



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Filogeografía de la especie introducida trucha café (*Salmo trutta*
Linnaeus, 1758) en Chile para definir rutas de invasión

César Augusto Bugueño Silva

Seminario de Título presentado a la

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Para optar al título de

Biólogo

Profesor guía:

Dr. Daniel Gómez Uchida

Concepción - Chile 2024



Concepción, Marzo de 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Zoología,

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Prof. Guía

Dr. Daniel Gomez-Uchida

Prof. Co-guía

MSc Carla Muñoz-Mendoza

Prof. Evaluadores

Dr. Cristian B. Canales Aguirre

Dr Claudio Correa

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, Abril de 2024

*Dedico este escrito a mi Madre y Padre
Los amo, solo a veces no sé expresarme como se espera.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mi madre Elsa Ivonne Magaly Silva Ramírez por cuidarme, educarme y siempre recibirme cada vez que volvía a Curicó. También a mi padre, Fernando Eduardo Bugueño Nazer, quien aunque falleció, fue un buen padre del que guardo alegres recuerdos, ideales y cariño. Me gustaría agradecer a mis amigos y amigas que he hecho hace años, de Curicó, Santiago y Concepción, quienes aunque no participaron en mi formación académica, han sido un escape y desahogo necesario.

También quisiera agradecer a quienes conocí al llevar a cabo este trabajo, principalmente al Dr. Daniel Gómez Uchida, por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar junto a él. Ha sido todo lo que se puede esperar de un profesor guía y un colega, con su paciencia, ideas y disposición. No puedo olvidar a la profesora Carla Muñoz Mendoza, quien me instruyó en el trabajo práctico, el uso de programas y el funcionamiento de la oficina, siendo sumamente agradable y alegre. Saludo igualmente al Dr. Selim Musleh y a Mauricio Cañas por su ayuda, además de a los tesisistas y futuros tesisistas del laboratorio.

Para finalizar, quisiera dejar un párrafo aparte para una persona especial que me ha acompañado a lo largo de mi carrera, que probablemente presentará el mismo día y sentirá los mismos miedos e inseguridades. Un especial agradecimiento a Micaela Conejeros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
Invasiones Biológicas.....	12
Trucha café (Salmo trutta).....	13
Introducción de la trucha café Salmo trutta en Chile.....	14
Estructura Filogeográfica y patrones demográficos.....	17
HIPÓTESIS.....	20
MATERIALES Y MÉTODO.....	21
Colección de muestras.....	21
Muestras de Chile.....	21
Secuencias externas.....	21
Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADNmt.....	22
Extracción.....	22
Síntesis y Amplificación por PCR.....	22
Secuenciación y Alineación de secuencias.....	23
Análisis Filogenéticos.....	24
Búsqueda de similitudes.....	24
Alineación con secuencias externas.....	24
Haplotipos no redundantes.....	24
Análisis descriptivos.....	25
Red de haplotipos.....	25
Distancia genética.....	26
Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).....	26
Mapa de muestreo y distribución de puntos.....	26
RESULTADOS.....	27
Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADNmt.....	27
Análisis Filogenéticos.....	28
Búsqueda de similitudes.....	28
Alineación con secuencias externas.....	28
Haplotipos no redundantes.....	29
Análisis descriptivos.....	32
Red de haplotipos.....	32
Distribución espacial de haplotipos muestreados.....	37
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIÓN.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de electroforesis con amplificación de la región control del ADNmt usando tres pares de primers.	28
Figura 2. Secuencias 1 y 65 del rango introducido en Chile junto a secuencias del rango nativo Europeo ATcs1, ATcs2 y ATcs21.....	32
Figura 3. Red de haplotipos, muestra 12 secuencias, la frecuencia de muestras por secuencia además de la distribución en las cuencas. Los colores representan cuencas muestreadas del rango introducido (código DGA de cada cuenca entre paréntesis): Río Toltén (94), Río Valdivia (101), Río Bueno (103), Cuencas e islas entre río Bueno y río Puelo (104), Cuencas costeras entre río Puelo y Río Yelcho (106), Isla Chiloe y circundantes (109), Cuencas costeras e islas entre río Hollemberg, Golfo Alte. Laguna Blanca (124) y Cuencas costeras entre Laguna Blanca (inc), seno Otway, canal Jeronimo y Magallanes (125).....	33
Figura 4. Red de haplotipos generada utilizando 123 secuencias del rango nativo en Europa (Azul) y 12 secuencias del rango introducido en Chile (Anaranjado) de la trucha café. Mediterraneo (ME), Adriatico (AD), Atlantico (AT), Duero (DU).....	34
Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de una matriz de distancia genética de la región control del ADNmt de individuos de trucha café. A) PCoA obtenido a partir de 12 secuencias del rango introducido en Chile. B) PCoA obtenido al integrar 123 secuencias del rango nativo y 12 secuencias del rango introducido. C) PCoA realizado utilizando 12 secuencias de rango introducido en Chile en conjunto con los 3 haplotipos de rango nativo con menor distancia genética a nuestras secuencias.....	36
Figura 6. Mapa de distribución de muestras secuenciadas a lo largo de 8 cuencas. Los puntos de color representan los haplotipos; Rojo: 66; Amarillo: 65; Verde: 1; y en Azul los otros 9 haplotipos. En color gris resaltan las cuencas que hemos muestreado.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las introducciones de trucha café documentadas por (Basulto Del Campo, 2003), se señala el año de la introducción, su país de origen y la ubicación o destino donde fueron liberados.....	17
Tabla 2. Resumen de los valores para la amplificación y observación en Agarosa del material genético extraído en este trabajo.....	23
Tabla 3. Secuencias distribuidas en doce haplotipos no redundantes de la región control mitocondrial de la trucha café.....	29
Tabla 4. Haplotipos redundantes de Chile y sus coincidencias con secuencias Externas.....	30
Tabla 5. Resumen de los ríos de origen de los haplotipos descritos por Cortey et al. (2009). Tanto ATcs1 como ATcs2 se consideran haplotipos hatchery de origen Alemán.....	31
Tabla 6. Matriz de distancia genética entre los haplotipos presentes en Chile. Se aprecia en rojo que nuestros haplotipos 7, 39 y 104 son más distantes en relación al resto, mientras que en verde se observan los más cercanos. Esto se puede ser reflejado en la Fig. 5A.....	35
Tabla 7. Frecuencia de nuestros haplotipos en las cuencas del sur de Chile. Resalta Hp 1 al estar presente en todas las cuencas.....	37
Tabla 8. Resumen de las 102 muestras extraídas, señalando las que llegaron a ser secuenciadas y las que coinciden con la especie objetivo.....	48
Tabla 9. Tabla de haplotipos de rango nativo utilizados para los cálculos de distancia genética, redes de haplotipos, PCoA y determinación de ancestro común, elaborada por Splendiani et al. (2016).....	51

RESUMEN

Las invasiones biológicas representan una amenaza global para la biodiversidad, afectando a especies nativas y endémicas. En Chile, nuestros ríos y lagos están invadidos por diversas especies de salmónidos, como la trucha arcoíris y la trucha café, las cuales representan el 80% de la biomasa de nuestros recursos acuícolas. *Salmo trutta*, conocida como trucha café, es una especie originaria del hemisferio norte que fue introducida globalmente desde 1852, colonizando todos los continentes excepto la Antártica en menos de 90 años. La trucha café, ha prosperado en Chile debido a su capacidad adaptativa, abundancia de recursos y la ausencia de competidores o depredadores. Para abordar su origen en Chile y evaluar el estado actual de las poblaciones introducidas, aplicamos la filogeografía, contrastando secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) de individuos de rango introducido en Chile y secuencias de rango Nativo en Europa. Para ello se recolectó y extrajo muestras de material genético de la región control del ADNmt de ocho cuencas de Chile, las cuales fueron amplificadas con primers: FST y PST. Se identificaron los haplotipos presentes en Chile, mediante BLAST se obtuvieron secuencias del rango nativo en Europa y se llevaron a cabo cálculos de distancia genética, redes de haplotipos y representaciones de distribución.

Los resultados revelaron la presencia de 12 haplotipos, destacando Haplotipo 1 y 65 por su alta frecuencia (76,66% y 12,22%) y distribución (8 y 2 cuencas), ambos pertenecientes al linaje Atlántico. El primer haplotipo se vincula a ancestros de hatchery de España con truchas provenientes de Alemania, mientras que el segundo haplotipo muestra dos posibles ancestros, uno de hatchery y otro silvestre de España. Además, identificamos 10 secuencias únicas, aparentemente originadas en Chile dada su divergencia y nula coincidencia con las muestras Europeas analizadas. En conclusión, se confirma que las

truchas cafés en Chile tienen su origen desde haplotipos provenientes del linaje Atlántico (AT) característico de Alemania y dispersados en diversas hatcheries. Destaca la amplia distribución del haplotipo 1 en contraste con el haplotipo 65, este último predominantemente encontrado en la Araucanía. Estos hallazgos resaltan la importancia del análisis filogeográfico para comprender la invasión de especies y su impacto en los ecosistemas acuáticos chilenos.

Palabras claves: Especie invasora, Filogeografía, Hatchery, ADNmt, Región control.

ABSTRACT

Biological invasions pose a global threat to biodiversity, impacting native and endemic species. In Chile, our rivers and lakes are invaded by various species of salmonids, such as rainbow trout and brown trout, which represent 80% of the biomass of our aquaculture resources. *Salmo trutta*, known as brown trout, is a species native to the northern hemisphere that has been globally introduced since 1852, colonizing all continents except Antarctica in less than 90 years. Brown trout has thrived in Chile due to its adaptive capacity, abundance of resources, and the absence of competitors or predators. To address its origin in Chile and evaluate the current status of introduced populations, we applied phylogeography, contrasting mitochondrial DNA (mtDNA) sequences from individuals of introduced range in Chile and sequences from the native range in Europe. For this purpose, samples of genetic material were collected and extracted from the control region of mtDNA from eight Chilean basins, which were amplified with primers: FST and PST. The haplotypes present in Chile were identified, sequences from the native range in Europe were obtained via BLAST, and calculations of genetic distance, haplotype networks, and distribution representations were conducted.

The results revealed the presence of 12 haplotypes, with Haplotypes 1 and 65 standing out due to their high frequency (76.66% and 12.22%) and distribution (8 and 2 basins), both belonging to the Atlantic lineage. The first haplotype is linked to hatchery ancestors from Spain with trout from Germany, while the second haplotype shows two possible ancestors, one from a hatchery and another wild from Spain. Additionally, we identified 10 unique sequences, apparently originating in Chile due to their divergence and lack of coincidence with the European samples analyzed. In conclusion, it is confirmed that brown trout in Chile

have their origin from haplotypes originating from the Atlantic lineage (AT) characteristic of Germany and dispersed in various hatcheries. The widespread distribution of haplotype 1 contrasts with haplotype 65, the latter predominantly found in the Araucanía region. These findings highlight the importance of phylogeographic analysis in understanding the invasion of species and their impact on Chilean aquatic ecosystems.

Keywords: Invasive species, Phylogeography, Hatchery, mtDNA, Control region.

INTRODUCCIÓN

Invasiones Biológicas

Las invasiones biológicas son eventos que ocurren cuando los organismos son transportados e introducidos desde su área nativa hasta un nuevo ambiente fuera de sus límites geográficos naturales donde su descendencia prolifera, se propaga y persiste (Blackburn et al., 2011; Elton, 1958). Estos eventos generan perturbaciones en la naturaleza y afectan el equilibrio de las poblaciones (Elton, 1958). En este contexto Blackburn et al. (2011) propuso un marco para las invasiones biológicas mediadas por humanos que propone que el proceso de invasión puede dividirse en una serie de etapas y que en cada etapa hay barreras que la especie o población debe superar para avanzar a la siguiente etapa. A nivel mundial, la introducción e invasión de especies exóticas es una de las principales amenazas a la biodiversidad y a los ecosistemas (Habit et al., 2012; Mack et al., 2000). Las especies exóticas invasoras (EEI) impactan negativamente a las especies nativas y a los ecosistemas donde estas son introducidas, produciendo efectos tales como: depredación de las especies nativas; competencia directa por los recursos del ambiente; alteración en la reproducción, abundancia y riqueza de especies nativas; alteración en las redes tróficas y homogenización de los ambientes o paisajes (*Invasiones Biológicas – Especies Exóticas Invasoras*, 2019).

Un proceso de invasión involucra variaciones espacio - temporales en los tamaños poblacionales que frecuentemente llevan a una reducción sucesiva de la diversidad genética durante la introducción, establecimiento y la propagación de los individuos introducidos, lo que podría llevar a la extinción a la población introducida (Frankham, 2005). Sin embargo, hay especies invasoras que logran establecerse en los sitios donde se han introducido a pesar de la disminución en la diversidad genética, por ejemplo si consideramos el caso del cangrejo

rojo *Procambarus clarkii* G. (1852) presenta una gran diversidad haplotipo en las poblaciones dentro del rango nativo mientras que en áreas no nativas se encontraron bajos niveles de diversidad (Aladrén, 2019).

En Chile, la introducción de especies exóticas como los salmones es un fenómeno íntimamente relacionado con la actividad económica. Puntualmente, el salmón llegó a nuestro país a finales del siglo XIX con el objetivo de fomentar la pesca recreativa y turismo, y posteriormente para fomentar la industria piscicultora (Albert, 1902; Basulto Del Campo, 2003; Golusda, 1907). No obstante, la introducción de especies a nuevos ambientes, tiene un impacto negativo desde un punto de vista de la conservación. Puntualmente los salmones han traspasado las barreras impuestas por el ambiente (Blackburn et al., 2011; Elton, 1958), llegando a establecerse como una EEI. Los ejemplares presentes en Chile se introdujeron desde Europa, aunque no existe certeza sobre la región de origen, que es lo que este proyecto busca clarificar.

Trucha café (*Salmo trutta*)

La trucha café, trucha marrón o simplemente trucha europea (*Salmo trutta*) es una EEI que se ha introducido en todo el mundo, excepto en la Antártica, por su interés como alimento y para la pesca recreativa (Nelson, 2006). La trucha café es una especie nativa del hemisferio norte, con un rango nativo que incluye el norte de África, Europa occidental y oeste de Asia. Las primeras introducciones en el mundo ocurrieron en 1852 en el este de Rusia, y en menos de 90 años, la Trucha café pasó de ser una especie europea a estar presente en todo el globo. El éxito de la introducción y establecimiento de esta especie fuera de su distribución geográfica es reflejo de su variabilidad ecológica, excelente capacidad para propagarse, y colonizar nuevos cursos de agua (Klemetsen et al. 2003).

La trucha café pertenece al orden de los Salmoniformes que está restringido a la familia Salmonidae, un grupo de peces de agua dulce, anádromos, y que comprende 3 subfamilias, con 11 géneros y 66 especies (Nelson, 2006). El género *Salmo* o truchas del Atlántico, se desplaza al agua dulce de los ríos para reproducirse, principalmente en otoño (periodo de desove).

La trucha café varía en tamaño, tasa de crecimiento, nicho de alimentación y uso de hábitat dentro y entre cursos de agua; si las condiciones del sector de desove son apropiadas, puede ocupar desde arroyos muy pequeños hasta los ríos más grandes, incluyendo pequeños estanques hasta fiordos y aguas costeras (Klemetsen et al., 2003). Las truchas cafés tienen tres ciclos o historias de vida distintas que se caracterizan por habitar en: Los ríos, los lagos y la costa. El primero se basa principalmente en ríos fluviales o glaciares, el segundo tiene una fuerte influencia de los lagos y ríos fluviales o glaciares; mientras que el tercero incluye la salida al mar además de un proceso de transformación llamado smolting, en este último se clasifican las truchas anádromas (Klemetsen et al., 2003), todos estos ciclos de vida retornan al río natal para realizar el desove.

Introducción de la trucha café *Salmo trutta* en Chile

La introducción de salmones en Chile y el interés por la empresa de piscicultura tiene sus orígenes a finales del siglo XIX con distintas especies, orígenes y dificultades. Los primeros intereses en introducir salmones fueron realizados por Luis Cousiño en 1865, quien encargó a Inglaterra ovas y alevines, previo a los ensayos de aclimatación realizados en Nueva Zelanda. Una década después, no se tiene más registro del proyecto de Cousiño (Basulto Del Campo, 2003). Después de 18 años, Doña Isidora Goyenechea, viuda de Luis Cousiño, retoma el esfuerzo de su difunto marido y logra (junto a escoceses) traer ovas de

Salmo trutta fario las cuales son criadas en el río Chivilingo (Lota) logrando crecer, pero debido a una tormenta los peces son arrastrados al mar y se pierde registro (Basulto Del Campo, 2003). En 1878, Jose Urmeneta junto a Rodolfo Philippi logran la introducción de ovas de salmón traídas desde Escocia en algún lugar del sector Recoleta Dominicana, siendo datado como la primera introducción de Salmones (no se tiene más información) en Chile según Rafael Elizalde (Basulto Del Campo, 2003). En 1902, Federico Albert, bajo el mandato del Presidente de la República, Germán Riesco, envía a Chile ovas de salmónidos provenientes de: Baviera, Berlín y Sandfort (Alemania) las cuales en 1905 son enviadas a Chile con destino a la piscicultura de Río Blanco (Valparaíso, Chile) (Albert, 1902; Basulto Del Campo, 2003; Golusda, 1907).

La piscicultura de Río Blanco en la cuenca del Aconcagua fue un éxito y comenzó la siembra en Chile. A fines de octubre de 1905 se inicia la propagación de los salmones criados en Río Blanco en las provincias de: O'Higgins, Colchagua, Talca, Linares, Maule, Cautín y Valdivia (Basulto Del Campo, 2003). En diciembre de ese mismo año, Rodolf Wilde adquiere 350 mil ovas de Alemania; de esta segunda partida se obtienen 170 mil alevines que son sembrados en los ríos: Angostura, Calle-Calle y Río Bueno (Basulto Del Campo, 2003). Este mismo año se registran pescas en: el Aconcagua, Limache, el Angostura, Paine, Rios de Santiago (sin seguridad), Lifuemo, Tinguiririca, el Cautín, el Imperial y Toltén (cerca de Pitrufquen), una nota señala que en el río Tinguiririca se liberaron 45 mil salmones (Basulto Del Campo, 2003). En 1908, Albert solicita la adquisición de ovas desde Alemania y España, de un lugar llamado "Monasterio de Piedra", se encargan 600 mil ovas de las cuales 100 mil son trucha café, sin embargo no se sabe si esta solicitud llegó a concretarse, aunque en 1913, Ernesto Maldonado menciona que se realizaron introducciones de salmones en Chile en:

1908, 1910, 1911 y 1913, esta última podría ser la solicitada por Albert a Alemania y España (Basulto Del Campo, 2003) entre las cuales pudo incluirse trucha café.

La introducción y siembra de salmones tuvo un gran éxito que se evidencia en la pesca de ejemplares. Se logran pescar en el estero de Chimbarongo y Cautín, en este último destaca la presencia de truchas café y arco iris (Basulto Del Campo, 2003). Este éxito llevó a la creación de la nueva piscicultura de Lautaro en 1916 y la introducción de 1.3 millones de ovas de salmón desde Europa (Basulto Del Campo, 2003). En 1927 se continuó con la siembra de salmones provenientes de Río Blanco, se introdujo salmón atlántico y trucha café en los ríos magallánicos: Pescado, Agua Fresca, Penitente, Tres Pasos, Picana, Kark, Guillermo (en el continente) y Side, Oscar, Del Oro y Verde (en Tierra del Fuego), esta siembra se repitió en los años 1941 y 1943 (Basulto Del Campo, 2003). En 1975, el oceanógrafo químico, Timothy Joyner, menciona sobre la migración de trucha café desde los lagos de la patagonia hacia el Estrecho de Magallanes (Basulto Del Campo, 2003). Gracias a los esfuerzos de distintos pioneros en la piscicultura nacional se logró la introducción, aclimatación, y distribución de salmones en Chile.

Tabla 1. Resumen de las introducciones de trucha café documentadas por (Basulto Del Campo, 2003), se señala el año de la introducción, su país de origen y la ubicación o destino donde fueron liberados.

Año de introducción	Origen	Destino
1865	Inglaterra	Sin registro
1883	Escocia	Chivilingo (Lota)
1878	Escocia	Santo Domingo (Recoleta Dominicana)
1905	Baviera, Berlín y Sandfort (Alemania)	Rio Blanco (Valparaiso)
1905	Alemania	Rio Blanco (Valparaiso)
1908	Alemania y España	Rio Blanco (Valparaiso)
1910	Europa	Rio Blanco (Valparaiso)
1911	Europa	Rio Blanco (Valparaiso)
1913	Chile	Bolivia
1916	Europa	Lautaro (Araucanía)
1930	Chile	Sudamérica

Estructura Filogeográfica y patrones demográficos

La disciplina que nos permite comprender alguna de las rutas de dispersión y el lugar de origen de las especies es la filogeografía. La filogeografía nos permite comprender la historia evolutiva a nivel genético de las especies de acuerdo con su distribución espacial en el tiempo (Avice, 2000). Mediante análisis de la variación de las secuencias de ADN entre individuos de una misma especie, se puede reconstruir su genealogía. Si relacionamos estas variaciones con la distribución geográfica, podremos deducir la historia evolutiva de las poblaciones (Emerson & Hewitt, 2005). En el caso de EEIs, mediante la filogeografía podemos obtener información valiosa sobre el origen de las EEI en nuevos territorios, cuántas veces han sido introducidas y qué relación existe entre sus movimientos y la acción humana. El análisis molecular de la variación genética en poblaciones naturales puede proporcionar

datos sobre la estructura de la población que se pueden combinar con datos de información biogeográfica.

La obtención de secuencias de ADN permite estimar los niveles de variabilidad genética e inferir indirectamente el flujo genético y la estructura poblacional de cualquier especie. Uno de los marcadores más utilizados en estudios filogeográficos es el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt se encuentra al interior de las mitocondrias y es heredado sólo a través de la línea maternal y no sufre recombinación genética. Debido a la falta de mecanismos de reparación y la exposición a especies reactivas del oxígeno (ROS), el ADNmt tiende a acumular mutaciones. Estas características permiten al ADNmt ser usado para la reconstrucción de linajes a través de la inferencia filogenética.

Estudios filogenéticos previos de la trucha café en Eurasia, basados en ADNmt, muestran la presencia de cinco grandes grupos geográficamente separados (Bernatchez et al., 1992). En este contexto se usarán secuencias de la región control del ADNmt, comparando los haplotipos encontrados en Chile, con haplotipos del rango nativo de *Salmo trutta* obtenidos de GENBANK (www.ncbi.nlm.nih.gov), para determinar el origen de las truchas café que están presentes en los ríos del Sur de Chile.

Los estudios de genética de poblaciones y filogeografía de la trucha café son escasos. Algunos estudios previos se han realizado con *Salmo trutta* empleando aloenzimas y marcadores microsatélites (Colihueque et al., 2003; Faundez et al., 1997). Se presume que las condiciones ambientales y/o el efecto fundador provocaron que esta especie haya experimentado un grado de divergencia respecto a las poblaciones originales dado que se ha demostrado que la trucha café posee una tasa relativamente rápida de diferenciación poblacional desde la introducción (Colihueque et al., 2003; Krueger & May, 1987). Faundez

et al. (1997) utilizó aloenzimas para proponer que la trucha café presente en Chile deriva de un grupo europeo “moderno” propuesto por Hamilton et al. (1989). Dicho grupo se encuentra en el centro y norte de Europa, mientras que el grupo ancestral habita en el sur y Mediterráneo. Alelos de ambos grupos se han encontrado en poblaciones de trucha café en Chile, lo que reafirma la idea de una mezcla de orígenes, sin embargo, Riffel et al. (1995) presenta la existencia de poblaciones en Europa Central (Alemania), más relacionadas con el grupo ancestral que con el grupo moderno, por lo que estas poblaciones podrían ser también un origen a las poblaciones presentes en Chile (Colihueque et al., 2003). Por su parte los resultados de Colihueque et al. (2003) apoyan la hipótesis de que el origen de las poblaciones de trucha café tienen un origen mixto proveniente de distintos hatcheries de países Europeos, aunque no se tiene certeza si la mezcla se produjo en Chile o previamente en Europa, por lo que el uso de ADNmt resultará útil al momento de obtener una evaluación más precisa del origen de esta especie en Chile.

HIPÓTESIS

La hipótesis presentada busca responder la pregunta de si: **¿Un análisis filogeográfico de la Trucha café en su rango nativo e introducido permitirá revelar el origen de las poblaciones presentes en Chile?** Nos referimos a si al realizar un estudio filogeográfico de *Salmo trutta* podremos obtener resultados concluyentes sobre el o los ancestros comunes de las poblaciones de trucha café presentes actualmente en Chile.

Por ello planteamos la hipótesis de que **“La búsqueda del ancestro común de las poblaciones de *Salmo trutta* introducidas en Chile y de su rango nativo en Europa permitirá identificar el origen de las poblaciones introducidas y clarificar posibles rutas de invasión mediante un análisis filogeográfico.”** .” Basándonos en las técnicas de análisis filogenéticos esperamos encontrar uno o más ancestros en el hemisferio norte, los cuales corresponderían a los linajes donantes traídos e introducidos en Chile décadas pasadas y cuya descendencia se estableció en nuestros ríos.

MATERIALES Y MÉTODO

Colección de muestras

Muestras de Chile

Muestras de aleta se obtuvieron de las colecciones de *Salmo trutta* perteneciente al laboratorio GEECLAB, de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción. Estas muestras fueron colectadas entre los años 2014 a 2021, a lo largo del sur de Chile. El laboratorio cuenta con más de 2000 muestras de tejido, pero para efectos de este trabajo utilizamos 102 muestras de 8 cuencas distribuidas las siguientes regiones: 1. Araucanía (IX), 2. Los Ríos (XIV), 3. Los Lagos (X), 4. Aysén (XI) y 5. Magallanes (XII). Para escoger las muestras que serían extraídas consideramos: su ubicación, dado que un punto puede tener más de un muestreo; las distintas localidades, intentamos cubrir la mayor cantidad de localidades de muestreo (55 de 103 localidades); y el rango completo de las regiones mencionadas.

Secuencias externas

En nuestro estudio, empleamos la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2023) para buscar secuencias de *Salmo trutta* en países fuera de Chile, con un enfoque particular en Europa. Utilizamos el motor de búsqueda del sitio web con palabras clave específicas: “(haplotype mitochondrial complete control region) AND "Salmo trutta"[porgn: __txid8032]”, lo que nos permitió obtener un total de 169 secuencias.

Posteriormente, aplicamos los criterios de selección propuestos por Splendiani et al. (2016), como se detalla en la Tabla 9 de su estudio, para filtrar las secuencias obtenidas. Este proceso de filtrado nos permitió conservar 123 secuencias relevantes, las cuales descargamos en formato FASTA (.fas) y procedimos a editar sus etiquetas para su análisis posterior.

Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADNmt

Extracción

El ADN genómico total se obtuvo a través del kit de extracción comercial Wizard SV Genomic DNA Purification (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante, pero acortando el tiempo de digestión del tejido con proteinasa K a 3h. La calidad de cada extracción fue verificada mediante observación de bandas en geles de agarosa al 1% teñido con SybrSafe. El ADN genómico se almacenó en tubos Eppendorf de 1,5 ml a -20°C rotulados con su código de laboratorio.

Síntesis y Amplificación por PCR

Se envió a sintetizar 5 secuencias de primers a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT) con los nombres: LN20, HN20 (Bernatchez & Danzmann, 1993); FST, PST (Cortey & Garcia-Marin, 2002); y Trutta-mt-F (Kanjuh et al., 2020), este último se utilizó en conjunto con HN20.

Realizamos pruebas con las 3 combinaciones de primers amplificando muestras de ADN genómico extraído, siguiendo el protocolo propuesto por Cortey & Garcia-Marin (2002) con algunas modificaciones: Iniciamos con una desnaturalización a 95°C por 2 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 52°C por 45 seg y extensión a 72°C por 2 min; posteriormente una última extensión a 72°C por 5 min; finalmente los amplicones obtenidos fueron almacenados a 4°C (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los valores para la amplificación y observación en Agarosa del material genético extraído en este trabajo.

Protocolo	52-trutta Cesar			Primers		Gel	
Temperatura (°C)	Tiempo	Componentes	x1	P1	P2	1%	
95	2	MM	12.5	FST	PST	Agarosa	0,4 g
95	0:30	F	1			TAE	40 ml
52	0:45	R	1			SybrSafe	2 ul
72	2	H2O	5.5			Volt	70 v
72	5	ADNmt	5			Tiempo	40 min
4	∞						

Secuenciación y Alineación de secuencias

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen DNA Sequencing Services, Korea, para la obtención de las secuencias de los segmentos forward y reverse de ADNmt. Las secuencias obtenidas fueron visualizadas, editadas y alineadas usando el programa Geneious Prime (*Geneious 2023.0.4* (<https://www.geneious.com>), 2023). Utilizamos la función Reverse en las secuencias amplificadas por el primer reverse, la función Alignment para alinear los pares de secuencias, corregimos los errores como gaps e incertidumbres utilizando como referencia la información dispuesta en el cromatograma, recortamos los extremos y obtuvimos 95 secuencias de alrededor de 924 pb cada una.

Análisis Filogenéticos

Búsqueda de similitudes

Una vez obtenidas las 95 secuencias de la región control del ADNmt, verificamos mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de GENBANK (Benson et al., 2013) que todas nuestras amplificaciones pertenecían a la especie *Salmo trutta*. Se eliminaron aquellas secuencias que no cumplieran con dicho criterio o que su amplificación no fue concluyente.

Alineación con secuencias externas

Utilizamos el programa MEGA11 (Tamura et al., 2021) para cargar nuestros archivos FASTA, con las secuencias de Chile y las secuencias Externas. Utilizamos el programa ClustalW (*Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW*, 2024) para la alineación de las secuencias y recortamos los extremos con el fin de obtener todas las secuencias con la misma longitud. Este archivo fue guardado en formato FASTA para análisis posteriores.

Haplotipos no redundantes

Utilizamos el programa TCS Network (Clement et al., 2002; Templeton et al., 1992) para obtener información sobre las secuencias repetidas y que se agrupan en haplotipos con un representante. Para ello cargamos nuestras secuencias. Determinamos los gaps como información perdida (missing) e iniciamos el análisis; esto nos entregó un archivo .graph con la información resumida. Este método también fue aplicado a las secuencias externas a Chile descargadas y alineadas previamente. Obteniendo cuales de nuestras secuencias representan a las secuencias externas a Chile.

Análisis descriptivos

Para estudiar las poblaciones de *Salmo trutta*, se calcularon los valores de π (diversidad nucleotídica), h (número de haplotipos), H_d (diversidad haplotípica) y s (número de sitios segregantes) mediante un análisis de: sitios polimórficos; y ADN polimórfico para todas nuestras secuencias de Chile. Todos estos análisis se realizaron mediante el programa DNAsp v6 (Rozas et al., 2017) y nos ayudaron a determinar si la especie invasora proviene de una población fundadora específica o si han habido múltiples eventos de invasión de diferentes fuentes.

Red de haplotipos

Se construyó una red de haplotipos para determinar las relaciones de parentesco entre haplotipos de trucha café del rango introducido mediante un análisis de parsimonia utilizando el algoritmo TCS Network (Clement et al., 2002). Las secuencias se cargaron y se determinaron los gaps como información perdida (missing). La representación gráfica de la información obtenida se hizo a través del software PopART 1.7 (Leigh and Bryant, 2015). Este análisis nos permitió determinar la frecuencia de los haplotipos y su distribución en las cuencas de Chile.

Posteriormente utilizamos las 123 secuencias de haplotipos de *Salmo trutta* del rango nativo obtenidas de Splendiani et al. (2016), en los cuales se encontraba la región control completa. Estas secuencias fueron cargadas en conjunto con haplotipos del rango introducido para construir una red de haplotipos nativos-introducidos conjunta.

Distancia genética

Las distancias genéticas intra e interpoblacionales fueron calculadas con el software MEGA11 utilizando como método de Máxima Verosimilitud Compuesta o Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Sometimos a estos análisis nuestras secuencias no redundantes de Chile y además las secuencias Externas que poseen representantes en Chile.

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Utilizamos R, un entorno de programación y lenguaje para análisis y visualización de datos (R Core Team, 2023) para el desarrollo de nuestros gráficos PCoA, en conjunto con las matrices de distancia genética obtenidas en MEGA11. Para ello utilizamos la librería *vegan* (Oksanen et al., 2022) que nos permitió realizar el cálculo y representación del gráfico con su función “*cmdscale*”. Adicionalmente utilizamos las librerías *ggplot* (Wickham, 2016) y *ggrepel* (Slowikowski, 2024) para modificar nuestro gráfico visualmente.

Mapa de muestreo y distribución de puntos

Utilizamos el programa ArcMap (*ArcMap*, 2020) para la creación de nuestro mapa, la identificación de las cuencas y la distribución de los haplotipos en Chile. Utilizamos información obtenida del sitio web de Infraestructura de Datos Geospaciales (IDE) para la determinación de las cuencas en conjunto con la Dirección General de Aguas (DGA).

RESULTADOS

Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADNmt

Logramos obtener muestras de *Salmo trutta* a lo largo del sur de Chile mediante la extracción, amplificación (Fig.1) y secuenciación de ADNmt. Del total de muestras de trucha café que conserva el laboratorio GEECLAB, extrajimos y amplificamos 102 muestras. De dicho total se secuenciaron 95 muestras. Con esto obtuvimos información que abarca un rango geográfico desde la región de la Araucanía hasta la región de Magallanes. Obtuvimos información de 55 de las 103 localidades recolectadas por GEECLAB (53.40%), nuestras 95 muestras secuenciadas representan el 4.54% de las 2091 muestras de tejido de trucha café almacenadas en criotubos.

La edición de las muestras con el programa Geneious Prime (*Geneious 2023.0.4* (<https://www.geneious.com>), 2023) nos dio como resultado 95 muestras de 924 pb. Estas representan 8 cuencas del sur de Chile (código DGA de cada cuenca entre paréntesis) tales como: Río Toltén (94), Río Valdivia (101), Río Bueno (103), Cuencas e islas entre río Bueno y río Puelo (104). Cuencas costeras entre río Puelo y Río Yelcho (106), Isla Chiloe y circundantes (109), Cuencas costeras e islas entre río Holleberg, Golfo Alte. Laguna Blanca (124) y Cuencas costeras entre Laguna Blanca, seno Otway, canal Jeronimo y Magallanes (125).

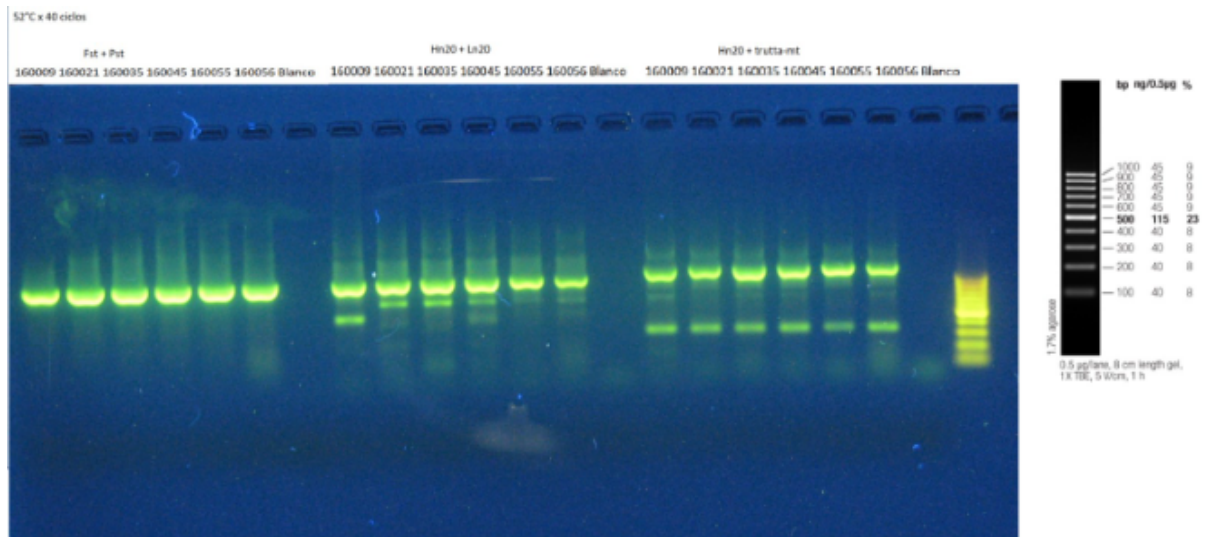


Figura 1. Gel de electroforesis con amplificación de la región control del ADNmt usando tres pares de primers.

Análisis Filogenéticos

Búsqueda de similitudes

La herramienta BLAST de GenBank en conjunto con el programa Geneious Prime dio como resultado que 90 de nuestras 95 muestras pertenecen a la especie *Salmo trutta* y no tuvieron errores en su secuenciación como se señala en la Tabla 8.

Alineación con secuencias externas

Utilizando el programa MEGA11 se obtuvieron 213 secuencias de la región control del ADNmt de la trucha café, de ellas 90 provienen del rango introducido en Chile y 123 del rango nativo. Cada secuencia tuvo una longitud de 927 pb con 73 sitios variables de los cuales 8 sitios son parsimoniosamente informativos.

Haplotipos no redundantes

El programa TCS Network nos entregó un resumen en el cual nuestras 90 secuencias se agrupaban en torno a 12 haplotipos (Tabla 3). El haplotipo 1 presenta la mayor frecuencia con 67 coincidencias (76,66%), seguido del haplotipo 65 con 11 coincidencias (12,22%). Nuestras otras 10 secuencias no tienen coincidencias por lo cual son únicas y se auto representan.

Tabla 3. Secuencias distribuidas en doce haplotipos no redundantes de la región control mitocondrial de la trucha café.

Haplotipo 1	Str160007, Str210186, Str210191, Str210012, Str210021, Str210039, StrutTLS2013_006, StrutTLS2013_008, StrutTLS2013_013, StrutTLS2013_021, StrutTLS2013_003, StrutTLS2014_140, StrutTLS2014_144, StrutTLS2014_170, StrutTLS2014_226, StrutTLS2014_014, StrutTLS2014_048, Str160081, Str160076, StrutTLS2014_018, StrutTLS2014_046, Str160066, Str160075, Str160079, Str210032, Str210033, Str160099, Str160089, Str160090, Str210169, Str210170, Str160014, Str160078, Str210036, Str210038, Str210167, Str210171, Str210174, Str210178, Str210182, Str210183, Str210188, Str210044, Str210047, Str210052, Str210061, Str210063, Str210077, Str210051, Str160112, Str160265, Str210064, Str210066, Str210065, Str210074, Str210086, Str210087, Str210089, Str210090, Str160247, Str160248, Str160255, Str160258, Str160378, Str160021, Str160035, Str160045, Str160056									
Haplotipo 65	Str160380, Str160376, Str160377, Str160393, Str160394, Str160407, Str160410, Str210102, Str160375, Str160384, Str160406									
Haplotipo	66	89	106	39	40	104	3	7	42	63
Código	Str160383	Str210091	Str160032	Str210131	Str210153	Str160055	Str210181	Str210001	Str210142	Str210076

Realizamos este proceso utilizando las 169 secuencias del rango nativo ya alineadas y recortadas, lo que nos dio como resultado que 6 secuencias coinciden directamente con 2 de nuestras 12 secuencias. Como se puede observar en la tabla 4, 1 secuencia de rango nativo (AF273086) se ve representada por el haplotipo 1 y otras 2 secuencias Externas (AF273087.1, EF530483.1) se ven asociar a el haplotipo 65. Estos haplotipos descritos por Cortey et al. (2009) corresponden a muestras obtenidas en Europa, en países como España, Francia, Dinamarca, Islas Británicas, Noruega e Islandia. En la tabla 5 podemos observar esta

información con mayor detalle. Los haplotipos ATcs1 y ATcs2 provienen de Hatchery en España de origen Alemán.

Tabla 4. Haplotipos redundantes de Chile y sus coincidencias con secuencias Externas.

Haplotipo	Coincidencias
1	AF273086
3	
7	
42	
63	
65	AF273087, EF530483
66	
89	
106	
39	
40	

Tabla 5. Resumen de los ríos de origen de los haplotipos descritos por Cortey et al. (2009).

Haplotipo Chileno	Haplotipo Europeo	Código	País	Ríos
1	ATcs1	AF273086	España	Hatchery stocks
				Garona
			Francia	Gulf of Biscay
			Dinamarca	Jutland
			Islas Británicas	
			Noruega	
		Islandia		
2	ATcs2	AF273087	España	Hatchery stocks
			Francia	Gulf of Biscay
			Dinamarca	Jutland
			Islas Británicas	
			Noruega	
			Rusia	
	ATcs21	EF530483	España	Minho

Las secuencias del rango introducido tienen una longitud de 972 pb, mientras que las secuencias del rango nativo obtenidas desde Genbank tienen una longitud de 1013 pb (Cortey et al., 2009; Cortey & Garcia-Marin, 2002). Por ello al comparar las secuencias ATcs2 y ATcs21 dentro de nuestro fragmento de 972 pb no obtuvimos diferencias, no obstante podemos observar que en el sitio 989 se presenta un sitio parsimoniosamente informativo que diferencia ambos haplotipos. En el sitio 989 ATcs2 presenta una timina(T) mientras que ATcs21 presenta una citosina (C) como se observa en la Fig.2.

Figura 2. Secuencias 1 y 65 del rango introducido en Chile junto a secuencias del rango

nativo		Europeo	ATcs1,	ATcs2	y	ATcs21.	
1	863	GCACCACTTT	TATAATTAAA	GTATACATTA	ATAAACTTTT	CGCTAAATTT	TATAACATTT
65	863	GCACCACTTT	TATAATTAAA	GTATACATTA	ATAAAATTTT	CGCTAAATTT	TATAACATTT
ATcs1	900	GCACCACTTT	TATAATTAAA	GTATACATTA	ATAAACTTTT	CGCTAAATTT	TATAACATTT
ATcs2	900	GCACCACTTT	TATAATTAAA	GTATACATTA	ATAAAATTTT	CGCTAAATTT	TATAACATTT
ATcs21	900	GCACCACTTT	TATAATTAAA	GTATACATTA	ATAAAATTTT	CGCTAAATTT	TATAACATTT
1	923	AG-----	-----	-----	-----	-----	---
65	923	AG-----	-----	-----	-----	-----	---
ATcs1	960	AGCACCGACT	CCACTGTCAT	TAGCACCCCTC	TCAATCAAAC	ATATAAAGGC	CTA
ATcs2	960	AGCACCGACT	CCACTGTCAT	TAGCACCCCTC	TCAATCAAAC	ATATAAAGGC	CTA
ATcs21	960	AGCACCGACT	CCACTGTCAT	TAGCACCCCTC	TCAATCAAAC	ATATAAAGGC	CTA

Análisis descriptivos

La información de las secuencias analizadas mediante DNAsp 6 utilizando el análisis de sitios polimórficos nos da como resultado: 851 sitios invariables y 73 sitios polimórficos. De estos últimos, 8 se consideran sitios parsimoniosamente informativos. Los 65 restantes caen en la categoría de variables únicas (singletons).

Utilizando el análisis de polimorfismo del ADN en DNAsp 6 obtuvimos que las 90 secuencias de *Salmo trutta* del rango introducido se dividen en 12 haplotipos ($h=12$) con una diversidad de haplotipos de 0,404 (Hd). Presentan moderada variabilidad genética, los valores de varianza (0,00395), desviación estándar (0,063) y el promedio de diferencias de nucleótidos ($k=2,281$) también son obtenidos en este análisis.

Red de haplotipos

Utilizando nuestras 90 secuencias, la información obtenida de TCS Network y la generación de redes de PopART 1.7 se obtuvo la siguiente red de haplotipos (Fig.3). En ella se observan con una escala de colores las distintas cuencas muestreadas. Los círculos representan los 12 haplotipos del rango introducido. El tamaño de los mismos representa la

frecuencia de cada haplotipo, mientras que las líneas que cortan las uniones representan las variaciones entre los nodos.

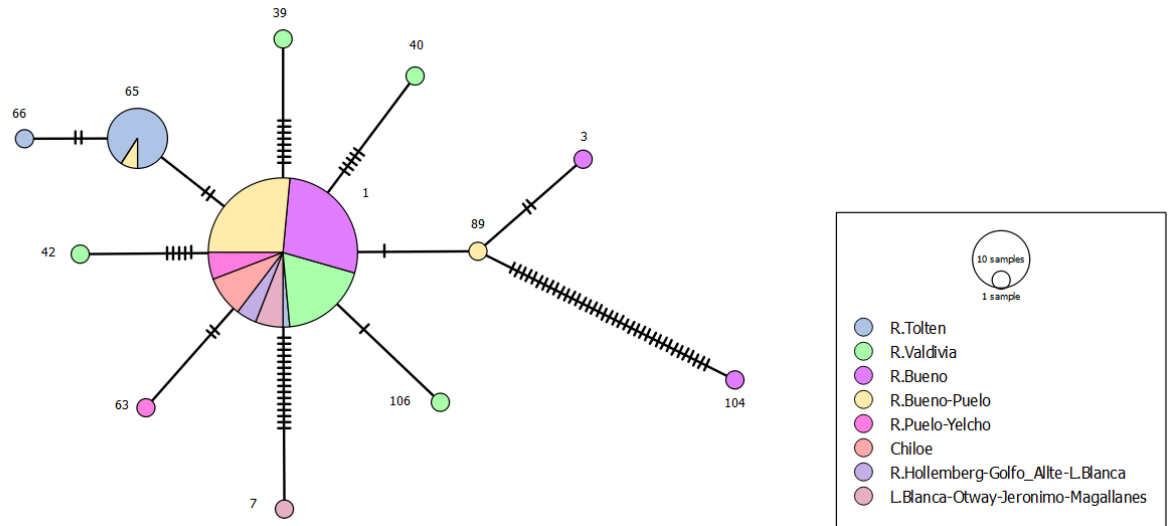


Figura 3. Red de haplotipos, muestra 12 secuencias, la frecuencia de muestras por secuencia además de la distribución en las cuencas. Los colores representan cuencas muestreadas del rango introducido (código DGA de cada cuenca entre paréntesis): Río Tolten (94), Río Valdivia (101), Río Bueno (103), Cuencas e islas entre río Bueno y río Puelo (104), Cuencas costeras entre río Puelo y Río Yelcho (106), Isla Chiloe y circundantes (109), Cuencas costeras e islas entre río Holleberg, Golfo Alte. Laguna Blanca (124) y Cuencas costeras entre Laguna Blanca (inc), seno Otway, canal Jeronimo y Magallanes (125).

Al crear la siguiente red de haplotipos conjunta se usaron las 123 secuencias del rango nativo de Europa alineadas con nuestras secuencias de rango introducido en Chile (Fig.4). Como observamos la totalidad de nuestras muestras se agrupan en el linaje Atlántico (AT) verificando que nuestras muestras pertenecen a dicho linaje. Notamos que al igual que en la figura (3), nuestros haplotipos 1 y 65 son los principales representantes en cuanto a Chile se refiere.

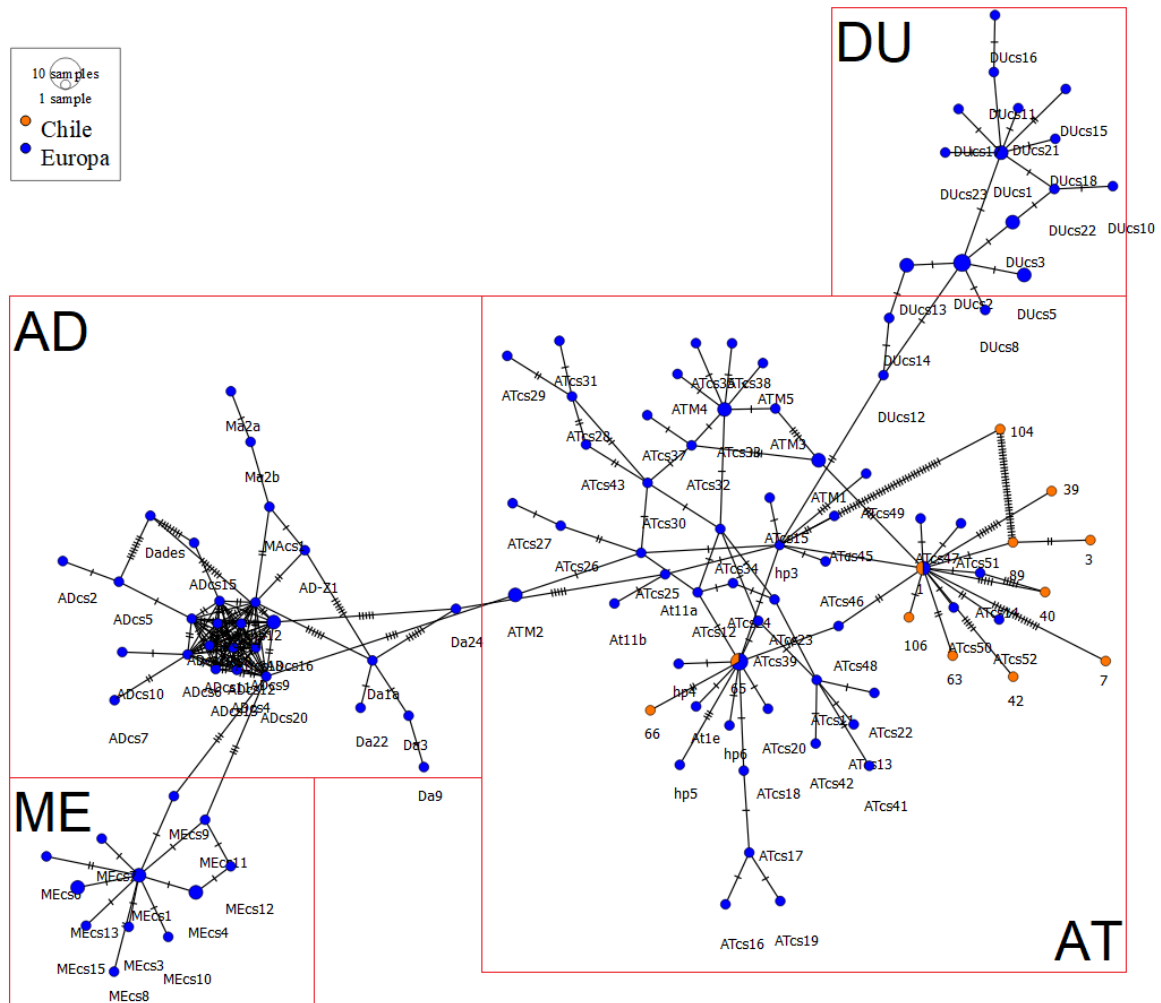


Figura 4. Red de haplotipos generada utilizando 123 secuencias del rango nativo en Europa (Azul) y 12 secuencias del rango introducido en Chile (Anaranjado) de la trucha café. Mediterraneo (ME), Adriatico (AD), Atlantico (AT), Duero (DU)

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

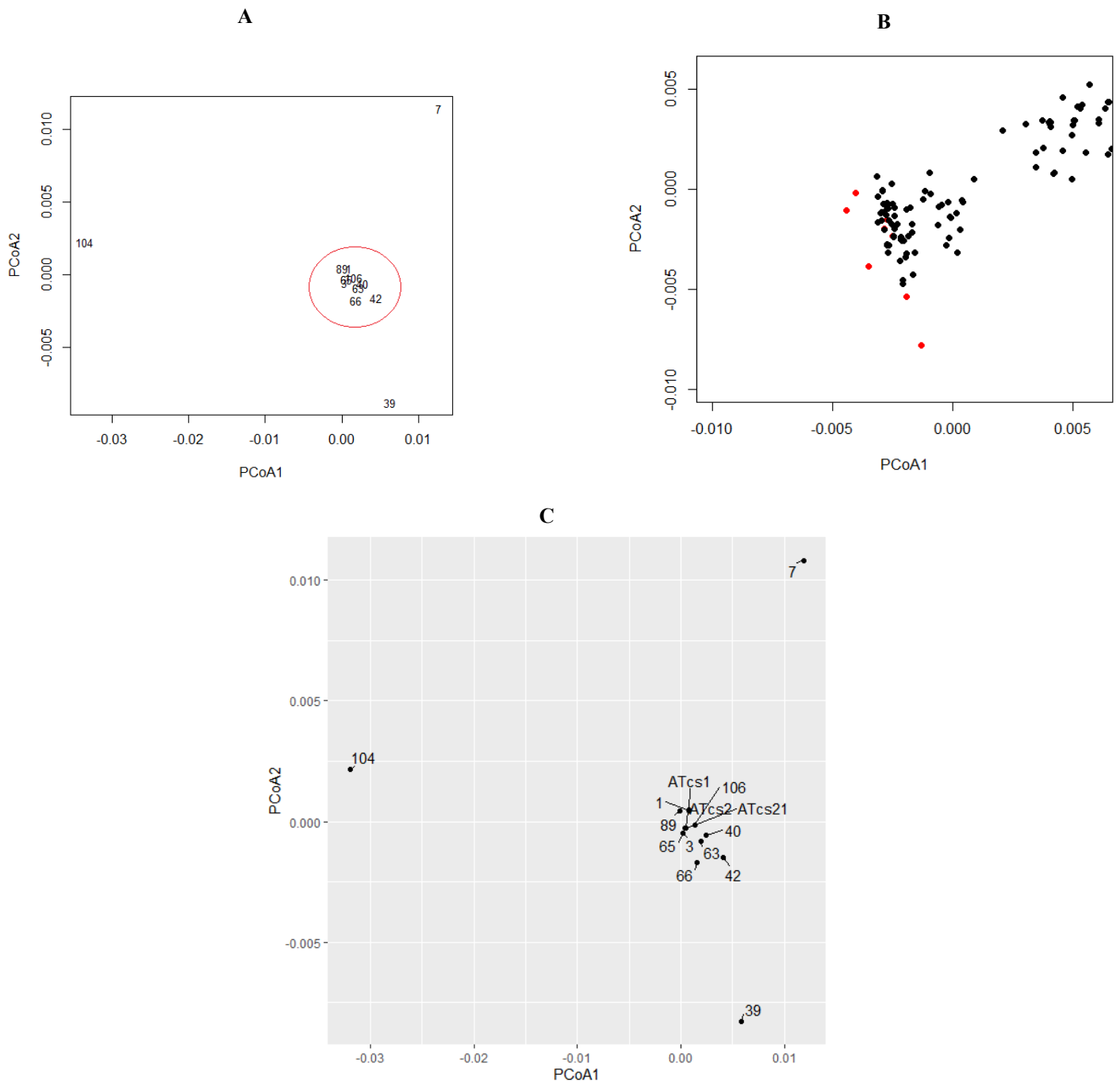
Al realizar los Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en conjunto con la matriz de distancia genética (Tabla 6) obtuvimos los siguientes gráficos (Fig.5). En ellos podemos observar que en Chile existen 9 haplotipos estrechamente relacionados: 1, 3, 42, 63, 65, 66, 89, 106 y 40. Por otro lado, encontramos 3 haplotipos muy distanciados del grupo: 7, 39 y 104). Esta información se corresponde con nuestra red de haplotipos (Fig.2), siendo los

haplotipos 1 y 65 los principales (A). Al añadir las 123 secuencias de rango nativo obtuvimos un gráfico difícil de leer (B) por la saturación de información por lo que decidimos filtrar las secuencias Europeas seleccionando aquellas con menor distancia obteniendo la tercera imagen (C). En ella observamos como estos haplotipos Externos se encuentran estrechamente relacionados con nuestros haplotipos principales formando dos grupos.

Tabla 6. Matriz de distancia genética entre los haplotipos presentes en Chile.

	1	3	7	42	63	65	66	89	106	39	40	104
1												
3	0.002611											
7	0.014083	0.016761										
42	0.00436	0.006991	0.016763									
63	0.00174	0.004359	0.015869	0.006114								
65	0.001739	0.004358	0.015865	0.006112	0.003484							
66	0.003484	0.006111	0.017658	0.006112	0.005235	0.00174						
89	0.000869	0.001739	0.014976	0.005236	0.002612	0.002611	0.004359					
106	0.000869	0.003483	0.014971	0.005235	0.002611	0.00261	0.004358	0.001739				
39	0.00699	0.009633	0.021254	0.011406	0.008752	0.00875	0.010518	0.007871	0.007868			
40	0.00436	0.006991	0.016763	0.007874	0.006114	0.006112	0.007872	0.005236	0.005235	0.011406		
104	0.033982	0.033982	0.047043	0.038609	0.035828	0.033992	0.035842	0.033059	0.034894	0.041387	0.036751	

Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de una matriz de distancia genética de la región control del ADNmt de individuos de trucha café. A) PCoA obtenido a partir de 12 secuencias del rango introducido en Chile. B) PCoA obtenido al integrar 123 secuencias del rango nativo y 12 secuencias del rango introducido. C) PCoA realizado utilizando 12 secuencias de rango introducido en Chile en conjunto con los 3 haplotipos de rango nativo con menor distancia genética a nuestras secuencias.



Distribución espacial de haplotipos muestreados

Nuestro mapa construido en ArcGis 10.8.2 se muestra a continuación (Fig.6). Se puede observar que las 90 secuencias analizadas cubren las primeras siete cuencas de desde el Río Toltén en la Región de la Araucanía hasta las Isla de Chiloé; los sitios de muestreo más apartados corresponden a cuencas de la Región de Magallanes. Podemos apreciar la distribución de nuestros 12 haplotipos identificados en el sur de Chile, las secuencias pertenecientes a el Haplotipo 1 se encuentran extensamente distribuidas, mientras que el haplotipo 65 y 66 (un haplotipo único estrechamente relacionado), están casi en su totalidad en la cuenca del Río Toltén (94). El resto de haplotipos son únicos y se distribuyen a lo largo del sur de Chile. Observamos esta información resumida en la Tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia de nuestros haplotipos en las cuencas del sur de Chile.

Cuencas	N	Frecuencia de Haplotipos											
		Hp 1	Hp 3	Hp 7	Hp 39	Hp 40	Hp 42	Hp 63	Hp 65	Hp 66	Hp 89	Hp 104	Hp 106
Río Toltén	12	1							10	1			
Río Valdivia	18	14			1	1	1						1
Río Bueno	21	19	1									1	
C. entre Río Bueno y Río Puelo	20	18							1		1		
C. entre Río Puelo y Río Yelcho	5	4						1					
Isla Chiloe	6	6											
C. entre Río Hollemberg...	3	3											
C. entre Laguna Blanca (inc)...	5	4		1									
Σ	90	69	1	1	1	1	1	1	11	1	1	1	1

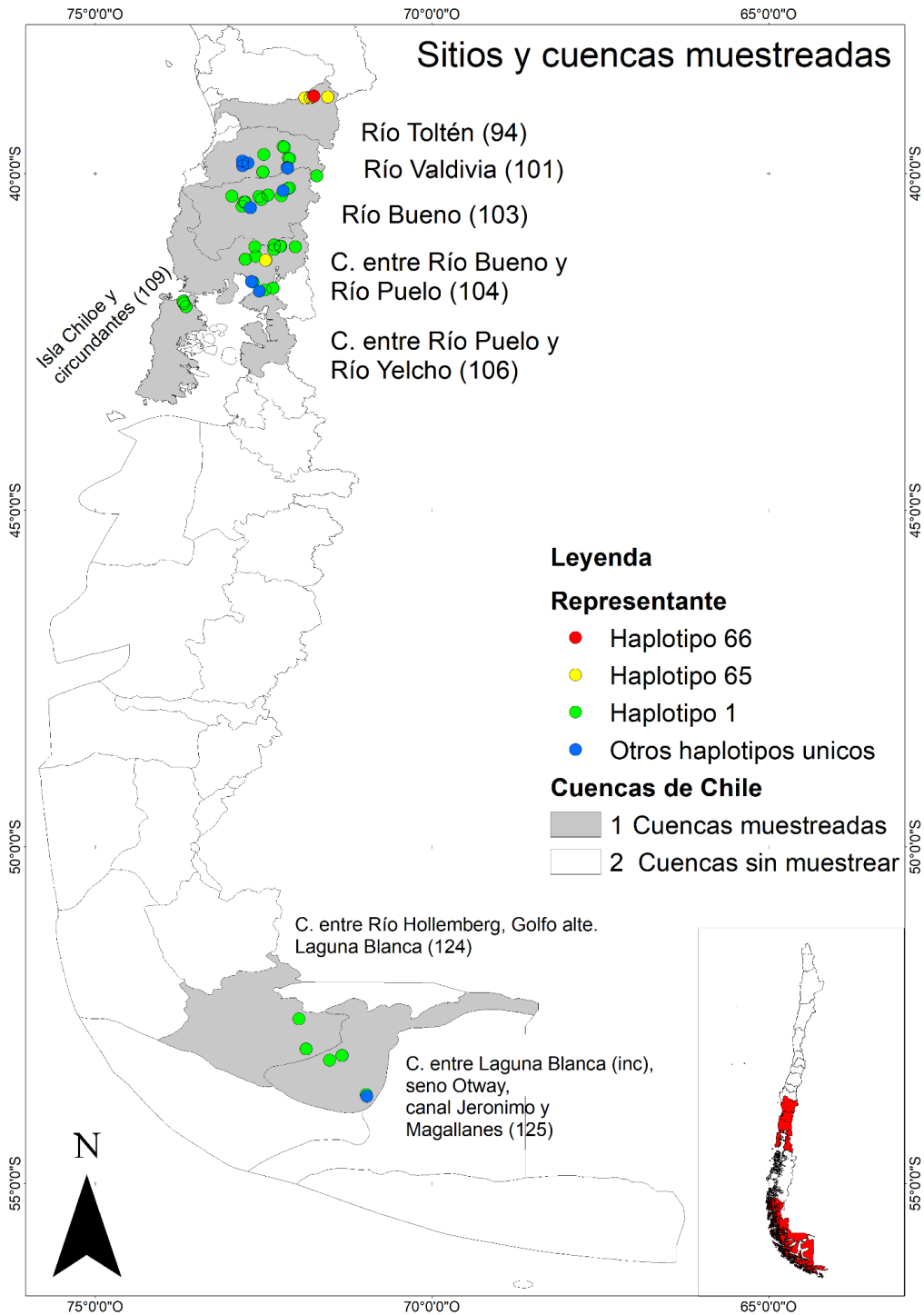


Figura 6. Mapa de distribución de muestras secuenciadas a lo largo de 8 cuencas. Los puntos de color representan los haplotipos; Rojo: 66; Amarillo: 65; Verde: 1; y en Azul los otros 9 haplotipos. En color gris resaltan las cuencas que hemos muestreado.

DISCUSIÓN

Obtuvimos como resultado que las poblaciones de trucha café presentes actualmente en Chile tienen un origen filogenético en el linaje del Atlántico (AT) descrito por Bernatchez et al. (1992) y Hamilton et al. (1989) este linaje es el más extendido y diverso de Europa. Dada su amplia distribución en el rango nativo, resulta esperable que las muestras analizadas en el rango introducido pertenecieran a dicho linaje, pues a él pertenecen los haplotipos característicos de hatchery como ATcs1,2,3,4. Dentro de las 90 secuencias del rango introducido analizadas logramos identificar dos haplotipos principales, que llamamos haplotipo 1 y haplotipo 65. Nos referimos a ellos como principales puesto que son aquellos que presentaron mayores frecuencias. El haplotipo 1 corresponde, según nuestros resultados, al haplotipo ATcs1 descrito por Cortey et al. (2009), que está presente en España, Francia, Dinamarca, Islas Británicas, Noruega e Islandia. Esto se puede explicar debido a que ATcs1 es clasificado como un haplotipo de hatchery, aunque el origen de este haplotipo tiene distintas interpretaciones. Cortey et al. (2002) menciona que el haplotipo ATcs1 (llamado haplotipo 1 en ese año) bajo el código AF273086 proviene de hatcheries en España con origen en Alemania. Sin embargo, Cortey et al. (2009) menciona a ATcs1 como un haplotipo cuyo origen es Alemania, mientras que Vera et al. (2010) indica que tiene un origen en España. Por lo cual consideramos que la respuesta al origen del haplotipo 1 presente en Chile debe ser que provino de un hatchery de España vía introducciones desde Alemania.

En cuanto a nuestro segundo haplotipo principal en Chile, el haplotipo 65, obtuvimos dos secuencias que coinciden con nuestra muestra, los haplotipos ATcs2 y ATcs21, ambos descritos por Cortey et al. (2009). En este caso ATcs2 tiene una descripción idéntica a ATcs1, puesto a que se encuentra dentro de los clasificados como “haplotipos hatchery” donde encontramos a ATcs1, ATcs2, ATcs3 y ATcs4 (Cortey et al., 2009). El segundo haplotipo que

mencionamos ATcs21 no es descrito como proveniente de hatchery, pertenece a una muestra silvestre de España que se puede encontrar en el Río Minho de acuerdo a Cortey et al. (2009). La información que nos entrega nuestro fragmento de 927 pb sugiere que tanto ATcs2 como ATcs21 son idénticos. Sin embargo, nuestros análisis revelan en la Fig.2, que en el sitio 989 hay una sustitución, por lo que no podemos distinguir entre ellas dentro del segmento observado..

La Información filogeográfica obtenida en esta investigación es concordante con los registros históricos documentados por Basulto (2003) en los cuales menciona tres introducciones desde Alemania hacia Chile, dos veces el año 1905 y una en 1908, este último también se realizó una introducción desde España proveniente de un lugar llamado “Monasterio de Piedra”. Todas estas con destino en Río Blanco, Valparaíso, desde donde se realizaron diversas y numerosas siembras. Esto resulta interesante dado que, como se esperaba, Alemania figura como uno de los principales donadores de haplotipos de trucha café lo cual coincide con el trasplante de trucha café desde hatcheries de Alemania y criaderos españoles, tales como ATcs1 y ATcs2. Esto refuerza la idea que la mayoría de las truchas café caracterizadas en el rango introducido en Chile se habrían originado desde poblaciones de cautiverio ubicadas en Alemania

Los estudios filogenéticos de *Salmo trutta* en Chile son escasos. Faundez et al. (1997) plantea que las poblaciones de trucha café en Chile podrían tener un origen mixto, refiriéndose a un linaje ancestral proveniente de la zona sur de Europa y el Mediterráneo, y un linaje moderno presente en centro y norte de Europa (Hamilton et al., 1989). Colihueque et al. (2003) apoya la hipótesis de una mezcla de poblaciones, con la incerteza de si dicho evento se produjo en Europa o en Chile. Riffel et al. (1995) presenta la existencia de poblaciones de Europa Central (Alemania), más relacionadas con el grupo moderno mencionado previamente, teniendo entonces tres posibles orígenes para las poblaciones

presentes en Chile (Colihueque et al., 2003). Nuestra información obtenida nos indica que los haplotipos presentes en Chile pertenecen al linaje Atlántico (AT), posiblemente ancestral del cual derivan el resto de linajes y que se encuentra distribuido desde el sur a el norte de Europa (Bernatchez, 2001) incluyendo Alemania como sugiere Riffel et al. (1995). Sin embargo, no podemos determinar si ocurrió o no una mezcla de haplotipos previo a la introducción o una vez aclimatados, dado que tanto ATcs1 como ATcs2 suelen ser utilizados en hatcheries o programas de crianza.

Nuestros resultados indicaron que el haplotipo 1 secuenciado en el rango introducido de trucha café en Chile es el más abundante y extendido, abarcando desde la Araucanía hasta Magallanes, representado el 76,66% de nuestra información. Seguido por el haplotipo 65, el cual representa el 12,22%, añadimos que la distribución de este haplotipo se concentra principalmente en la cuenca del Río Toltén (10 de las 11 muestras) lo que nos hace plantearnos si hacia el norte de esta cuenca podríamos notar un aumento de este haplotipo a la par de una disminución del haplotipo 1. Además, como se observó en la Fig.3, existe el haplotipo 66 muy relacionado a 65, que solo observamos en la cuenca del Río Toltén. En cuanto al resto de haplotipos, presentan desde leves variaciones genéticas como los haplotipos 3, 63, 89 y 106 que poseen máximo 3 variaciones con respecto al haplotipo 1, mientras que 7, 39, 40 y 104 presentan entre 5 hasta 38 variaciones. Considerando que la ventana de tiempo desde la introducción de esta especie en Chile es de más de 120 años y que *Salmo trutta* presenta una tasa relativamente alta de diferenciación población como se observó en los estudios de Krueger & May (1987), planteamos la posibilidad de que las condiciones locales y/o el efecto fundador provocan cierto grado de divergencia respecto a las poblaciones originales como sugiere Colihueque et al. (2003); estos resultados nos hacen considerar la aparición de haplotipos propios de Chile, como lo sucedido en Japón por

Berrebi et al. (2020) con la descripción de ATcs53, producto de la deriva genética de introducciones de inicios del siglo XX; a excepción de nuestro haplotipo 104, el cual presenta 38 pasos mutacionales, por lo que no resulta acorde a la idea de un proceso de divergencia en el periodo de 120 años, por lo que no consideramos que se explique por este proceso, pero pueda estar ligado a una reintroducción o proveniente de un proceso divergente de otro sector no estudiado.

CONCLUSIÓN

El uso de herramientas filogeográficas en la trucha café introducida en Chile identifica a su ancestro común en Europa, dentro del linaje ancestral del Atlántico (AT), que es el más extendido desde el sur hasta el norte de Europa. En Chile, la especie *Salmo trutta* se divide en 12 haplotipos, siendo el haplotipo 1 el más representado, seguido del haplotipo 65 y otros 10 haplotipos únicos. Las muestras con el haplotipo 1 tienen como ancestro común al haplotipo ATcs1, propuesto por Cortey y Garcia-Marin (2002). Este haplotipo, identificado en un criadero español con origen alemán, es uno de los cuatro más comunes debido a su uso en la industria de crianza de salmones. El haplotipo 65 se relaciona con dos secuencias propuestas (Cortey et al., 2009; Cortey & Garcia-Marin, 2002): ATcs2, muy relacionado con ATcs1 y también de origen alemán, y ATcs21, un haplotipo netamente español del Río Miño. Nuestro segmento de 927 pb no permitió diferenciar entre estas secuencias debido a la ubicación del sitio variable en la posición 989. Las 10 secuencias adicionales obtenidas no presentaron coincidencias directas en Europa, sugiriendo la posibilidad de un proceso evolutivo local en Chile, aunque esto no puede confirmarse con certeza.

BIBLIOGRAFÍA

- Aladrén, F. J. O. (2019). *The invasion of the red swamp crayfish: Introductions, impacts and management*. [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Sevilla].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=226080>
- Albert, F. (1902). *LA INTRODUCCIÓN DE LOS SALMONES*. Cervantes.
- ArcMap (10.8.2). (2020). [Software de SIG]. Esri.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Basulto Del Campo, S. (2003). «*El largo viaje de los salmones*». *Una cronica olvidada. Propagacion y cultivo de especies acuáticas en Chile*. Gobierno de Chile : Sernapesca.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bernatchez, L., & Danzmann, R. G. (1993). Congruence in Control-Region Sequence and Restriction-Site Variation in Mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus Fontinalis* Mitchill). *Molecular Biology and Evolution*.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040062>
- Bernatchez, L., Guyomard, R., & Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1(3), 161-173.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00172.x>
- Berrebi, P., Marić, S., Snoj, A., & Hasegawa, K. (2020). Brown trout in Japan – introduction history, distribution and genetic structure. *Knowledge & Management of Aquatic*

Ecosystems, 421, Article 421. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020004>

Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., Wilson, J. R.

U., & Richardson, D. M. (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(7), 333-339.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>

Clement, M., Snell, Q., Walke, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene

genealogies. *Proceedings 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium*, 7 pp-. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2002.1016585>

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: Genetic variability in naturalized brown trout. *Aquaculture Research*, 34(7), 525-533. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00847.x>

Cortey, M., & Garcia-Marin, J.-L. (2002). Evidence for phylogeographically informative

sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *Journal of Fish Biology*, 60(4), 1058-1063.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02429.x>

Cortey, M., Vera, M., Pla, C., & García-Marín, J.-L. (2009). Northern and Southern

expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(4), 904-917.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01220.x>

Elton, C. C. (1958). *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Springer Netherlands.

<https://doi.org/10.1007/978-94-009-5851-7>

Faundez, V., Blanco, G., Vázquez, E., & Sánchez, J. A. (1997). Allozyme variability in

brown trout *Salmo trutta* in Chile. *Freshwater Biology*, 37(3), 507-514.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00173.x>

- Geneious 2023.0.4* (<https://www.geneious.com>). (2023). [Software].
- Golusda, P. (1907). *LA INTRODUCCIÓN DEL SALMON EN CHILE*. Imprenta Cervantes.
- Habit, E., Gonzalez, J., Ruzzante, D. E., & Walde, S. J. (2012). Native and introduced fish species richness in Chilean Patagonian lakes: Inferences on invasion mechanisms using salmonid-free lakes. *Diversity and Distributions*, *18*(12), 1153-1165.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00906.x>
- Hamilton, K., Ferguson, A., Taggart, J., Tomasson, T., Walker, A., & Fahy, E. (1989). Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: Ldh-5 as a phylogeographic marker locus. *Journal of Fish Biology*, *35*, 651-664.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03017.x>
- Invasiones Biológicas – Especies Exóticas Invasoras*. (2019, septiembre).
<https://especies-exoticas.mma.gob.cl/invasiones-biologicas/>
- Kanjuh, T., Tošić, A., Piria, M., Špelić, I., Maguire, I., & Simonović, P. (2020). Diversity of brown trout, *Salmo trutta* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae), in the Danube River basin of Croatia revealed by mitochondrial DNA. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, *50*, 291-300. <https://doi.org/10.3750/AIEP/02939>
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O’Connor, M. F., Connell, & Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): A review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, *12*(1), 1.
- Krueger, C. C., & May, B. (1987). Stock Identification of Naturalized Brown Trout in Lake Superior Tributaries: Differentiation Based on Allozyme Data. *Transactions of the American Fisheries Society*, *116*(6), 785-794.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1987\)116<785:SIONBT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)116<785:SIONBT>2.0.CO;2)
- Mack, R., Simberloff, D., Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., & Bazzaz, F. (2000). Biotic

- Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences, and Control. *Ecological Applications*, 10, 689-710. <https://doi.org/10.2307/2641039>
- Multiple Sequence Alignment—CLUSTALW*. (2024).
<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*.
<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Riffel, M., Storch, V., & Schreiber, A. (1995). Allozyme variability of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations across the Rhenanian–Danubian watershed in southwest Germany. *Heredity*, 74(3), 241.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Slowikowski, K. (2024). *ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with «ggplot2»*. <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>
- Splendiani, A., Fioravanti, T., Giovannotti, M., Negri, A., Ruggeri, P., Olivieri, L., Cerioni, P. N., Lorenzoni, M., & Barucchi, V. C. (2016). The Effects of Paleoclimatic Events on Mediterranean Trout: Preliminary Evidences from Ancient DNA. *PLOS ONE*, 11(6), e0157975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157975>
- Tamura, K., Kumar, S., & Nei, M. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by

using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, *101*, 11030-11035.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022-3027.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). TCS. *Genetics*, *132*, 619-633.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

ANEXO

Tabla 8. Resumen de las 102 muestras extraídas, señalando las que llegaron a ser secuenciadas y las que coinciden con la especie objetivo.

ID	Latitud	Longitud	Localidad	Secuenciación	BLAST
Str160002	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160003	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160004	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160005	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160006	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160007	-39.597691	-72.214612	PteNegro	X	X
Str160008	-39.597691	-72.214612	PteNegro		
Str160009	-39.70791	-72.206438	Niltre	X	
Str160010	-39.70791	-72.206438	Niltre		
Str160011	-39.70791	-72.206438	Niltre		
Str160014	-39.778838	-72.117008	Reca	X	X
Str160021	-39.608965	-72.19629	Zahuil	X	X
Str160032	-39.919329	-72.147413	Huechulafquen	X	
Str160035	-39.914645	-72.14957	Estero Venado	X	X
Str160045	-39.90842	-72.149308	PteBlanco	X	X
Str160055	-40.254103	-72.211261	Calcurrupe	X	X
Str160056	-40.211341	-72.122199	Curanilahue	X	X
Str160066	-40.319201	-72.43741	Iculpe	X	X
Str160075	-40.319201	-72.43741	Iculpe	X	X
Str160076	-40.3316833	-72.2416	Riñinahue	X	X
Str160078	-39.771848	-72.131463	Punir	X	X
Str160079	-40.33835	-72.5726833	Ignao	X	X
Str160081	-40.33835	-72.5726833	Ignao	X	X
Str160089	-40.0335667	-71.7133667	Hua Hum	X	X
Str160090	-40.0335667	-71.7133667	Hua Hum	X	X
Str160099	-39.7152667	-72.5003667	Manio	X	X
Str160112	-40.48751	-72.82166	Chirre	X	X
Str160247	-40.3858333	-72.5361111	Coique	X	X

Str160248	-40.3858333	-72.5361111	Coique	X	X
Str160255	-41.2883	-72.4708833	Pata	X	X
Str160258	-40.42375	-72.7903333	Currileufu	X	X
Str160265	-40.42375	-72.7903333	Currileufu	X	X
Str160375	-38.8649	-71.7775	Los Arriesgados	X	X
Str160376	-38.8628667	-71.5503833	Sahuelhue	X	X
Str160377	-38.8628667	-71.5503833	Sahuelhue	X	X
Str160378	-38.8628667	-71.5503833	Sahuelhue	X	X
Str160380	-38.8510167	-71.7591167	Pte Matanza	X	X
Str160383	-38.8510167	-71.7591167	Pte Matanza	X	X
Str160384	-38.8510167	-71.7591167	Pte Matanza	X	X
Str160393	-38.8774167	-71.89065	PteNegro	X	X
Str160394	-38.8774167	-71.89065	PteNegro	X	X
Str160406	-38.8748167	-71.8108	Llaima	X	X
Str160407	-38.8748167	-71.8108	Llaima	X	X
Str160410	-38.8748167	-71.8108	Llaima	X	X
Str210001	-53.69902	-70.96899	SanPedro	X	X
Str210012	-53.67397	-70.97751	SantaMaria	X	X
Str210021	-53.16475	-71.52512	Rio Canelo	X	X
Str210032	-53.09558	-71.33515	Río Grande Ottway Senso	X	X
Str210033	-53.09558	-71.33515	Río Grande Ottway Senso	X	X
Str210036	-52.9985	-71.87289	Rio Grande Riesco Isla	X	X
Str210038	-52.9985	-71.87289	Rio Grande Riesco Isla	X	X
Str210039	-52.55151	-71.98015	RioPerez	X	X
Str210044	-41.97701	-73.65348	Puente Inglés	X	X
Str210047	-41.97701	-73.65348	Puente Inglés	X	X
Str210051	-41.9268	-73.68778	Río Huillinco	X	X
Str210052	-41.9268	-73.68778	Río Huillinco	X	X
Str210061	-41.89602	-73.69811	Río_Cumpillen	X	X
Str210063	-41.89602	-73.69811	Río_Cumpillen	X	X
Str210064	-41.70306	-72.36181	Puente Yates	X	X
Str210065	-41.70306	-72.36181	Puente Yates	X	X

Str210066	-41.70306	-72.36181	Puente Yates	X	X
Str210074	-41.72879	-72.48087	Río Llaguepe	X	X
Str210076	-41.74804	-72.56881	Río Chaparano	X	X
Str210077	-41.74804	-72.56881	Río Chaparano	X	X
Str210086	-41.61526	-72.65858	Río Lenca	X	X
Str210087	-41.61526	-72.65858	Río Lenca	X	X
Str210089	-41.60641	-72.68319	Río Chaica	X	X
Str210090	-41.60641	-72.68319	Río Chaica	X	X
Str210091	-41.60641	-72.68319	Río Chaica	X	X
Str210102	-41.28827	-72.47231	Río Pata	X	X
Str210131	-39.88454	-72.81476	Estero Machaco	X	X
Str210136	-39.87666	-72.76917	Estero Huenuhenu	X	
Str210142	-39.81392	-72.81724	Estero Huillinco	X	X
Str210153	-39.84412	-72.73464	Estero San Pedrito	X	X
Str210167	-39.97852	-72.51288	Río Trafún	X	X
Str210169	-39.97852	-72.51288	Río Trafún	X	X
Str210170	-39.97852	-72.51288	Río Trafún	X	X
Str210171	-39.97852	-72.51288	Río Trafún	X	X
Str210174	-40.42258	-72.77592	Río Carrileufu	X	X
Str210178	-40.42258	-72.77592	Río Carrileufu	X	X
Str210181	-40.50991	-72.69822	Río Muticao	X	X
Str210182	-40.50991	-72.69822	Río Muticao	X	X
Str210183	-40.50991	-72.69822	Río Muticao	X	X
Str210186	-40.33535	-72.97522	Río Contra	X	X
Str210188	-40.33535	-72.97522	Río Contra	X	X
Str210189	-40.33535	-72.97522	Río Contra	X	
Str210191	-40.22813	-72.15183	Río Calcurrepe	X	X
Str210196	-40.22688	-72.1504	Río Curanilahue	X	
StrutLL2014_014	-41.2713	-72.7754	Pescado	X	X
StrutLL2014_018	-41.2713	-72.7754	Pescado	X	X
StrutLL2014_046	-41.2713	-72.7754	Pescado	X	X
StrutLL2014_048	-41.2279	-72.621	Blanco	X	X

StrutTLS2013_003	-41.1289	-72.3489	León	X	X
StrutTLS2013_006	-41.1289	-72.3489	León	X	X
StrutTLS2013_008	-41.0871	-72.6348	Yerbas Buenas	X	X
StrutTLS2013_013	-41.062	-72.3455	Escape	X	X
StrutTLS2013_021	-41.062	-72.3455	Escape	X	X
StrutTLS2014_140	-41.0888	-72.0332	Peulla	X	X
StrutTLS2014_144	-41.0888	-72.0332	Peulla	X	X
StrutTLS2014_170	-41.0797	-72.2567	Cachimba	X	X
StrutTLS2014_225	-41.077175	-72.249752	Puntiagudo	X	
StrutTLS2014_226	-41.077175	-72.249752	Puntiagudo	X	X

Tabla 9. Tabla de haplotipos de rango nativo utilizados para los cálculos de distancia genética, redes de haplotipos, PCoA y determinación de ancestro común, elaborada por Splendiani et al. (2016).

Haplotype	GenBank Accession no.	Reference
ADcs1	AY836330	Cortey et al., 2004
ADcs2	AY836331	Cortey et al., 2004
ADcs3	AY836332	Cortey et al., 2004
ADcs4	AY836333	Cortey et al., 2004
ADcs5	AY836334	Cortey et al., 2004
ADcs6	AY836335	Cortey et al., 2004
ADcs7	AY836336	Cortey et al., 2004
ADcs8	AY836337	Cortey et al., 2004
ADcs9	AY836338	Cortey et al., 2004
ADcs10	AY836339	Cortey et al., 2004
ADcs11	AY836340	Cortey et al., 2004
ADcs12	AY836341	Cortey et al., 2004
ADcs13	AY836342	Cortey et al., 2004
ADcs14	AY836343	Cortey et al., 2004
ADcs15	AY836344	Cortey et al., 2004
ADcs16	AY836345	Cortey et al., 2004
ADcs17	AY836346	Cortey et al., 2004
ADcs18	AY836347	Cortey et al., 2004
ADcs19	AY836348	Cortey et al., 2004
ADcs20	AY836349	Cortey et al., 2004
AD-Z1	DQ381565	Susnik et al., 2007
Haplo12	AY926570	Susnik et al., 2006

Ma2a	DQ841189	Meraner et al., 2007
Ma2b	DQ841190	Meraner et al., 2007
MAcs1	AY836365	Cortey et al., 2004
MEcs1	AY836350	Cortey et al., 2004
MEcs2	AY836351	Cortey et al., 2004
MEcs3	AY836352	Cortey et al., 2004
MEcs4	AY836353	Cortey et al., 2004
MEcs5	AY836354	Cortey et al., 2004
MEcs6	AY836355	Cortey et al., 2004
MEcs7	AY836356	Cortey et al., 2004
MEcs8	AY836357	Cortey et al., 2004
MEcs9	AY836358	Cortey et al., 2004
MEcs10	AY836359	Cortey et al., 2004
MEcs11	AY836360	Cortey et al., 2004
MEcs12	AY836361	Cortey et al., 2004
MEcs13	AY836362	Cortey et al., 2004
MEcs14	AY836363	Cortey et al., 2004
MEcs15	AY836364	Cortey et al., 2004
ATcs1	AF273086	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs2	AF273087	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs3	AF274574	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs4	AF274575	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs5	AF274576	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs6	AF274577	Cortey and Garcia-Marin, 2000
ATcs11	AY836327	Cortey et al., 2004
ATcs12	AY836328	Cortey et al., 2004
ATcs13	AY836329	Cortey et al., 2004
ATcs14	EF530476	Cortey et al., 2009
ATcs15	EF530477	Cortey et al., 2009
ATcs16	EF530478	Cortey et al., 2009
ATcs17	EF530479	Cortey et al., 2009
ATcs18	EF530480	Cortey et al., 2009
ATcs19	EF530481	Cortey et al., 2009
ATcs20	EF530482	Cortey et al., 2009
ATcs21	EF530483	Cortey et al., 2009
ATcs22	EF530484	Cortey et al., 2009
ATcs23	EF530485	Cortey et al., 2009
ATcs24	EF530486	Cortey et al., 2009
ATcs25	EF530487	Cortey et al., 2009
ATcs26	EF530488	Cortey et al., 2009
ATcs27	EF530489	Cortey et al., 2009
ATcs28	EF530490	Cortey et al., 2009
ATcs29	EF530491	Cortey et al., 2009
ATcs30	EF530492	Cortey et al., 2009
ATcs31	EF530493	Cortey et al., 2009
ATcs32	EF530494	Cortey et al., 2009
ATcs33	EF530495	Cortey et al., 2009
ATcs34	EF530496	Cortey et al., 2009

ATcs35	EF530497	Cortey et al., 2009
ATcs36	EF530498	Cortey et al., 2009
ATcs37	EF530499	Cortey et al., 2009
ATcs38	EF530500	Cortey et al., 2009
ATcs39	EF530501	Cortey et al., 2009
ATcs41	EF530502	Cortey et al., 2009
ATcs42	EF530503	Cortey et al., 2009
ATcs43	EF530504	Cortey et al., 2009
ATcs45	EF530505	Cortey et al., 2009
ATcs46	EF530506	Cortey et al., 2009
ATcs47	EF530507	Cortey et al., 2009
ATcs48	EF530508	Cortey et al., 2009
ATcs49	EF530509	Cortey et al., 2009
ATcs50	EF530510	Cortey et al., 2009
ATcs51	EF530511	Cortey et al., 2009
ATcs52	EF530512	Cortey et al., 2009
AT11a	AY185578	Duftner et al., 2003
AT11b	AY185579	Duftner et al., 2003
At1e	DQ841192	Meraner et al., 2007
ATM1	JF297978	Snoj et al., 2011
ATM2	JF297979	Snoj et al., 2011
ATM3	JF297980	Snoj et al., 2011
ATM4	JF297975	Snoj et al., 2011
ATM5	JF297977	Snoj et al., 2011
ATM6	JF297976	Snoj et al., 2011
ATM7	JF297982	Snoj et al., 2011
Dades	JF297981	Snoj et al., 2011
Da1a	AY185568	Duftner et al., 2003
Da3	AY185571	Duftner et al., 2003
Da9	AY185572	Duftner et al., 2003
Da22	AY185573	Duftner et al., 2003
Da24	AY185576	Duftner et al., 2003
DUcs1	EF530513	Snoj et al., 2011
DUcs2	EF530514	Snoj et al., 2011
DUcs3	EF530515	Snoj et al., 2011
DUcs4	EF530516	Snoj et al., 2011
DUcs5	EF530517	Snoj et al., 2011
DUcs6	EF530518	Snoj et al., 2011
DUcs7	EF530519	Snoj et al., 2011
DUcs8	EF530520	Snoj et al., 2011
DUcs9	EF530521	Snoj et al., 2011
DUcs10	EF530522	Snoj et al., 2011
DUcs11	EF530523	Snoj et al., 2011
DUcs12	EF530524	Snoj et al., 2011
DUcs13	EF530525	Snoj et al., 2011
DUcs14	EF530526	Snoj et al., 2011
DUcs15	EF530527	Snoj et al., 2011
DUcs16	EF530528	Snoj et al., 2011

DUcs17	EF530529	Snoj et al., 2011
DUcs18	EF530530	Snoj et al., 2011
DUcs19	EF530531	Snoj et al., 2011
DUcs20	EF530532	Snoj et al., 2011
DUcs21	EF530533	Snoj et al., 2011
DUcs22	EF530534	Snoj et al., 2011
DUcs23	EF530535	Snoj et al., 2011