



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magister en Ciencias con mención en Zoología

Patrones de dispersión y migración de la especie invasora Salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) en dos regiones del sur de Chile utilizando polimorfismos de único nucleótido (SNPs)

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Zoología

FRANCISCA VERONICA VALENZUELA AGUAYO

CONCEPCIÓN-CHILE

2015

Profesor Guía: Dr. Daniel Gómez Uchida
Dpto. de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción



*Dedicado a mi familia, Negri y Mamishi,
y a mis amigos ratas
Pupee, Diegol y Abuelo.*

“La manera más sencilla de llegar hasta la orilla es nunca dejar de nadar...”

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesor guía, Dr. Daniel Gómez Uchida por su ayuda y apoyo en todo el proceso educacional de este Magister y en la elaboración de esta tesis.

Quiero agradecer también al Dr. Cristian Salas y Sandra Aguayo por su gran, importante y constante amor y contención emocional. Y también a todos los integrantes del Laboratorio de Genómica en Ecología, Evolución y Conservación (GEEClab), en especial a María Ignacia Cádiz, Diego Cañas y Selim Musleh, por sus frecuentes, positivas e inolvidables conversaciones, por su disposición y su enorme colaboración práctica en la preparación de esta tesis.

Quiero agradecer al Dr. Cristian Canales y Dr. Pedro Victoriano por su dedicación a las correcciones constructivas de este estudio.

Al estudio biológico en la pesca del Salmón Chinook del río Toltén, IX Región, Chile FIP 2014-87; al proyecto FONDECYT 1130807 sobre Investigación genética y ecológica de Trucha arco iris en el Lago Todos Los Santos y el Lago Llanquihue, X Región, Chile; a Beca de Magister Centro INCAR 2013 y a Beca CONICYT de magister 2014, por el financiamiento de este tesis.

Al Dr. Ricardo Galleguillos y equipo del Laboratorio genética y acuicultura de la Universidad de Concepción, por facilitar sus dependencias para la extracción de ADN; y a los Dr. James E. Seeb y Lisa W. Seeb del laboratorio de Genómica Ecológica de la Universidad de Washington por otorgar sus dependencias para tipificar SNPs.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
<i>Establecimiento y naturalización de Salmón Chinook en Chile: problemáticas y la aplicación de polimorfismos de único nucleótido (SNPs).....</i>	8
• Problema 1: El origen del Salmón Chinook del Río Toltén: ¿Colonización artificial desde instalaciones de cultivo o colonización natural por dispersión?	10
HIPOTESIS PROBLEMA 1	12
• Problema 2: El Salmón Chinook en zonas de alimentación del mar interior de Chiloé, Golfo de Ancud (GA): ¿Proviene de una o más poblaciones de origen?.....	12
HIPOTESIS PROBLEMA 2	13
OBJETIVOS	14
Objetivo general:.....	14
Objetivos específicos:	14
<i>Objetivo Problema 1.....</i>	14
<i>Objetivo Problema 2.....</i>	14
MATERIALES Y METODOS	15
1. AREAS DE ESTUDIO	15
1.1 <i>Río Toltén</i>	15
1.2 <i>Golfo de Ancud</i>	15
2. MUESTREO.....	16
3. EXTRACCIÓN DE ADN Y TIPIFICACIÓN DE SNPs.....	16
4. ANÁLISIS PRELIMINARES Y SELECCIÓN DE SNPs	17
5. DIVERSIDAD GENÉTICA	18
6. ESTRUCTURA GENÉTICA BASADA EN INDIVIDUOS.....	18
7. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DEL STOCK (GSI).....	19
RESULTADOS.....	21
1. ANÁLISIS PRELIMINARES Y SELECCIÓN DE SNPs	21

2. DIVERSIDAD GENÉTICA	21
3. ESTRUCTURA GENÉTICA.....	21
4. TEST DE ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS	22
4.1 Río Toltén y Río Petrohué a las poblaciones nativas del hemisferio Norte.....	22
4.2 Golfo de Ancud y Río Petrohué.....	23
DISCUSIÓN.....	25
Objetivo 1. ¿Colonización artificial desde instalaciones de cultivo o colonización natural por dispersión?.....	25
Objetivo 2: El Salmón Chinook en zonas de alimentación del mar interior de Chiloé, Golfo de Ancud: ¿Proviene de una o más poblaciones de origen?.....	27
CONCLUSIÓN	30
FIGURAS	31
Figura 1. Distribución del SCh en su rango nativo en el hemisferio Norte.	31
Figura 2. Salmón Chinook estadio fry.....	32
Figura 3. Salmón Chinook macho..	32
Figura 4. Mapa de la IX región de la Araucanía.....	33
Figura 5. Mapa de la X región de los Lagos.	34
Figura 6. Análisis de componentes principales (PCA), realizado en adegenet. Componente X describe el 16.68% de la variabilidad de los datos y la Componente Y describe el 6.92%. Río Petrohué (RP), Río Toltén (RT) y Golfo de Ancud (GA).....	35
Figura 7. Análisis discriminante de coordenadas principales (DAPC).....	36
Figura 8. Barplot del porcentaje de asignación de cada población en estudio a los reporting groups del hemisferio norte analizados.	37
Figura 9. Resultado del test de asignación de los individuos del Río Toltén (RT) a los reporting groups del hemisferio Norte.....	38
Figura 10. Resultado del test de asignación de los individuos del Río Petrohué (RP) a las poblaciones del hemisferio Norte.....	38
Figura 11. Resultado del test de asignación de los individuos del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones del hemisferio Norte.....	39

Figura 12. Barplot del porcentaje total de asignación de la población del Golfo de Ancud a cada población de ríos Chilenos-Argentinos analizada.....	40
Figura 13. Resultado del test de asignación de los individuos del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones de ríos Chilenos-Argentinos.....	41
TABLAS	42
Tabla 1. Cronología de la introducción del SCh a Chile.....	42
Tabla 2. <i>Reporting groups</i> de las poblaciones nativas utilizadas como base de datos de referencia para el análisis de identificación genética del stock (GSI).....	43
Tabla 3. Índices de diversidad genética de las tres poblaciones consideradas en el análisis.....	43
Tabla 4. Índice de diferenciación F_{ST} por pares de localidades.....	44
Tabla 5. Probabilidad de asignación de la población total del Golfo de Ancud, Río Petrohué (población de referencia) y Río Toltén a cada <i>reporting groups</i> del hemisferio Norte.....	45
Tabla 6. Probabilidad de asignación de la población total del Golfo de Ancud, a cada población Chilena-Argentina analizada.....	45
ANEXOS	46
Anexo 1. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Río Toltén a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o <i>reporting groups</i>).....	46
Anexo 2. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Río Petrohué (RP) a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o <i>reporting groups</i>).....	49
Anexo 3. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o <i>reporting groups</i>).	51
Anexo 4. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones introducidas de la Patagonia Chilena y Argentina.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	55

RESUMEN

La especie introducida Salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) ha sido particularmente exitosa en establecer poblaciones anádromas en las cuencas fluviales, tanto del Océano Pacífico como del Atlántico. Hoy en día, es considerada una especie asilvestrada en Chile y con gran capacidad invasiva producto de su rápida dispersión en los últimos años en la Patagonia Chilena con registro de su presencia en ríos desde la IX región de la Araucanía, Mar interior de Chiloé hasta Tierra del Fuego. Esto, puede estar proporcionando grandes oportunidades de mezcla entre linajes genéticamente distintos, implicando el aumento o disminución de la diversidad genética y cambios en la estructura genética de las poblaciones. En esta investigación se evaluaron los posibles patrones de dispersión y migración del Salmón Chinook, en dos áreas de su rango introducido en Chile: Río Toltén y Golfo de Ancud, mediante la utilización de polimorfismos de único nucleótido (SNPs) como marcador molecular y técnicas de identificación genética de stock, a fin de dar respuesta a dos interrogantes: 1) El origen del Salmón Chinook del Río Toltén, ¿Colonización natural por dispersión o trasplante artificial desde instalaciones de cultivo? y 2) El Salmón Chinook en zonas de alimentación del mar interior de Chiloé, Golfo de Ancud ¿Proviene de una o más poblaciones de origen?. Nuestros resultados indican una leve diferenciación genética en la población del Río Toltén y la población de referencia (Río Petrohué), un origen genético diferente en ambas poblaciones, pero múltiple para la población del Río Toltén, lo que también permite que Río Toltén tenga una alta variación genética, por lo que el origen de la población del Río Toltén es producto de múltiples introducciones producidos por el hombre, no informados, a partir de individuos cultivados en el sur de Chile y no por dispersión natural. Por otra parte, la evaluación genética de stock indica que los individuos analizados del Golfo de Ancud provienen mayoritariamente del Río Petrohué, por lo que el Golfo de Ancud es una de sus estaciones de alimentación en su proceso migratorio y al igual que en su rango nativo, SCh introducido hace migraciones cercanas a la costa.

INTRODUCCIÓN

Establecimiento y naturalización de Salmón Chinook en Chile: problemáticas y la aplicación de polimorfismos de único nucleótido (SNPs)

Una de las especies de salmónidos introducidos con mayor presencia en Sudamérica es el Salmón Chinook (SCh), *Oncorhynchus tshawytscha*. Su rango nativo en la costa del Pacífico de América del Norte abarca desde el sur de California hasta Alaska, y del Noreste de Asia hasta el Norte de Japón (Cadwallader, 1996) (Figura 1). Es también conocido bajo el nombre común de Salmón Rey o *Quinnat* y es el más grande de los salmónidos del Pacífico: puede medir cerca de 150 cm y pesar hasta 45 kg (Healey, 1991; Heard, 2007; Froese, 2014). Los alevines (o “fry”, Figura 2) de SCh eclosionan en agua dulce, los que más tarde en su etapa juvenil tienen un comportamiento territorial agresivo (Healey, 1991). La especie muestra dos variaciones en su historia de vida. Dependiendo del tiempo de residencia en agua dulce, se reconocen dos tipos de poblaciones juveniles a) “*ocean-type*” que migran al océano poco después de su eclosión en su primer año de nacimiento, y b) “*stream-type*”, que migran después de pasar al menos un año en agua dulce; los primeros efectúan migraciones oceánicas mucho más cortas que los segundos. Durante su etapa adulta (entre los 3 y 6 años), tanto *ocean-type* como *stream-type*, se alimentan activamente en el océano. Luego retornan a su río natal, lo que es llamado “*homing*” o filopatría. El *homing* es generalmente preciso, originando aislamiento reproductivo y adaptación local (Dittman & Quinn, 1996). Sin embargo, la dispersión de individuos hacia otras cuencas que no sean la cuenca natal es también típica de los salmones, lo que les permite colonizar nuevos hábitats. Dependiendo del periodo de retorno de los SCh adultos (Figura 3) a su cuenca natal para reproducirse, se reconocen poblaciones de Primavera, Verano u Otoño (Quinn, 2005). Finalmente, después del desove, los machos y las hembras mueren en el lugar, mientras que los embriones se desarrollan en un nido de grava durante dos a seis meses, dependiendo de la temperatura del agua, antes de eclosionar como alevines y completar el ciclo (Quinn, 2005).

En nuestro país, los registros indican que los primeros intentos de introducir SCh fueron en 1886 desde Paris, Francia, y entre 1924 y 1930 desde el criadero McCloud (Cuenca del Río Sacramento, California, Estados Unidos) lo que ha sido seguido por una serie de eventos

introdutorios desde entonces (Tabla 1). En la actualidad el SCh se encuentra establecido y naturalizado en al menos 10 cuencas andinas que desembocan en el Océano Pacífico Sur y en al menos una que desemboca en el Océano Atlántico Sur (Correa & Gross, 2008), entre ellas los Ríos Toltén (Vargas *et al.*, 2010), Puelo (Correa & Gross, 2008), Pratt (Basulto, 2003), Futaleufú (Di Prinzio, 2001), Petrohué (Soto *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007), Aysén (Correa & Gross, 2008) y en la Patagonia Argentina (Río Santa Cruz) (Di Prinzio, 2001; Becker *et al.*, 2007; Pascual & Ciancio, 2007). El origen de estas poblaciones coincide en la mayoría de los casos con la historia de introducciones a través de importaciones de ovas realizadas tanto por iniciativas gubernamentales como privadas (Tabla 1). No obstante, el origen del SCh en algunas cuencas es controversial por la falta de registros confiables de introducciones directas de ovas en estos cuerpos de agua o estudios que permitan relacionar genéticamente las relaciones entre las diferentes poblaciones presentes en cuencas de Chile. ¿Corresponden a poblaciones originadas localmente, producto de introducciones mediadas por el hombre, o han ocurrido por dispersión natural desde poblaciones ya asilvestradas? Esta incerteza insta a conocer el origen, diversidad genética y divergencia entre estas poblaciones debido a que puede ser clave para comprender qué puede influenciar su rápido y exitoso establecimiento (Consuegra *et al.*, 2011). Por otra parte, la anadromía de esta especie genera migraciones y movimiento de estos individuos hacia el océano, cuyo comportamiento es desconocido en su rango introducido y exige investigación empírica sustancial debido al alto número de poblaciones retornantes a ríos tanto del Pacífico como Atlántico.

Las herramientas moleculares han sido históricamente aplicadas en el estudio de los salmónidos y su administración, principalmente en su rango nativo (Banks *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2011; Winkler *et al.*, 2011; Riva Rossi *et al.*, 2012; Limborg *et al.*, 2014; Di Prinzio *et al.*, 2015). Los estudios genéticos moleculares proporcionan una visión excepcional de las relaciones entre poblaciones, y por lo tanto una aproximación para entender patrones de migración y evolución en poblaciones nativas e introducidas. Por otro lado, la filopatría o *homing*, característica de *Oncorhynchus tshawytscha*, por su río de origen permiten una fina adaptación al ambiente local, originando poblaciones discretas y reproductivamente aisladas, y permite la evolución de diferentes historias de vida (Dittman & Quinn, 1996). Esta diferenciación también facilita la estimación de la población de origen de cualquier individuo muestreado y la proporción de mezcla entre individuos de distintas poblaciones mediante *identificación genética de stocks* (GSI, sigla en inglés) (Bolker *et al.*, 2007;

Ackerman *et al.*, 2011). Esta tecnología de identificación de poblaciones se está utilizando cada vez más en las aplicaciones de gestión de estas especies en su rango nativo para complementar (y en algunos casos sustituir) etiquetas físicas y estimar el origen de los individuos o las mezclas de estos (e.g salmón del Pacífico, Seeb *et al.* (2000), Templin *et al.* (2012)). Para esto se utiliza la estructura genética de las poblaciones desovantes de una especie como línea base, para luego estimar las proporciones de mezclas poblacionales, los genotipos en la mezcla, y la frecuencia de las marcas genéticas con respecto a una población de referencia. De esta manera, el pez capturado a partir de un *stock* mezclado puede ser genotipificado y asignado de nuevo a su población o grupo de origen (Ackerman *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se utilizarán polimorfismos de único nucleótido (SNPs) (Seeb *et al.*, 2011) en conjunto con principios de genética de poblaciones para aclarar dos problemáticas relacionadas con posibles patrones de dispersión y migración de esta especie en poblaciones de SCh establecidas en nuestro país, las que se exponen a continuación:

- ***Problema 1: El origen del Salmón Chinook del Río Toltén: ¿Colonización artificial desde instalaciones de cultivo o colonización natural por dispersión?***

La actual distribución de SCh asilvestrado más allá de sus puntos iniciales de introducción (X Región de los Lagos) y la presencia de adultos retornantes y juveniles en el Río Toltén y aledaños (e.g., Río Imperial) no pueden ser explicados por escapes recientes desde centros de cultivo de la IX Región, debido principalmente a que (1) no hay pisciculturas que cultiven actualmente SCh en la región de la Araucanía y (2) juveniles o adultos, muestreados como parte de un proyecto del fondo de investigación pesquera (FIP 2014-87) actualmente en ejecución, no presentaron rasgos morfológicos clásicos de peces cultivados, tales como aletas pectorales o dorsales erosionadas (Gross, 1998; Correa & Gross, 2008). Por lo tanto, el origen del SCh del Río Toltén podría ser producto de colonización artificial, debido a una o más siembras locales no documentadas de ovas, alevines, o ambas, o debido a la colonización por dispersión natural desde poblaciones ya establecidas desde el sur de Chile.

La información desde *blogs* de pescadores deportivos sugiere que la población de SCh del Río Toltén podría haberse originado desde una piscicultura ubicada en la localidad de

Melipeuco, la que fue construida en los 1980s. El origen de las ovas habría sido el Río Sacramento en EEUU. El stock no pudo ser finalmente comercializado debido al poco desarrollo de los ejemplares (atribuido a la no adecuada temperatura del agua), lo que generó la quiebra de la empresa (entre 1994 y 1995) y como resultado la liberación de los alevines sobrevivientes al estero El membrillo, un afluente del Río Allipén. Existen registros de operación de dicha piscicultura en Sernapesca y la autorización para cultivar la especie *O. tshawytscha*. Esta liberación coincide con el ciclo de la especie (4 o 5 años) y primeros avistamientos de SCh en la desembocadura y curso superior a partir del año 2000. La información expuesta por Basulto (2003) indica que no hubo siembra directa de SCh en el Río Toltén, solo registros de introducción directa al Río Cautín (al norte del Toltén) de alevines de SCh cuyas ovas provenían desde EEUU, pero que fueron sembrados en 1924, sin resultados positivos.

Alternativamente, el establecimiento de poblaciones en el Río Toltén podría ser un proceso continuo y equivalente a su dispersión natural en América del Norte (Correa & Gross, 2008), esto debido a que el límite inferior de su distribución latitudinal es 39°, tanto en su área de distribución natural de América del Norte (es decir, el sistema de Sacramento- Río San Joaquín) y su equivalente en América del Sur (es decir, la Cuenca del Río Toltén). De acuerdo a Halpin *et al.* (2004), los procesos oceanográficos del Océano Pacífico Oriental y sus efectos sobre el clima y la biota son bastantes similares y comparables tanto en el hemisferio Norte como en el Hemisferio Sur. En primer lugar, existen ejemplos donde escapes tempranos a partir de las poblaciones en el Petrohué han sido capaces de dar origen a poblaciones lejanas hacia el Norte del país, como lo es la población que habita hoy en el Lago Puyehue (Al norte del Petrohué). En segundo lugar, Riva Rossi *et al.* (2012) usó secuencias de ADN mitocondrial para estudiar la diversidad genética asociada a la invasión de poblaciones de SCh a seis cuencas del Pacífico y una del Atlántico, y cuyos resultados indicaron que la colonización de nuevas poblaciones en cuencas Argentinas, específicamente, puede haber ocurrido por dispersión no contigua.

HIPOTESIS PROBLEMA 1

Debido a los registros de operación y cultivo de SCh en la piscicultura del sector de Melipeuco, IX región, entre los años 1994 y 1995, la población asilvestrada del Río Toltén se originó a partir de una colonización artificial local.

- ***Problema 2: El Salmón Chinook en zonas de alimentación del mar interior de Chiloé, Golfo de Ancud (GA): ¿Proviene de una o más poblaciones de origen?***

Las introducciones realizadas en la década de los años 80 en la X Región probablemente dieron origen a las poblaciones actualmente presentes en los ríos Petrohué, Yelcho y Palena avistadas por primera vez en la década de los años 90 (Correa & Gross, 2008). En nuestro país solo hubieron dos sitios informados en el mar interior de Chiloé donde se cultivó SCh: Calbuco y Hornopirén (Soto *et al.*, 2007). Desde ambas localidades se pudieron haber originado poblaciones de SCh que se establecieron al norte del Estuario de Reloncaví y Río Petrohué (río de gran relevancia ya que es el principal río con sitios de desove y presencia de juveniles de SCh documentados (Soto *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007). Cañas (2014) sugiere que el SCh que se reproduce en el Río Petrohué tiene múltiples orígenes geográficos, incluyendo fuentes de Washington, Oregon y California. Con el tiempo, SCh de Petrohué probablemente dió origen a las poblaciones del Río Puelo (Soto *et al.*, 2007) y al Río Futaleufú (Ciancio *et al.*, 2015). En consecuencia, los salmones alguna vez introducidos o escapados de cultivo han generado múltiples poblaciones en las cuencas que desembocan al Golfo de Ancud, el que probablemente representa una gran área de alimentación.

Las áreas de alimentación de SCh en el hemisferio Norte están compuestas de una mezcla de individuos pertenecientes a diversas poblaciones (Templin *et al.*, 2012). Se han usado varios métodos para estudiar los patrones de migración y distribución de salmónidos en alta mar: a) capturas con redes de cerco y redes de enmalle, diseñados para detectar la dirección del movimiento de los cardúmenes (Weitkamp, 2010); b) marcaje de salmón capturado en el mar y recaptura posterior de las marcas en aguas costeras, estuarios o ríos (Weitkamp, 2010); c) uso de marcas “naturales” (e.g., parásitos) estrechamente vinculados

a un continente o región específica de origen; y d) la variación individual y poblacional a nivel de marcadores moleculares (Limborg *et al.*, 2014). Estas técnicas han permitido conocer distintos patrones del comportamiento migratorio y el comportamiento de las poblaciones de Salmón del Pacífico en el océano. Por ejemplo, SCh y Salmón Coho (*O. kisutch*) se distribuyen generalmente al norte de su río natal, prefiriendo las zonas más frías y productivas, y se mantienen relativamente cerca de la costa en su rango nativo (Fisher *et al.*, 2014).

Debido a que la comprensión de la ecología de una especie es un componente fundamental en el desarrollo de planes de gestión (Buser, 2009), aplicaciones tipo GSI en SCh del Golfo de Ancud pueden ser fundamentales, por ejemplo, para obtener información ecológica sobre periodos y extensión de las migraciones de SCh. Cañas (2014) determinó que existen diferencias genéticas marcadas entre las poblaciones desovantes del Río Petrohué y otras cuencas de la XI Región que podrían estar contribuyendo a las mezclas (Río Baker, Río Aysén). Estas diferencias aseguran el éxito de la aplicación GSI para análisis de mezclas poblacionales. Por otro lado, conocer la composición genética mediante GIS tiene aplicación a planes de administración y explotación de los salmónidos como recursos de gran valor comercial (Limborg *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestro conocimiento sobre rutas de migración en SCh en su rango introducido es limitado (Soto *et al.*, 2007). Por otro lado, si el SCh que se alimenta en el Golfo de Ancud sugiere múltiples orígenes, entonces se hace necesario poder identificar las fuentes de dichos aportes, esto es porque la productividad de cada población discreta puede ser distinta y variable en el tiempo (Hilborn *et al.*, 2003; Schindler *et al.*, 2010).

HIPOTESIS PROBLEMA 2

Debido a que el SCh en su rango nativo es una especie cuyas migraciones al mar son cercanas a su río de origen en la costa, los individuos capturados en el Golfo de Ancud serán mayoritariamente asignados a la población desovante del Río Petrohué.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar los patrones de dispersión y colonización (artificial o natural) en el Río Toltén y el patrón de migración y composición genética del SCh en la zona de alimentación del Golfo de Ancud utilizando polimorfismos de único nucleótido (SNPs).

Objetivos específicos:

Objetivo Problema 1

- Determinar si los individuos asilvestrados de SCh que desovan en el Río Toltén se originaron desde una colonización artificial desde una piscicultura local o como resultado de una colonización natural por dispersión desde ríos el Río Petrohué mediante la evaluación de la divergencia genética de los individuos de ambos ríos y la probabilidad de asignación al Río Petrohué según su origen genético.

Objetivo Problema 2

- Inferir patrones de migración al determinar la cuenca de origen del SCh capturado en el área de alimentación del Golfo de Ancud y estimar la composición porcentual de uno o varios stocks desovantes de la X y XI Región.

MATERIALES Y METODOS

1. AREAS DE ESTUDIO

1.1 Río Toltén

El Río Toltén se encuentra ubicado en la Provincia de Cautín, IX Región de la Araucanía, Chile (Figura 4). La cuenca del Río Toltén se origina del lago Villarrica y posee una superficie de 8,040 km², su largo es de 123 km y tiene una altitud 134 m (Soto *et al.*, 2007). Tiene como afluentes principales los ríos Allipén, Voipir y Donguil (Cassin & Sepúlveda, eds. 2006). El río, es engrosado con las aguas del Río Allipén a partir de la localidad de Pitrufquén, a unos 40 km de su origen (donde pasa a ser de lecho ancho y poca pendiente). Luego, se divide en numerosos brazos que vuelven a juntarse dejando otras tantas islas entre sí, lo que le confiere el carácter de anastomosado. A la altura de la Comuna de Teodoro Smith, la cuenca desemboca en el mar, presentando un ancho superior a 500 m. Debido a los diversos avistamientos de reproductores de SCh por parte de guías de pesca y pescadores locales en distintas áreas a lo largo de la cuenca del Río Toltén, las muestras fueron extraídas desde los ríos Llaima y Allipén (importantes tributarios en los que se ha avistado SCh) en el curso superior del río (Figura 4). En esta área se obtuvieron y muestrearon 124 individuos juveniles de SCh de forma no destructiva mediante pesca eléctrica.

1.2 Golfo de Ancud

El Golfo de Ancud se encuentra ubicado al noreste de la isla Grande de Chiloé y pertenece a la X Región de Los Lagos, Chile (Figura 5). Su límite norte comprende Calbuco y Queullin y su límite sur se ubica entre las Islas Desertores y Quinchao principalmente. El Golfo de Ancud presenta una variación en su temperatura anual entre los 9°C (mínima temperatura en meses de invierno) y 18°C (máxima temperatura en meses de verano), con un promedio anual de 10°C y 31 de salinidad entre los primeros 10 metros de la columna de agua (Iriarte *et al.*, 2007). En esta área de estudio fueron capturados 45 individuos de SCh adultos como fauna acompañante de las faenas de pesca artesanal de *Merluccius australis* (Merluza del

sur o austral) mediante espineles de profundidad. Estos individuos fueron muestreados en la localidad de Calbuco, X Región de Los Lagos, Chile (Figura 5).

2. MUESTREO

Del Río Toltén se capturaron individuos juveniles mediante un equipo de pesca eléctrica Halltech 2000 que fueron almacenados en baldes de 20 L para anestesiarnos paulatinamente con 0.5 µL de Benzocaína. Luego de anestesiados se procedió a realizar una biopsia no letal de la aleta adiposa y caudal. Los individuos, posteriormente, fueron reanimados colocándolos rápidamente luego de muestreados en un segundo balde con agua sin Benzocaína y con movimiento constante del agua para permitir una mejor aireación de esta. Las muestras de estos individuos fueron conservadas en criotubos (Biologix) con 1.5 mL de alcohol al 96%, los que fueron transportados al laboratorio AcuiGen (Universidad de Concepción) con el fin de preservarlas a -80°C para su posterior análisis.

De la zona del Golfo de Ancud se extrajeron biopsias de aleta adiposa o caudal desde individuos adultos. Estas muestras al igual que las de juveniles del Río Toltén fueron conservadas en criotubos (Biologix) con 1.5 mL de alcohol al 96%. Posteriormente se transportaron al Laboratorio AcuiGen (Universidad de Concepción) con el fin de preservarlas a -80°C para su posterior análisis.

3. EXTRACCIÓN DE ADN Y TIPIFICACIÓN DE SNPs

Se extrajo ADN desde 190 individuos: 145 del Río Toltén y 45 del Golfo de Ancud. Este procedimiento se llevó a cabo mediante la utilización del Kit NucleoSpin® Tissue (Qiagen), en las dependencias del laboratorio AcuiGen (Universidad de Concepción). El ADN extraído fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000, en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Acuicola del Centro de Biotecnología (Universidad de Concepción). Posteriormente se tomó una alícuota de 25 µL de ADN de cada individuo y fueron puestos en placas para PCR, las que se enviaron al laboratorio de Genómica Ecológica de la Universidad de Washington (Estados Unidos) para realizar la tipificación de SNPs según el protocolo de Seeb *et al.* (2009). Los SNPs (Polimorfismos en un solo nucleótido) son variaciones en nucleótidos que no cambian la longitud total de la secuencia

de ADN, existen en todo el genoma y la mayoría se localizan en regiones no codificantes sin efecto directo en el fenotipo del individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en regiones que influyen en la expresión génica (codificante), por lo tanto nos permiten caracterizar polimorfismos que puedan tener importancia adaptativa y neutral (Morin *et al.*, 2004). Los SNPs adaptativos permiten caracterizar la variación adaptativa en relación a factores ambientales y espaciales (Gomez-Uchida *et al.*, 2012; Limborg *et al.*, 2012) y los SNPs neutrales, son utilizados para comparar la distribución de los alelos entre las poblaciones, y por lo tanto permiten medir migración y deriva entre éstas; también es posible estimar el número efectivo de reproductores (N_b) y el tamaño efectivo de la población (N_e) (Gomez-Uchida *et al.*, 2012).

Se realizó una verificación manual de los SNPs amplificados por cada individuo en el software Fluidigm® SNP Genotyping Analysis. Se excluyeron los individuos que presentaban más del 75% de sus SNPs sin información.

4. ANÁLISIS PRELIMINARES Y SELECCIÓN DE SNPs

Para realizar los análisis preliminares se usó una base de datos conteniendo información de 191 SNPs para un total de 190 individuos: 45 del Río Toltén, 45 de Golfo de Ancud y 88 individuos del Río Petrohué (Cañas, 2014). Esta última población fue considerada como población de referencia dada su cercanía geográfica con la población del Golfo de Ancud y su alta estructuración genética. Los genotipos del Río Petrohué provienen de un estudio anterior que analizó la estructuración del SCh en Sudamérica (Cañas, 2014).

Se evaluó la integridad de los datos de SNPs mediante un análisis de equilibrio de Hardy & Weinberg utilizando el programa GenALEX 6, el cual es un paquete que utiliza la plataforma de Excel de Microsoft para la realización de análisis genéticos de poblaciones mediante el procesamiento de secuencias de ADN en formato numérico (Peakall & Smouse, 2006). Este permitió encontrar los SNPs que presentaron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Además, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) utilizando el programa GENEPOP (Rousset, 2008) (utilizando los valores por defecto: 10.000 *dememorization steps*, 100 *batches* y 5000 *iterations*) a fin de poder determinar si las frecuencias alélicas de ciertos loci están correlacionadas debido a la ausencia de recombinación o por mezcla reciente de las poblaciones. Fueron excluidos aquellos SNPs

que no se ajustaron a HWE en más del 50% de las poblaciones en estudio y que presentaron LD en más de un 99%.

Complementariamente, se realizó un scan del genoma para detectar SNPs adaptativos que se encuentran bajo la influencia de selección natural mediante la identificación de valores atípicos o “outliers”. Este procedimiento fue realizado en el software BAYESCAN, el que consiste en la identificación de loci con niveles más altos de divergencia a lo esperado bajo la teoría neutral mediante método Bayesiano (Foll & Gaggiotti, 2008). Los SNPs no detectados como SNP adaptativos fueron considerados como SNPs neutrales los que posteriormente fueron utilizados para la estimación del resto de los análisis.

5. DIVERSIDAD GENÉTICA

Se usó el programa GenALEx 6 para estimar la diversidad genética tanto para las muestras del Río Toltén y las muestras del Golfo de Ancud, estimando los valores de Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), además del Índice de diversidad de Shannon (I).

También, usando GenALEx 6 se realizó una matriz de distancia genética F_{ST} (el cual mide el grado de diferenciación genética de las poblaciones calculando las varianzas estandarizadas de las frecuencias alélicas entre individuos), para observar la diferenciación genética entre los individuos de las áreas en estudio y los de la población de referencia (Río Petrohué). Para cuantificar la magnitud de las diferencias genéticas entre las localidades analizadas, se estimó el índice F_{ST} por pares de localidades en el programa ARLEQUIN versión 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Los valores de probabilidad fueron estimados mediante un test de permutación utilizando 101.000 iteraciones. Se utilizó la corrección de Bonferroni cuando fue necesario ($\alpha' = 0,05 / \text{número de localidades} \times \text{número de loci}$).

6. ESTRUCTURA GENÉTICA BASADA EN INDIVIDUOS

Para esto fue utilizada la base de datos con la información genética de las tres poblaciones. Con esta información se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), a partir del cual se infirió el número de *cluster* o poblaciones genéticamente similares (número máximo de *cluster* =50 e iteraciones =100.000). Posteriormente asumiendo el número de

cluster resultantes se procedió a comparar la estructura genética entre individuos de las poblaciones del Río Toltén, Golfo de Ancud y Río Petrohué, usando el paquete de R *adegenet* versión 1.4-2, el cual utiliza análisis multivariantes como método estadístico (Jombart, 2008). Estos análisis son muy útiles actualmente, para evaluar la estructuración genética consenso entre un conjunto de marcadores genéticos, así como para investigar el patrón espacial de la variabilidad genética. Se llevó a cabo un análisis discriminante de componentes principales (ADPC) para lograr obtener la mejor separación de los individuos dentro de grupos predefinidos y permitir hacer una asignación probabilística de los individuos a cada grupo sin la limitante de la correlación de variables propia del análisis discriminante (Jombart, 2008), además permite resumir la variabilidad genética sin hacer fuertes suposiciones acerca de un modelo de evolución: no dependen del equilibrio de Hardy-Weinberg, ni tampoco suponen la ausencia de desequilibrio de ligamiento.

7. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DEL STOCK (GSI)

Objetivo 1: Si el origen de la población del Río Toltén es resultado de una siembra local, entonces su composición genética en relación a un set de poblaciones de referencia del hemisferio Norte debiera ser significativamente distinta de la composición genética del Río Petrohué. Con este fin se utilizó el software ONCOR versión 2.0 para calcular la probabilidad de asignación de cada individuo a un grupo de poblaciones de referencia (Kalinowski *et al.*, 2008). Las poblaciones de referencias corresponden a 41 poblaciones nativas del hemisferio Norte desde Alaska a California que fueron tipificadas para un panel de 192 SNPs (Warheit *et al.*, 2013). Para usar idénticos SNPs entre ambas bases de datos se seleccionaron los SNPs comunes en R utilizando la función *match* (R-Core-Team, 2014). Las 41 poblaciones fueron agrupadas en *reporting groups*; grupos de poblaciones que son genéticamente más homogéneas que poblaciones de otros grupos (Tabla 2), de manera de facilitar la asignación de cada individuo a las poblaciones de referencia nativas. Se empleó un test de chi-cuadrado de Pearson en R para ver si la asignación a cada *reporting group* fue significativamente distinta entre Río Toltén y Río Petrohué.

Objetivo 2: Se comparó la asignación de los individuos del Golfo de Ancud con los individuos del Río Petrohué a los *reporting groups* del hemisferio Norte usando ONCOR y se aplicó el test de chi-cuadrado de Pearson para evaluar diferencias entre Golfo de Ancud y Río Petrohué. Para identificar potenciales poblaciones de origen local de los Sch

capturados en el Golfo de Ancud se usó ONCOR, asignando estos individuos a poblaciones de referencia del Pacífico y Atlántico Sur, incluyendo poblaciones de los ríos Toltén, Petrohué, Pichicolo, Cobarde, Vargas, Serrano y Prat, y de los ríos argentinos Santa Cruz y Caterina.



RESULTADOS

1. ANÁLISIS PRELIMINARES Y SELECCIÓN DE SNPs

A partir de los 278 individuos analizados (y 191 SNPs) un total de 95 individuos presentaron menos del 75% de información por lo que fueron eliminados de la base de datos. Tres loci presentaron desviaciones significativas al equilibrio de HWE: Ots_97 660-56; Ots_CCR7 y Ots_cox1-241 y fueron filtrados de la base. Se excluyeron además tres loci que demostraron estar en LD: Ots_Aldo B4-183, Ots_aldb-177M y Ots_Tnsf. El análisis realizado en Bayescan no arrojó valores atípicos en los loci SNP analizados. La base de datos de poblaciones introducidas quedó constituida por 183 individuos y 185 SNPs.

2. DIVERSIDAD GENÉTICA

Los valores variación genética, medida como heterocigosidad observada y esperada (H_O y H_E respectivamente) mostraron que la población del Golfo de Ancud posee una H_O de 0,292 (D.E.= 0,013) y la población de la localidad del Río Toltén obtuvo el valor de 0,279 (D.E. = 0,013). El mayor valor de H_E fue para las muestras del Golfo de Ancud con un valor de 0,291 (D.E. = 0,013), mientras que la localidad con menor valor de H_E fue la del Río Toltén con $H_E= 0,277$ (D.E.=0,013). De las dos poblaciones en análisis, la de la localidad del Río Toltén mostró el menor índice de diversidad de Shannon ($0,417 \pm 0,018$). Referente al porcentaje de loci polimórficos de (%P) la localidad del Golfo de Ancud mostró el valor más alto (92,97%) (Tabla 3).

3. ESTRUCTURA GENÉTICA

El análisis de coordenadas principales (PCA) basado en la distancia genética entre individuos, logró explicar un 23,6% de la varianza explicada entre los dos primeros ejes. La coordenada 1 (eje X) explicó un 16,68% y la coordenada 2 (eje Y) un 6,92% (Figura 6). La distribución de los individuos en ambas coordenadas expuso una clara agrupación entre los individuos del Río Petrohué y los individuos pertenecientes al Golfo de Ancud los que parecen estar genéticamente relacionados. Por otra parte se distingue una segunda agrupación conformada por los individuos del Río Toltén (muestreados en Río Allipén y Río Llaima).

El análisis discriminante de coordenadas principales (DPCA) indica como número de *clusters* resultantes $k=2$ con un valor de máxima verosimilitud 594,6155, lo que indica que existen dos poblaciones definidas dentro de los individuos en estudio, una compuesta por 78 individuos (*cluster 1*, individuos del Río Toltén) y otra con 105 individuos (*cluster 2*, individuos del Golfo de Ancud y Río Petrohué) (Figura 7). La estimación de divergencia por pares de localidades basadas en el índice de fijación (F_{ST}) mostró una baja estructuración genética (no significativa) entre las poblaciones del Golfo de Ancud y Río Petrohué ($F_{ST}=0,00582$), y por otra parte muestra una alta estructuración genética (significativa) que diferencia al Río Toltén del Río Petrohué y Golfo de Ancud ($F_{ST}=0,06947$ y $0,06024$ respectivamente) (Tabla 4).

4. TEST DE ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS

4.1 Río Toltén y Río Petrohué a las poblaciones nativas del hemisferio Norte

Aproximadamente el 53% de los individuos del Río Toltén fueron asignados al *reporting group* de Oregon California Coast (OR-CA Coast) (Figura 9, Anexo 1) con un valor de probabilidad promedio de 0,52 (Tabla 5). Los individuos restantes (correspondientes al 32% de los individuos, Tabla 5) fueron asignados a Lower Columbia River- Willamette con un valor de probabilidad del 0.91 (Figura 9, Anexo 1). De los individuos restantes solo el 8.9% fueron asignados a Puget Sound - South British Columbia con valores de probabilidad entre el 0.4 y 0.97 (Anexo 1), el resto fueron asignados a CR_OceanType-Deschutes y a PNW Coast-W VI. Por el contrario, el Río Petrohué a diferencia del Río Toltén el mayor porcentaje de individuos (89%) fueron asignados a Puget Sound - South British Columbia (Tabla 5) con un alto valor de probabilidad (entre 0.9 y 1, Figura 10, Anexo 2). El restante de los individuos fueron asignados en un menor porcentaje a Central Valley, Oregon California Coast (OR-CA Coast), Lower Columbia River- Willamette. Esto nos permite inferir que ambas poblaciones poseen una composición genética principalmente distinta y por lo tanto no es posible indicar el origen del SCh en el Río Toltén como una potencial colonización natural a partir de dispersión desde el Río Petrohué y se acepta la hipótesis del problema 1. Para evaluar si la preferencia de cada población de los ríos (Toltén y Petrohué) a cada uno de los *reporting groups* es independiente o dependiente entre Río Toltén y Río Petrohué

se realizó un análisis estadístico de χ^2 en R (R-Core-Team, 2014). El resultado ($\chi^2=105,93$, $p\text{-value}=2,2*10^{-16} < 0,05$, $df=3$) nos indica que la hipótesis de independencia entre las variables debe rechazarse y por lo tanto una dependencia entre la preferencia de cada río en cuanto al número de individuos frente a cada *reporting group*. Si cada río (en número de individuos) es tan dependiente del *reporting group* asignado debido a que contiene esos genotipos específicos dentro de su población, esto genera que ambos ríos entre sí sean distintos y por lo tanto la distribución de asignación también sea distinta.

4.2 Golfo de Ancud y Río Petrohué

Mediante la utilización del software ONCOR pudimos encontrar la población de origen más probable para cada uno de los individuos capturados en el Golfo de Ancud. Treinta y dos de los cuarenta y cuatro individuos de Golfo de Ancud (72%, Tabla 5) fueron asignados a Puget Sound - South British Columbia con valores de probabilidades entre 0,69 y 1 (Anexo 3). El 16% de la población (7 individuos) fueron asignados a Lower Columbia River-Willamette, y los individuos restantes se asignaron a Oregon-California Coast y a Central Valley (Figura 11, Anexo 3).

Para comprender mayormente el origen genético de la población circundante del Golfo de Ancud se realizó el mismo test de asignación a los individuos de la población de referencia (Río Petrohué) a los *reporting groups* del hemisferio Norte. El resultado indica que el mayor porcentaje de individuos (89%) del Río Petrohué fueron asignados a Puget Sound - South British Columbia Tabla 5 y por lo tanto muestran la misma procedencia ancestral (Puget Sound-South British Columbia) que los individuos muestreados en Golfo de Ancud con altos valores de probabilidad (entre 0,91 y 1) a excepción de un individuo que mostró una probabilidad de pertenencia de 0,69. El restante de los individuos fueron asignados en un menor porcentaje a Central Valley, Oregon California Coast (OR-CA Coast) y Lower Columbia River- Willamette.

El resultado ($\chi^2= 11,736$, $p\text{-value} < 0,008346$ $df = 5$) nos indica que la hipótesis de independencia entre las variables debe rechazarse y por lo tanto existe una dependencia entre las variables ríos y *reporting groups* al igual que en el caso anterior. Por lo tanto, también existe una dependencia entre la asignación de cada población, en cuanto al número de individuos, frente a cada *reporting group*. En consecuencia, a mayor valor del

estadístico χ^2 , mayor es el grado de asociación entre las variables y por lo tanto existe una dependencia entre ambas poblaciones (Río Petrohué y Golfo de Ancud) que permite la asignación a los mismos *reporting groups*.

En relación a la asignación a las poblaciones presentes en ríos chilenos y argentinos, 39 individuos (de 44, lo que corresponde al 89% de la población en estudio) fueron asignados al Río Petrohué con valores de probabilidad entre 0.91 y 1 (Tabla 6, Figura 12). Los individuos restantes fueron asignados mayoritariamente al Río Cobarde con mínima influencia del Río Vargas (Figura 13, Anexo 4). En este test fueron asignados individuos a las poblaciones presentes en los ríos Pichicolo y Prat, no obstante estos valores fueron muy bajos y no se representaron en la gráfica. Lo anterior reafirma que la mayor composición de la población del Golfo de Ancud corresponden a individuos pertenecientes al Río Petrohué y también implica que un gran número de SCh provenientes del Río Petrohué utiliza el Golfo de Ancud como zona de alimentación demostrando un patrón migratorio similar al reconocido en el hemisferio Norte: cercano a la costa y al río natal (Quinn, 2005), por lo que se acepta la hipótesis 2.



DISCUSIÓN

Objetivo 1. ¿Colonización artificial desde instalaciones de cultivo o colonización natural por dispersión?

Nuestros resultados muestran mediante el PCA y DPCA que los individuos de la población del Río Toltén se encuentran distanciados genéticamente de los individuos del Río Petrohué generando un *cluster* de 78 individuos separado de la población de referencia. Al respecto, existe una diferenciación significativa entre ambas poblaciones.

Por otra parte el análisis de asignación de los individuos del Río Toltén a la población de origen nativo (*Reporting group* del hemisferio Norte) indica que estos poseen un origen muy variado (Oregon-California Coast, Lower Columbia River-Willamette, Pacific Northwest Coast-W VI Columbia River fall, Puget Sound - South British Columbia) y donde el mayor número de individuos muestreados tiene su origen ancestral a partir de ovas procedentes de la Costa de Oregon-California. En **contraste**, casi la totalidad de los individuos del Río Petrohué fueron mayormente asignados a la población nativa o *reporting group* de Puget Sound-South British Columbia, lo que denota la diferencia ancestral de ambas poblaciones. El test de chi-cuadrado de Pearson, indica que los *reporting groups* asignados son diferentes y por lo tanto el origen genético del Río Petrohué y el Río Toltén es significativamente distinto. De lo anterior podemos sugerir que la población del Río Toltén se habría originado como resultado de una colonización local, probablemente por introducciones y no producto de un patrón de dispersión a larga distancia.

¿Qué explica la presencia de tantos linajes distintos en el Río Toltén? Estos transplantes poseían distintos orígenes nativos producto de las introducciones múltiples desde el hemisferio Norte al sur de Chile en el periodo de experimentación con salmónidos en nuestro país. Debemos recordar que en esa etapa de experimentación se utilizaron ovas y alevines de criaderos del Río Cowlitz (Lower Columbia river basin Washington), Universidad de Washington, la costa de Oregon y de Puget Sound (Washington) principalmente y donde, a modo de ejemplo, solo el criadero de la Universidad de Washington, ya tiene un origen complejo producto que fue fundado con peces de criaderos en Puget Sound, criadero que a su vez utiliza peces del criadero de Kalama (que se encuentra en la parte baja del Río

Columbia, Washington), la que fue también fundada a partir de peces producidos en criaderos de los Ríos Cowlitz y Carson (Ciancio *et al.*, 2015).

En los registros de introducción de SCh a la IX región solo existe un reporte de introducción en el Río Cautín de cuyos resultados no existe evidencia publicada. No obstante si existen reportes no formales de SCh retornando al Río Toltén entre los años 2000-2004 y otros del importante establecimiento de *O. tshawytscha* en un gran número de cuencas de la Patagonia Chilena-Argentina (Pascual & Ciancio, 2007), muchas de las cuales fueron colonizados por esta especie, ya sea directamente, debido a la mediación humana (Soto *et al.*, 2007) o indirectamente por el establecimiento natural de individuos extraviados (Ciancio *et al.*, 2005; Correa & Gross, 2008) lo que es propio de las migraciones al océano realizadas durante el ciclo de vida de salmones anádromos.

Nuestros resultados por tanto son contrarios a los resultados obtenidos en otros estudios donde si se demuestra la posible colonización natural de SCh como es el caso de la población del Río Futaleufú producto de la colonización de peces que fueron introducidos entre el 1970 y 1980 (con origen en la cuenca baja del Río Columbia) al sur de Chile y de peces reproductores escapados durante el ascendente periodo acuícola en la década de los años 90, los cuales poseían múltiples orígenes (Valle Central de California, Nueva Zelandia, la costa de Oregon y Vancouver). Y el caso del Río Santa Cruz de la Patagonia Argentina la que surgió, probablemente, por dispersión del SCh desde cuencas chilenas de la Patagonia Chilena (Ríos Serrano o Prat) (Ciancio *et al.*, 2015), y presentan el mismo origen genético nativo (LColrR-Willamette: parte baja del Río Columbia y Río Willamette) que los individuos encontrados por ejemplo en el Río Santa Cruz y Caterina (Ciancio *et al.*, 2015). Por lo tanto estos peces pueden ser producto de la desviación del recorrido migratorio desde cuencas del sur Austral Chileno hacia el Río Santa Cruz durante los años 1981-1985.

Con respecto a la variación genética, nuestros resultados indican que la población de Río Toltén muestra una alta variación genética y no se diferencia mayormente en variabilidad de los individuos del Río Petrohué (Río Toltén: $H_0=0.279 \pm 0.013$; Río Petrohué: $H_0=0.304 \pm 0.014$), lo que también es señal de que la población de SCh presente en Río Toltén no surgió a partir de salmones extraviados pues si esto hubiese sucedido los niveles de variabilidad genética hubiesen también disminuido producto del efecto cuello de botella. En

este aspecto tanto Ciancio *et al.* (2015) como Di Prinzio *et al.* (2015), confirman que la variabilidad genética de las poblaciones del Río Santa Cruz como el Río Futaleufú mantienen niveles de variación genética similares a su población originaria lo que ha podido deberse a las mezcla resultante de múltiples poblaciones fuente de SCh introducidos a Chile (Di Prinzio *et al.*, 2015), esto también ha sido reportado en otros estudios y especies (e.g Trucha arcoíris), donde se indica que la variabilidad puede estar influenciada por las poblaciones múltiples introducidas, alta presión de propágulo e hibridación (Consuegra *et al.*, 2011; Arismendi *et al.*, 2014). A mayor variabilidad genética las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente que las especies con menor variabilidad debido a que se facilita la adaptación local y aumenta la posibilidad de invasión exitosa y posterior colonización (Di Prinzio *et al.*, 2015). Además variados estudios apoyan el hecho de que la colonización de una especie tiene más probabilidades de ser exitosa bajo condiciones que requieran pequeños cambios adaptativos lo que puede ser considerado como un concepto de “pre-adaptación” (Facon *et al.*, 2006; Correa & Gross, 2008; Dlugosch & Parker, 2008; Riva Rossi *et al.*, 2012; Ciancio *et al.*, 2015).

Por lo tanto la invasión y colonización exitosa del SCh en el Río Toltén puede haber sido facilitada por la mezcla desde múltiples eventos de introducción, así como por la variabilidad asociada en los rasgos de historia de vida, características influenciadas por factores genéticos y ambientales (Healey, 1991; Quinn *et al.*, 2001). No obstante es fundamental nuevos estudios que permitan integrar estos análisis moleculares con otras técnicas (e.g marcaje y recaptura, Piedra *et al.* (2012)) para observar a una escala temporal el patrón de desplazamiento de SCh del Río Toltén y si puede realmente dispersarse, como lo ha hecho a ríos argentinos, a cauces aledaños a la cuenca del Toltén como lo son el Río Cautín o el Imperial, donde ya existen avistamientos de SCh juveniles.

Objetivo 2: El Salmón Chinook en zonas de alimentación del mar interior de Chiloé, Golfo de Ancud: ¿Proviene de una o más poblaciones de origen?

Los resultados del análisis del stock genético de los individuos capturados en el Golfo de Ancud y asignados a poblaciones del hemisferio Norte indican, en base a la proporción de individuos analizados para cada localidad, que ambas poblaciones (Golfo de Ancud y Río Petrohué) presentan un porcentaje similar de individuos (71% y 89% respectivamente) con

el mismo origen genético nativo (Puget Sound). El resto de la constitución porcentual de la población de Golfo de Ancud es similar a la de la población del Río Petrohué con individuos originarios de Central Valley, OR-CA Coast y LColrR-Willamette. Por otro lado, el análisis de stock genético asociado a las poblaciones de ríos Chilenos y Argentinos indica que el 88% de los individuos fueron asignados al Río Petrohué y el restante son asignados a las poblaciones del Río Cobarde (los que a su vez son asignados en un 99% a LColrR-Willamette y en un 1% a Puget Sound). Esto es coincidente con el origen genético nativo (*reporting groups*) y con el origen genético introducido, por lo tanto podemos afirmar que los individuos capturados en el Golfo de Ancud proceden principalmente de la población de SCh del Río Petrohué, aceptándose la hipótesis 2.

Los anteriores resultados además sugieren, que los juveniles de SCh, ya sean *ocean-type* o *stream-type*, cuando proceden a dejar los ríos para crecer y alimentarse en el mar, se dirigen al Golfo de Ancud, como al menos una de sus direcciones migratorias. El Golfo de Ancud al igual que el mar interior de Chiloé es reconocido por ser particularmente productivo. El SCh en su rango nativo, durante la etapa de alimentación en el mar, es consumidor de pescado principalmente pelágico y bentopelágico (Healey, 1991; James, 1996; Behnke, 2002). Según un estudio del Soto *et al.* (2001) el SCh puede depredar sobre cardúmenes de peces como *Engraulis ringens*, *Sardinops sagax*, *Normanichthys crockeri*, *Odontesthes regia* y juveniles de *Macruronus magellanicus* y otros crustáceos parte del zooplancton. Lo anterior es coincidente con la alimentación sugerida (sardina y anchoveta, principalmente) en resultados obtenidos por parte del proyecto fondo de investigación pesquera (FIP 2014-87) actualmente en ejecución.

Por otra parte, los individuos *ocean-type* que tienden a residir en zonas pelágicas profundas también tienden a habitar las zonas costeras más cerca de su río de origen, en su rango nativo (Healey, 1991; Quinn, 2005; Fisher *et al.*, 2014), lo que sería la cualidad ecológica que permite encontrar en la zona del Golfo de Ancud, a menos de 150 km de la desembocadura del Río Petrohué en el Seno de Reloncaví, individuos de SCh procedentes de tal cuenca (SChRP). No obstante, debido a la alta tasa de nado y de viaje en su rango nativo (2-2,5 km/h y 40-60 km/día; Quinn, 2005), y al largo periodo de tiempo que pasan en el mar, es probable que SChRP extienda su ruta migratoria hacia la zona sur del mar interior de Chiloé o hacia la zona Oeste por el Canal de Chacao, en busca de alimento, debido fundamentalmente a que otra característica del SCh en su rango nativo es nadar a favor de

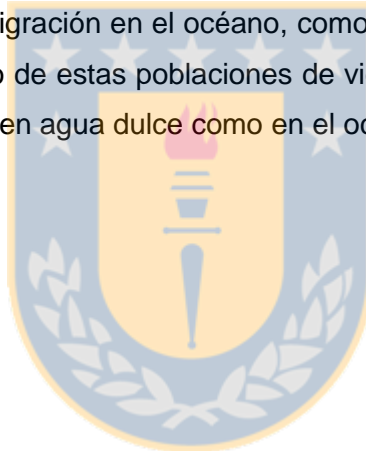
la corriente (Joyner, 1978; Riva Rossi *et al.*, 2012), y las corrientes salientes del Golfo de Ancud son paralelas y cercanos a la costa en dirección al Océano Pacífico (Cáceres *et al.*, 2003). Esto podría permitir procesos migratorios del SChRP hacia el Océano Pacífico, interesantes de estudiar. No obstante, por el momento podemos inferir que un gran número de los SCh procedentes del Río Petrohué migran al Golfo de Ancud a crecer y alimentarse y por lo tanto permanecerían un tiempo indeterminado cercano a su cuenca natal, al igual como ocurre en el rango nativo de esta especie (Quinn, 2005).

Nuestros resultados son el punto de partida al estudio de la ecología de alta mar del SCh introducido en Sudamérica, por lo que es sumamente necesario complementarlos con investigaciones más profundas del recurso para comprender con mayor exactitud las interacciones del SCh en la red alimentaria de los recursos locales (e.g. *Merluccius magellanicus*, *Merluccius australis*) y la composición del o los stock presentes en el Golfo de Ancud, entre otros. Además de la utilización de técnicas de marcaje (e.g. marcas externas tipo T-bar) y recaptura que permitan definir con mayor exactitud y en escala temporal el patrón migratorio no solo de los individuos del Río Petrohué si no también del resto de las cuencas en las que SCh se ha establecido.

Por último, la identificación genética de stock (GSI), mediante SNPs (Hauser & Seeb, 2008; Ciancio *et al.*, 2015; Satterthwaite *et al.*, 2015), como la realizada en este estudio a los individuos del Río Toltén y Golfo de Ancud, es una técnica particularmente aplicable a los salmónidos anádromos. Se ha utilizado en variados estudios de composición de stock, estructura de la población, patrones de migración y distribución, y en aplicaciones para la gestión de la pesca en muchos salmónidos del Pacífico (Habicht *et al.*, 2010; Tucker *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2012; Ciancio *et al.*, 2015; Satterthwaite *et al.*, 2015). En nuestro país esta técnica puede ser fundamental, para identificar, entre otras cosas, los ríos fuentes de aportes de SCh al Golfo e incluso del mar interior de Chiloé. Esto es importante para una adecuada gestión del recurso debido a que la productividad de cada población discreta puede ser distinta y variable en el tiempo. Por otra parte también es importante obtener información ecológica sobre periodos y extensión de las migraciones de SCh según su ecotipo (*ocean-type* o *stream-type*) como ya lo han hecho investigadores argentinos con la población de SCh retornante al Río Santa Cruz (Ciancio *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

Los análisis aquí presentados ayudaron a dilucidar el origen genético múltiple de la población de SCh del Río Toltén y su modo más probable de colonización, a partir de un variado número de introducciones producidos por el hombre, no informados, de individuos cultivados en el sur de Chile y no por dispersión natural desde el Río Petrohué. Por otra parte, según el análisis de GSI, los individuos presentes en el Golfo de Ancud provienen mayoritariamente del Río Petrohué, lo que permite verificar en su rango introducido las migraciones cercanas a la costa y a su río de origen como rasgo ecológico, reconociendo al Golfo de Ancud como una de sus estaciones de alimentación durante su vida en el mar. La colonización del SCh en la región Patagónica de Sudamérica ofrece una gran fuente de investigación dentro de las cuales se deberían considerar estudios que aborden tanto procesos “ecológicos y evolutivos” relacionados con la naturalización del SCh en América del Sur, patrones y rutas de migración en el océano, como también estrategias de gestión que permitan un mejor manejo de estas poblaciones de vida libre desde el punto de vista “ecológico y económico” tanto en agua dulce como en el océano.



FIGURAS

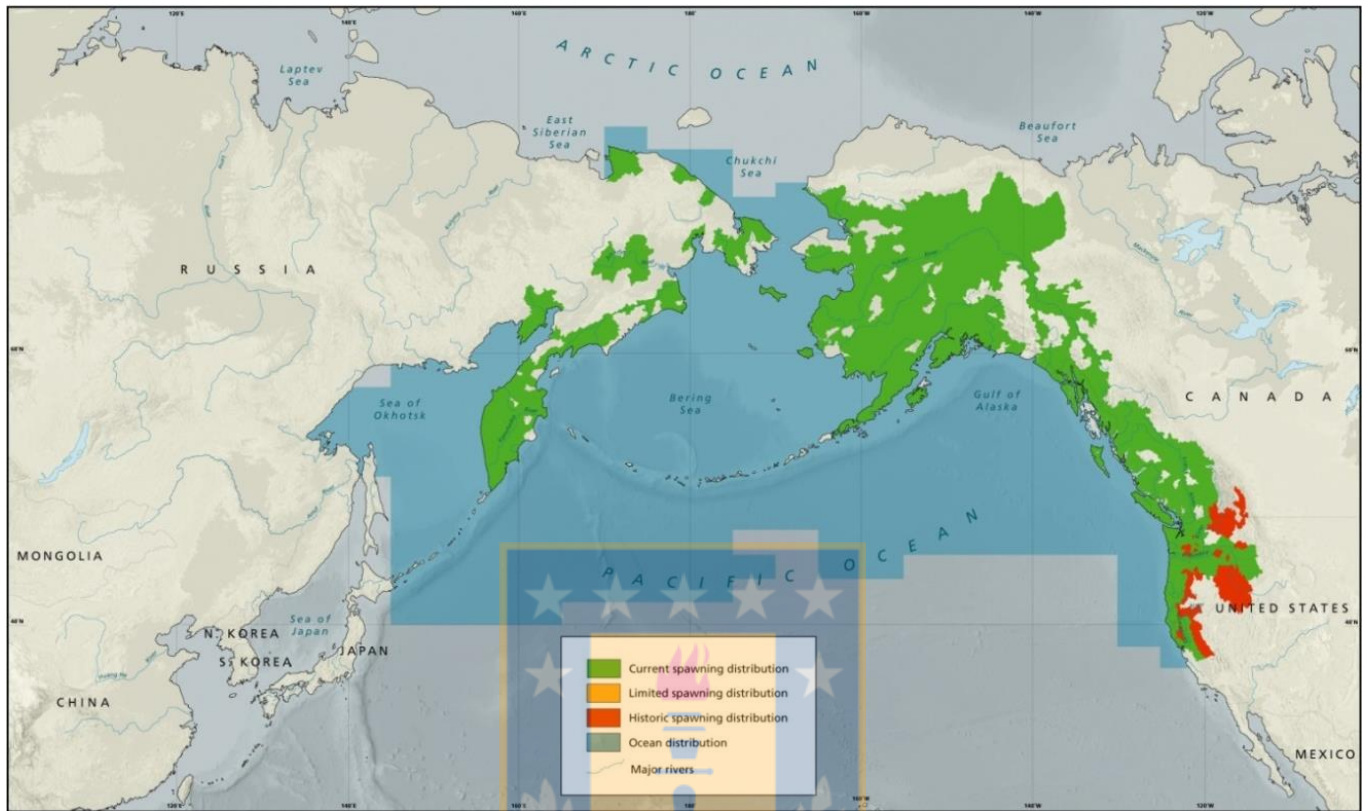


Figura 1. Distribución del SCh en su rango nativo en el hemisferio Norte (En el mapa: Verde= distribución actual; Rojo= distribución histórica; Azul= distribución oceánica).



Figura 2. Salmón Chinook estadio fry. Fotografía de Richard Bell, Universidad de Washington. Extraído de Quinn, (2005).



Figura 3. Salmón Chinook macho. Fotografía de Mark Giovannetti. Extraído de Quinn, (2005).

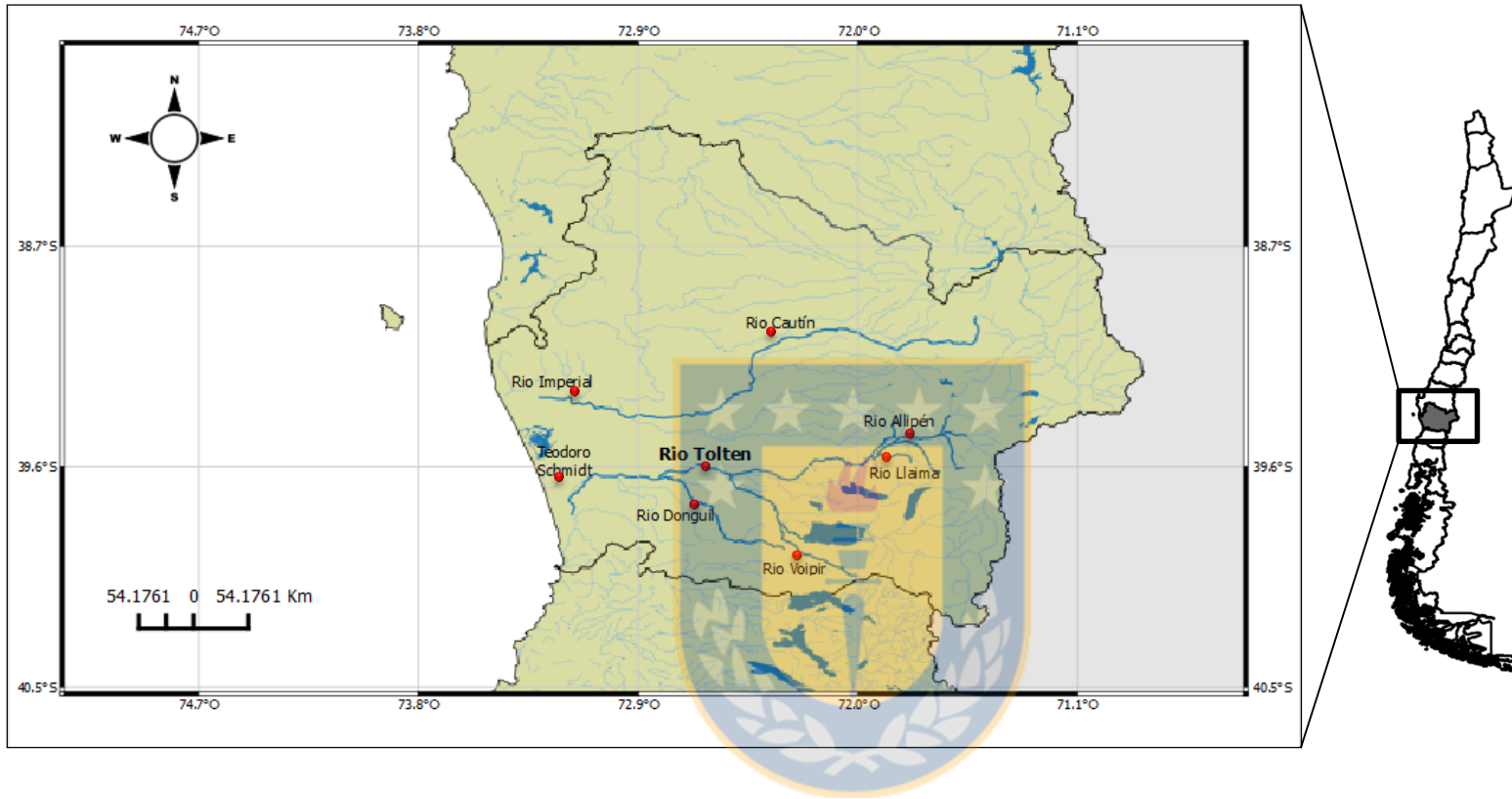


Figura 4. Mapa de la IX región de la Araucanía.

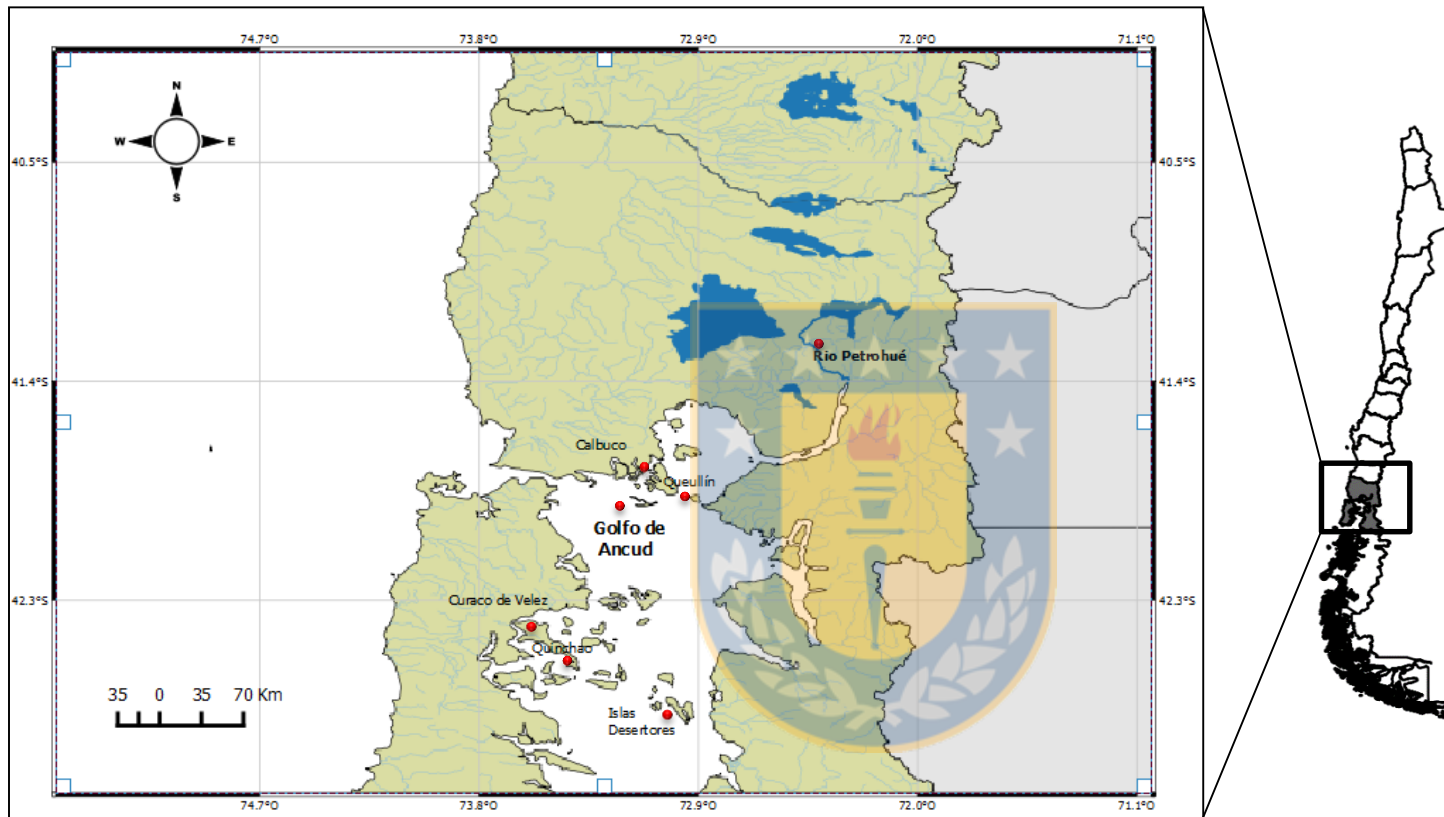


Figura 5. Mapa de la X región de los Lagos.

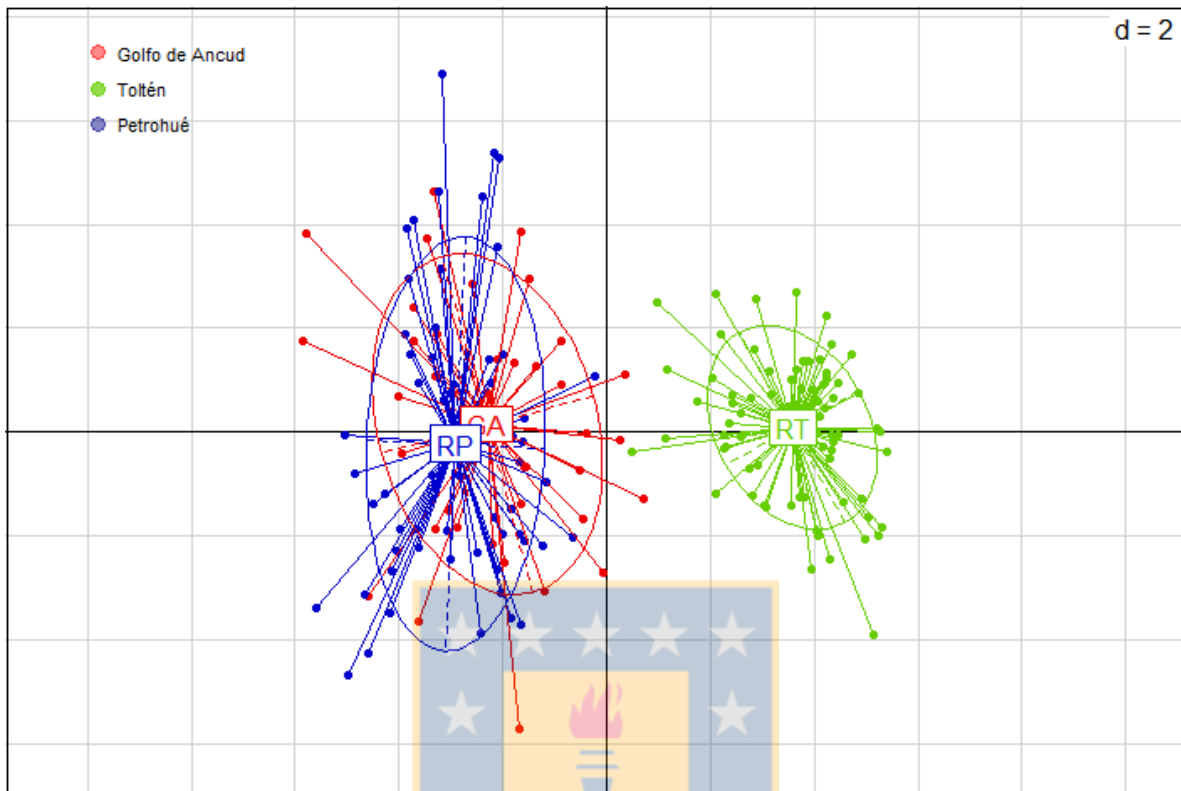


Figura 6. Análisis de componentes principales (PCA), realizado en adegenet. Componente X describe el 16.68% de la variabilidad de los datos y la Componente Y describe el 6.92%. Río Petrohué (RP), Río Toltén (RT) y Golfo de Ancud (GA).

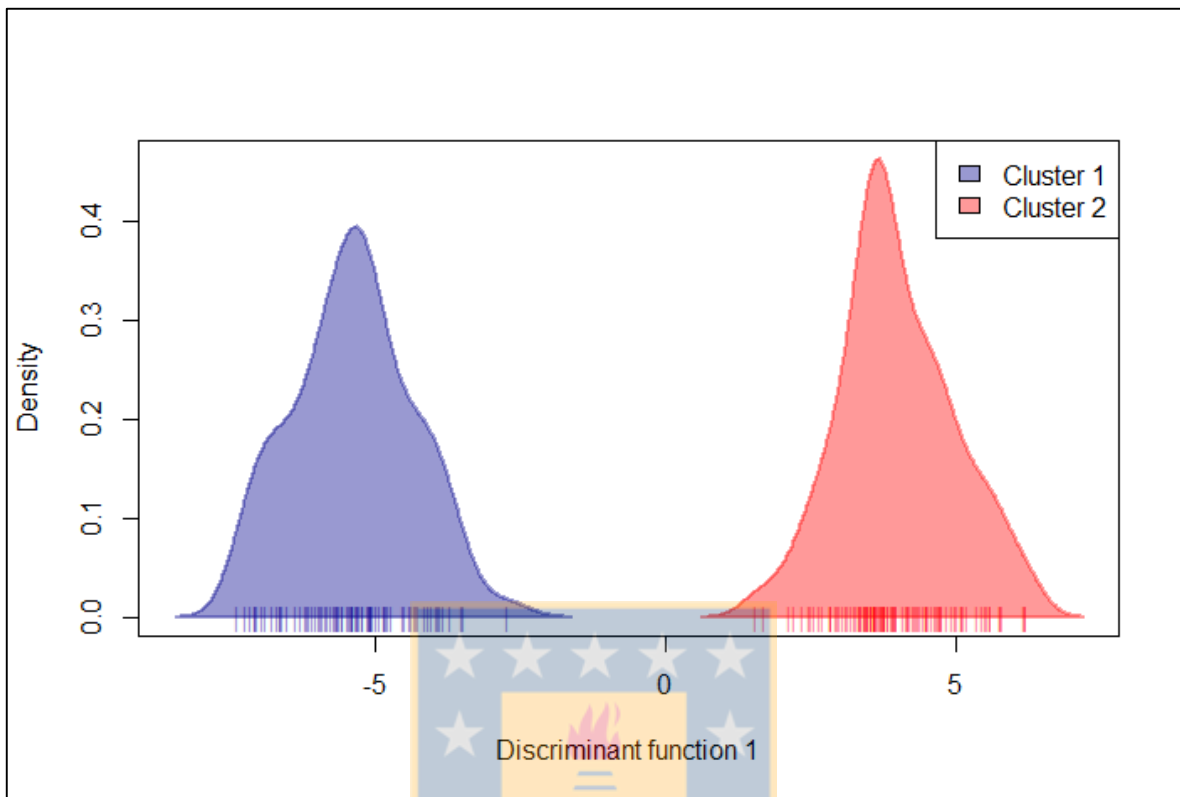


Figura 7. Análisis discriminante de coordenadas principales (DAPC) ($k=2$). *Cluster 1*, individuos del Río Toltén (78 individuos) y *Cluster 2*, individuos del Golfo de Ancud y Río Petrohué (105 individuos).

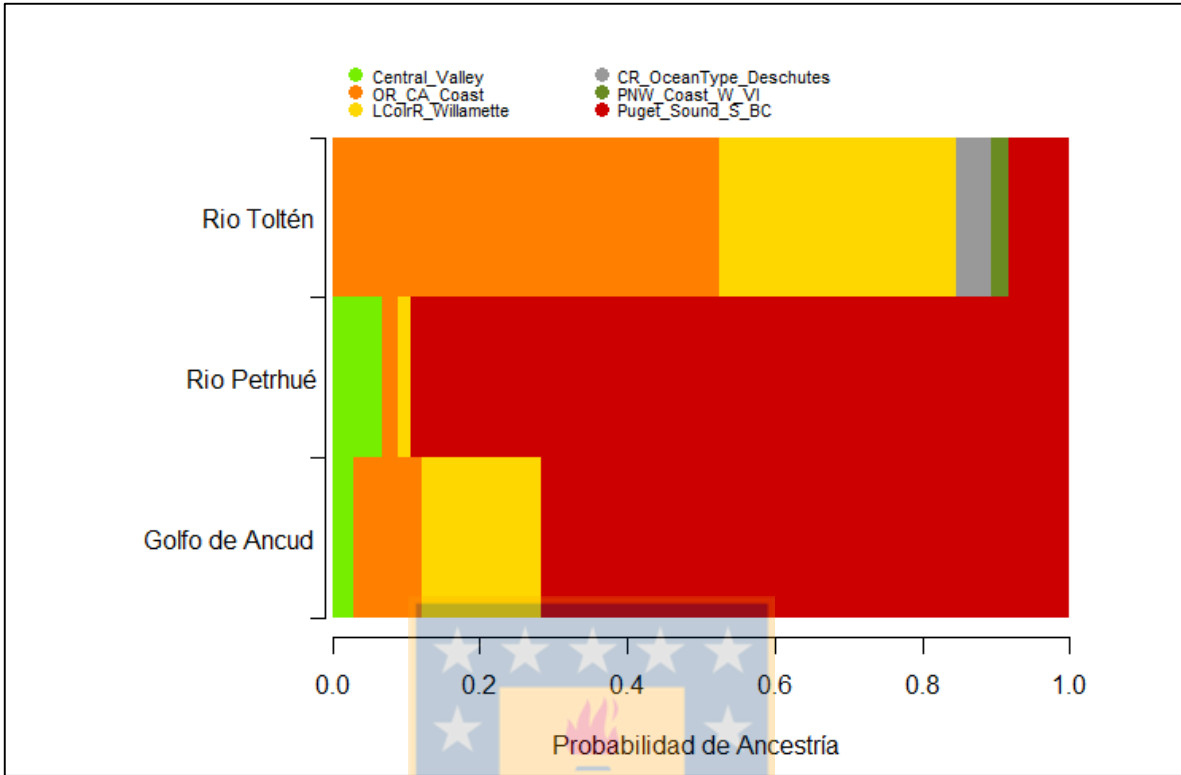


Figura 8. Barplot del porcentaje de asignación de cada población en estudio a los *reporting groups* del hemisferio norte analizados.

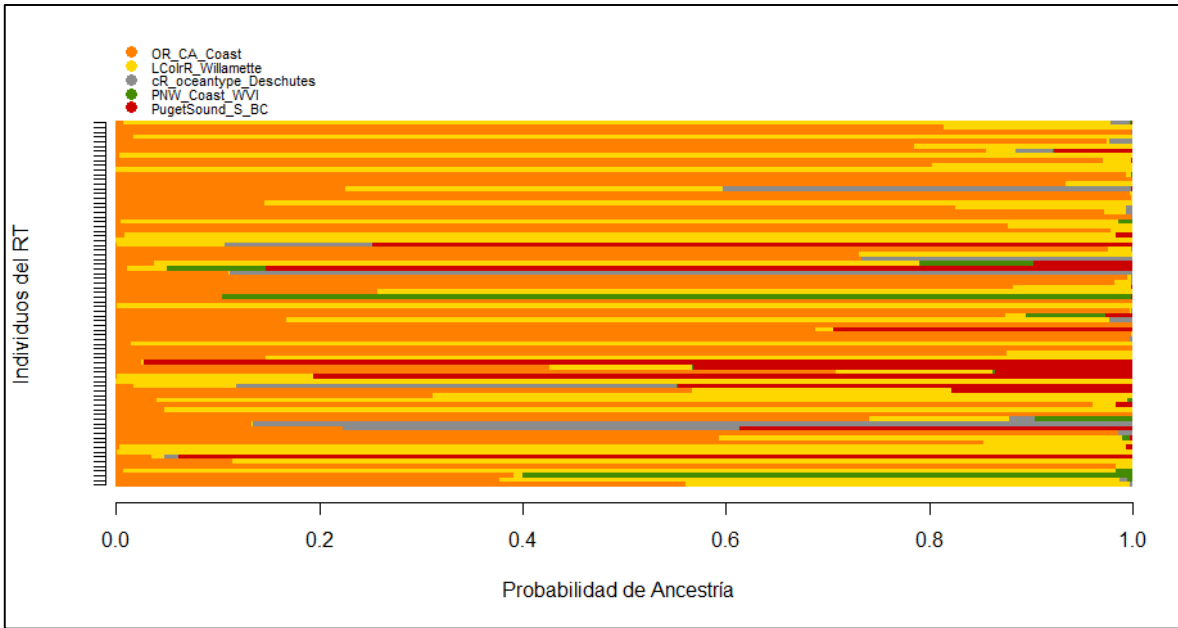


Figura 9. Resultado del test de asignación de los individuos del Río Toltén (RT) a los *reporting groups* del hemisferio Norte. Cada línea horizontal representa un individuo, cada color representa el *reporting groups* al que fueron asignados.

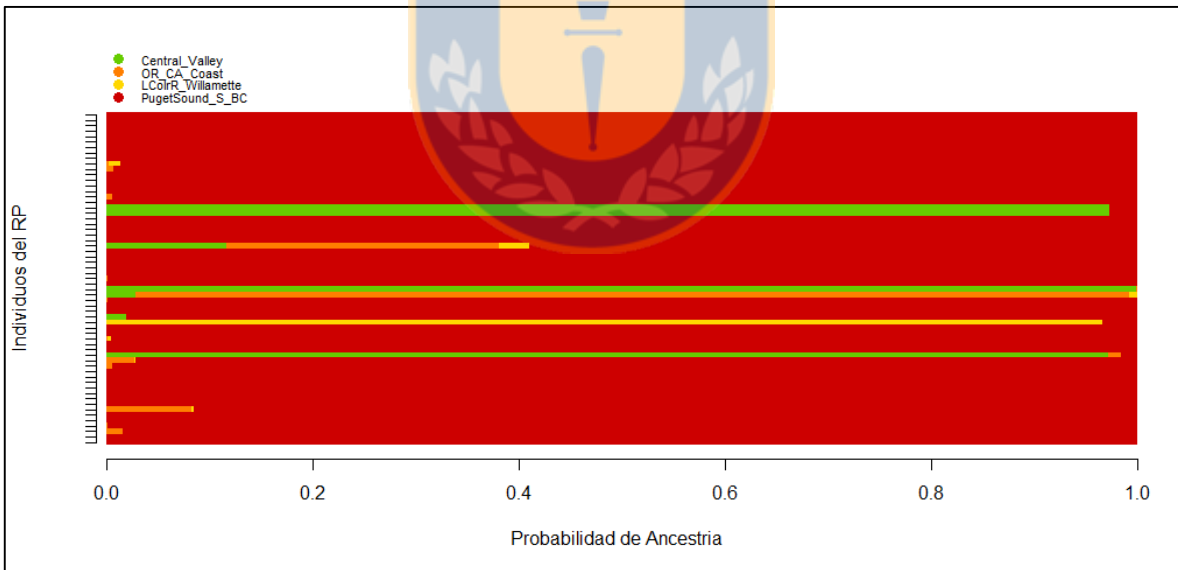


Figura 10. Resultado del test de asignación de los individuos del Río Petrohué (RP) a las poblaciones del hemisferio Norte. Cada línea horizontal representa un individuo, cada color representa el *reporting groups* al que fueron asignados.

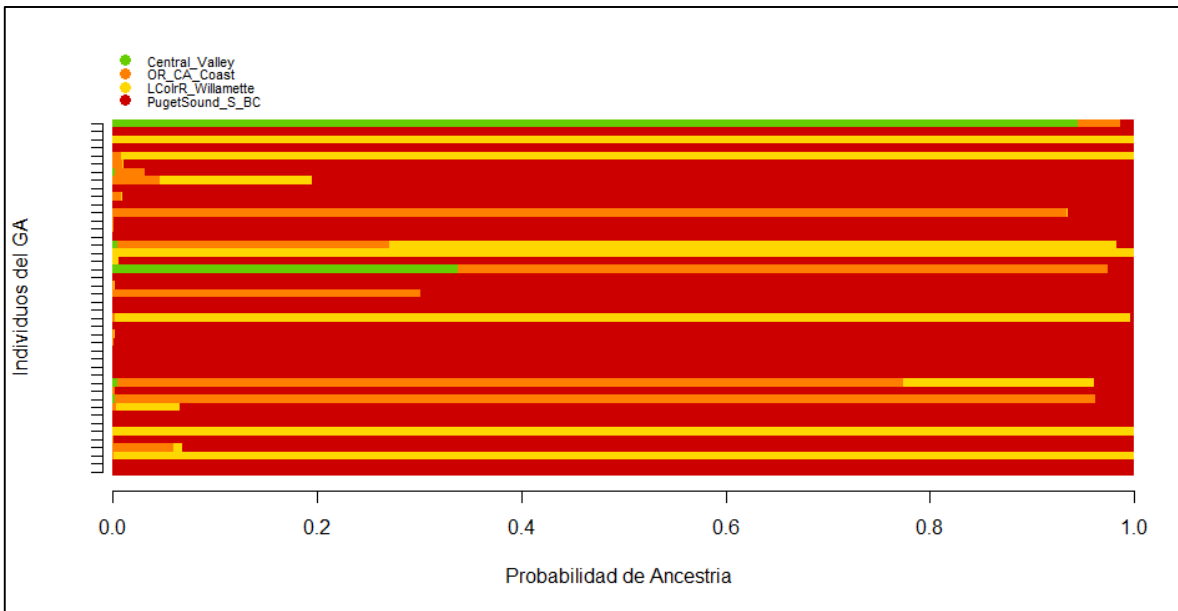


Figura 11. Resultado del test de asignación de los individuos del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones del hemisferio Norte. Cada línea horizontal representa un individuo, cada color representa el *reporting groups* al que fueron asignados.



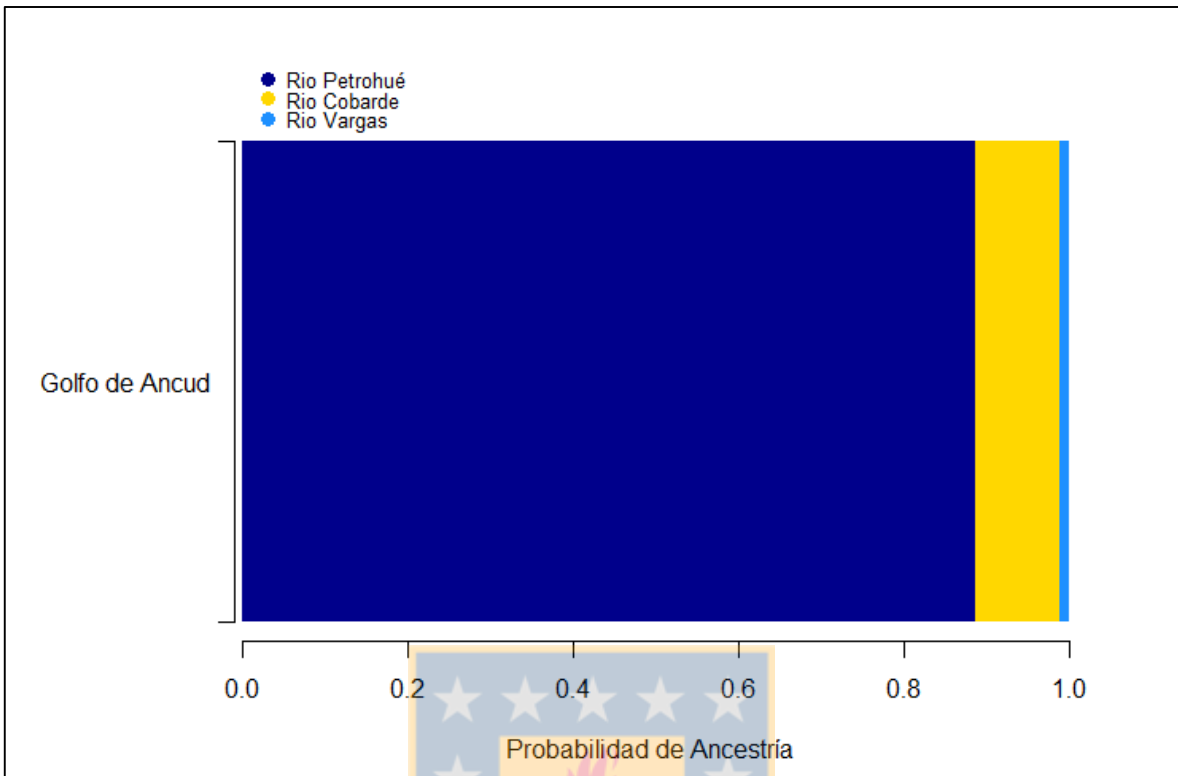


Figura 12. Barplot del porcentaje total de asignación de la población del Golfo de Ancud a cada población de ríos Chilenos-Argentinos analizada.

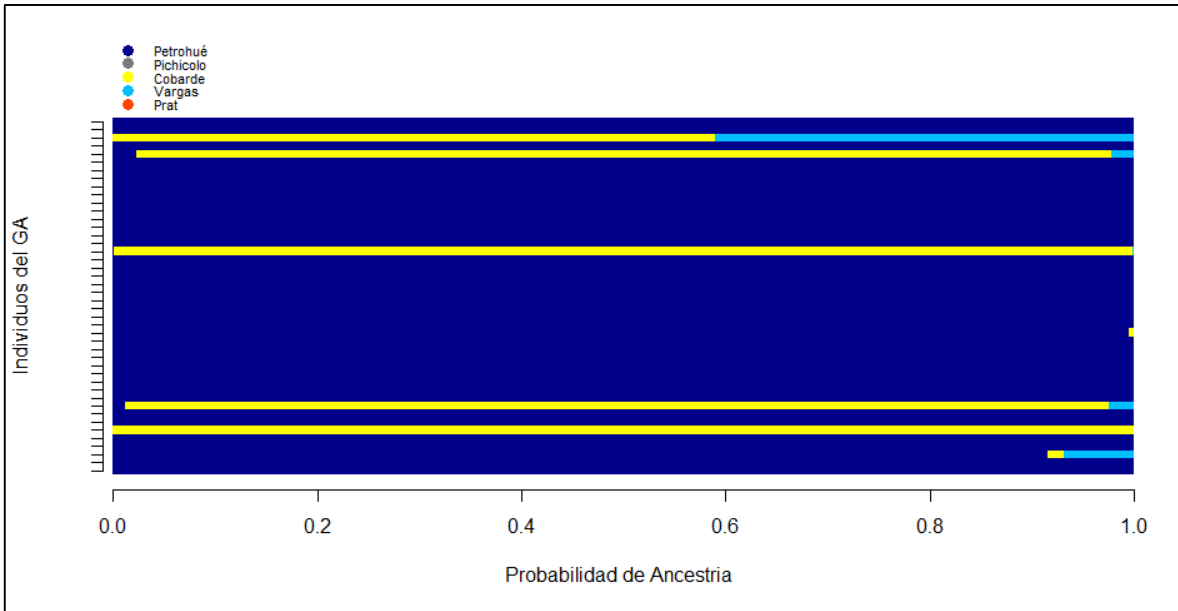


Figura 13. Resultado del test de asignación de los individuos del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones de ríos Chilenos-Argentinos. Cada línea horizontal representa un individuo, cada color representa una población introducida Chilena.



TABLAS

Tabla 1. Cronología de la introducción del SCh a Chile.

Fecha de la Introducción	Lugar de siembra	Origen de introducción	Motivo de la Introducción	Referencias
1886	Santiago de Chile	Paris, Francia	Ranching, Pesca Deportiva	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008
1924 - 1930	Ríos Blanco, Cautín, Maullín, Cochamó y Puelo	Criadero McCloud (Cuenca del Río Sacramento, California, E.E.U.U)	Ranching, Pesca Deportiva	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008
1967 - 1971	Río Bueno y Río Chirri	Washington, E.E.U.U	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
1972 -1984	Curaco de Vélez	Río Cowlitz (Lower Columbia river basin Washington E.E.U.U)	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
década 1980	Río Prat y Río Santa María	Universidad de Washington, Cuenca baja del Río Columbia, Washington, Puget Sound y Centro nacional Curaco de Vélez	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
1987	X región	Costa de Oregon, Puget Sound (Washington) y Vancouver en la Columbia Británica (Canadá)	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
1988, 1992, 1995	Pichicolo, Hualaihue, Chaqueihua	Isla de Vancouver, Canadá	Ranching	Niklitschek et al., 2011
1989, 2000	Pichicolo, Hualaihue, Chaqueihua	Río Waitaki, Nueva Zelanda	Ranching	Niklitschek et al., 2011
	Río Prat, Puerto Natales.	Curaco de Vélez, Piscicultura Astilleros (Canal Dalcahue) y Washington	Ranching	Niklitschek et al., 2011
1991	X - XI Región (Chile)	Costa de Oregon, Puget Sound (WA, EEUU), Vancouver (British Columbia, Canadá) y New Zeland (originarios de California)	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
1978 a 1997	Estero Ñilque, Osorno, Lago Llanquihue, Curaco de Vélez, Isla Magdalena, Isla Tortuga, Río Prat, Río Sta. María	Seattle, Washington, Cuenca Río Columbia, Ríos Cowlitz, Green y Kalama	Ranching	Basulto, 2003; Correa y Gross, 2008; Niklitschek et al., 2011
1990	Ríos Maicolpué y Contaco, Prov. Valdivia.	Nacional	Ranching	Niklitschek et al., 2011

Tabla 2. *Reporting groups* de las poblaciones nativas utilizadas como base de datos de referencia para el análisis de identificación genética del stock (GSI).

Reporting groups	Localidad en el hemisferio Norte
Central Valley	Central Valley
Eel	Eel River
OR-CA Cost	Oregon-California Coast
LColrR-Willamette	Lower Columbia River- Willamette
CR_OceanType-Deschutes	Columbia River fall
CR_StreamType	Columbia River Stream Type
PNW Coast-W VI	Pacific Northwest Coast-W VI
South Thompson	South Thompson
Puget Sound-SBC	Puget Sound - South British Columbia
U Fraser	U Fraser
NBC-SEAK	North British Columbia, Southeast Alaska
TransB-Tahini	Southeast Alaska
Alsek-Cooper	Alsek-Cooper
Western-Alaska	Western-Alaska

Tabla 3. Índices de diversidad genética de las tres poblaciones consideradas en el análisis (valores promedios). N = Número de individuos en cada localidad considerados en el estudio; I = Índice de diversidad de Shannon; H_o = Heterocigosidad observada; H_E = heterocigosidad esperada; %P = porcentaje de loci polimórficos. Valores en paréntesis corresponden a desviación estándar (D.E).

Pop	N	I	H_o	H_E	%P
Golfo de Ancud	44	0.441 (0.017)	0.292 (0.013)	0.291 (0.013)	92.97%
Río Toltén	78	0.417 (0.018)	0.279 (0.013)	0.277 (0.013)	86.49%
Río Petrohué*	61	0.445 (0.016)	0.304 (0.014)	0.293 (0.012)	94.05%

* Población de referencia.

Tabla 4. Índice de diferenciación F_{ST} por pares de localidades. Valores con asterisco indica diferencia significativa posterior a corrección de Bonferroni.

	Golfo de Ancud	Río Toltén	Río Petrohué
Golfo de Ancud	0.000		
Río Toltén	0,06024*	0.000	
Río Petrohué	0,00582	0,06947*	0.000



Tabla 5. Probabilidad de asignación de la población total del Golfo de Ancud, Río Petrohué (población de referencia) y Río Toltén a cada *reporting groups* del hemisferio Norte.

Reporting groups						
Pop	Central_Valley	OR_CA_Coast	LColr_Willamette	CR_OceanType_Deschutes	PNW_Coast_W_VI	Puget_Sound_S_BC
Golfo de Ancud	0.0295	0.0927	0.1618	0	0	0.7161
Río Petrohué	0.0669	0.0228	0.0168	0	0	0.8936
Río Toltén	0	0.5242	0.3225	0.0459	0.0248	0.0827

Tabla 6. Probabilidad de asignación de la población total del Golfo de Ancud, a cada población Chilena-Argentina analizada.

Poblaciones chilenas Argentinas									
Pop	Río Toltén	Río Petrohué	Río Pichicolo	Río Cobarde	Río Vargas	Río Serrano	Río Prat	Río Santa_Cruz	Río Caterina
Golfo de Ancud	0	0.8851	0	0.1029	0.012	0	0	0	0

ANEXOS

Anexo 1. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Río Toltén a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o *reporting groups*)

Individuo	Mejor estimación	Probabilidad	2da mejor estimación	Probabilidad
RT1	OR-CA Coast	0.5605	LColrR-Willamette	0.4363
RT2	OR-CA Coast	0.9831	LColrR-Willamette	0.0162
RT3	OR-CA Coast	0.8537	LColrR-Willamette	0.1463
RT4	OR-CA Coast	0.5935	LColrR-Willamette	0.396
RT5	OR-CA Coast	0.9857	CR_OceanType-Deschutes	0.0141
RT6	OR-CA Coast	0.7404	LColrR-Willamette	0.1382
RT7	OR-CA Coast	0.9993		
RT8	OR-CA Coast	0.961	LColrR-Willamette	0.0223
RT9	OR-CA Coast	0.5672	LColrR-Willamette	0.255
RT10	OR-CA Coast	0.7076	LColrR-Willamette	0.1539
RT11	OR-CA Coast	0.8757	LColrR-Willamette	0.1238
RT12	OR-CA Coast	0.9995		
RT13	OR-CA Coast	0.9971		
RT14	OR-CA Coast	0.9988		
RT15	OR-CA Coast	0.6881	Puget Sound-S BC	0.2946
RT16	OR-CA Coast	0.9999		
RT17	OR-CA Coast	0.8749	PNW Coast-W VI	0.0776
RT18	OR-CA Coast	0.9981		
RT19	OR-CA Coast	0.9997		
RT20	OR-CA Coast	0.8827	LColrR-Willamette	0.116
RT21	OR-CA Coast	0.9821	LColrR-Willamette	0.0172
RT22	OR-CA Coast	0.9952		
RT23	OR-CA Coast	0.7339	CR_OceanType-Deschutes	0.2661
RT24	OR-CA Coast	0.7309	LColrR-Willamette	0.2686
RT25	OR-CA Coast	0.9761	LColrR-Willamette	0.0229
RT26	OR-CA Coast	0.9784	LColrR-Willamette	0.0216
RT27	OR-CA Coast	0.8774	LColrR-Willamette	0.1226
RT28	OR-CA Coast	0.9984		
RT29	OR-CA Coast	0.972	LColrR-Willamette	0.0212
RT30	OR-CA Coast	0.8257	LColrR-Willamette	0.1683
RT31	OR-CA Coast	0.9986		
RT32	OR-CA Coast	0.9969		
RT33	OR-CA Coast	0.9344	LColrR-Willamette	0.065
RT34	OR-CA Coast	0.9996		

RT35	OR-CA Coast	0.9934		
RT36	OR-CA Coast	0.8025	LColrR-Willamette	0.1972
RT37	OR-CA Coast	0.9701	LColrR-Willamette	0.0286
RT38	OR-CA Coast	0.8561	Puget Sound-S BC	0.0768
RT39	OR-CA Coast	0.7855	LColrR-Willamette	0.2139
RT40	OR-CA Coast	0.9745	CR_OceanType-Deschutes	0.0224
RT41	OR-CA Coast	0.9986	-	
RT42	OR-CA Coast	0.8145	LColrR-Willamette	0.1855
RT43	LColrR-Willamette	0.9541	OR-CA Coast	0.04
RT44	LColrR-Willamette	0.6888	OR-CA Coast	0.3111
RT45	LColrR-Willamette	0.98	PNW Coast-W VI	0.0147
RT46	LColrR-Willamette	0.8089	OR-CA Coast	0.1683
RT47	LColrR-Willamette	0.6098	OR-CA Coast	0.3779
RT48	LColrR-Willamette	1	-	
RT49	LColrR-Willamette	0.8542	OR-CA Coast	0.1457
RT50	LColrR-Willamette	0.9988	-	
RT51	LColrR-Willamette	0.8846	OR-CA Coast	0.1152
RT52	LColrR-Willamette	0.7431	OR-CA Coast	0.2568
RT53	LColrR-Willamette	0.8529	OR-CA Coast	0.147
RT54	LColrR-Willamette	0.9993	-	
RT55	LColrR-Willamette	0.9998	-	
RT56	LColrR-Willamette	0.9896	Puget Sound-S BC	0.0071
RT57	LColrR-Willamette	0.7517	PNW Coast-W VI	0.1121
RT58	LColrR-Willamette	0.9964	-	
RT59	LColrR-Willamette	0.9845	OR-CA Coast	0.0154
RT60	LColrR-Willamette	0.9522	OR-CA Coast	0.0476
RT61	LColrR-Willamette	0.9769	PNW Coast-W VI	0.0163
RT62	LColrR-Willamette	0.9829	OR-CA Coast	0.0171
RT63	LColrR-Willamette	0.9996	-	
RT64	LColrR-Willamette	0.9743	Puget Sound-S BC	0.0166
RT65	LColrR-Willamette	0.9718	CR_OceanType-Deschutes	0.0191
RT66	CR_OceanType-Deschutes	0.8877	OR-CA Coast	0.1114
RT67	CR_OceanType-Deschutes	0.4005	LColrR-Willamette	0.3718
RT68	CR_OceanType-Deschutes	0.3897	Puget Sound-S BC	0.3868
RT69	CR_OceanType-Deschutes	0.8645	OR-CA Coast	0.1339
RT70	PNW Coast-W VI	0.8948	OR-CA Coast	0.104
RT71	PNW Coast-W VI	0.5996	OR-CA Coast	0.3908
RT72	Puget Sound-S BC	0.4474	CR_OceanType-Deschutes	0.4331
RT73	Puget Sound-S BC	0.748	CR_OceanType-Deschutes	0.1442
RT74	Puget Sound-S BC	0.4326	OR-CA Coast	0.4266
RT75	Puget Sound-S BC	0.8528	PNW Coast-W VI	0.0971

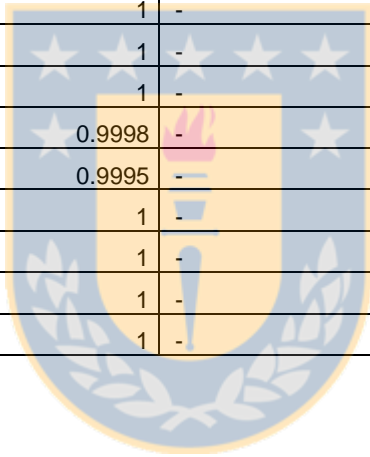
RT76	Puget Sound-S BC	0.9727	OR-CA Coast	0.0257
RT77	Puget Sound-S BC	0.9383	OR-CA Coast	0.0351
RT 78	Puget Sound-S BC	0.8053	LColrR-Willamette	0.1933



Anexo 2. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Río Petrohué (RP) a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o *reporting groups*).

Individuo	Mejor estimación	Probabilidad	2da mejor estimación	Probabilidad
RP1	Central Valley	0.9713	Puget Sound-S BC	0.016
RP2	Central Valley	0.9991	-	-
RP3	Central Valley	0.9729	Puget Sound-S BC	0.0269
RP4	Central Valley	0.9729	Puget Sound-S BC	0.0269
RP5	OR-CA Coast	0.9642	Central Valley	0.0277
RP6	LColrR-Willamette	0.9655	Puget Sound-S BC	0.0344
RP7	Puget Sound-S BC	0.9154	OR-CA Coast	0.0822
RP8	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP9	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP10	Puget Sound-S BC	0.9996	-	-
RP11	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP12	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP13	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP14	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP15	Puget Sound-S BC	0.9941	-	-
RP16	Puget Sound-S BC	0.9722	OR-CA Coast	0.0269
RP17	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP18	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP19	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP20	Puget Sound-S BC	0.9958	-	-
RP21	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP22	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP23	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP24	Puget Sound-S BC	0.9811	Central Valley	0.0189
RP25	Puget Sound-S BC	0.9998	-	-
RP26	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP27	Puget Sound-S BC	0.9991	-	-
RP28	Puget Sound-S BC	0.9845	OR-CA Coast	0.0155
RP29	Puget Sound-S BC	0.9987	-	-
RP30	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP31	Puget Sound-S BC	0.9995	-	-
RP32	Puget Sound-S BC	0.9997	-	-
RP33	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP34	Puget Sound-S BC	0.9998	-	-
RP35	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP36	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP37	Puget Sound-S BC	0.5899	OR-CA Coast	0.2644

RP38	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP39	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP40	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP41	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP42	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP43	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP44	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP45	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP46	Puget Sound-S BC	0.9947	-	-
RP47	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP48	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP49	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP50	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP51	Puget Sound-S BC	0.993	-	-
RP52	Puget Sound-S BC	0.9867	LColrR-Willamette	0.0115
RP53	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP54	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP55	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP56	Puget Sound-S BC	0.9998	-	-
RP57	Puget Sound-S BC	0.9995	-	-
RP58	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP59	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP60	Puget Sound-S BC	1	-	-
RP61	Puget Sound-S BC	1	-	-



Anexo 3. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones nativas del hemisferio Norte (o *reporting groups*).

Individuo	Mejor estimación	Probabilidad	2da mejor estimación	Probabilidad
GA1	Central Valley	0.945	OR-CA Coast	0.0419
GA2	OR-CA Coast	0.7683	LColrR-Willamette	0.1878
GA3	OR-CA Coast	0.6364	Central Valley	0.3375
GA4	OR-CA Coast	0.9345	Puget Sound-S BC	0.0645
GA5	OR-CA Coast	0.9596	Puget Sound-S BC	0.0384
GA6	LColrR-Willamette	0.9997	-	-
GA7	LColrR-Willamette	1	-	-
GA8	LColrR-Willamette	0.7122	OR-CA Coast	0.2666
GA9	LColrR-Willamette	1	-	-
GA10	LColrR-Willamette	0.992	-	-
GA11	LColrR-Willamette	0.9999	-	-
GA12	LColrR-Willamette	0.9945	-	-
GA13	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA14	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA15	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA16	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA17	Puget Sound-S BC	0.9998	-	-
GA18	Puget Sound-S BC	0.9984	-	-
GA19	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA20	Puget Sound-S BC	0.9998	-	-
GA21	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA22	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA23	Puget Sound-S BC	0.6986	OR-CA Coast	0.3013
GA24	Puget Sound-S BC	0.9983	-	-
GA25	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA26	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA27	Puget Sound-S BC	0.9945	-	-
GA28	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA29	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA30	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA31	Puget Sound-S BC	0.9995	-	-
GA32	Puget Sound-S BC	0.9997	-	-
GA33	Puget Sound-S BC	0.9344	LColrR-Willamette	0.0625
GA34	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA35	Puget Sound-S BC	0.9904	-	-
GA36	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA37	Puget Sound-S BC	0.8049	LColrR-Willamette	0.1489

GA38	Puget Sound-S BC	0.9688	OR-CA Coast	0.0292
GA39	Puget Sound-S BC	0.989	OR-CA Coast	0.0101
GA40	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA41	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA42	Puget Sound-S BC	0.9979	-	-
GA43	Puget Sound-S BC	1	-	-
GA44	Puget Sound-S BC	0.9318	OR-CA Coast	0.0594



Anexo 4. Probabilidad de asignación de cada individuo de la población del Golfo de Ancud (GA) a las poblaciones introducidas de la Patagonia Chilena y Argentina.

Individuo	Mejor Estimación	Probabilidad	2da mejor estimación	Probabilidad
GA1	Petrohué	1	-	-
GA2	Petrohué	1	-	-
GA3	Petrohué	0.9152	Vargas	0.0682
GA4	Petrohué	1	-	-
GA5	Petrohué	1	-	-
GA6	Petrohué	1	-	-
GA7	Petrohué	1	-	-
GA8	Petrohué	1	-	-
GA9	Petrohué	1	-	-
GA10	Petrohué	1	-	-
GA11	Petrohué	1	-	-
GA12	Petrohué	1	-	-
GA13	Petrohué	1	--	-
GA14	Petrohué	1	-	-
GA15	Petrohué	1	-	-
GA16	Petrohué	0.9951	-	-
GA17	Petrohué	1	-	-
GA18	Petrohué	1	-	-
GA19	Petrohué	1	-	-
GA20	Petrohué	1	-	-
GA21	Petrohué	1	-	-
GA22	Petrohué	1	-	-
GA23	Petrohué	1	-	-
GA24	Petrohué	1	-	-
GA25	Petrohué	1	-	-
GA26	Petrohué	1	-	-
GA27	Petrohué	1	-	-
GA28	Petrohué	1	-	-
GA29	Petrohué	1	-	-
GA30	Petrohué	1	-	-
GA31	Petrohué	1	-	-
GA32	Petrohué	1	-	-
GA33	Petrohué	1	-	-
GA34	Petrohué	0.9997	-	-
GA35	Petrohué	1	-	-
GA36	Petrohué	1	-	-
GA37	Petrohué	1	-	-

GA38	Petrohué	1	-	-
GA39	Petrohué	1	-	-
GA40	Cobarde	0.9558	Petrohué	0.0223
GA41	Cobarde	0.9984	-	-
GA42	Cobarde	0.5897	Vargas	0.4103
GA43	Cobarde	1	-	-
GA44	Cobarde	0.9639	Vargas	0.0246



BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, M.W., Habicht, C. & Seeb, L.W. (2011) Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) under Diversifying Selection Provide Increased Accuracy and Precision in Mixed-Stock Analyses of Sockeye Salmon from the Copper River, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, **140**, 865-881.
- 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**, 919-941.
- Banks, M.A., Rashbrook, V.K., Calavetta, M.J., Dean, C.A. & Hedgecock, D. (2000) Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in California's Central Valley. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 915-927.
- Basulto, S. (2003) *El largo viaje de los salmones. Una crónica olvidada. Propagación y cultivo de especies acuáticas en Chile*. Maval Ltd, Santiago.
- Becker, L.A., Pascual, M.A. & Basso, N.G. (2007) Colonization of the Southern Patagonia Ocean by Exotic Chinook Salmon Colonización del Sur de la Patagonia por el Salmón Exótico *Oncorhynchus tshawytscha*. *Conservation Biology*, **21**, 1347-1352.
- Behnke, R.J. (2002) *Trout and salmon of North America.*, The Free Press, New York.
- Bolker, B.M., Okuyama, T., Bjørndal, K.A. & Bolten, A.B. (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: 'many-to-many' analyses. *Molecular Ecology*, **16**, 685-695.
- Buser, T.J., Davis, N. D., Jiménez-Hidalgo, I., Hauser, L. (2009) Genetic Techniques Provide Evidence of Chinook Salmon Feeding on Walleye Pollock Offal. *North Pacific Anadromous Fish Commission*, **Bulletin No. 5**, 225-229.
- Cáceres, M., Valle-Levinson, A. & Atkinson, L. (2003) Observations of cross-channel structure of flow in an energetic tidal channel. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, **108**, n/a-n/a.
- Cadwallader, P.L. (1996) Overview of the impacts of introduced salmonids on Australian native fauna. *Australian Nature Conservation Agency*, 69 pgs.
- Cañas, D. (2014) *Análisis de Estructuración Genética Poblacional Intra- e Inter-Cuenca, de la especie invasora Oncorhynchus tshawytscha (Walbaum, 1792) en los ríos de la Patagonia chilena y argentina*. Universidad de Concepción,
- Cassin, M.H. & Sepúlveda, M. (eds. 2006) El Huillín Lontra provocax: Investigaciones sobre una nutria patagónica en peligro de extinción. *Serie Fauna Neotropical 1, Publicación de la Organización PROFAUNA, Buenos Aires* pp. 162.
- Ciancio, J., Pascual, M., Lancelotti, J., Rossi, C.R. & Botto, F. (2005) Natural Colonization and Establishment of a Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, Population in the Santa Cruz River, an Atlantic Basin of Patagonia. *Environmental Biology of Fishes*, **74**, 219-227.
- Ciancio, J.E., Riva Rossi, C., Pascual, M., Anderson, E. & Garz, J.C. (2015) The invasion of an Atlantic Ocean river basin in Patagonia by Chinook salmon: new insights from SNPs. *Biol Invasions*, **17**
- Consuegra, S., Phillips, N., Gajardo, G. & de Leaniz, C.G. (2011) Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout. *Evolutionary Applications*, **4**, 660-671.
- Correa, C. & Gross, M. (2008) Chinook salmon invade southern South America. *Biological Invasions*, **10**, 615-639.

- Di Prinzio, C., Rossi, C., Ciancio, J., Garza, J. & Casaux, R. (2015) Disentangling the contributions of ocean ranching and net-pen aquaculture in the successful establishment of Chinook salmon in a Patagonian basin. *Environmental Biology of Fishes*, 1-11.
- Di Prinzio, C.Y. (2001) *Estudio preliminar de la remonta del sCh (Oncorhynchus tshawytscha) en las cuencas de los ríos Corcovado, Futaleufú y Pico, Chubut, Argentina*. Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco, Esquel.
- Dittman, A. & Quinn, T. (1996) Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. *The Journal of Experimental Biology*, **199**, 83-91.
- Dlugosch, K.M. & Parker, I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, **17**, 431-449.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (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.
- Facon, B., Genton, B.J., Shykoff, J., Jarne, P., Estoup, A. & David, P. (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 130-135.
- Fisher, J.P., Weitkamp, L.A., Teel, D.J., Hinton, S.A., Orsi, J.A., Farley, E.V., Morris, J.F.T., Thiess, M.E., Sweeting, R.M. & Trudel, M. (2014) Early Ocean Dispersal Patterns of Columbia River Chinook and Coho Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, **143**, 252-272.
- Foll, M. & Gaggiotti, O. (2008) A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *GENETICS*, **180**, 977-993.
- Froese, R.y.D.P.E. (2014) Fishbase. In:
- Gomez-Uchida, D., Seeb, James E., Habicht, C. & Seeb, Lisa W. (2012) Allele frequency stability in large, wild exploited populations over multiple generations: insights from Alaska sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **69**, 916-929.
- Gross, M.R. (1998) One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Can J Fish Aquat Sci*, **55**, 131-144.
- Habicht, C., Seeb, L.W., Myers, K.W., Farley, E.V. & Seeb, J.E. (2010) Summer-Fall Distribution of Stocks of Immature Sockeye Salmon in the Bering Sea as Revealed by Single-Nucleotide Polymorphisms. *Transactions of the American Fisheries Society*, **139**, 1171-1191.
- Halpin, P.M., Strub, P.T., Peterson, W.T. & Baumgartner, T.R. (2004) An overview of interactions among oceanography, marine ecosystems, climatic and human disruptions along the eastern margins of the Pacific Ocean. *Revista chilena de historia natural*, **77**, 371-409.
- Hauser, L. & Seeb, J.E. (2008) Advances in molecular technology and their impact on fisheries genetics. *Fish and Fisheries*, **9**, 473-486.
- Healey, M.C. (1991) *Pacific salmon life histories: Life history of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha**. University of British Columbia Press, Vancouver.
- Heard, W.R., Shevlyakov, E., Zikunova, O. V., McNicol, R. E. (2007) Chinook Salmon – Trends in Abundance and Biological Characteristics. *North Pacific Anadromous Fish Commission., Bulletin No. 4: 77-91*.
- Hess, J., Matala, A. & Narum, S. (2011) Comparison of SNPs and microsatellites for fine-scale application of genetic stock identification of Chinook salmon in the Columbia River Basin. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 137-149.
- Hilborn, R., Quinn, T.P., Schindler, D.E. & Rogers, D.E. (2003) Biocomplexity and fisheries sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 6564-6568.

- Iriarte, J.L., González, H.E., Liu, K.K., Rivas, C. & Valenzuela, C. (2007) Spatial and temporal variability of chlorophyll and primary productivity in surface waters of southern Chile (41.5–43° S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **74**, 471-480.
- James, G.D.y.U., M.J. (1996) Diet of ChS (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Canterbury coastal waters, New Zealand. *N Z J Mar Freshw Res*, **30**, 69–78.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**, 1403-1405.
- Joyner, T. (1978) Salmon base in Chile. *Fishing News International*, **42-43**, 18-19 y 46.
- Kalinowski, S.T., Manlove, K.R. & Taper, M.L. (2008) ONCOR: Software for genetic stock identification.
- Larson, W.A., Utter, F.M., Myers, K.W., Templin, W.D., Seeb, J.E., Guthrie Iii, C.M., Bugaev, A.V. & Seeb, L.W. (2012) Single-nucleotide polymorphisms reveal distribution and migration of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Bering Sea and North Pacific Ocean. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**, 128-141.
- Limborg, M.T., Seeb, L.W., Larson, W.A., Seeb, J.E. & Utter, F.M. (2014) Genomic studies of fishes: Potentialities and limitations *Fish and Fisheries*,
- Limborg, M.T., Helyar, S.J., De Bruyn, M., Taylor, M.I., Nielsen, E.E., Ogden, R.O.B., Carvalho, G.R., Consortium, F.P.T. & Bekkevold, D. (2012) Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Molecular Ecology*, **21**, 3686-3703.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K. & the, S.N.P.w.g. (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 208-216.
- Pascual, M. & Ciancio, J. (2007) Introduced Anadromous Salmonids in Patagonia: Risks, Uses, and a Conservation Paradox. *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities* (ed. by T. Bert), pp. 333-353. Springer Netherlands.
- Peakall, R.O.D. & Smouse, P.E. (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Piedra, P., Habit, E., Oyanedel, A., Colin, N., Solis-Lufí, K., González, J., Jara, A., Ortiz, N. & Cifuentes, R. (2012) Patrones de desplazamiento de peces nativos en el Río San Pedro (cuenca del Río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, **76**, 59-70.
- Quinn, T., Kinnison, M. & Unwin, M. (2001) Evolution of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations in New Zealand: Pattern, rate, and process. *Microevolution Rate, Pattern, Process* (ed. by A.P. Hendry and M.T. Kinnison), pp. 493-513. Springer Netherlands.
- Quinn, T.P. (2005) *The behavior and ecology of Pacific salmon and trout*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, and University of Washington Press, Seattle.
- R-Core-Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. In:
- Riva Rossi, C.M., Pascual, M.A., Aedo Marchant, E., Basso, N., Ciancio, J.E., Mezga, B., Fernández, D.A. & Ernst-Elizalde, B. (2012) The invasion of Patagonia by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): inferences from mitochondrial DNA patterns. *Genetica*, **140**, 439-453.
- Rousset, F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
- Satterthwaite, W.H., Ciancio, J., Crandall, E., Palmer-Zwahlen, M.L., Grover, A.M., O'Farrell, M.R., Anderson, E.C., Mohr, M.S. & Garza, J.C. (2015) Stock composition and ocean spatial distribution inference from California recreational Chinook salmon fisheries using genetic stock identification. *Fisheries Research*, **170**, 166-178.

- Schindler, D.E., Hilborn, R., Chasco, B., Boatright, C.P., Quinn, T.P., Rogers, L.A. & Webster, M.S. (2010) Population diversity and the portfolio effect in an exploited species. *Nature*, **465**, 609-612.
- Seeb, J., Pascal, C., Ramakrishnan, R. & Seeb, L. (2009) SNP Genotyping by the 5'-Nuclease Reaction: Advances in High-Throughput Genotyping with Nonmodel Organisms. *Single Nucleotide Polymorphisms* (ed. by A.A. Komar), pp. 277-292. Humana Press.
- Seeb, L.W., Habicht, C., Templin, W.D., Tarbox, K.E., Davis, R.Z., Brannian, L.K. & E., S.J. (2000) Genetic diversity of sockeye salmon of Cook Inlet, Alaska, and its application to management of populations affected by the Exxon Valdez oil spill. *Transactions of the American Fisheries Society*, **129**, 1223-1249.
- Seeb, L.W., Templin, W.D., Sato, S., Abe, S., Warheit, K., Park, J.Y. & Seeb, J.E. (2011) Single nucleotide polymorphisms across a species' range: implications for conservation studies of Pacific salmon. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 195-217.
- Soto, D., Jara, F. & Moreno, C. (2001) Escaped salmon in the inner seas, southern Chile: Facing ecological and social conflicts. *Ecological Applications*, **11**, 1750-1762.
- Soto, D., Arismendi, I., Prinzi, C.D. & 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, C., Guzman, E. & Lara, A. (2006) Southern Chile, trout and salmon country: invasion patterns and threats for native species. *Revista chilena de historia natural*, **79**, 97-117.
- Templin, W., Seeb, L., Berger, J., Bloomquist, R., McPherson, S. & Carlile, J. (2012) Mixed stock analysis of sublegal Chinook salmon encountered in the Southeast Alaska troll fishery 1998-2003. *Alaska Department of Fish and Game, Fishery Data Series N° 12-32, Anchorage.*
- Tucker, S., Trudel, M., Welch, D.W., Candy, J.R., Morris, J.F.T., Thiess, M.E., Wallace, C. & Beacham, T.D. (2011) Life History and Seasonal Stock-Specific Ocean Migration of Juvenile Chinook Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, **140**, 1101-1119.
- Vargas, P.V., 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.
- Warheit, K.I., Seeb, L., Templin, W.D. & Seeb, J. (2013) Moving GSI into the Next Decade: SNP Coordination for Pacific Salmon Treaty Fisheries. *Washington Department of FISH AND WILDLIFE (Fish Program and Fish Science Division)*,
- Weitkamp, L.A. (2010) Marine Distributions of Chinook Salmon from the West Coast of North America Determined by Coded Wire Tag Recoveries. *Transactions of the American Fisheries Society*, **139**, 1, 147-170.
- Winkler, K.A., Pamminer-Lahnsteiner, B., Wanzenböck, J. & Weiss, S. (2011) Hybridization and restricted gene flow between native and introduced stocks of Alpine whitefish (*Coregonus* sp.) across multiple environments. *Molecular Ecology*, **20**, 456-472.