de los faldeos del volcán Villarrica y no tiene conexión con otros cuerpos de agua, hasta encontrarse con el río Pellaifa, donde continúa su recorrido bajo ese nombre. Por lo que estos cambios pueden haberse producido como resultado de efectos fundadores,

promoviendo la deriva génica, o debido al restringido flujo de genes causado por el aislamiento físico del cuerpo de agua dulce (Gajardo et al., 1998).

El análisis de la subunidad I del gen mitocondrial COI evidencia una diversidad genética (Tabla 1) y diversidad nucleotídica (Tabla 1) dentro del rango reportado en trabajos previos para la trucha arcoíris. Por ejemplo, Nielsen et al. (1997) estudió trucha arcoíris utilizando la región control o Dloop del genoma mitocondrial como marcador genético y detectó una diversidad haplotípica de 0,57 y diversidad nucleotídica de 0,014 en poblaciones de California y México. Posteriormente, Rasmussen et al (2009) estudió poblaciones de trucha arcoíris desde Alaska hasta California, analizando 219 secuencias utilizando el gen COI y obtuvo una diversidad genética de 0,781 y una diversidad nucleotídica de 0,016. Más recientemente, Martsikalis et al. (2014) realizó un estudio utilizando un ensayo de PCR-RFLP que abarcó 5500 bp del genoma mitocondrial en trucha arcoíris provenientes de cultivos de Grecia y detectó una diversidad genética que va desde 0,71 a 0,87 y una diversidad nucleotídica desde 0,18 a 0,36.

El marcador mitocondrial COI corresponde a una región del ADN mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I. Ésta región ha sido utilizada con éxito en trazabilidad de especies, porque generalmente muestra una considerable divergencia entre especies, lo que permite la diferenciación de especies (Rasmussen et al., 2009). Sin embargo, también ha sido frecuentemente usado en estudios filogeográficos debido a la carencia de recombinación en el genoma mitocondrial (Hare et al., 2001), y a que el tamaño efectivo poblacional para los genes mitocondriales es cuatro veces más bajo que en genomas nucleares, enfatizando cualquier efecto de deriva genética o patrones de aislamiento por distancia (Díaz-Almeda et al., 2004). También, al ser un fragmento que permite su fácil amplificación, dada la existencia de partidores universales como los utilizados en esta tesis (Folmer et al. 1994), facilitan la comparación con otras especies. Un rápido análisis en la base de datos de GenBank reveló que al día de hoy (enero 2015) existen 967.551 secuencias nucleotídicas disponibles para cualquier especie, de las cuales 77.014 corresponden a peces y de éstas, 1.620 son secuencias de individuos que pertenecen a alguna especie salmonídea y 1.061 son de alguna de las 17 especies de *Oncorhynchus* y 273 son secuencias de individuos de la especie *O. mykiss*.

Las actuales tecnologías para la secuenciación, permiten que cada vez se puedan estudiar fragmentos más largos del genoma. El presente estudio es una primera mirada a la evolución de las poblaciones naturalizadas de trucha arcoíris en Chile e indudablemente quedan aún preguntas por resolver como por ejemplo: ¿Qué sabemos sobre las bases genéticas de la adaptación de estas poblaciones? O por ejemplo, ¿Cómo sabremos si los linajes genéticos únicos detectados en esta tesis están adaptados al ambiente o si responderán al cambio global? Lo anterior podría ser aproximado mediante el uso de marcadores genéticos de ultima generacion como los EST-ssr (o microsatélites ligados a genes) o mediante análisis de genomas completos usando una aproximación de genome wide association (Luikart et al. 2003). Sin embargo, todas estas preguntas requieren una primera caracterización de la diversidad genética en un contexto espacial y esta tesis constituye un avance en esa materia. Será necesario ampliar el rango geográfico de estudio y por supuesto sería muy interesante incluir aquellas zonas donde se realizaron las primeras introducciones en Chile durante el siglo XX, como por ejemplo la piscicultura de Río Blanco en la región de Valpariso.

7.1 Implicancias para el manejo y conservación de la especie

Dentro de la normativa legal vigente para regular la pesca recreativa en Chile, destaca la Ley de Pesca Recreativa n° 20.256. En esta ley se establecen las medidas de conservación de especies hidrobiológicas de interés en la pesca recreativa (donde se incluye a *O. mykiss*) como, límites diarios de captura por pescador, talla o peso máximo permitido en la captura, prohibición de captura en áreas vulnerables, establecimiento del método de pesca con devolución, además de medidas de repoblamiento y siembra y planes de manejo. Sin embargo, dentro de los contenidos mínimos exigidos por la ley para los planes de manejo, no se incluyen medidas para la mantención de la diversidad genética, siendo que es un objetivo importante de la mayoría de los planes de conservación de especies (Meffe y Carroll 1994).

La principal carencia en el diseño y elaboración de estrategias de conservación y manejo para la trucha arcoíris, es el vacío que existe en la información sobre la estructura

filogeográfica de la especie. Con información como la entregada en esta tesis, se podrían elaborar planes de manejo que, junto a una buena administración y políticas adecuadas, podrían lograr que nuestro país explote todo el potencial que tiene para el desarrollo de la pesca deportiva, pudiendo incrementar sus ingresos en más de 1000% debido a este deporte.

Para la pesca deportiva, es importante que existan haplotipos únicos, como los encontrados en esta tesis, ya que aportan de manera significativa a la diversidad genética de las poblaciones y por lo tanto a su respuesta frente a perturbaciones. La importancia de mantener la diversidad genética en el manejo y conservación de las especies, se debe a que organismos con mayor diversidad genética responden de mejor forma a las presiones selectivas (Reed y Frankham, 2003), sean naturales como, por ejemplo, el cambio climático o artificiales como la degradación y contaminación ambiental, la explotación, etc.

8. BIBLIOGRAFÍA

Arismendi I, Penaluna B, Dunham J, García de Leaniz C, Soto D, Fleming I, Gomez-Uchida D, Gajardo G, Vargas P & León-Muñoz J (2014) Differential invasion success of salmonids in southern Chile: patterns and hypotheses. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 24(3), 919-941.

Arratia G (1978) Comentario sobre la introducción de peces exóticos en aguas continentales de Chile. *Ciencias Forestales* 1, 21-30.

Bandelt H, Foster P & Röhl A (1999) Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1), 37-48.

Benson D, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman D, Ostell J & Sayers E (2013). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(Database issue) D36-D42.

Boyer M, Muhlfeld C & Allendorf F (2008) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) invasion and the spread of hybridization with native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii lewisi*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65, 658–669.

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K & Madden, T (2008) "BLAST+: architecture and applications." *BMC Bioinformatics* 10:421. PubMed.

Claude M & Oporto J (2000) La ineficiencia de la Salmonicultura en Chile: Aspectos sociales, económicos y ambientales. Fundación Terram, Santiago, Chile 72 pp.

Colihueque N, Vergara N & Parraguez M (2003) Genetic characterization of naturalized populations of brown trout *Salmo trutta* L. in southern Chile using allozyme and microsatellite markers. *Aquaculture Research* 34, 525-533.

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

Correa C, Bravo A & Hendry A (2012) Reciprocal trophic niche shifts in native and invasive fish: salmonids and galaxiids in Patagonian lakes. *Freshwater Biology* 57, 1769-1781.

Correa C & Hendry A (2012) Invasive salmonids and lake order interact in the decline of puye grande *Galaxias platei* in western Patagonia lakes. *Ecological Applications*, 22(3), 828–842-

Currens K, Schreck C & LI H (1990) Allozyme and Morphological Divergence of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Above and Below Waterfalls in the Deschutes River, Oregon. *Copeia* 3, 730-746.

Cussac V, Becker L, Aigo J, Conte-Grand C, Blasetti G, Cordero P, Crichigno S & Nabaes D (2014) Abundance of native fishes, wild-introduced salmonids and escaped farmed rainbow trout in a Patagonian reservoir. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 19, 74–85.

Díaz-Almela E, Boundry P, Launey S, Bonhomme F & Lapegue S (2004) Reduced female gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity* 95, 510–516.

Einum S & Fleming I (2001) Implications of Stocking: Ecological interactions Between Wild and Released Salmonids. *Nordic Journal of Freshwater Research* 75, 56-70.

Espinós A (1995) El alimento - presa que encontraron las truchas en la Argentina Irene Wais. Boletín mosquero AAPM invierno de 1995. Los salmónidos (enfoque científico) APMN Cornell University - Department of Natural Resources Novascotia - Canada - Agriculture and Fisheries.

Excoffier L & Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.

Faundez V, Blanco G, Vázquez E & Sánchez J (1997) Allozyme variability un Brown trout *Salmo trutta* in Chile. *Aquaculture Research* 29, 785-790.

Filatov D (2002) PROSEQ: software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence datasets. *Molecular Ecology Notes* 2, 621–624.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R (1994) DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase submit I diverse metazoan invertebrates. *Molecular Biology & Biotechnology* 3, 294 - 299.

Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.

Gajardo G, Díaz O & Crespo J (1998) Allozymic variation and differentiation in naturalized populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from southern Chile. *Aquaculture Research* 29, 785-790.

Gall G & Crandell P (1992) The rainbow trout. *Aquaculture* 100, 1-10.

Garcia de Leaniz C, Fleming I, Einum S, Verspoor E, Jordan W, Consuegra S, Aubin-Horth N et al. (2007). A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic salmon: implications for conservation. *Biological Reviews* 82, 173–211.

Golusda P (1907) La introducción del salmón en Chile. Sección de aguas y bosques des ministerio de industria. Imprenta Cervantes, Santiago, Chile 31 pp.

Groot C (1996) Chapter 3 Salmonid life histories. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 29, 97-230.

Hare, M.P. (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 700–706.

Hansen L, Hastein T, Nævdal G, Saunders R & Thorpe J (1991) Interactions between cultured and wild Atlantic salmon. *Aquaculture* 98, 1–324.

Keskin E & Atar H (2013) DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. *Molecular ecology resources*, 13(5), 788-797.

Laird L & Needham T (1988) The farmed salmonids. In: L.M. Laird and T. Needham (Editors), *Salmon and Trout Farming*. Ellis Horwood, Chichester 15-31.

Lockwood J, Cassey L & Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 223–228.

Luikart G, England P, Jordan S & Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4, 981-994.

Martsikalis P, Gkafas G, Apostolidis A & Exadactylos A (2014) Genetic Structure Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farmed Strains in Greece. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14, 749-757.

Meffe GK & Carroll CR (1994) *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Nielsen J, Fountain M & Wright J (1997) Biogeographic analysis of Pacific trout (*Oncorhynchus mykiss*) in California and Mexico based on mitochondrial DNA and nuclear microsatellites. *Molecular Systematics of Fishes* (eds KocherTD, StepienCA.) Academic Press, San Diego 53-73.

Muñoz O (2009) La industria de la salmonicultura en Chile. En: *Aguas arriba: La transformación socioeconómica del ecosistema Llanquihue-Chiloé (Chile) durante los años 90*. 1a ed. Buenos Aires, CLACSO. 57-60.

Rasmussen R, Morrissey M & Hebert P (2009) DNA Barcoding of Commercially Important Salmon and Trout Species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8379–8385

Reed D & Frankham R (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17, 230-237.

Redondo S, Castillo J, Rubio-Casal E, Luque T & Figueroa M (2003) El conocimiento de la diversidad genética como base para la conservación de la naturaleza. Grupo de Investigación “Ecología, Citogenética y Recursos Naturales”, Universidad de Sevilla, *El Ecologista* nº 38.

Riffel M, Storch V & Schreiber A (1995) Allozyme variability of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations across the Rhenanian-Danubian watershed in southwest Germany. *Genetical Society of Great Britain* 241-249.

Sepúlveda M, Arismendi I, Soto D, Jara F & Farías F (2013) Escaped farmed salmon and trout in Chile: incidence, impacts, and the need for an ecosystem view. *Aquacult Environ Interact* 4, 273-283.

Sepúlveda M, Farías F & Soto E (2009) Escapes de salmones en Chile. Eventos, impactos, mitigación y prevención. Valdivia, Chile: WWF.

SERNATUR (2005) Proyecto FDI Sistema Normativo para la calidad en turismo. Resumen Ejecutivo. Gobierno de Chile, Servicio Nacional de Turismo, Chile. pp. 10.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics* 105, 437-460.

Wetzlar H (1979) Beitrage zur biologie and bewirtschaftung von forellen *Salmo gairdneri* und *Salmo trutta* in Chile. Dissertation zur erlangung des doktorgrades vorgelegt des Fakultat fur Biologie der Albert-Ludwigs Universitat in Freiburg.