



**Universidad de Concepción**

Facultad de Ciencias Ambientales

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos

Continentales

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA, CONECTIVIDAD Y PERSISTENCIA  
DEL GÉNERO *Percilia* EN LAS CUENCAS DE LOS RÍOS BIOBÍO E ITATA:  
CONOCIMIENTO GENÉTICO PARA LA CONSERVACIÓN EN LA GESTIÓN  
AMBIENTAL DE CHILE**

Tesis para optar al grado de

**Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos**

**Continentales**

Por

**FRANCISCA VERONICA VALENZUELA AGUAYO**

CONCEPCIÓN-CHILE

Octubre 2021



# Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Ambientales

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos  
Continetales

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA, CONECTIVIDAD Y PERSISTENCIA  
DEL GÉNERO *Percilia* EN LAS CUENCAS DE LOS RÍOS BIOBÍO E ITATA:  
CONOCIMIENTO GENÉTICO PARA LA CONSERVACIÓN EN LA GESTIÓN  
AMBIENTAL DE CHILE**

Tesis para optar al grado de

**Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos  
Continetales**

Por

**FRANCISCA VERONICA VALENZUELA AGUAYO**

Profesor Guía: Dra. Evelyn Habit Conejeros

Profesor Co-Guía: Dr. Daniel Ruzzante

CONCEPCIÓN-CHILE

Octubre 2021

## **DERECHOS DE AUTOR**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



## PROFESORES INTEGRANTES COMISIÓN EVALUADORA

Dra. Evelyn Habit Conejeros

Directora de Tesis

Departamento de Sistemas Acuáticos

Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad de Concepción-Chile

Dr. Daniel Ruzzante

Co-director de Tesis

Biology Department

Dalhousie University-Canadá



Dr. Pedro Victoriano

Evaluador del Programa

Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad de Concepción-Chile

Dr. Oscar Link

Evaluador del Programa

Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad de Concepción-Chile

Dr. Daniel Gómez Uchida

Evaluador Externo

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción-Chile



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos al proyecto FONDECYT N°1150154, beca de Doctorado NACIONAL N° 519811 y a becas Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) por el financiar esta tesis. Al Marine Gene Probe Lab del Departamento de Biología de la Universidad de Dalhousie, Nueva Escocia, Canadá, junto al laboratorio de Ecología y Conservación de Peces de la Facultad de Ciencias Ambientales-Centro EULA-Chile, de la Universidad de Concepción Chile, por su acogida, apoyo técnico y suministro de insumos y espacios tan necesarios para el desarrollo y completitud de esta investigación.

Especialmente quisiera agradecer tanto en lo personal como en lo profesional a mis profesores tutores Dra. Evelyn Habit y Dr. Daniel Ruzzante por brindarme el apoyo y tranquilidad fundamental en momentos de gran desconsuelo, pero sobre todo por conducir con respeto, dedicación y rigurosidad esta investigación doctoral y por ser fuente de inspiración y admiración científica.

También quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio Lisette, Angela, Sarah, May, Greg y James por las interesantes tardes de conversaciones y su invaluable apoyo fraterno y académico durante mi estadía en Canadá y hasta el día de hoy. Quiero dar un especial agradecimiento a Greg, cuyo soporte técnico en el desarrollo de los marcadores y su paciencia con “mi inglés” fueron vitales para llegar hasta aquí. A mis “compañeros” Aliro y Gustavo con quienes compartí extensas horas de trabajo en terreno y otras experiencias paranormales, gracias por el afecto, el apoyo, la colaboración y por tener una inmejorable vista y ayudarme a quechar mis cientos de *Percillias*.

A mis amigas del doctorado y de la vida Thais, Paty y María, gracias por las extensas horas de catarsis, días de trabajo y risas, por el apoyo infinito y

honesto, y por juntas hacer realidad sueños locos del mismo modo, pero en el sentido contrario.

A mi familia Sandra, Dagoberto, Marcelo y Cristián, por darme el más grande amor, por ser mis cimientos y entregarme los fundamentos para seguir avanzando en momentos difíciles, incluso a veces sin necesidad de palabras. Gracias por alimentar mis trasnoches y mi ansiedad, por soportar mi carácter y por estar al pie del cañón absolutamente siempre. A mi Dominga y Frida, nada hubiese sido igual sin todos los momentos de perro-terapia y de calor que cada una me ha brindado a su manera. Los amo.

Y a todos aquellos que no mencioné explícitamente en estos agradecimientos pero que de una u otra forma vibraron en alta frecuencia y ayudaron a que este trabajo llegara a término. Tengan todos ustedes mis más genuinos agradecimientos.



## RESEÑA CURRICULUM VITAE

### ESTUDIOS

**2012** - Título Profesional Ingeniero en Biotecnología Marina y Acuicultura – Universidad de Concepción, Chile.

**2013-2015** - Magister en Ciencias con mención en Zoología - Universidad de Concepción, Chile.

**2016** – Candidato al Grado de Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales, Facultad de Ciencias Ambientales – Universidad de Concepción, Chile.



### LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

**Línea de investigación principal:** Biodiversidad, servicios ecosistémicos y agua

**Línea de investigación secundaria:** Genética de Poblaciones para la conservación y Ecología Molecular.

### PRODUCTIVIDAD DURANTE PERMANENCIA EN EL PROGRAMA

1) Dan, Yu, Ding, Xueyun, Zhang, Zhi, Zeng, Yu, Liu, Huanzhang, Wang, Lin, Gong, Ye, Liu, Xingtuo, Lyu, Xianguo, McCracken, Gregory R., **Valenzuela-Aguayo, Francisca V.**, Habit, Evelyn M., Ruzzante, Daniel E., Du, Min,

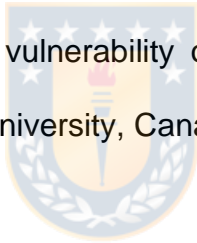


Wang, Wentao, Song, Taowen, Niu, Baozhen, Zhang, Qilin, Simmons, Catherine L., Taylor, Tamara K., Zalucki, Jacinta M., Hoebee, Susan E., Fernando, Denise R., Holmes, Gareth D., Shapcott, Alison, Zhang, Zhiyong, Yan, Xiaolan, Zhang, Qixiang, Correction to: Microsatellite records for volume 10, issue 2, Conservation Genetics Resources, 10, 2, ISSN: 1877-7260, Editorial: Springer link, **2018**, 269-276.

- 2) **Valenzuela-Aguayo, Francisca**, McCracken, Gregory R., Manosalva, Aliro, Habit, Evelyn, Daniel E., Ruzzante, Human induced habitat fragmentation effects on connectivity, diversity and population persistence of an endemic fish, *Percilia irwini*, in the Biobío river basin (Chile), Evolutionary Applications, **2019**;00:1–14. DOI/URL: <https://doi.org/10.1111/eva.12901>
- 3) **Valenzuela-Aguayo, Francisca**, McCracken, Gregory R., Manosalva, Aliro, Habit, Evelyn, Ruzzante, Daniel E. Connectivity, diversity, and hybridization between two endemic fish species (genus *Percilia*) in a complex temperate landscape, 2021. Aceptada en Conservation genetics Agosto 2021.
- 4) Gomez•Uchida, Daniel, Cañas•Rojas, Diego, Riva•Rossi, Carla M., Ciancio, Javier E., Pascual, Miguel A., Ernst, Billy, Aedo, Eduardo, Musleh, Selim S., **Valenzuela-Aguayo, Francisca**, Quinn, Thomas P., Seeb, James E., Seeb, Lisa W., Genetic signals of artificial and natural dispersal linked to colonization of South America by non-native Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), Ecology and Evolution, 8, 12, Editorial: John Wiley & Sons Ltd., **2018**, 6192-6209, DOI/URL: <https://doi.org/10.1002/ece3.4036>

## CONGRESOS

- 1) **Valenzuela-Aguayo, Francisca**, McCracken Gregory, Manosalva, Aliro, Díaz, Gustavo, Habit, Evelyn, Ruzzante, Daniel E. Different barriers, different fragmentation? The genetic structure of *Percilia irwini* in a river system under contrasting degrees of human intervention. Canadian Society of Ecology and Evolution Meeting 2018, Canadá, Guelph, 2018.
- 2) **Valenzuela-Aguayo, Francisca**, McCracken Gregory, Manosalva Aliro, Díaz Gustavo, Habit Evelyn, Ruzzante Daniel E. DIFFERENT BARRIERS, DIFFERENT FRAGMENTATION: How do genetic indicators help us understand the genetic vulnerability of populations of *Percilia irwini*, Lett Symposium Dalhousie University, Canadá, Halifax, 2019.



## PASANTIAS

- 1) **Dinamarca** – Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) (15-02-2016 a 15-06-2016).
- 2) **Canadá** – Universidad de Dalhousie, Departamento de Biología (01-05-2017 a 01-03-2018).
- 3) **Canadá** – Universidad de Dalhousie, Departamento de Biología (01-09-2018 a 01-06-2019).

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE TABLA CAPÍTULO I .....</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE TABLAS CAPÍTULO II .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE TABLAS CAPÍTULO III .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE FIGURA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO III .....</b>	<b>XX</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XXII</b>

<b>RESUMEN .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XXXI</b>



<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3. ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS .....</b>	<b>17</b>
a) Área de estudio .....	17
b) Especies modelo .....	22
c) Muestreo .....	26
d) Resumen metodología por capítulo .....	29
<b>TABLA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS .....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>4. CAPÍTULO I: .....</b>	<b>34</b>

<b>REVISIÓN DEL USO DEL CONOCIMIENTO GENÉTICO PARA LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD .....</b>	<b>35</b>
a) Importancia del conocimiento de la diversidad genética.....	36
b) Marco legal Internacional y Nacional.....	39
c) Estimadores de variabilidad genética en ayuda de la conservación .....	45
d) Marcadores moleculares.....	48
e) Monitoreo genético.....	51
f) Comentarios finales .....	55
<b>TABLA CAPÍTULO I .....</b>	<b>58</b>
<b>5. CAPÍTULO II: .....</b>	<b>59</b>
<b>HUMAN-INDUCED HABITAT FRAGMENTATION EFFECTS ON CONNECTIVITY, DIVERSITY AND POPULATION PERSISTENCE OF AN ENDEMIC FISH, <i>Percilia irwini</i>, IN THE BIOBÍO RIVER BASIN (CHILE) .....</b>	<b>60</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>62</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>68</b>
a) The study area and hydroelectric power plants .....	68
b) Sampling design and collections.....	70
c) DNA extraction and Microsatellite genotyping .....	70
d) Estimating genetic diversity and population structure .....	71
e) Population differentiation causes .....	73
f) Anthropogenic and natural fragmentation influences in connectivity ...	74
<b>RESULTS .....</b>	<b>75</b>

a) Genetic quality control .....	75
b) Population structure .....	76
c) Causes of Population differentiation and barrier influences .....	77
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>79</b>
a) Influence of natural factors .....	80
b) Influence of anthropogenic factors .....	82
c) Management and conservation comments.....	86
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>88</b>
<b>LITERATURE CITED.....</b>	<b>89</b>
<b>TABLAS CAPÍTULO II.....</b>	<b>100</b>
<b>FIGURAS CAPÍTULO II .....</b>	<b>104</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPITULO II .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERENCIAS MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO II .....</b>	<b>126</b>
<b>6. CAPÍTULO III:.....</b>	<b>127</b>
<b>CONNECTIVITY, DIVERSITY, AND HYBRIDIZATION BETWEEN TWO ENDEMIC FISH SPECIES (<i>Percilia</i> spp.) IN A COMPLEX TEMPERATE LANDSCAPE.....</b>	<b>127</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>128</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>131</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>133</b>
a) The study area.....	133
b) Sampling design and DNA extraction .....	134
c) Microsatellite sequencing and scoring .....	134
d) Genetic diversity and population structure using microsatellites.....	135

e) Mitochondrial DNA sequencing.....	135
f) Phylogenetic reconstruction with Mitochondrial DNA.....	136
g) Hybrid detection.....	137
h) Percilia spp. genetic with morphological comparisons.....	138
<b>RESULTS .....</b>	<b>138</b>
a) Microsatellite quality control.....	138
b) Population structure (microsatellites).....	139
c) COI Phylogeny and Haplotype distribution .....	140
d) BLAST (mtDNA) and NEWHYBRIDS (microsatellite DNA) analyses and comparison of mtDNA with nuclear (microsatellite) structure .....	140
e) Genetic and morphology species classification.....	142
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>143</b>
a) Description of the clustering pattern.....	143
b) Historical and current connectivity between the two watersheds .....	144
c) Complex diversity patterns .....	146
d) Limited concordance between genetic and morphological classification .....	147
e) Implications for conservation.....	148
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>149</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>149</b>
<b>FIGURAS CAPÍTULO III .....</b>	<b>156</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO III.....</b>	<b>162</b>
<b>REFERENCIAS MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO III .....</b>	<b>175</b>

<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>176</b>
<b>Parte I: PRINCIPALES HALLAZGOS en términos de variabilidad, estructura genética, conectividad y persistencia de las poblaciones de <i>Percilia</i> spp.....</b>	<b>176</b>
<b>Parte II: RECOMENDACIONES E IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACION</b>	<b>184</b>
a) De las poblaciones fragmentadas de <i>P. irwini</i> en el cauce principal río Biobío en base a datos genéticos .....	184
b) Conectividad de <i>Percilia</i> en áreas sin fragmentación de la cuenca del Biobío .....	187
c) Sobre la delimitación de los rangos de distribución de <i>P. gillissi</i> y <i>P. irwini</i> .....	188
d) Zona híbrida entre Itata-Laja.....	190
e) Futuras investigaciones en cuanto a delimitación de especies e identificación de unidades de conservación .....	192
<b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>194</b>
<b>9. GLOSARIO GENÉTICO .....</b>	<b>198</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>202</b>

## ÍNDICE TABLA INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Canales de regadío en las cuencas del río Biobío e Itata (basado en Sandoval Jeria 2003; Fabres 2010). .....	<b>32</b>
---	-----------





## ÍNDICE TABLA CAPÍTULO I

Tabla 1: Resumen de los acuerdos vigentes suscritos por Chile en materia de conservación de la biodiversidad, basado en Perez-Quezada (2018).(-) Sin información.....	<b>59</b>
---	-----------



## ÍNDICE TABLAS CAPÍTULO II

Tabla 1: Características de las centrales hidroeléctricas del sistema fluvial del río Biobío. El tipo de central indica si se trata de una central hidroeléctrica de almacenamiento (con presa y embalse) o de paso del río (RoR; sin embalse y toma de agua lateral). Año: indica el año en que comenzaron las operaciones. Se indicaron la presencia o ausencia de barrera física y embalse para cada planta. na: no aplicable..... **100**

Tabla 2: Información de los sitios de muestreo para *Percilia irwini* del sistema del río Biobío, incluye ID de la muestra, coordenadas (Lat. y Long.), elevación (msnm), tamaño de muestra N por año (2016, 2017), riqueza alélica ( $A_R$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), nombres de poblaciones finales (LU = Laja aguas arriba, LD = Laja aguas abajo, BU = Biobío aguas arriba, BC = Biobío central, BD = Biobío aguas abajo, BD (salida) = Biobío aguas debajo de BD, RM = Renaico-Malleco, NI = Niblinto), y tamaño efectivo de la población (con y sin migrantes, incluidos los límites inferior y superior.  $\infty$  = infinito)..... **102**

Tabla S1: Índices de diversidad: Riqueza alélica ( $A_R$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y heterocigosidad observada ( $H_o$ ), utilizando 28 o 26 loci microsatélites. N por año (2016, 2017) muestra el número de individuos muestreados por año. **111**

Tabla S2: Estimaciones de  $F_{ST}$  por pares para los ocho sitios muestreados en 2016 y 2017..... **113**

Tabla S3: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) y distancias de vías fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi, Yamamoto y Maekawa, 2006)..... **118**

Tabla S4: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra del sistema del río Laja. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006). Las exclusiones de sitios se verificaron utilizando el mejor modelo con el AICc más bajo. .... **122**

Tabla S5: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra del sistema fluvial del Biobío. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006)..... **123**

Tabla S6: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestreo del sistema fluvial Renaico-Malleco. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006)..... **124**

Tabla S7: Resultados de los análisis de redundancia basados en la distancia, realizados para comparar las coordenadas principales de la distancia genética con  $\hat{F}_{ST}$ s pareado entre sitios de muestreo de la cuenca del Biobío con variables de paisaje significativas: distancias de vías fluviales (Wwd) y número de barreras (BaN). Wwd y BaN, se calcularon a partir de la selección de varias coordenadas principales (PC) entre los sitios de muestreo. Se informa el número de permutaciones (n), el valor del criterio de Akaike (AICc), los valores F (F), los grados de libertad (DF), los valores P (P) y los valores R<sup>2</sup> ajustados. Valores p significativos (P) \*..... **125**

### ÍNDICE TABLAS CAPÍTULO III

Tabla S1: Rasgos morfológicos utilizados para identificar las especies de 134 individuos muestreados en las cuencas hidrográficas de Itata y Biobío. (-) no información. ....	<b>163</b>
Tabla S2: Información del sitio de muestreo para <i>Percilia</i> spp. de las cuencas hidrográficas de los ríos Itata y Biobío incluyendo ID de muestra, coordenadas (Lat. y Long.), elevación (msnm), tamaño de muestra en 2016 y 2017, riqueza alélica ( $A_R$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) por sitios de muestreo. ....	<b>165</b>
Tabla S3: Índice de diversidad de las 290 secuencias COI, todos los sitios incluidos. ....	<b>170</b>
Tabla S4: Valores de incertidumbre de selección para el mejor modelo de sustitución probado, basado en tres diferentes criterios BIC, AIC y DT, utilizando JModel Test 2.1.10 (Guindon y Gascuel 2003; Darriba et al. 2012).....	<b>171</b>
Tabla S5: Frecuencias de nucleótidos del modelo de sustitución seleccionado HKY + G. ....	<b>172</b>

**ÍNDICE FIGURA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS**

Figura 1: Pasos de la metodología general de la tesis. .... **34**



## ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO II

Figura 1: Cuenca del río Biobío en el centro de Chile. Muestra los sitios de muestreo y las centrales hidroeléctricas. Círculos amarillos: río Laja; Círculos rojos: río Biobío; Círculos azules: sitios de muestreo del río Renaico-Malleco. Círculos negros: sitios de muestreo donde *P. irwini* estuvo ausente. El círculo blanco y negro representa la cascada “Salto del Laja”. Los triángulos negros representan las centrales hidroeléctricas de pasada y los triángulos celestes representan las centrales hidroeléctricas de almacenamiento: (a) El Toro, (b) Abanico, (c) Antuco, (d) Quilleco, (e) Laja, (f) Rucúe, (g) Peuchén, (h) Mampil, (i) Ralco, (j) Pangue y (k) Angostura. Los corchetes negros muestran la localización de las barreras físicas..... **104**

Figura 2: Análisis de estructuración genética STRUCTURE de *P. irwini* endémica de agua dulce (utilizando el método de Evanno) de 21 sitios de muestreo y caracterizada con 28 loci de microsatélites. Las líneas de color verticales indican los coeficientes de mezcla individuales (Q). El círculo blanco y negro representa la cascada “Salto del Laja”, (i) Ralco, (j) Pangue y (k) centrales hidroeléctricas Angostura. .... **106**

Figura 3: Gráficos de estimaciones de  $\hat{F}_{STs}$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) linealizadas por pares frente a la distancia geográfica (vía fluvial) (en km). La línea roja indica la línea de regresión: a) Sistema Biobío ( $R^2 = 0.5987$ , valor  $P \leq 0.0001$ ), b) Río Laja ( $R^2 = 0.0080$ , Valor  $P \geq 0.384$ ), c) Río Biobío ( $R^2 = 0.7730$ ,  $P$ -valor  $\leq 0.0001$ ), d) Río Renaico-Malleco ( $R^2 = 0.0798$ , valor  $P \geq 0.117$ ). .... **107**

Figura 4: Gráfico de análisis de redundancia basado en distancia (dbRDA) que muestra las variables explicativas del paisaje con impacto significativo en las (dis) similitudes derivadas de la respuesta (diferenciación genética: valores  $\hat{F}_{STs}$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) linealizados) en el sistema Biobío: Número de barreras (BaN) y Distancias fluvial (Wwd). Puntos amarillos: sitios de muestreo dentro del río Laja. Puntos rojos: sitios de muestreo dentro del río Biobío. Puntos azules: sitios de muestreo dentro del río Renaico-Malleco. .... **108**

Figura 5: Estimaciones de las tasas de migración contemporáneas utilizando BAYESASS y tamaños efectivos calculados sin migrantes en LDNe para cada

población del sistema del río Biobío: a) río Laja b) río Biobío, c) río Renaico-Malleco. Las líneas continuas muestran dónde está presente la conectividad entre las poblaciones y su dirección. Las tasas de migración contemporáneas rojas son significativas. Círculos negros: sitios de muestreo. Círculo blanco y negro: Cascada “Salto del Laja”. Triángulos negros: centrales hidroeléctricas de pasada. Triángulos celestes: centrales hidroeléctricas de embalse. Paréntesis cuadrado: barrera física. Las líneas rojas representan áreas sin individuos de *P. irwini* (EA: Áreas de Extirpación 1 y 2)..... **109**

Figura S1: Análisis jerárquico del pez de agua dulce *Percilia irwini* de 21 sitios de muestreo y caracterizado en a) 26 y b) 28 loci. Las líneas de color verticales en los gráficos muestran coeficientes de mezcla individuales (Q). Estimamos el número más probable de agrupamiento según la metodología de Evanno (Evanno, Regnaut y Goudet, 2005) implementada en STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl y vonHoldt, 2012). Cada ejecución de STRUCTURE independiente se llevó a cabo utilizando 5 repeticiones, donde cada ejecución consistió en 2,000,000 de iteraciones con un burning inicial de 200,000. .... **112**

Figura S2: Correlación entre los valores de  $F_{ST}$  obtenidos para los años 2016 y 2017, usando 9999 permutaciones ( $R^2 = 0.9358$ , valor  $P = 0.0001$ )..... **114**

Figura S3: Mapa de calor que representa los valores de  $F_{ST}$  por pares calculados utilizando un conjunto de datos restringido de 927 individuos recolectados de veintiún sitios de muestreo, genotipados en 28 microsatélites. .... **115**

Figura S4: (a) Análisis de coordenadas principales basado en  $F_{ST}$  linealizados:  $\hat{F}_{ST}S (\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST}))$ , a) incluyó todos los sitios del sistema Biobío, b) solo sitios del río Laja, c) solo sitios del río Biobío y d) solo sitios de los ríos Renaico-Malleco. .... **116**

Figura S5: Autocorrelación espacial de alelos ( $r$ ) basada en distancia genética más errores estándar (barras) en función de la distancia (km) entre pares de individuos: a) Sistema Biobío, b) río Laja, c) río Biobío, d) ríos Renaico - Malleco. .... **117**

Figura S6: Correlaciones entre  $F_{ST}$  linealizados por pares  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y a) Distancia fluvial (Wwd), b) Número de barreras (BaN), c) Edad de las barreras (BaA), d) Elevación y e) Pendiente, entre las muestras recolectadas de veintiún sitios de muestreo dentro de todo el sistema Biobío. 1) Inicialmente, todos los sitios de muestreo se incluyeron en la correlación y 2) una gráfica de barras de los residuos para cada sitio de muestreo que indica los posibles sitios atípicos.  
..... 121





### ÍNDICE DE FIGURAS CAPÍTULO III

Figura 1: Cuencas hidrográficas de Itata (1) y Biobío (2) en el centro de Chile. Línea punteada roja: Cuenca del Itata. Línea punteada azul: Cuenca del Biobío. Círculos negros: sitios de muestreo. Triángulos: (a) Salto del Itata y (b) Salto del Laja. Muestra de etiquetas de ubicación como en la Tabla S1..... **156**

Figura 2: Diversidad de ADN nuclear de *Percilia* spp. (marcadores de microsatélites; n = 1602 individuos) y diversidad de ADN mitocondrial (ADNmt COI; n = 290 individuos). A) Análisis de coordenadas principales basado en estimaciones de pares FST entre todos los sitios de muestreo en las cuencas hidrográficas de Itata y Biobío. Cluster 1: magenta (Ñuble, Chillán y tramos aguas abajo del río Itata), Cluster 2: turquesa (Diguillín, tramos aguas arriba de Itata y Laja), Cluster 3: azul (Biobío, Renaico y Malleco). B) Plot de STRUCTURE de *Percilia* spp. (28 loci de microsatélites, 35 ubicaciones). Se distinguen tres conglomerados, uno exclusivamente en la cuenca del Itata (magenta), uno exclusivamente en la cuenca del Biobío (azul) y uno que se encuentra en ambas cuencas (turquesa). C) Distribución geográfica de los cluster de *Percilia* spp. basado en microsatélites. D) Red de haplotipos que muestra haplogrupos rojos, amarillos y verdes. E) Árbol filogenético bayesiano de los haplogrupos (41 secuencias COI), los valores de probabilidad posterior para el análisis bayesiano se muestran en cada nodo. Los colores del haplogrupo coinciden con la distribución geográfica como se muestra en F). F) Distribución geográfica de *Percilia* spp. de los haplogrupos (mtDNA COI)..... **158**

Figura 3: A) Mapa de calor de identidad pareada (%) entre haplotipos dentro y entre haplogrupos. B) Mapa de calor de identidad por pares (%) entre haplotipos dentro y entre las especies de referencia: *Percilia irwini* 1 de Lavoué et al. (2014), *Percilia irwini* 2 y *Percilia gillissi* de Arratia & Quezada-Romegialli, (2019). El grupo de haplotipos verdes difería de los grupos de haplotipos amarillos y rojos entre un 2,7% y un 3%. El grupo de haplotipos rojos probablemente sean *P. irwini*. El grupo de haplotipos amarillos probablemente sean *P. gillissi*. El grupo de haplotipos verdes no se parece a ninguno de los dos. C) Salida gráfica de la asignación genética de individuos de NEWHYBRIDS para 1602 individuos de *Percilia* spp. Las barras individuales muestran la probabilidad posterior de cada individuo de pertenecer a una

categoría determinada: Puro\_0 (*P. gillissi*), Puro\_1 (*P. irwini*), F2 y retrocruzamientos O\_Bx. D) Diagrama circular de la consistencia entre datos genéticos y morfológicos. Círculo interno: número total de individuos analizados con los tres enfoques (ADN microsatélite, ADNmt y morfología) (N = 134). Segundo círculo: número de individuos por cuenca. Tercer círculo: agrupaciones de microsatélites. Cuarto círculo: haplogrupos COI de ADNmt por especies. Quinto círculo: categorías NEWHYBRIDS basadas en genotipos de microsatélites multilocus. Círculo más externo: clasificación según morfología.  
..... **160**

Figura S1: Mapa de calor que representa los valores de  $F_{ST}$  por pares calculados utilizando un conjunto de datos de 1602 individuos recolectados de 35 sitios de muestreo, genotipados en 28 microsatélites. 927 individuos de la colección Biobío se utilizaron previamente en (Valenzuela-Aguayo et al.2019).  
..... **168**



## ABREVIATURAS

Abreviación	Descripción
AICc	Coeficiente de información de Akaike
AR	Riqueza de Alelos
bp	pares de bases
BaN	Número acumulativo de barreras
BaA	Edad acumulativa de barreras
BD <sub>(outlet)</sub>	Población Biobío Aguas abajo de BD
BU	Población Biobío Aguas arriba
BC	Población Biobío central
BD	Población Biobío aguas abajo
CBD	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CONAMA	Comisión Nacional del Medio Ambiente
COP25	Conferencia de las Partes N. 25
COI	Citocromo oxidasa I
DPR	Análisis de regresión por pares descompuesto
db-RDA	Análisis de redundancia basado en Distancia
DNA	Ácido dexosirribonucleico
EA1	Área de Extirpación 1 río Laja
EA2	Área de Extirpación 2 río Biobío
FST	Índice de fijación
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IBD	Aislamiento por Distancia
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Km	Kilómetros
LDNe	Estimación del tamaño efectivo de la población a partir de datos sobre desequilibrio de ligamiento
LU	Población Laja Aguas arriba

<b>Abreviación</b>	<b>Descripción</b>
LD	Población Laja Aguas abajo
mtDNA	ADN mitocondrial
mya	Millones de años atrás
masl	Metros sobre el nivel del mar
MCMC	Cadenas de markov y Monte Carlo
N	Tamaño de la muestra
Ne	Tamaño efectivo poblacional
NI	Población Niblinto
nuDNA	ADN nuclear
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimeraza
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
RM	Población Renaico-Malleco
SNP	Polimorfismo de Unico Nucleótido
SEIA	Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental
SBAP	Servicio de Biodiversidad y Áreas Protegidas
Wwd	Distancia fluvial
$\hat{N}_e$	Tamaño efectivo de la población estimado

## RESUMEN

La diversidad genética es el componente más básico y fundamental de la Biodiversidad dado que el potencial evolutivo de las especies depende en gran medida de la cantidad de variación genética dentro de las poblaciones y de su distribución entre poblaciones. Actualmente existe un consenso que considera la necesidad de integrar el conocimiento tanto ecológico como genético para poder asegurar la viabilidad de las especies a conservar. No obstante, a pesar de la importancia y del creciente interés en diseñar prioridades que incluyan el conocimiento de la variabilidad genética, la diversidad genética a nivel de población raramente ha sido considerada de forma explícita dentro de los procedimientos de planificación de la conservación en Chile y en el mundo.

En la actualidad se ha registrado una disminución en la diversidad genética para muchas especies como resultado de las actividades humanas, específicamente en los ecosistemas de agua dulce, los cuales son uno de los ecosistemas más amenazados del mundo. Una de las principales amenazas a estos ecosistemas corresponde a las actividades antrópicas como la construcción de represas y la extracción de agua. Estas perturbaciones pueden aumentar, disminuir o incluso interrumpir la conectividad física y genética de la

red fluvial, afectando a la diversidad y la persistencia de especies acuáticas a escala ecológica y evolutiva.

En Chile se proyecta un aumento de la fragmentación de los sistemas fluviales andinos en la zona central producto del desarrollo hidroeléctrico. Específicamente la cuenca del río Biobío (la de mayor riqueza de especies de peces de Chile) posee uno de los más altos índices de fragmentación actual producto de barreras de centrales hidroeléctricas y proyecta un incremento sustancial al 2050, potenciando impactos en las comunidades de peces. Pero también la cuenca del río Biobío es caracterizada por una gran matriz de canales de riego agrícolas directos y derivados que tienen el potencial de facilitar la conectividad y el flujo de genes entre los ríos y entre cuencas, especialmente con la cuenca vecina del río Itata. La cuenca del río Itata, cuyo índice de fragmentación por centrales hidroeléctricas es cercano a cero, se conecta con el río Biobío gracias a la recepción de aguas provenientes de este último a través de los canales de regadío. Por lo anterior las cuencas Biobío-Itata conforman un sistema complejo con distintos grados de intervención antropogénica que pueden tener efectos directos en la variabilidad genética de las poblaciones que en ellas habitan.

En esta tesis se presenta la importancia del conocimiento de la variabilidad genética para la gestión de la biodiversidad a través del análisis de la influencia

de los factores naturales y antropogénicos sobre la conectividad, estructura genética y distribución poblacional de dos especies endémicas de Chile, *Percilia irwini* y *Percilia gillissi*, en un contexto de alta fragmentación de la red de drenaje intracuenca y de alteración (generación) de la conectividad intercuenca, en los ríos Biobío e Itata. Para lograr lo anterior, fueron abordados objetivos de la siguiente forma: primero, en el capítulo uno se analizó la importancia del conocimiento de la diversidad genética y las medidas basadas en conocimiento genético que pueden ser implementadas para la gestión de la biodiversidad de especies de peces en Chile a través de una revisión bibliográfica. Luego, en el capítulo dos se determinó la diversidad genética, estructura y flujo génico entre poblaciones de *P. irwini* en la cuenca del río Biobío (fragmentada) y se evaluó el efecto genético de las barreras (represas hidroeléctricas y saltos de agua). Finalmente, en el capítulo tres, se determinó la influencia del aumento de la conectividad contemporánea en la diversidad genética, la distribución geográfica y la hibridación de las poblaciones de *P. irwini* y *P. gillissi* en las dos cuencas contiguas (Biobío e Itata).

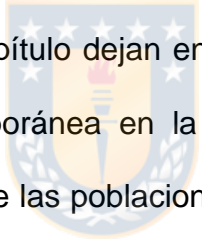
En base al análisis del capítulo 1 se concluye que el conocimiento de la variabilidad genética de especies silvestres chilenas hoy es fundamentalmente de carácter investigativo y académico. No obstante, en un futuro cercano, el monitoreo genético podrá ser una de las herramientas importantes a aplicar. A través de estos monitoreos se podrán comparar datos relevantes en el análisis

de los indicadores de variabilidad genética, evaluar tendencias y proporcionar indicadores de salud genética de las poblaciones. Esta información serviría para conocer el estado del patrimonio genético presente en las especies amenazadas en Chile y para esclarecer problemas de conservación más amplios (e.g, efectos antropogénicos como la fragmentación, efectos de la historia demográfica, aumento de la conectividad e hibridación, entre otros), información que es clave en las decisiones de conservación.

Los resultados del capítulo II demostraron que la diversidad genética y estructura poblacional de *P.irwini* a lo largo de toda la cuenca del río Biobío están influenciadas por (o son función de) la morfología dendrítica de la cuenca, de su geomorfología representada por una barrera natural (el Salto del Laja) y de numerosas barreras artificiales (represas). Cuando fueron evaluados los efectos de diferentes tipos de barreras en la estructura genética del pez *Percilia irwini* en la cuenca del río Biobío, se identificaron 8 unidades genéticas a lo largo de todo el sistema Biobío con altos tamaños efectivos. Sin embargo, se observó una reducción del tamaño efectivo en una población ubicada entre dos barreras antrópicas infranqueables. Tanto la cascada natural como las represas artificiales fueron importantes impulsores de la diferenciación de la población en este sistema; sin embargo, las represas afectan la diversidad genética de manera diferente según su modo de operación. Se encontró evidencia de la extirpación de la población en dos tramos de río limitados por represas aguas



arriba y aguas abajo. Además, en áreas de la cuenca donde no existen barreras a la dispersión, ni naturales ni artificiales (e.g. en el río Renaico-Malleco), se observó una alta conectividad analizada a través del flujo génico simétrico, aguas arriba y aguas abajo, siendo aquí la variable más influyente en la diferenciación genética la distancia entre puntos de muestreo a lo largo de la vía fluvial. En conclusión, las barreras antrópicas están generando un fuerte efecto en la estructuración genética de *P. irwini* en la cuenca del río Biobío, promoviendo además la reducción y extirpación de poblaciones locales.



Los resultados del tercer capítulo dejan en evidencia la influencia del aumento de la conectividad contemporánea en la diversidad genética, la distribución geográfica y la hibridación de las poblaciones de *P. irwini* y *P. gillissi* en las dos cuencas contiguas (Biobío e Itata). Estos mostraron la existencia de tres grupos genéticos en los dos sistemas Itata y Biobío, y la existencia de tres haplogrupos o linajes. El primer grupo genético, identificado como *P. irwini*, se distribuye en la zona central y sur de la cuenca del Biobío. El segundo grupo genético, identificado como *P. gillissi*, está confinado a la zona norte de la cuenca del Itata y no se encuentra en toda la cuenca, como es actualmente reconocido. El resto de los individuos revelaron una alta complejidad de los patrones de diversidad genética y de distribución geográfica en el área de estudio. Algunos de estos individuos portaron mtDNA característico de *P. irwini* pero genotipos de microsatélites clasificados por NEWHYBRIDS como *P. gillissi* o retrocruzas.

Estos individuos, aunque presentes en ambas cuencas, en la cuenca del río Biobío están restringidos a su tramo norte (río Laja, el más cercano a la cuenca del Itata), sugiriendo la existencia de una barrera reproductiva incompleta entre *P. gillissi* y *P. irwini*, con *P. irwini* como ascendencia materna. Estos individuos catalogados como híbridos (F2) son el reflejo de una alta conectividad, ya sea histórica natural, o debido a la generación de conectividad contemporánea mediada por la dispersión de individuos de *Percilia* a través de los grandes canales para riego que unen ambas cuencas (canales Zañartu y Laja Diguillín). Por lo tanto, ya sea usando tanto movimientos pasivos como activos se han potenciado y facilitado la dispersión y conectividad de *Percilia* spp. entre cuencas hidrográficas.



El presente trabajo de tesis cuantificó por primera vez la variabilidad genética de las poblaciones de *Percilia* spp. en las cuencas de los ríos Biobío e Itata, revelando que: 1) la pérdida de conectividad entre poblaciones en el cauce principal del río Biobío y una alta vulnerabilidad de las poblaciones de *P. irwini* a la construcción futura de represas las cuales podrían llevar a una severa reducción de los tamaños poblacionales, e incluso a la extinción poblacional local. 2) La generación de conectividad entre cuencas ha permitido la hibridación entre poblaciones de *Percilia* spp. del río Biobío con poblaciones de *Percilia* spp. del río Itata. 3) La importancia de estudiar conjuntos de datos de toda la cuenca con métricas genéticas para comprender la fuerza y la dirección

de los impactos antropogénicos en las poblaciones de peces. 4) De igual manera, los resultados demuestran la necesidad de integrar este tipo de información con la correcta identificación de la especie de estudio y los límites de su distribución geográfica. Sólo de esta forma se podrán proponer medidas de conservación y/o mitigaciones adecuadas y eficientes. Finalmente 5) la comprensión del estado de las poblaciones en términos de diversidad genética y conectividad adquiere un valor fundamental para anticipar el efecto de nuevos proyectos en estas cuencas hidrográficas y permitirán una gestión apropiada de las poblaciones de *Percilia* spp. para evitar la erosión genética futura. Por último, se destacan las grandes oportunidades y desafíos que presentan los enfoques genéticos para la conservación, para comprender y predecir mejor las respuestas demográficas y evolutivas de las poblaciones naturales a las perturbaciones. Desarrollar esta comprensión es ahora fundamental dado que los regímenes de perturbación están cambiando rápidamente debido al desarrollo económico a nivel país, y al cambio climático.

## ABSTRACT

Genetic diversity is the most basic and fundamental component of biodiversity, since the evolutionary potential of species depends to a large extent on the amount of genetic variation within populations and its distribution among populations, species, and ecosystems. There is currently a consensus that considers the need to integrate both ecological and genetic knowledge to ensure the viability of the species to be conserved. However, despite the importance and growing interest in designing priorities that include knowledge of genetic variability, genetic diversity at the population level has rarely been explicitly considered in conservation planning procedures in Chile and the world.

Currently, there has been a decrease in genetic diversity for many species because of human activities. Specifically in freshwater ecosystems, which are one of the most threatened ecosystems in the world. One of the main threats to these ecosystems corresponds to anthropogenic activities such as dam construction, water extraction and modifications in the flow regime. These disturbances can increase, decrease or even interrupt the physical and genetic connectivity of the river network, affecting the diversity and persistence of aquatic species on an ecological and evolutionary scale.

In Chile, fragmentation of Andean river systems in the central zone is projected to increase as a result of hydroelectric development. Specifically, the Biobío

river basin (the one with the greatest richness of fish species in Chile) has one of the highest current fragmentation indexes, as a result of hydroelectric power plant barriers and is projected to increase substantially by 2050, increasing impacts on fish communities. But also, the Biobío river basin is characterized by a large matrix of direct agricultural irrigation canals and derivatives that have the potential to facilitate connectivity and gene flow between rivers and between basins, especially with the neighboring Itata river basin. The Itata river basin, whose fragmentation index due to hydroelectric power plants is close to zero, is connected to the Biobío river thanks to the reception of water from the Biobío through irrigation canals. Therefore, the Biobío-Itata basins form a complex system with different degrees of anthropogenic intervention that can have direct effects on the genetic variability of the populations that inhabit them.

This thesis presents the importance of knowledge of genetic variability for biodiversity management through the analysis of the influence of natural and anthropogenic factors on the connectivity, genetic structure, and population distribution of two endemic species of Chile, *Percilia irwini* and *Percilia gillissi*, in a context of high intra-basin fragmentation and increased inter-basin connectivity, in the Biobío and Itata rivers. To achieve the above, the objectives were addressed as follows: first, chapter one analyzed the importance of knowledge of genetic diversity and the measures based on genetic knowledge that can be implemented for the management of fish species biodiversity in Chile through a literature review. Then, in chapter two, the genetic diversity,

structure and gene flow among populations of *P. irwini* in the Biobío river basin (fragmented) was determined and the genetic effect of barriers (hydroelectric dams and waterfalls) was evaluated. Finally, in chapter three, the influence of increased contemporary connectivity on genetic diversity, geographic distribution, and hybridization of *P. irwini* and *P. gillissi* populations in the two contiguous basins (Biobío and Itata) was determined.

Based on the analysis in Chapter 1, we can say that knowledge of the genetic variability of Chilean wild species is currently only of a research and academic nature. However, soon, genetic monitoring could be one of the important tools to be applied through the future Biodiversity Service of Protected Areas. Through this monitoring, it will be possible to compare relevant data in the analysis of genetic variability indicators, evaluate trends and provide indicators of the genetic health of populations. This information will serve to know the state of the genetic heritage present in threatened species in Chile and to clarify broader conservation problems (e.g., anthropogenic effects such as fragmentation, effects of demographic history, increased connectivity, and hybridization, among others), information that is key to conservation decisions.

The results of Chapter II demonstrated that the genetic diversity and population structure of *P. irwini* throughout the Biobío river basin are influenced by (or are a function of) the dendritic morphology of the basin, its geomorphology represented by a natural barrier (the Salto del Laja) and numerous artificial

barriers (dams). When the effects of different types of barriers on the genetic structure of *Percilia irwini* fish in the Biobío river basin were evaluated, we identified 8 genetic units along the entire Biobío system with high effective sizes. However, a reduction in effective size was observed in a population located between two impassable anthropogenic barriers. Both natural waterfalls and artificial dams were important drivers of population differentiation in this system; however, dams affect genetic diversity differently depending on their mode of operation. Evidence of population extirpation was found in two river reaches bounded by upstream and downstream dams. Furthermore, in areas of the basin where there are no barriers to dispersal, neither natural nor artificial (e.g. in the Renaico-Malleco river), high connectivity was observed as analyzed through symmetrical gene flow, upstream and downstream, the most influential variable in genetic differentiation being here the distance of the waterway. In conclusion, anthropic barriers are generating a strong effect on the genetic structuring of *P. irwini* in the Biobío river basin, which translates into reduction and extirpation of local populations.

The results of the third chapter show the influence of increased contemporary connectivity on the genetic diversity, geographic distribution, and hybridization of the populations of *P. irwini* and *P. gillissi* in the two contiguous basins (Biobío and Itata). These showed the existence of three genetic groups in the two systems Itata and Biobío, and the existence of three haplogroups or lineages. The first genetic group, identified as *P. irwini*, is distributed in the central and

southern zones of the Biobío basin. The second genetic group, identified as *P. gillissi*, is confined to the northern part of the Itata basin and is not found throughout the basin, as is currently recognized. The rest of the individuals revealed a high complexity of genetic diversity and geographic distribution patterns in the study area. Some of these individuals carried mtDNA characteristic of *P. irwini* but microsatellite genotypes classified by NEWHYBRIDS as *P. gillissi* or backcrosses. These individuals, although present in both basins, in the Biobío river basin are restricted to its northern section (Laja river, the closest to the Itata basin), suggesting the existence of an incomplete reproductive barrier between *P. gillissi* and *P. irwini*, with *P. irwini* as maternal ancestry. These individuals catalogued as hybrids (F2) are the reflection of a high connectivity, either natural historical, or due to an increase in contemporary connectivity mediated by the dispersal of *Percilia* individuals through the large irrigation canals that link both basins (Zañartu and Laja Diguillín canals). Therefore, both passive and active movements have enhanced and facilitated the dispersal and connectivity of *Percilia* spp. between watersheds.

This thesis work quantified for the first time the genetic variability of *Percilia* spp. populations in the Biobío and Itata river basins, revealing: 1) the loss of connectivity between populations in the main channel of the Biobío river and a high vulnerability of *P. irwini* populations to future development of dams which could lead to a severe reduction of population sizes, and even to local population extinction. 2) The increase in connectivity between basins has



allowed hybridization between populations of *Percilia* spp. of the Biobío river with populations of *Percilia* spp. of the Itata river. 3) The importance of studying basin-wide data sets with genetic metrics to understand the strength and direction of anthropogenic impacts on fish populations. 4) Similarly, it demonstrates the need to integrate this type of information with the correct identification of the study species and the limits of its geographic distribution. Only in this way will it be possible to propose adequate and efficient conservation and/or mitigation measures. Finally, 5) the understanding of the status of populations in terms of genetic diversity and connectivity acquires a fundamental value to anticipate the effect of new projects in these watersheds and will allow an appropriate management of *Percilia* spp. populations to avoid future genetic erosion. Finally, it is necessary to highlight the great opportunities and challenges presented by genetic approaches to conservation to better understand and predict the demographic and evolutionary responses of natural populations to disturbance. Developing this understanding is now critical given that disturbance regimes are changing rapidly due to economic development at the country level, and climate at the global level.

## 1. INTRODUCCION

Las actividades humanas han moldeado la diversidad biológica (compuesta por los ecosistemas, las especies y sus recursos genéticos, McNeely et al. 1990) alterando los procesos naturales y las fuerzas selectivas que dan forma a la evolución dentro de las especies, aumentando la velocidad de extinción y determinando en gran medida qué especies y ecosistemas están en riesgo (Urban 2015; Otto 2018). El funcionamiento ecológico de la biodiversidad nos otorga gratuitamente una gama de servicios ecosistémicos que contribuyen directa o indirectamente al beneficio de la humanidad como lo son la producción de agua, alimentos u otros valores estéticos y culturales (De Groot et al. 2002; Durance et al. 2016). Los cambios en la biodiversidad pueden influir en el suministro de estos servicios y por tanto la gestión sustentable y la conservación de la biodiversidad hoy son tanto un compromiso moral como una condición para nuestra sobrevivencia (Luck et al. 2003; Boulton et al. 2016).

Dentro de los tres niveles fundamentales de la biodiversidad, la diversidad genética es el componente más básico y fundamental, dado que el potencial evolutivo de las especies depende en gran medida de la cantidad de variación genética dentro de las poblaciones y su distribución entre poblaciones y ecosistemas (Hughes et al. 2008; Bailey et al. 2009; Miraldo et al. 2016). En la

actualidad se ha registrado una disminución en la diversidad genética para muchas especies como resultado de, por ejemplo, las fluctuaciones climáticas pasadas y actuales (Jackson et al. 2018; De Kort et al. 2021) y las actividades antropogénicas (Hewitt 2000; Miraldo et al. 2016). Por lo tanto, el conocimiento de la variabilidad genética es de vital importancia si pretendemos comprender estos impactos a largo plazo en el potencial de las especies a adaptarse a los cambios ambientales; y también si se quiere intentar frenar en parte el daño a la integridad de la biósfera que puede producirse por la pérdida de biodiversidad (Steffen et al. 2015).

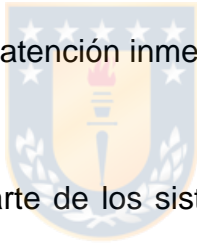


Actualmente existe un consenso sobre la necesidad de integrar el conocimiento tanto ecológico (abundancia, tasas de crecimiento, estocasticidad demográfica) como genético (estimaciones de endogamia, flujo de genes y *fitness*) para poder asegurar la viabilidad de los objetos a conservar (Moritz 2002; Pressey 2004; Carvalho et al. 2011). La genética para la conservación hoy es un amplio campo de investigación (Frankham 2010; Allendorf et al. 2013; Frankham et al. 2014). Las principales contribuciones que hace la genética para la conservación a la biodiversidad (Taylor et al. 2017b), comprenden campos como: a) Resolución de incertidumbres taxonómicas y la definición de unidades evolutivamente divergentes a conservar (Palsbøll et al. 2007; Chan et al. 2018), b) Manejo genético de poblaciones en cautiverio (West et al. 2018; Lott et al. 2020), c) Gestión de especies invasoras y sus impactos (Hofmeister et al.

2021), d) Manejo genético de poblaciones salvajes (Bernatchez 2016; Wultsch et al. 2016) y e) Recopilación de información a través de monitoreo genético (Thomsen and Willerslev 2015; Wheat et al. 2016; Carroll et al. 2018). No obstante, a pesar de la importancia y del creciente interés en diseñar medidas que incluyan el conocimiento de la variabilidad genética, la diversidad genética observada a nivel de población raramente ha sido considerada de forma explícita dentro de los procedimientos de planificación de conservación (Laikre et al. 2010a; Lundmark et al. 2019). Un gran número de trabajos y de conocimientos sobre el uso de genética para la conservación está más bien restringidos a investigaciones académicas, en un lenguaje complejo y con menor acceso para los tomadores de decisiones sobre conservación. Esto produce que finalmente exista una brecha en el manejo de información genética (Shafer et al. 2015; Haig et al. 2016) y que carezcamos de una comprensión integrada sobre: la gama de posibles efectos ecológicos que los diversos impactos estresantes tienen sobre la diversidad genética dentro de las especies (e.g., a nivel de población), cuál es la importancia del conocimiento genético de las especies para la gestión de la biodiversidad impactada y de cómo integrar la información genética a las políticas de conservación.

Entre los ecosistemas más amenazados del mundo a pesar de su importante contribución al bienestar humano, están los ecosistemas de agua dulce (Reid et al. 2019). Estos albergan más del 10% de todas las especies conocidas en el

planeta (Darwall et al. 2018) y de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2021), aproximadamente un tercio de las 25.000 especies de agua dulce mapeadas por la comisión de Supervivencia de Especies están en peligro de extinción y más de 200 ya están extintas. El decline de la biodiversidad es por tanto mayor en éstos que en el resto de los ecosistemas (e.g., cuando se modela el valor de impacto sobre la biodiversidad de ecosistemas terrestres dado el intercambio biótico al 2100, el valor promedio de impacto será de 1.6 en una escala del 1 al 5, versus para sistemas acuáticos como lagos y ríos donde el valor de impacto es de 4; Sala et al. 2000) y en consecuencia requieren una atención inmediata.

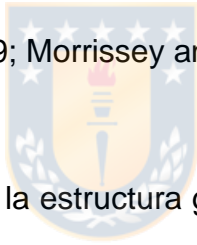


Particularmente una gran parte de los sistemas fluviales tienen una estructura dendrítica representada como una bifurcación arborescente, que forma una gran red jerárquica (Fagan 2002) o gradiente espacial fluvial (Vannote et al. 1980), donde los procesos que actúan a niveles de altitud superiores se ven reflejados en cursos fluviales con jerarquías mayores (Allan and Castillo 2007). La organización espacial dinámica de estos sistemas y su flujo unidireccional hacen que la conectividad y la dispersión de las poblaciones acuáticas sea dependiente y limitada por la conectividad del sistema fluvial por sí mismo. En los ríos, la heterogeneidad natural a escala espacial puede alterar la dinámica de poblaciones y comunidades debido a que las conexiones físicas se forman y se rompen en múltiples ocasiones y variadas escalas de tiempo e influyen por

ejemplo en la distribución de la biota a través de la red fluvial (Smith and Kraft 2005; Tonkin et al. 2018) y en consecuencia la biota puede tener cambios en sus abundancias en base a su capacidad de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas circundantes (Maciel-Mata et al. 2015). Sin embargo, en ríos donde el paisaje ha sido modificado por influencia humana reciente, lo que usualmente ocurre a una escala de tiempo mucho más rápida que los procesos naturales (Faulks et al. 2011), la mayoría de las especies pueden ver superada su capacidad para adaptarse y responder a la disponibilidad decreciente y la creciente irregularidad del hábitat adecuado, produciéndose el fenómeno de fragmentación. Por lo tanto, las perturbaciones naturales y antrópicas directas e indirectas, como por ejemplo cambios geomorfológicos por eventos climáticos, la construcción de represas, la extracción de agua, modificaciones en el régimen de caudal, pueden alterar, disminuir o incluso detener la conectividad de la red, afectando a la diversidad y la persistencia de especies acuáticas a escala ecológica y evolutiva (e.g., Prunier et al. 2018).

Específicamente en peces, los atributos de los sistemas fluviales tienen una fuerte influencia sobre la dispersión y la estructura genética de las poblaciones (Boizard et al. 2009; Koizumi 2011; Dias et al. 2013). En condiciones naturales, sin intervención en la conectividad fluvial, los sistemas fluviales pueden amplificar la variación genética en las poblaciones de peces, debido a que las migraciones asimétricas, especialmente aguas abajo, en sistemas fluviales

permiten el incremento de la variabilidad genética a lo largo del gradiente fluvial (Raeymaekers et al. 2008; Horreo et al. 2011; Golden et al. 2021) y en zonas de confluencia (Morrissey and de Kerckhove 2009). Esto está correlacionado también con el tamaño de la población y la capacidad de dispersión de la especie (Dehais et al. 2010). Se han determinado tamaños poblacionales reducidos en las zonas de cabecera de los ríos comparado con zonas aguas abajo (Morrissey and de Kerckhove 2009), por tanto, la diversidad genética de las poblaciones en hábitats de cabecera o rítrón se prevé que sea menor que la de áreas bajas o potamón, pero de composición distinta entre diversas áreas de cabecera (Hughes et al. 2009; Morrissey and de Kerckhove 2009).



Sin embargo, la dispersión y la estructura genética de las poblaciones de peces en estos paisajes dinámicos también están determinados por otros procesos: a) contemporáneos como la fragmentación que implica una restricción al flujo genético (por ejemplo, las barreras físicas) (Raeymaekers et al. 2008), b) por procesos demográficos (por ejemplo, cuellos de botella o acontecimientos fundadores) (Costello et al. 2003) y c) por procesos a gran escala (por ejemplo, glaciaciones) (Zemlak et al. 2011; Vera-Escalona et al. 2015). Estos tienen el potencial de afectar la conectividad, el tamaño, reducir la diversidad genética de una población así como aumentar las diferencias genéticas entre las poblaciones (Frankham et al. 2017). Evidencia científica ha demostrado, en peces con alta capacidad de dispersión, diferencias genéticas entre poblaciones

aguas arriba y abajo de barreras impasables que interrumpen la conectividad física fluvial como por ejemplo, barreras de centrales hidroeléctricas (Meldgaard et al. 2003; Roberts et al. 2013; Brinker et al. 2018; Vega-Retter et al. 2020). Las barreras provocan la obstrucción de la migración hacia aguas arriba y a su vez limitan el flujo génico, acelerando la deriva genética, y aumentando la probabilidad de perder alelos raros, lo que usualmente reduce la variabilidad genética de una población (Allendorf et al. 2013; Frankham et al. 2017). Por otra parte, las mismas barreras a la conectividad, pero en poblaciones de especies con baja capacidad de dispersión, incluso podrían no mostrar efectos en la estructura genética de las poblaciones, manteniendo el tamaño poblacional y la variabilidad genética. Esto puede deberse a múltiples factores como por ejemplo que: el tamaño del fragmento sea mayor que el área mínima necesaria para completar su ciclo de vida, el tamaño poblacional sea muy grande, la barrera sea muy reciente respecto al tiempo generacional de la especie en estudio (ver ejemplo en Blazek et al. 2013), la barrera sea permeable (e.g., barreras de baja altura, con paso de peces) (Reid et al. 2008; Zhao et al. 2016), o incluso dado factores biológicos como la capacidad de nado y el comportamiento migratorio (Whiteley et al. 2004). Por otra parte cuando la especie tiene poblaciones con baja capacidad de dispersión, y pequeño tamaño poblacional, los efectos negativos de la reducción del flujo de genes sobre el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) y la diversidad genética de la misma, pueden proporcionar un menor potencial de adaptación y resistencia de una



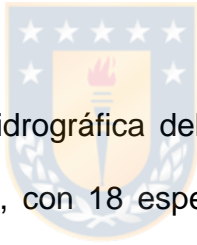
población para responder a los cambios en las condiciones ambientales pudiéndose ver afectada la viabilidad poblacional (Frankham 2005, 2010; Hanski 2011; Allendorf et al. 2013). Sin embargo, también hay situaciones en las que la conectividad aumenta artificialmente (e.g., a través de la translocación y la repoblación o canalización) dando lugar a resultados no pretendidos, como: iniciar la conectividad entre poblaciones que estuvieron aisladas durante un tiempo evolutivo lo que puede resultar en la pérdida, no solo de patrones espaciales naturales de diversidad genética, sino que además de variantes genéticas adaptadas de forma única a su entorno local o crear híbridos con aptitud reducida (Allendorf et al. 2001, 2013; Stockwell and Leberg 2002).



Dado los antecedentes anteriores, en el presente trabajo de tesis se presenta la importancia del conocimiento de variabilidad genética para la gestión de la biodiversidad a través del análisis de la influencia de los factores naturales y antropogénicos sobre la conectividad, estructura genética y distribución poblacional de dos especies de peces endémicas de Chile, *Percilia irwini* y *Percilia gillissi*, en un contexto de alta fragmentación intracuenca y de generación de conectividad intercuenca, de los ríos Biobío e Itata.

En Chile, los ecosistemas fluviales de la zona central han mostrado un deterioro progresivo, en parte debido al aumento de las actividades antropogénicas

relacionadas con el desarrollo hidroeléctrico, donde se encuentran más del 95% de las centrales hidroeléctricas en operación del país (Díaz et al. 2019). Más del 24% de la energía entregada al Sistema Eléctrico Nacional (SEN), el cual suministra electricidad a más del 90% de la población chilena, proviene de la hidroelectricidad, por lo tanto, esta es una importante fuente de abastecimiento energético para Chile (Ministerio de Energía 2021). Al mismo tiempo, los ríos de la zona central poseen aún un gran potencial hidroeléctrico y las políticas energéticas de país favorecen y potencian el desarrollo de esta energía renovable (Ministerio de Energía 2015; Arriagada et al. 2019).



Especialmente, la cuenca hidrográfica del río Biobío (la de mayor riqueza de especies de peces de Chile, con 18 especies nativas, dos de las cuales son endémicas del río Biobío; Habit et al. 2006, 2019) se caracteriza por un gran desarrollo hidroeléctrico desde principios de la década de 1950 a la fecha, con la construcción de 11 represas, (ver más en Sección Estructura Metodológica del Trabajo de tesis: Área de estudio). Díaz et al. (2019) demostró que la cuenca del río Biobío posee uno de los más altos índices de fragmentación contemporánea, producto de barreras por centrales hidroeléctricas, en comparación con otras cuencas del área central del país; además proyectan al 2050 un incremento sustancial en el número de barreras, tanto en los tramos medios como bajos, lo que aumentaría esta fragmentación potenciando impactos en las comunidades de peces. Estudios previos han mostrado en

parte los efectos de fragmentación sobre la fauna íctica de la cuenca del río Biobío encontrando cambios en la estructura comunitaria reflejados en la reducción de rangos de distribución (Habit et al. 2006, 2007). Pero también, la cuenca del río Biobío se caracteriza por una gran matriz de canales de riego agrícolas directos y derivados que tienen el potencial de facilitar la conectividad y el flujo de genes entre los ríos y entre cuencas, con la cuenca vecina del río Itata.

La cuenca del río Itata, se caracteriza por poseer un índice de fragmentación por centrales hidroeléctricas cercano a cero (Díaz et al. 2019), no obstante, su régimen hidrológico ha sido principalmente modificado por el riego de más de 144.000 ha para propósitos agrícolas (Habit et al. 1998; Sandoval Jeria 2003). Esta cuenca se conecta con Biobío gracias a la recepción de aguas provenientes del Biobío a través de los canales de regadío Laja-Diguillin y Zañartu principalmente (ver más en Sección Estructura Metodológica del Trabajo de tesis: Área de estudio). King and O'Connor (2007) han demostrado que, cuando grandes proporciones del caudal del río se desvían a canales de riego (e.g. sobre el 20% del caudal medio mensual del río), es probable que los peces se desvíen y arrastren, especialmente en las primeras etapas de vida debido a su relativamente baja capacidad de nado, aunque también hay evidencia de individuos adultos atrapados en pozas aisladas durante periodos de no irrigación (King and O'Connor 2007). La dispersión entre cuencas

hidrográficas distintas a través de riego ha sido demostrada en Chile para la especie *Diplomystes incognitus* (Muñoz-Ramírez et al. 2015). Muñoz-Ramírez et al., (2015) determinaron a través del uso de ADN mitocondrial y análisis bayesianos, que la baja estructura génica entre cuencas (Mataquito y Rapel, al norte del Biobío e Itata) está altamente sustentada por un escenario contemporáneo de dispersión a través de canales de riego, rechazando la posibilidad de que el patrón observado haya sido producto de la divergencia reciente del linaje. Esta evidencia robusta de conectividad artificial podría también ocurrir en otras especies nativas. Por otra parte, ambas cuencas, que tienen atributos diferentes relacionados con su tamaño y su nivel de fragmentación, también coinciden en una zona de transición climática altamente influenciada por eventos tectónicos y volcánicos que pudieron permitir la conectividad fluvial y biológica en el área, así como influir distintamente en la distribución de la biota producto de las condiciones glaciales particulares que pudieron sufrir cada cuenca, en especial la parte andina de la cuenca del Biobío donde han sido descritos morrenas pertenecientes a la última época glacial (Thiele et al. 1998; Diaz 2020).

Considerando el escenario de alta fragmentación física de la cuenca del río Biobío, así como el de una alta conectividad artificial con su cuenca vecina del río Itata, en la presente tesis se ha realizado un análisis de la conectividad, diversidad genética y persistencia de especies del género *Percilia* (Girard 1855)

en ambas cuencas. El género *Percilia* es endémico de Chile, distribuido al oeste de los Andes en la zona central del país. Comprende dos especies: *Percilia gillissi* y *Percilia irwini*. *Percilia irwini* ha sido descrito como restringido principalmente a la cuenca del río Biobío (~ 37°S), mientras que *P. gillissi* se distribuye al norte y al sur de esta cuenca desde el río Aconcagua en el norte (~ 32°S) hasta el lago Llanquihue en el sur (~ 41°S) (Dyer 2000). Ambas especies habitan en una región de alto nivel de endemismo, considerada como un *hotspot* de biodiversidad (25°S a 47°S, Arroyo et al. 2006), altamente intervenida por actividades antropogénicas (Myers et al. 2000). Ambas especies son pequeñas (70-90 mm de longitud total) y generalmente difíciles de distinguir, sobre todo en sus etapas juveniles (Arratia 1982; Dyer 2000). En general, la biología de las especies, las pautas de variabilidad genética entre estas especies y su distribución geográfica son poco conocidas. Ambas especies se consideran en peligro de extinción (clasificadas por el Reglamento de Clasificación de Especies - RCE, en 2011 *P. gillissi* y 2008 *P. irwini*) debido a su estrecha distribución y degradación de su hábitat (Habit and Belk 2007). Ruzzante et al. (2006) demostraron que *P. irwini* del río Biobío está más estrechamente relacionado con *P. gillissi* de las cuencas hidrográficas que habitan en el sur que con las que habitan sistemas del norte, lo que sugiere una fuerte diferenciación entre las poblaciones de *P. gillissi* al norte de la cuenca del Biobío (Ruzzante et al. 2006). Los resultados de Ruzzante et al. (2006) sugieren entonces discrepancias entre la variabilidad morfológica y genética de *Percilia*

spp. y por tanto una complejidad taxonómica dentro de este género mayor de lo que es actualmente reconocida y que pueden ser producto tanto de de los cambios de distribución por eventos vinculados a glaciación y vulcanismo como eventos más recientes de generación de conectividad.

Debido a la gran complejidad del paisaje donde habitan estas especies (cambios en la conectividad fluvial sean por una alta fragmentación o una generación de la conectividad antropogénica o natural), y la complejidad taxonómica entre ambas especies estrechamente relacionadas, fenotípicamente similares y con áreas de distribución contiguas o parcialmente solapadas donde pudieran hibridar, el análisis a través de un enfoque integrador que permita comprender la influencia de los factores naturales y antropogénicos en la organización de la variación genética dentro y entre las poblaciones *Percilia* spp. es esencial debido a que proporcionan evidencia de cómo responderán las poblaciones a cambios futuros en la conectividad y aporta en la generación de conocimiento base para las decisiones de conservación y en la comprensión del uso potencial y estratégico de la genética para la conservación como herramienta de gestión ambiental en Chile.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes previamente expuestos, se plantea que las alteraciones antropogénicas de la conectividad fluvial alteran los procesos naturales de dispersión, distribución y estructura genética de poblaciones de *Percilia* spp. Las alteraciones antrópicas que alteran positiva o negativamente la conectividad podrían producir una reducción en los tamaños poblacionales y probables extirpaciones poblacionales (en caso de aumento de la fragmentación) o podrían resultar en la hibridación introgresiva entre especies estrechamente relacionadas del género (en caso de una generación de conectividad). Estos efectos, no obstante, son dependientes de la capacidad de dispersión, tamaño poblacional (deriva génica) y del grado de aislamiento de las poblaciones (flujo génico) de *Percilia* spp. por lo que la implementación de medidas de conservación apropiadas para estas especies requiere de conocimientos acabados de su estado genético producto de la conectividad contemporánea.

En base a lo anterior y considerando la alta fragmentación por centrales hidroeléctricas en el río Biobío, la alta conexión por canalización con la cuenca del río Itata, se postulan las siguientes predicciones para los objetivos 2 y 3:

Objetivo específico 2:

1. Las poblaciones de *Percilia* spp. de los ríos de la cuenca del río Biobío se diferenciarán entre sí a escala de ríos, dada la estructura jerárquica y longitudinal propia de los ríos en la cuenca, y a escala de tramos en ríos, cuando estos han sido intervenidos por una barrera antropogénica (muros de centrales hidroeléctricas) y/o una barrera natural. En las áreas sin fragmentación, se observará un patrón de diferenciación genética denominado aislamiento por distancia donde la diferenciación aumenta con la distancia entre las poblaciones.
2. La estructura genética poblacional generada por barreras antropogénicas dependerá de la permeabilidad de la barrera (en este caso, del tipo de barrera según tipo de central hidroeléctrica, siendo más limitante del flujo génico las centrales con embalse).

Objetivo específico 3:

3. Se evidenciará conectividad genética contemporánea entre las poblaciones de *Percilia* spp. entre ambas cuencas dado el actual escenario de incremento de conectividad por canalización entre ambas cuencas.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de tesis es:



Determinar cómo la pérdida y la generación de conectividad fluvial, por razones antropogénicas, ha influenciado a los patrones de variabilidad genética neutral de *Percilia* spp. y formular medidas de manejo basadas en el conocimiento genético para la conservación como herramientas de gestión ambiental en Chile.

Consecuentemente, los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Analizar la importancia del conocimiento de la diversidad genética y la posibilidad de implementar medidas basadas en conocimiento genético para la gestión de la biodiversidad de especies de peces de ecosistemas acuáticos continentales en Chile.
2. Determinar la diversidad genética, estructura y flujo génico entre poblaciones de *Percilia irwini* en la cuenca del río Biobío y evaluar el efecto genético de las barreras (represas hidroeléctricas y saltos de agua).
3. Determinar la influencia de la alteración (aumento) de la conectividad contemporánea en la diversidad genética, la homogenización genética y la distribución geográfica de poblaciones de *Percilia irwini* y *Percilia gillissi* en dos cuencas contiguas (ríos Biobío e Itata).

### 3. ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS

#### a) Área de estudio

El área de estudio se extiende desde los 36°10'S-72°10'W hasta los 38°20'S-72°59'W y comprende dos cuencas hidrográficas andinas con distintos niveles de intervención en su conectividad física, la cuenca del río Biobío y la cuenca del río Itata en Chile central. Ambas presentan características físicas naturales similares en cuanto al clima templado con estaciones lluviosas y secas muy marcadas y los ríos que las componen tienen regímenes de caudales de tipo pluvial, nival y nivopluvial. Además, comparten una ictiofauna similar y pertenecen a la misma área de endemismo (Dyer 2000).

La cuenca del río Biobío corresponde a uno de los ecosistemas acuáticos más importantes del país, no solo por ser eje del desarrollo de la VIII Región del Biobío, sino también porque alberga la mayor riqueza específica de peces nativos en Chile (Habit et al. 2006), representadas por 18 de las 45 especies descritas para el país. La cuenca del río Biobío tiene un área de drenaje de 24.260 Km<sup>2</sup> y corresponde a la tercera más grande del país (DGA 2004). Al mismo tiempo está compuesta por 15 subcuencas menores, de las cuales las principales son las del Alto Biobío y las de los ríos Duqueco, Bureo, Vergara y Laja. Estas han sido sometidas a diversas actividades productivas; por lo que

las dinámicas del sistema entero han sido descritas por Valdovinos and Parra (2006) como muy variables desde zonas de cabecera hasta desembocadura. Las altas pendientes y caudales de estas subcuencas implican también que el río Biobío sea el río con mayor potencial hidroeléctrico del país (Ministerio de Energía 2016). Actualmente, esta cuenca ya alberga en funcionamiento 11 centrales hidroeléctricas (3 de embalse y 8 de pasada). Las centrales de pasada, ordenadas de acuerdo con su cronología, corresponden a Abanico (1948), El Toro (1973), Antuco (1981), Rucúe (1998), Peuchén (2000), Mampil (2000), Quilleco (2007) y Laja (2015). Las centrales de embalse se encuentran secuenciales a lo largo del cauce principal, ubicadas en el siguiente orden comenzando desde aguas arriba: Ralco (2004), Pangue (1996) y Angostura (2014). Recientemente se ha aprobado además el proyecto Central Hidroeléctrica Rucalhue, el cual consiste en la construcción y operación de una central de pasada sin capacidad de regulación, la que se construirá directamente aguas abajo de Angostura (RCA N° 159, Servicio de Evaluación Ambiental, 2016). En forma natural, la cuenca presenta una barrera importante, el Salto del Río Laja, cuyo origen se remonta a la era del Pleistoceno superior hace aproximadamente  $15.000 \pm 500$  AP (fecha de datación del abanico lahárico del Salto del Laja, Moreno R. and Varela B. 1985). La cuenca también cuenta con un vasto sistema de canales de regadío construidos desde mediados de los años 20 para sustentar el desarrollo agrícola, de los cuales dos (Canal Zañartu y Canal Laja-Diguillín) captan sus recursos en el río Laja en la

cuenca del Biobío y los traspasan a los ríos Itata, Huépil, y Cholguán en la cuenca del río Itata (Sandoval Jeria 2003) (Ver tabla 1). Hoy, la agricultura es la actividad económica que consume más recursos hídricos en el país. No obstante, la disponibilidad de agua para riego se ha visto alterada desde 2010 debido a la megasequía y se verá alterada de acuerdo a las proyecciones de cambio climático de aumentos de temperatura y una disminución en las precipitaciones (Marengo et al. 2009). Al mismo tiempo, la utilización de infraestructura para satisfacer las necesidades agrícolas futuras podrá verse modificada en base a planes de adaptación al cambio climático (Fabres 2010; Donoso et al. 2013), y al desarrollo potencial de la iniciativa público-privada “proyecto Carretera-Hídrica”, que plantea el traslado de agua para riego, minería y producción eléctrica, a través de un sistema de canalización desde la VIII región del Biobío hasta la III región de Atacama (Corporación Reguemos Chile 2021), lo que evidentemente tendrá importantes implicancias ecológicas y genéticas en el futuro.

Por otra parte, y considerando exclusivamente barreras por centrales hidroeléctricas, Díaz et al., (2019) han demostrado que, en la actualidad, la cuenca del Biobío posee un alto índice de fragmentación (IF) (IF: 0.436; solo superada por la cuenca del Rapel, IF: 0.463). Los resultados de esta investigación también muestran que en un escenario futuro al 2050 esta cuenca tendrá el mayor índice de fragmentación de todas las cuencas de zona central

del país (IF: 0.936), el tamaño del fragmento (LF) disponible para la movilidad disminuirá, y aumentará el número total de barreras especialmente en los tramos medios y bajos del río. Por lo que supone una fuerte presión futura para las poblaciones de *Percilia* spp. en esta zona.

La cuenca del río Itata posee un área de 11.200 km<sup>2</sup>. Sus principales subcuencas corresponden a la de los ríos Ñuble, Diguillín e Itata, que contienen los ríos Cholguán, Ñuble, Chillán, Diguillín, Cato, Lonquén e Itata. El río Ñuble y los tributarios de ritrón tienen un marcado régimen nival, al contrario del río Itata (principalmente en su curso inferior) que presenta un régimen pluvial. El curso principal del río Itata (195 km largo) a 18km al oeste de Yungay, presenta una barrera natural, correspondiente al Salto del Río Itata, el cual posee una altura de 20-25m (DGA 2013). Inmediatamente arriba del salto del Itata, 150 metros, se emplaza la central hidroeléctrica Itata (de pasada), cuyo funcionamiento comenzó en el año 2016. Una segunda central hidroeléctrica de pasada se encuentra actualmente en construcción, central Ñuble de pasada (RCA N°218/2007). En la actualidad el régimen hidrológico ha sido modificado por la construcción de canales para riego agrícola y forestal (Ver tabla 1), y algunos, como los mencionados anteriormente (Zañartu y Laja-Diguillín), incluso trasvasijan aguas desde el Biobío al Itata. A pesar de las intervenciones antrópicas, esta cuenca es considerada de bajo grado de fragmentación física por centrales, pero con un alto grado de intervención en su conectividad

producto de los canales de regadío. Diaz et al., (2019) determinó que esta cuenca posee uno de los más bajos valores del índice de fragmentación (IF: 0.044), pero de los valores más altos del índice de largo de fragmento (LF) lo cual refleja que los tamaños de fragmento disponibles para la movilidad de *Percilia* spp. son mayores en esta cuenca que en Biobío. Aun así, Diaz et al., (2019) proyectan una disminución de LF hacia el 2050 y un aumento del número de barreras fragmentado la cuenca.

Por otra parte, análisis tectonoestratigráficos de las cuencas Cenozoicas (alrededor de los 37°S donde se emplazan las cuencas del Biobío e Itata) demuestran que el área fue influenciada por el volcanismo y la tectónica iniciando su desarrollo durante el Oligoceno-Mioceno conformando posteriormente un sistema de al menos tres subcuencas conectadas por dos zonas de acomodación estructural (Chillán, Lileo y Lonquimay), las cuales fueron tectónicamente invertidas hacia el final del Mioceno (entre los 10 y 8 Ma; Suarez and Emparan 1995), dado el alzamiento de la cordillera principal y el plegamiento-fallamiento inverso de las formaciones depositadas (Radic 2010). Transcurrida la inversión tectónica ocurre el volcanismo y deformación Pliocena-Holocena en territorio chileno, donde se evidenciado el arco volcánico actual que se constituye de los complejos volcánicos cuaternarios de: Antuco, Lonquimay y Lanin y los complejos volcánicos Nevados del Chillán y Copague-Callaqui (Dixon et al. 1999; Radic 2010). Posterior a la erupción volcánica del

volcán Antuco, y al desborde de la laguna Laja, los depósitos provenientes de este, junto a los depósitos aluviales y morreínicos provenientes de la alta cordillera de los Andes, se habrían distribuido a lo largo de la depresión central (Thiele et al. 1998). Por otra parte, la reconstrucción paleogeográfica de la región del Laja durante la penúltima época glacial implicó una enorme masa de hielo que cubría el valle longitudinal. Sedimentos fluvioglaciares dejan en evidencia su recorrido hacia el área potamón del Laja, indicando que en la última época glacial existía ya el desagüe por los cerros de la costa. No así más al sur, donde al parecer no existía el valle desfiladero del Biobío en la Cordillera de la Costa para dar salida a una parte del agua proveniente del deshielo, las cuales buscaban su salida hacia el mar por la región de los ríos Imperial y Toltén (Díaz 2020).

#### **b) Especies modelo**

*Percilia spp.* fue seleccionado como modelo de estudio. El género *Percilia* es endémico de la provincia chilena (Dyer 2000) y está representado por dos especies *Percilia gillissi* y *Percilia irwini*. *Percilia irwini* (considerada con “Datos insuficientes” según la Unión internacional para la conservación de la Naturaleza (UICN) y como especie “en peligro” según el Reglamento de Clasificación de Especies Silvestres (RCE)) está restringida solo a algunos afluentes del río Biobío alrededor de 39°S (Arratia and Quezada-Romegialli 2019) aunque también se han registrado ejemplares en los ríos Andalién,

Rehue y esteros afluentes del Malleco (Arratia et al. 1981; Arratia 1982). *P. gillissi* (considerada con “Datos insuficientes” según UICN y especie “en peligro” según el RCE) se distribuye desde el Aconcagua ~32° 45'-S al lago Llanquihue 41°10' (Dyer 2000; Arratia and Quezada-Romegialli 2019). Ambas especies han sido consideradas residentes, no migratorias, con baja capacidad de dispersión y pequeño tamaño corporal (García et al. 2012; Victoriano et al. 2012; Link and Habit 2015). Al respecto Piedra et al. (2012) utilizando métodos de marcaje y recaptura sugirieron que *P. gillissi* tiene una baja capacidad de desplazamiento con una tasa de migración máxima de 26 km a favor de corriente, en la cuenca del río San Pedro (Valdivia, Chile). Por otra parte, mediante análisis genéticos se ha demostrado que las poblaciones de esta especie en el mismo río presenta un alto flujo génico (Victoriano et al. 2012), lo que estaría dado por su gran tamaño poblacional o como segunda alternativa por una posible sobreposición de eventos de reproducción en pequeños tramos a lo largo del río.

García et al. (2012) han realizado un análisis de la tasa metabólica estándar y activa en *P. irwini*. Los autores indican que ambas tasas tienen implicancias en aspectos claves para la supervivencia de los peces (como crecimiento, maduración y dispersión), pero específicamente la tasa metabólica activa está estrechamente relacionada con el rendimiento de nado y por tanto se puede asociar al gasto energético de patrones migratorios para comprender patrones



ecológicos. Los resultados de dicho estudio indican que la variabilidad de la tasa metabólica activa depende en un mayor porcentaje de la masa del pez y la velocidad absoluta del flujo, es decir, los individuos más grandes necesitan proporcionalmente menos energía específica por unidad de masa corporal para nadar que los individuos más pequeños, mientras que los más grandes necesitan proporcionalmente más energía solo para mantener una posición fija al sustrato de grava. Estas características pueden ser una adaptación fisiológica para sistemas de flujo rápido y una explicación de su gran abundancia en algunos tipos de hábitat como sugiere Victoriano et al. (2012) para *P. gillissi*. Al mismo tiempo, los autores sugieren que frente a un régimen de *hydropeaking* (o generación de electricidad que resulta en fuertes variaciones del flujo de las aguas receptoras, dado la producción de energía flexible asociada a la demanda energética; Moreira et al. 2019) como ocurre en el río Biobío específicamente, los cambios de velocidad y turbulencia del agua podrían tener un efecto en su presupuesto energético, lo cual podría disminuir su potencial de crecimiento y/o reproducción con consecuencias negativas a nivel poblacional a largo plazo (García et al. 2012). Respecto al análisis de la tasa metabólica estándar que proporciona una idea del rendimiento de natación que podría estar relacionado con la respuesta del pez a la operación de la presa, los autores observaron que *P. irwini* mantiene una posición fija en el fondo a bajas velocidades de flujo (5-15 cm s<sup>-1</sup>) comenzando a nadar a altas velocidades de flujo (25 y 35 cm s<sup>-1</sup>). Por lo anterior sería probable que *P. irwini* no nade

durante largos periodos de tiempo a velocidades mayores a  $15 \text{ cm s}^{-1}$  y por lo tanto es sugerida como una especie con baja capacidad de dispersión por García et al. (2012). No obstante, en una investigación más reciente de Vivancos et al. (2020) se reconstruyeron los movimientos de vida de *P. irwini* a través de microquímica de otolitos. Los resultados de dicho estudio demostraron que esta especie sí realiza movimientos de hasta 30 km incluso en contra de la corriente en zonas de río que no presentan barreras físicas al desplazamiento. Por lo que existen posibilidades de que *Percilia* spp. efectivamente haga largos desplazamientos al menos dentro de la cuenca a pesar de los resultados sugeridos por García et al. (2012).



Por otra parte, ambas especies son muy similares morfológicamente, principalmente en estadíos juveniles (Arratia and Quezada-Romegialli 2019). Por su parte, Ruzzante et al. (2006) notaron importantes discrepancias entre la variabilidad molecular (filogenia de ADNmt) y la actual distribución de estos taxa. Dichos autores plantean la efectiva existencia de dos especies del género *Percilia*, pero con una distribución distinta a la descrita, debido a una fuerte diferenciación entre las poblaciones de *P. gillissi* del Norte (cuencas Maipo, Mataquito y Maule) y del Sur (Imperial y Cruces). Estas últimas están de hecho más estrechamente relacionadas con *P. irwini*, por lo que se plantea una especie de *Percilia* del Norte y otra del Sur (Ruzzante et al. 2006). Esta

hipótesis no ha sido puesta a prueba y no es considerada por Arratia y Quezada en su revisión de 2019 de los perciformes de Sudamérica.

Bajo estas consideraciones, en este estudio todos los individuos del género *Percilia* fueron considerados inicialmente como *Percilia* spp. Luego según análisis efectuados se corroboró la identidad taxonómica de los individuos capturados en cada cuenca.

### **c) Muestreo**

Individuos de *Percilia* spp. fueron capturados usando el arte de pesca más idóneo para cada área (pesca eléctrica y/o red de arrastre; Zamora et al. 2009) durante dos veranos consecutivos en los años 2016 y 2017 a partir de 35 sitios de muestreo a lo largo de las cuencas de los ríos Biobío (21 sitios) e Itata (14 sitios).

Para determinar los efectos de la fragmentación física en *Percilia* spp del Biobío, los sitios de muestreo (21) se seleccionaron en base a las 11 barreras físicas en la cuenca: Pangué, Ralco, Angostura, Abanico, El Toro, Mampil, Peuchén, Antuco, Rucúe-Quilleco (considerando que funcionan conjuntamente), Laja y a la única barrera natural presentes en la cuenca (Salto del Laja). Para observar si las poblaciones aguas arriba de cada barrera se diferencian genéticamente de las poblaciones aguas abajo de la barrera, por cada barrera

artificial y natural se seleccionó un sitio de muestreo aguas arriba de la barrera. En el caso de centrales hidroeléctricas con generación de embalse, este sitio fue posicionado en una zona aguas arriba de la barrera. La distancia entre la barrera y el sitio de muestreo aguas arriba fue replicada de manera aproximada aguas abajo de la barrera para seleccionar un sitio de muestreo aguas abajo de dicha barrera. Para comprobar que las poblaciones agua arriba son distintas genéticamente de las aguas abajo por efecto de barrera y no por efectos de aislamiento por distancia, fueron seleccionados sitios de muestreo con similares características (condición del sitio: con o sin intervenciones antropogénicas, e.g uso de suelo agrícola, forestal, industrial, entre otros; orden de Strahler del fragmento; altitud; ancho; presencia o ausencia de vegetación nativa o introducida; uso de suelo y acceso) a los sitios aguas arriba de cada barrera dentro de la misma cuenca en áreas sin fragmentación.

Para determinar el efecto del aumento de conectividad por canales de riego entre cuencas, junto a los 21 sitios establecidos en la cuenca del río Biobío, fueron seleccionados catorce sitios en la cuenca del río Itata, distribuidos en los ríos Itata, Diguillín, Chillán y Ñuble. Específicamente 3 sitios del Biobío (LU3, LU2 y LU1 en río Laja), fueron posicionados aguas arriba de la bocatoma del canal Laja-Diguillín por río Laja. Ocho sitios fueron posicionados a lo largo del canal, pero fuera de él (IU1 e IU2 en río Cholguán, DD2 y DD1 por río Diguillín, IU3, ID4, ID5 e ID6 por río Itata) (ver Figura 1 Capítulo 3). El resto de los sitios

en Itata fueron posicionados aguas abajo del trasvase del canal Laja-Diguillín por río Itata (el trasvase es en Estero Colton a río Larqui a río Itata) y también en el río Ñuble siguiendo la estructura natural de la cuenca para poder determinar la conectividad con el resto de ella. El río Laja aguas arriba de bocatoma de canal Zañartu fue muestreado, sin embargo, no fueron encontrados individuos de *Percilia* spp., estos sitios no fueron considerados en los posteriores análisis. El trasvase del canal Zañartu es en el río Huepil (que desemboca en Itata) por lo que la evidencia de conectividad por este canal puede interpretarse a través del diseño de muestreo del canal Laja Diguillín.



En total se muestrearon 1602 individuos. El número de muestras por sitio varió entre  $14 \leq N \leq 101$ . Los ejemplares capturados fueron anestesiados con BZ-20 y les fue extraído un pequeño trozo de tejido desde la aleta caudal (Paso 2, Figura 1). El tejido fue preservado en etanol al 96%, debidamente etiquetado y almacenado en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  en la Colección de peces del Centro EULA de la Universidad de Concepción hasta la posterior extracción de ADN realizada en el Marine Gene Probe Lab en la Universidad de Dalhousie, Nueva Escocia, Canadá (Paso 3, Figura 1).

#### **d) Resumen metodología por capítulo**

En el Capítulo 1 se realizó una recopilación bibliográfica y análisis de la importancia del conocimiento de la diversidad genética y la posibilidad de implementar medidas basadas en conocimiento genético para la gestión de la biodiversidad de especies de peces de ecosistemas acuáticos continentales en Chile. Para esto fueron utilizadas las bases de datos Web of Science y Google académico (Paso 1, Figura 1).

Para el desarrollo de los capítulos 2 y 3 se utilizaron dos tipos diferentes de marcador molecular:

##### 1) Microsatélites:

Los marcadores de microsatélites son ampliamente utilizados como marcador molecular in genética de poblaciones, ecología molecular y conservación (Abdurakhmonov, 2016). La principal ventaja de estos es que usualmente son altamente polimórficos incluso en pequeñas poblaciones y en especies en peligro de extinción. Este alto polimorfismo permite diferenciar individuos estrechamente relacionados y también es particularmente útiles para estimación de la diversidad genética, estructura poblacional y flujo génico (Allendorf et al. 2013). El desarrollo y genotipado de estos marcadores se especifica en Capítulo II.

##### 2) Gen mitocondrial COI:

Este gen es utilizado a menudo como código de barras para la identificación de especies (p. Ej., Mariposas: Hebert, Penton, Burns, Janzen y Hallwachs, 2004; Insectos: Hebert et al., 2016; Peces: Gomes, Pessali, Sales, Pompeu y Carvalho, 2015, Ward, 2009, Ward, Zemlak, Innes, Last y Hebert, 2005), gracias principalmente a su origen materno y a su particular ritmo de evolución. Este enfoque permite la discriminación no solo de especies estrechamente relacionadas, sino a veces también de grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox y Hebert, 2001; Hebert et al., 2003); también contribuye a una mejor comprensión de los patrones históricos que modelaron la diversidad genética actual de las poblaciones (Carvalho Gomes et al., 2015; Hendry et al., 2010). Con base en el hecho empírico de que la probabilidad de conespecíficos es muy baja en peces (Ward 2009), cuando la divergencia entre secuencias >2%, los especímenes fueron considerados como pertenecientes a diferentes especies. El uso de esta metodología (gen mitocondrial COI) está acelerando enormemente la tasa de identificación de especies a través de la taxonomía estándar. Mas detalles de la secuenciación de este gen fueron descritos en metodología de Capítulo III.

En el Capítulo 2, específicamente, se trabajó solo con los genotipos de individuos capturados en la cuenca del río Biobío para 28 loci microsatélites (N=927) (Pasos 4, 5 y 6, Figura 1). Se realizaron análisis de calidad genética siguiendo metodología de uso frecuente en el área. Se efectuaron análisis de

variabilidad genética, estructura poblacional y aislamiento por distancia para detectar el efecto de barrera. Se estimaron tasas de migración contemporáneas basado en las poblaciones detectadas y se calculó el tamaño efectivo ( $N_e$ ) de cada población, entre otros análisis de rigor (Pasos 4, 5 y 6, Figura 1).

En el Capítulo 3 se trabajó con los genotipos del total de individuos capturados ( $N=1602$ ) para los mismos 28 loci microsatélites antes mencionados. Con esta información se realizaron análisis de variabilidad genética, de estructuración poblacional y detección de híbridos (Pasos 4, 5 y 6, Figura 1). Al mismo tiempo se trabajó con las secuencias del gen mitocondrial *COI* de 290 individuos (de Itata y Biobío) (Paso 7, Figura 1). Estas secuencias fueron utilizadas para realizar una reconstrucción filogenética de ambas especies y como barcoding para la clasificación de especies. Por último, se utilizó la información morfológica de 134 individuos de ambas cuencas para contrastarla con la información genética (mitocondrial y microsatélites) asociada a estos mismos individuos, para corroborar su clasificación de especie (Figura 1).

Finalmente se discutieron de manera interconectadas las implicancias de los resultados para la conservación y se propusieron recomendaciones basadas en conocimiento genético para el manejo de las poblaciones de *Percilia* spp. en Chile con miras a la integración de la genética para la conservación en la gestión ambiental.



## TABLA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS

Tabla 1: Canales de regadío en las cuencas del río Biobío e Itata (basado en Sandoval Jeria 2003; Fabres 2010).

	Canal Matriz	Año termino de construcción	Captación	Superficie bajo riego (ha)
	Canal Zañartu	1928	río Laja	21000
	Canal Laja	1925	río Laja	50000
	Canal Antuco	1964	Canal Pinochet Rios, río Laja	400
	Canal Quillaileo	1961	río Quillaileo y río Huequecura	2000
<b>CUENCA RÍO BIOBÍO</b>	Canal Biobío Norte	1934	río Biobío	7000
	Canal Biobío-Negrete	1958	río Biobío	10000
	Canal Duqueco-Cuel	1974	río Duqueco	5500
	Canal Coreo	1970	río Duqueco	3120
	Canal Biobío Sur	1954	río Biobío	45000
	Canal Zañartu	1928	río Laja	20000
<b>CUENCA RÍO ITATA</b>	Canal Laja-Diguillín	2007	río Laja y embalse Diguillín	43400
	Canal Perquilauquén-Ñinquen	1974	río Perquilauquén	2800
	Canal Quillón	1959	río Itata	2500

## FIGURA ESTRUCTURA METODOLÓGICA DEL TRABAJO DE TESIS



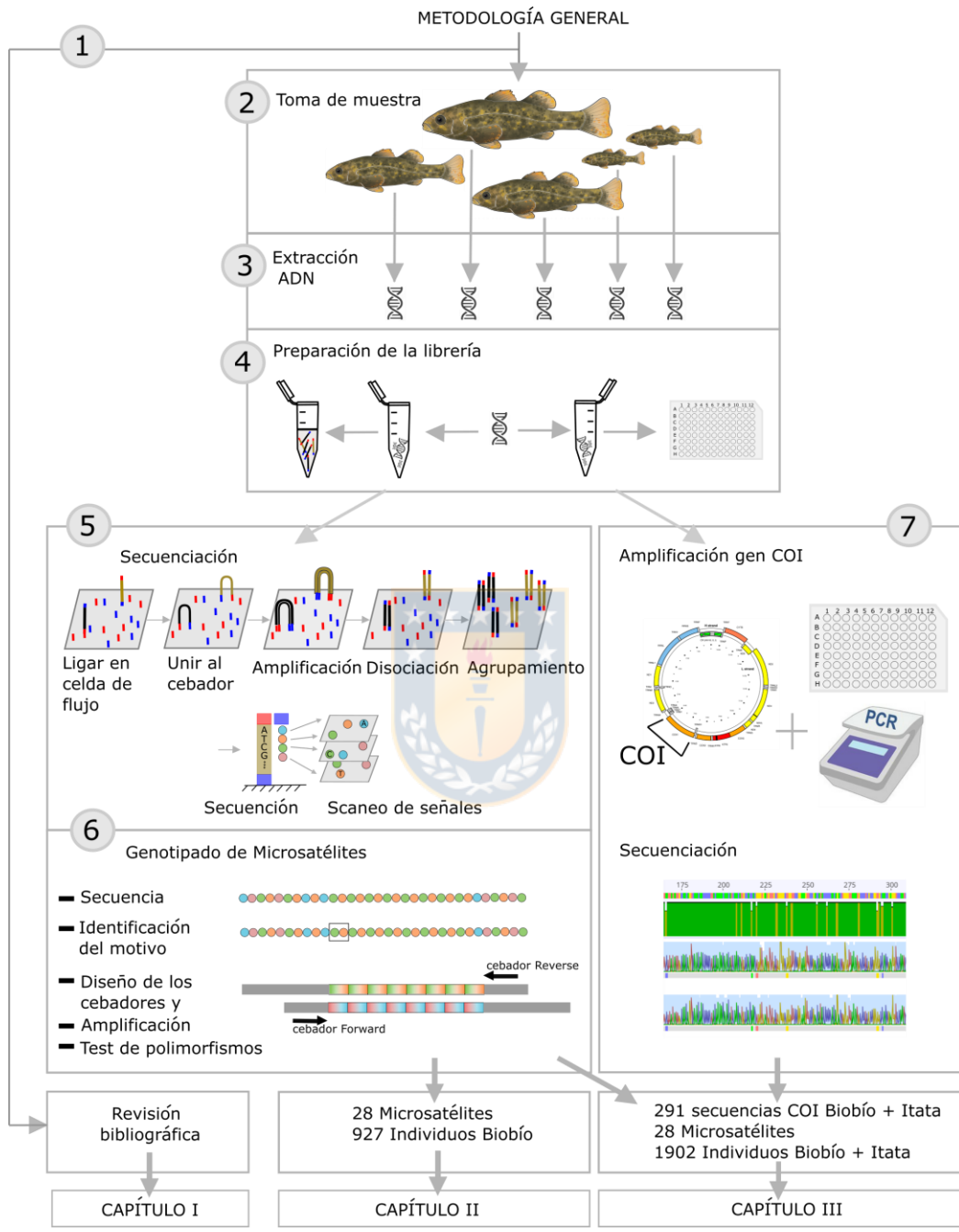


Figura 1: Pasos de la metodología general de la tesis.

**4. CAPÍTULO I:**

# REVISIÓN DEL USO DEL CONOCIMIENTO GENÉTICO PARA LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

**Valenzuela-Aguayo, Francisca<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología y Conservación de Peces, Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Department of Biology, Dalhousie University. Halifax, Nova Scotia, B3H4R2  
Canadá.



**Capítulo I: REVISIÓN DEL USO DEL CONOCIMIENTO GENÉTICO PARA LA  
GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD**

En este primer capítulo se analiza la importancia del conocimiento genético para la conservación de la biodiversidad, haciendo especial énfasis en Chile, en cumplimiento del objetivo específico 1: Analizar la importancia del conocimiento de la diversidad genética y la posibilidad de implementar medidas basadas en conocimiento genético para la gestión de la biodiversidad de especies de peces de ecosistemas acuáticos continentales en Chile.

#### **a) Importancia del conocimiento de la diversidad genética**

En la actualidad, la conservación de la biodiversidad es tanto un compromiso nacional e internacional como una condición para nuestra subsistencia (Luck et al. 2003). El funcionamiento de los ecosistemas, las especies y los recursos genéticos otorgan gratuitamente una gama de servicios ecosistémicos que contribuyen directa o indirectamente al beneficio de la humanidad (De Groot et al. 2002; Durance et al. 2016), por lo que cambios en la biodiversidad pueden influir en el suministro de estos servicios (Boulton et al. 2016). Recientemente ha sido reconocido que la rápida pérdida de variación intraespecífica es una crisis oculta de la biodiversidad (Des Roches et al. 2021). La variación intraespecífica, que incluye la diversidad genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, está siendo amenazada por una disminución de las abundancias y extinciones locales entre otros, sin embargo, las evaluaciones de

biodiversidad y su conservación a menudo no estiman ni destacan esta pérdida de diversidad dentro de una especie.

El conocimiento y la comprensión de la diversidad genética es de gran importancia debido a que ésta controla la variedad de la vida (composición y comportamiento) (Frankham et al. 2017) además de proporcionar i) una visión retrospectiva de los linajes evolutivos de todos los taxa y sus relaciones filogenéticas, ii) una visión contemporánea de la estructura genética dentro y entre poblaciones y iii) una proyección al futuro del potencial biológico evolutivo de las especies y sus poblaciones (Fisher 1930; Hughes et al. 2008; Allendorf et al. 2013). Los métodos de estudio genéticos, tales como la genética de poblaciones y/o el estudio simultáneo de numerosos loci o regiones del genoma, han contribuido a comprender mejor los roles de la evolución, el flujo de genes y la selección natural (Luikart et al. 2003; Allendorf et al. 2013). Además han contribuido de forma más específica a la a) resolución de incertidumbres taxonómicas y la definición de unidades evolutivamente divergentes (Palsbøll et al. 2007; Chan et al. 2018), b) al manejo genético de poblaciones en cautiverio (West et al. 2018; Lott et al. 2020), c) a la mantención de la variabilidad genética de poblaciones salvajes (Bernatchez 2016; Wultsch et al. 2016), d) a la gestión de especies invasoras y sus impactos (Hofmeister et al. 2021), y a e) la recopilación de información a través de monitoreo genético (Thomsen and Willerslev 2015; Wheat et al. 2016; Carroll et al. 2018). En

adición a lo anterior, los análisis genéticos también han permitido nuevos conocimientos sobre la interacción entre el factor genético y procesos demográficos y fluctuaciones ambientales producidas tanto naturalmente (Jackson et al. 2018; De Kort et al. 2021) como antropogénicamente (Miraldo et al. 2016). Igualmente, con las modificaciones del paisaje, las cuales tienen un papel importante en las variaciones espaciales y temporales de la biodiversidad (Turner 2010; Miller et al. 2011) y también en distribución de la diversidad genética (Brown et al. 2013). Incluso también, los análisis genéticos, permiten medir las variaciones negativas de la diversidad genética cuando no hay efectos visibles o detectables en los tamaños censales o en las tasas de supervivencia y mortalidad de una población.



No obstante, ha habido una evaluación limitada del uso potencial de la genética para mejorar el entendimiento de respuestas biológicas frente a condiciones ambientales y demográficas dinámicas y así tomar medidas de conservación apropiadas. Ello, a pesar de que las modificaciones y perturbaciones producto de las actividades humanas en el medio ambiente están ocurriendo rápidamente (e.g., eventos de temperaturas extremas, Wotton et al. 2010; Cambio climático, Flannigan et al. 2009). En consecuencia, los estudios que infieren procesos biológicos a partir de patrones genéticos, como la genética del paisaje (Manel et al. 2003) pueden aportar información significativa sobre la respuesta genética y demográfica de las poblaciones a los cambios físicos

observables en el presente y hacia el futuro, y también pueden generar conocimientos importantes para las decisiones de conservación (Laikre et al. 2009; Allendorf et al. 2013). Por lo mismo, el conocimiento de la genética para la conservación es un campo de investigación todavía muy amplio (Frankham 2010; Allendorf et al. 2013; Frankham et al. 2014).

### **b) Marco legal Internacional y Nacional**

Las políticas internacionales sobre el conocimiento y uso estratégico de la genética para la conservación son escasas. La autoridad mundial en cuanto a la evaluación del estado de conservación de la naturaleza y sus recursos y de proporcionar medidas adecuadas para su protección es la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, desde 1949). Por otra parte, el Convenio sobre la Diversidad Biológica CDB (1992) es actualmente el instrumento político internacional más importante que se ocupa de la creciente amenaza de la pérdida de biodiversidad, su protección y uso sustentable y de compartir los beneficios que surgen de la comercialización y otros usos de los recursos genéticos de manera equitativa (CBD 2021). Ambas entidades participan de manera asociativa de importantes programas, convenciones internacionales, protocolos y acuerdos para conservar y utilizar de manera sostenible la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas.

A pesar de que la genética para la conservación se ha convertido en un campo de conocimiento e investigación creciente para asegurar la viabilidad a largo

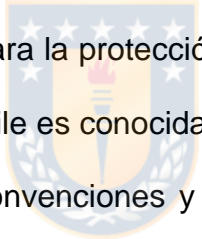


plazo de las poblaciones, fuera del ámbito académico, la genética sigue siendo en gran medida pasada por alto y descuidada en la gestión práctica, así como en las políticas internacionales (Laikre et al. 2010a). Ejemplos de esto es que 1) el sistema de la Lista Roja de la UICN para clasificar el estado de amenaza de las especies no incluye ningún criterio genético directo, a pesar de que la endogamia, la deriva genética y la pérdida de diversidad genética son procesos reconocidos por reducir la viabilidad y aumentar el riesgo de extinción de las poblaciones (Frankham 2005). 2) El único órgano, CBD, que considera como objetivo primario la conservación en el nivel genético tanto en Latinoamérica como en el resto del mundo (Torres-Florez et al. 2018), solo se limita a la meta de AICHI número 13 para la biodiversidad (la cual busca mantener y salvaguardar la diversidad genética de especies vegetal y animales domésticos y sus especies parientes silvestres), y tras la publicación del primer borrador de la estrategia de biodiversidad de la CBD (enero 2020), el organismo aún no sugiere indicadores para hacer seguimiento de las tendencias de la diversidad genética de animales y plantas silvestres, ni establece explícitamente que el mantenimiento de la diversidad genética es crucial para todas las especies y no solo para unas pocas (Hoban et al. 2020).

A pesar de lo anterior, usualmente las políticas de conservación de cada país derivan en medidas como planes de recuperación de especies amenazadas o estrategias de biodiversidad las cuales proporcionan objetivos de las acciones

de manejo de especies y permiten la cuantificación del manejo a través de datos genéticos, de ser considerados. Al respecto, un estudio realizado por Pierson et al. (2016) sobre la inclusión de los factores genéticos en los planes de recuperación de especies amenazadas en Estado Unidos de Norte América (USA), Unión Europea (EU) y Australia, estimó que un 63 % de los planes de USA, un 55% de planes de Australia y un 33% de los planes de EU consideran el factor genético como un factor de riesgo que debe ser incluido en los planes de recuperación. El 82% de los planes en USA, el 52% en Australia y el 17% en EU incorporan datos genéticos o asignan tareas para incorporar esta información en dichos planes. Respecto al tipo de información genética que fueron incluidos en estos planes los factores de variabilidad genética (genética de poblaciones) fueron los más frecuentes con 70% en USA, 60% en Australia y un 12% EU. La información genética relacionados con el fitness (Hibridación y Endogamia) fue rara vez incluida, solo el 7% de los planes incluye o recomienda la inclusión del uso de marcadores moleculares para estimar endogamia y el 5 % lo hace para estimar hibridación. Un panorama similar es expuesto por Laikre et al. (2016) quienes determinaron que las políticas de los planes de gestión que rigen las Áreas Marinas Protegidas del Mar Báltico en Suecia, Finlandia, Estonia y Alemania, carecen en gran medida de objetivos y estrategias para la biodiversidad genética. Por otra parte Torres-Florez et al. (2018) identificaron, a través de una amplia búsqueda de literatura publicada sobre genética de la conservación de América Latina, solo 71 trabajos

mencionados en informes gubernamentales (e.g, en planes de manejo, evaluaciones ambientales y otros), de los cuales 44 artículos propusieron acciones de manejo específicas y 2 resultaron en un monitoreo activo (Torres-Florez et al., 2018). Estos resultados puede que en la actualidad hayan aumentado, no obstante, siguen siendo el reflejo de la brecha que existe entre la aplicación práctica de los principios genéticos al manejo de especies amenazadas y a la gestión de la biodiversidad y promulgación de planes de conservación.



El marco legal estratégico para la protección y conservación de la biodiversidad (en todos sus niveles) en Chile es conocidamente débil, y actualmente está más bien basado en tratados, convenciones y acuerdos internacionales ratificados en materia de conservación de la biodiversidad (Figuroa and Simonetti 2003; Perez-Quezada 2018) (Ver Tabla 2). Algunos de ellos como la Convención de Washington, la Convención de Ramsar y la Convención sobre Diversidad Biológica (CDB) han sido incluso declarados como Ley de la República (e.g., CDB en 1995), con el fin de “proteger y conservar en su medio ambiente natural, ejemplares de todas las especies, los paisajes y/o ecosistema de gran diversidad biológica, belleza o valor histórico o científico”, entre otros (Perez-Quezada 2018). Como consecuencia del CBD en Chile, en 1994 fue promulgada la Ley de Bases del Medio Ambiente, la cual sentó las bases generales para la protección del medio ambiente. Al mismo tiempo con esta ley

se creó la CONAMA y el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) para coordinar, regular y fomentar la protección de los recursos naturales. Dieciséis años después, se crea el Ministerio de Medio Ambiente (2010), que tiene la facultad de desarrollar y aplicar variados instrumentos de gestión ambiental en materia normativa, para la protección de los recursos naturales, educación ambiental y control de la contaminación, entre otras materias (Jorquera-Jaramillo et al. 2012). No obstante, ante la falta de coordinación de estas entidades para una correcta y clara adecuación interna de la normativa nacional a las normas y principios consagrados en los tratados internacionales ratificados, en el año 2010, cuando se publica la Ley 20.417 (artículo transitorio N.8), que modifica la Ley 19.300 se solicita la creación del Servicio de Biodiversidad y Áreas Protegidas (SBAP) (Perez-Quezada 2018). El proyecto del SBAP, que en la actualidad se encuentra en la Comisión de Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Cámara de Diputados (enviado al congreso por primera vez el 2014), se propone como un servicio público cuyo objetivo será la conservación de la biodiversidad del país, a través de la gestión para la preservación, restauración y uso sustentable de genes, especies y ecosistema (Titulo II, Artículo 4° del Proyecto de ley). Este sistema considerará un Sistema de Información y Monitoreo de la Biodiversidad en consistencia con el conocimiento científico y generará un inventario de ecosistemas, de especies y su variabilidad genética, por lo que se convertiría en el primer instrumento en considerar el estudio de la “variabilidad genética” en el país. Y si bien, en este

proyecto aún no se estipula concretamente cuáles serían los índices por evaluar para determinar la variabilidad genética, al menos se concreta que el plan de recuperación, conservación o gestión de una especie considerará el diagnóstico del estado genético de la especie, la determinación de su hábitat y las amenazas reales o probables de que es objeto (Titulo III Párrafo 6° artículo 43).

Por otra parte, la Estrategia Nacional de Biodiversidad Chilena (creada en apoyo a la implementación de los compromisos estratégicos adquiridos por Chile en el CBD) también reconoce que, en el ámbito regulatorio nacional, no se dispone de estimaciones sobre la pérdida de diversidad genética de las especies chilenas, ni de series históricas que permitan un diagnóstico sobre su estado actual, a pesar que casi el 25% de las especies nativas de Chile son endémicas (Universidad de Chile 2016) compuestas por un recurso genético valioso, puesto que constituyen un patrimonio único y exclusivo en el mundo. Dado esto, en la actual estrategia de Biodiversidad 2017-2030 se ha planteado la conformación, al 2020, de un grupo de trabajo para el diseño del programa nacional encargado de prevenir, mitigar y restaurar los efectos que provocan sobre las especies nativas, su diversidad genética y sus poblaciones, la fragmentación y la pérdida de la calidad de su hábitat; y la implementación de este programa nacional al 2030. Si bien las intenciones de conocer y conservar la variabilidad genética están presentes en la estrategia de Biodiversidad, en el proyecto de ley que crea el Servicio de Biodiversidad y Áreas Protegidas, como

también en el informe de la mesa de biodiversidad del comité científico de Cambio climático preparado para la COP25, aun no hay señales concretas de cómo se logrará, quedando aun un largo camino por recorrer en materia del uso de la genética para la conservación de la variabilidad en Chile.

### **c) Estimadores de variabilidad genética en ayuda de la conservación**

El desarrollo de prioridades para la conservación de una especie requiere, entre otras cosas, una comprensión de la diferenciación genética entre las poblaciones para identificar las unidades que se conservarán, la comprensión de los patrones de variación genética dentro y entre poblaciones y las implicancias de la divergencia genética entre las poblaciones. Esta información puede obtenerse a través de múltiples estimadores de variabilidad genética.

1. Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), observada ( $H_o$ ) y Riqueza de alelos ( $A_R$ ):  
La Heterocigosidad es la medida más usada para comparar la magnitud de la variación genética entre diferentes poblaciones y corresponde a la proporciones de individuos que son heterocigotos, donde la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) es la proporción empírica de heterocigotos y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) es la proporción esperada de heterocigotos si la población en estudio se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Allendorf et al. 2013). La riqueza alélica ( $A_R$ ) o número total de alelos por locus, también es una medida de variabilidad genética. Esta es una valiosa medida complementaria, porque es más sensible a los cambios en el tamaño de la población que la

heterocigosidad, y es una medida importante del potencial evolutivo a largo plazo de las poblaciones (Allendorf et al. 2013).

## 2. Índice de fijación ( $F_{ST}$ ):

Respecto a la diferenciación genético poblacional, una de las métricas más antiguas y ampliamente utilizadas es el estadístico F de Sewall Wright (Wright 1931, 1951). Este estadístico describe la proporción en la que la heterocigosidad se reduce en cada población que es contrastada en relación con la heterocigosidad de una población que integra a las anteriores y que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) con las mismas frecuencias alélicas (Allendorf et al. 2013). Específicamente el coeficiente  $F_{ST}$  es la medida de diferenciación genética que está directamente relacionada con la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones e inversamente relacionada con el grado de semejanza entre los individuos dentro de las poblaciones; y la cantidad de diferenciación genética entre poblaciones tiene una relación predecible con las tasas de importantes procesos evolutivos (migración, mutación y deriva) (Holsinger and Weir 2009). Por lo anterior,  $F_{ST}$  ha sido una medida ampliamente aplicada en estudios genética de poblaciones, del paisaje y también en conservación (Sanchez et al. 2012; Roberts et al. 2013; Leder et al. 2020; Golden et al. 2021).

## 3. Tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ):

El tamaño efectivo de una población es el número de individuos reproductores que producen descendencia y/o que viven hasta la edad reproductiva (N) de

una población ideal cuya heterocigosis decrece a una tasa similar a la de la población bajo estudio. Una población ideal es una población cerrada (sin flujo génico), de tamaño constante, con igual número de individuos de ambos sexos que se aparean al azar el éxito reproductivo sigue una distribución de Poisson y donde la mutación es ignorada (Frankham et al. 2017). Este es un importante estimador en genética para la conservación ya que son estos individuos los que contribuyen a la generación siguiente en términos genéticos permitiendo entender el proceso de deriva génica y pérdida de variación de la población. La tasa de pérdida de variación y de heterocigosis por deriva génica es más alta en poblaciones pequeñas, aunque ocurre en todas las poblaciones finitas, a menos que la mutación y la inmigración contrarresten el proceso y lo hagan más lento (Solberg et al. 2006; Schwartz et al. 2007; Allendorf et al. 2013).

#### 4. Flujo génico

El flujo génico entre poblaciones es la fuerza cohesiva que mantiene juntas a poblaciones geográficamente separadas dentro un único cluster evolutivo, o una especie (Allendorf et al. 2013). Una disminución del flujo de genes puede conducir a la endogamia local ("*inbreeding depression*"), mientras que un aumento del flujo de genes puede limitar la adaptación local y causar depresión exógena ("*outbreeding depression*") cuando los cruces entre dos grupos o poblaciones genéticamente distantes dan como resultado una reducción de la aptitud o fitness. La importancia de la estimación del flujo génico radica en que el flujo génico reduce las diferencias genéticas entre poblaciones e incrementa



la variación genética dentro de una población (Allendorf et al. 2013). Finalmente, la tasa de flujo de genes en animales se correlaciona con las tasas de dispersión; por lo tanto, conocer las tasas de flujo de genes puede ayudar a predecir la probabilidad de recolonización de los hábitats vacantes después de la extirpación o la sobreexplotación (rescate demográfico) (Palsbøll et al. 2007).

#### **d) Marcadores moleculares**

Existe una amplia variedad de métodos y técnicas para examinar la variación genética, no obstante, la selección del método depende de cuál es la pregunta que se quiera responder y cuál es el tipo de información genética con la cual se cuenta para responder estas preguntas (Allendorf et al. 2013). Entre los métodos para determinar la variabilidad genética los marcadores moleculares, basados en las mutaciones de la secuencia de nucleótidos dentro del genoma del individuo; son los marcadores más confiables disponibles (Yang et al. 2013; Al-Samarai and Al-Kazaz 2015). Un marcador genético puede ser una secuencia de ADN corta, como una secuencia que rodea un cambio de un solo par de bases (polimorfismo de un solo nucleótido, SNP), o una larga, como los microsatélites. Hasta ahora, se han utilizado muchos tipos de marcadores moleculares para detectar la variación entre individuos y poblaciones (Schlotterer 2004; Wan et al. 2004), algunos de ellos son:

1. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Botstein et al. 1980). Esta técnica se basa en la acción de enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN y hacen un corte en la cadena. Si exponemos dos cadenas que tengan diferentes alelos, producto de sustituciones de bases de nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones, lo que puede eliminar o crear sitios de restricción y por tanto el corte de la misma enzima va a producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Finalmente, los fragmentos separados se hibridan con sondas homólogas radioactivas o quimioluminiscentes y los diferentes fragmentos son visibles por autorradiografía. El RFLP también fue uno de los primeros métodos utilizados para la tipificación genética pero hoy es un proceso lento y más tedioso en comparación con algunas de las técnicas de análisis de ADN más nuevas.

2. Polimorfismos de único nucleótido (SNPs). Un SNP es una mutación de un solo nucleótido (A, T, C o G) en la secuencia del genoma (producto de transiciones de base única, transversiones, inserciones y deleciones) y son muy abundantes a lo largo de todo el genoma (cada 200-50 pares (Chen and Sullivan 2003; Luikart et al. 2003). Son en gran medida neutros (aunque muchos si pueden estar en Desequilibrio de ligamiento con genes bajo selección), no afectan los fenotipos o la aptitud física, y son muy útiles para determinar las relaciones genéticas entre los individuos, el flujo de genes, la

estructura de las poblaciones y la historia demográfica. Actualmente, los marcadores SNP son uno de los enfoques más populares altamente utilizables para describir la variación genética en poblaciones naturales (Brumfield et al. 2003; Seeb et al. 2011; Allendorf et al. 2013).

3. Microsatélites: Los microsatélites o loci de secuencia simple repetida (SSR) o número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o polimorfismos de longitud de secuencia simple (SSLP), consisten en repeticiones en tándem de un motivo de 1 a 6 nucleótidos de longitud (repeticiones mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y hexanucleotídicas) (Selkoe and Toonen 2006) y el número de repeticiones es variable entre individuos (Abdurakhmonov 2016). Los marcadores de microsatélites tienen varias ventajas, ya que se consideran robustos y más variables e informativos que RFLP y otros. Usando la técnica de PCR requiere solo pequeñas cantidades de ADN molde. También son útiles para el análisis de parentesco y para estimar el grado de relación de los individuos o clusters (Li et al. 2002). Estos se han transformados en los más usados marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones, ecología molecular y conservación (Balloux and Lugon-Moulin 2002; Allendorf et al. 2013).

Otro importante tipo de marcador es el *ADN Mitocondrial (ADNmt)*, este es el genoma que reside fuera del núcleo en la mitocondria celular y se hereda maternalmente sin contribución paterna. Si bien el mtDNA es de poca utilidad

para investigar la pérdida reciente de variación genética, gracias a sus mayores tasas de evolución el ADNmt se prefiere para la construcción de filogenias y la inferencia de historias evolutivas y es ideal para llevar a cabo comparaciones dentro y entre especies (Wan et al. 2004). Específicamente, la región mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) ha sido ampliamente utilizada como código de barras en la identificación de especies (Hebert et al. 2003a). El código de barras del ADN tiene una alta precisión del 97,9% y proporciona una estrategia de identificación rápida (Ward 2009; Coissac et al. 2016).

Hoy se enfatiza en que el uso combinado de marcadores de ADN nuclear (nuDNA) y mitocondrial (mtDNA) mejora el poder de los datos moleculares para probar hipótesis filogenéticas y filogeográficas importantes para entender el comportamiento de las poblaciones a conservar (Toews and Brelsford 2012).

#### **e) Monitoreo genético**

Un aspecto particular en la conservación y conocimiento de la variabilidad genética es que las pérdidas de ésta pueden ocurrir sin manifestaciones visibles, y es frecuentemente difícil de detectar, a menos que se acompañe de la pérdida completa de una especie (Laikre et al. 2008). Por ello, la detección de los cambios en la composición genética requiere de monitoreo genético continuo (el estudio de la variación genética en el tiempo) (Schwartz et al. 2007). El monitoreo genético, ampliamente descrito por Schwartz et al. (2007),

ha sido una de las sugerencias relevantes sometidas en el proyecto de ley que crea el SBAP en Chile. El monitoreo permite el seguimiento de las poblaciones a lo largo del tiempo y evaluar cuándo alcanzan umbrales críticos, adelantando la toma de acciones de manejo. Sin embargo, estos programas requieren un diseño apropiado para su efectividad que incluya: Objetivos claros a responder, métodos analíticos y de muestreo según los objetivos (un enfoque estadístico o un marcador molecular en específico puede tener un impacto sustancial en el poder estadístico de los análisis cuando se trata de delimitar la estructura de una población, Ryman et al. 2006), flexibilidad en el diseño experimental (muestras control, imprevistos de campo) y una intensidad de muestreo acorde a las hipótesis a responder (solo un diagnóstico de las poblaciones a través de marcadores moleculares o un monitoreo de los parámetros genéticos de las poblaciones a través del tiempo), entre otros (Nichols and Williams 2006; Schwartz et al. 2007). Por otra parte, si bien existe una amplia necesidad de monitorear genéticamente (Hoban et al. 2020; Laikre et al. 2020), no siempre es posible monitorear todas las especies para observar la variabilidad intraespecífica, por lo que es necesario priorizar cuáles especies o poblaciones deben ser monitoreadas. Laikre et al. (2008), indican 6 categorías para determinar cuándo una especie o sus poblaciones merecen especial atención y priorizar su conservación: Cuando una especie: 1) Está sometida a alteraciones de gran escala como la liberación de especies exóticas en áreas con congéneres silvestres, dado que se espera se provoquen cambios y reducción

de la diversidad genética de las poblaciones silvestres (e.g Laikre et al. 2010b; Vera-Escalona et al. 2019). 2) Está sometida a extracción (cosechas o pesca) a gran escala, la cosecha implica la eliminación selectiva de fenotipos o agrupaciones demográficas particulares, y se ha demostrado que dicha eliminación causa efectos genéticos (e.g. Hauser et al. 2002). 3) Está clasificada como casi amenazada ("*near-threatened*") o preocupación menor ("*least concern*"), las especies clasificadas con estas categorías pueden enfrentar una pérdida de variabilidad intraespecífica que aún no ha sido reconocida y por tanto el seguimiento genético de esta categoría de especies permitiría obtener una imagen adecuada del nivel de amenaza genética (Allendorf et al. 2013). 4) Tiene tamaños poblacionales pequeños, el monitoreo genético de este tipo poblaciones se puede realizar principalmente para evaluar los efectos de medidas para aumentar el tamaño de la población y para documentar los efectos de la endogamia (Frankham et al. 2014, 2017). 5) Ya es objetivo de otro tipo de monitoreo como seguimientos de presencia y abundancia o para reflejar contaminantes ambientales. Aquí el monitoreo genético serviría para ampliar estos programas proporcionando información acoplada ecológica y genética y comprender los patrones observados en profundidad (e.g., Skujina et al. 2021). 6) Cuando ya están disponibles series de tiempo para esa especie, para ampliar el conocimiento sobre los procesos microevolutivos incluyendo las tasas de cambio genético durante períodos de tiempo y las fluctuaciones del tamaño de la población efectiva, por ejemplo.

Hoban et al. (2020) y Laikre et al. (2020) también han sugerido el uso de tres indicadores genéticos fundamentales para cumplir con los objetivos de comprensión y conservación de la variabilidad genética global y que pueden aplicarse a especies silvestres en Chile, estos son: 1) *Análisis del tamaño de población efectivo* ( $N_e$ ) para evitar la pérdida de diversidad genética (Willoughby et al. 2015). Tamaños de población efectivos inferiores a 500 (Jamieson and Allendorf 2012) resultarán en una capacidad reducida de la población para adaptarse al cambio ambiental (otros abogan por un umbral  $N_e$  de 1000; Frankham et al. 2014). Un  $N_e$  más alto que el umbral ayuda a mantener más alelos y una mayor diversidad genética y un  $N_e$  por debajo de 50 es una situación más extrema que requiere una acción inmediata para prevenir los aumentos rápidos y dañinos de la endogamia, disminución de la aptitud y del rendimiento reproductivo, y una pérdida muy rápida de la diversidad. 2) Conocer el *número de poblaciones genéticamente distintas dentro de un rango geográfico* respecto a datos históricos en lo posible. Los datos genéticos pueden revelar los límites de las poblaciones (Waples and Gaggiotti 2006), y también distinguir diferencias genéticas entre clusters o poblaciones aunque las diferencias genéticas observadas deben interpretarse con cuidado para evitar errores (e.g diferenciación poblacional por disminución reciente o por cese del flujo de genes, pueden llevar a una diferenciación poblacional observada que es solo muy reciente, por lo que este indicador no captaría completamente

situaciones tan complejas, ni captaría la hibridación entre especies). 3) Comprender la *diversidad genética dentro y entre las poblaciones* (idealmente entre múltiples poblaciones) haya sido esta evaluada para una publicación científica o publicada en bases de datos (e.g artículos de revistas, informes, repositorios, incluidos GenBank, Dryad, FishBank entre otros).

Aunque las herramientas para el monitoreo genético y los indicadores genéticos como los mencionados necesarios para comparar datos, evaluar tendencias y proporcionar indicadores de salud genética están prácticamente disponibles en todo el mundo, estos solo son ampliamente utilizados en investigaciones con fines académicos nacionales e internacionales, el uso de estos dentro del contexto de monitoreo genético de especies silvestres, es aún poco utilizado y solo se realizan en muy pocas especies en el mundo (Laikre et al. 2008, 2010a).

#### **f) Comentarios finales**

Considerando los antecedentes anteriores, uno de los focos de la conservación de la biodiversidad a nivel de especie debe ser la mantención de la estructura, integridad y diversidad genética de las poblaciones y especies, para permitir que éstas mantengan su potencial evolutivo a través de la capacidad de adaptación y respuesta a los cambios del ambiente. No obstante, actualmente el componente genético y el uso de herramientas y métodos genéticos no están



explícitamente incorporados como componentes de análisis en el diseño e implementación de estrategias de conservación de la biodiversidad en Chile. Hoy, el conocimiento genético sobre especies chilenas silvestres ha sido más bien de carácter investigativo enfocados en el análisis de la herencia genética y biología evolutiva (e.g., aves: Poblete et al. 2020; plantas, arbustos y arboles: Herrera et al. 2005; Baranzelli et al. 2014; Scherson et al. 2014; Cid et al. 2017); efectos de especies invasoras y de eventos históricos en peces patagónicos (e.g., Vanhaecke et al. 2015; Vera-Escalona et al. 2015, 2019); patrones de diversidad y estructura genética, y caracterización de genes en peces (e.g., Muñoz-Rojas et al. 2012; Vega-Retter and Véliz 2014; González-Wevar et al. 2015; Quezada-Romegialli, C. Guerrero et al. 2016; Morales et al. 2018), plantas: (e.g., Takayama et al. 2013; Bastías et al. 2020) y aves (Gonzalez 2014); detección de especies usando ADN ambiental (Peces Nardi et al. 2020), y el efecto antrópico en peces e insectos (Vega-Retter et al. 2020; Gouin et al. 2019), entre otros.

Todos estos estudios, han hecho que Chile sea el tercer país latinoamericano con más estudios sobre la diversidad genética de especies en peligro (Torres-Florez et al. 2018) y que solo en el universo de estudios sobre la diversidad genética de especie dulceacuícolas, los peces constituyan el taxa más estudiado (39% de los estudios) (Habit et al. 2019b). Pese a lo anterior, Chile está aún lejos de conocer íntegramente su biodiversidad en términos genéticos.

Y también lejos de la transferencia de conocimientos necesaria, entre los grupos de investigación científicos y los profesionales de la conservación, para generar medidas de conservación basada en datos genéticos. Frente a esta brecha de conocimiento, Habit et al. (2019b) han recomendado fomentar las investigaciones que ayuden a comprender el nivel genético de la biodiversidad en Chile y también han recomendado una mayor sensibilización pública y educacional de las personas en cuanto a la importancia de la biodiversidad en todos sus niveles. Este trabajo también concluye que se requiere promover el incremento del nivel de conocimiento sobre diversidad genética mediante la utilización de múltiples marcadores, a fin de conocer el estado del patrimonio genético presente en las especies amenazadas en Chile y así esclarecer problemas de conservación (e.g, efectos antropogénicos como la fragmentación, efectos de la historia demográfica, aumento de la conectividad e hibridación, entre otros) a través de una sólida base científica. Esta generación de información base, en conjunto con un buen desarrollo de la comunicación entre científicos y tomadores de decisión, son clave para comenzar una nueva era conservacionista en el país.

Concretamente se sugiere el estudio de la biodiversidad de peces dulceacuícolas en Chile. Los ecosistemas de agua dulce figuran entre los ecosistemas más amenazados del planeta producto de las modificaciones de las cuencas, contaminación y otros factores bióticos (Vörösmarty et al. 2010) . Y

Chile no es la excepción, nuestro país soporta fuertes presiones antrópicas producto de canalización del cauce para riego y la producción hidroeléctrica en las cuencas de la zona centro (Díaz et al. 2019; Habit et al. 2019a). Estas razones, sin contar la grave vulnerabilidad de los cuerpos de agua dulce chilenos al cambio climático (Vicuña et al. 2011; Demaria et al. 2013; Bozkurt et al. 2017) son motivos suficientes de interés y preocupación científico-administrativo a nivel país, para promover el conocimiento sobre variabilidad genética, como será abordado en los capítulos siguientes, y considerar estos resultados en la mejora del diseño de futuras medidas de conservación direccionando los esfuerzos de monitoreos en pro de una mejor y colaborativa gestión de la biodiversidad.



## **TABLA CAPÍTULO I**

Tabla 1: Resumen de los acuerdos vigentes suscritos por Chile en materia de conservación de la biodiversidad, basado en Perez-Quezada (2018). (-) Sin información.

<b>Acuerdos</b>	<b>Suscrito</b>	<b>Entrada en vigor</b>
<i>Convención para la Protección de la Flora, la Fauna y las Bellezas Escénicas Naturales de América, Convención de Washington</i>	1940	1967
<i>Convenio sobre Zonas Húmedas de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas (Ramsar)</i>	1971	1981
<i>Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES)</i>	1973	1975
<i>Convenio sobre Diversidad Biológica</i>	1992	1994
<i>Convención de las Naciones Unidas de Lucha contra la Desertificación en los Países afectados por Sequía Grave, en particular en África</i>	1994	1998
<i>Convención sobre la Protección del Patrimonio Mundial, Cultural y Natural</i>	-	1980
<i>Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 y las Metas de Aichi</i>	2010	2011
<i>Convenio Internacional para la reglamentación de la caza de ballena</i>	1946	1979
<i>Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres</i>	1979	1981

## 5. CAPÍTULO II:

**HUMAN-INDUCED HABITAT FRAGMENTATION EFFECTS ON  
CONNECTIVITY, DIVERSITY AND POPULATION PERSISTENCE OF AN  
ENDEMIC FISH, *Percilia irwini*, IN THE BIOBÍO RIVER BASIN (CHILE)**

**Valenzuela-Aguayo, Francisca<sup>1,2</sup>, McCracken, Gregory R.<sup>2</sup>, Manosalva,  
Aliro<sup>1</sup>, Habit, Evelyn<sup>1</sup> & Daniel E. Ruzzante<sup>2</sup>**

Publicado en: Evolutionary Applications Junio 2019



**HUMAN-INDUCED HABITAT FRAGMENTATION EFFECTS ON  
CONNECTIVITY, DIVERSITY AND POPULATION PERSISTENCE OF AN  
ENDEMIC FISH, *Percilia irwini*, IN THE BIOBÍO RIVER BASIN (CHILE)**

**Valenzuela-Aguayo, Francisca<sup>1,2</sup>, McCracken, Gregory R.<sup>2</sup>, Manosalva, Aliro<sup>1</sup>, Habit, Evelyn<sup>1</sup> & Daniel E. Ruzzante<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología y Conservación de Peces, Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Department of Biology, Dalhousie University. Halifax, Nova Scotia, B3H4R2 Canada.

#### **CORRESPONDENCE**

Daniel Ruzzante

Email: [daniel.Ruzzante@dal.ca](mailto:daniel.Ruzzante@dal.ca)

Francisca Valenzuela-Aguayo

Email: [fvalenzuela@udec.cl](mailto:fvalenzuela@udec.cl)



#### **E-MAIL ADDRESSES OF ALL AUTHORS**

Francisca Valenzuela-Aguayo

Email: [fvalenzuela@udec.cl](mailto:fvalenzuela@udec.cl)

Gregorio McCracken

Email: [Gregory.McCracken@dal.ca](mailto:Gregory.McCracken@dal.ca)

Aliro Manosalva

Email: [aliromanosalva@gmail.com](mailto:aliromanosalva@gmail.com)

Evelyn Habit

Email: [ehabit@udec.cl](mailto:ehabit@udec.cl)

Daniel Ruzzante

Email: [daniel.Ruzzante@dal.ca](mailto:daniel.Ruzzante@dal.ca)

## **ETHICS**

The sampling was carried out based on the ethics and biosafety rules and procedures specified in Law 18.755 of the Agricultural and Livestock Service of Chile and the Ethics Committee of Universidad de Concepción.

## **ARTICLE TYPE**

Original Article

## **ABSTRACT**

An understanding of how genetic variability is distributed in space is fundamental for the conservation and maintenance of diversity in spatially fragmented and vulnerable populations. While fragmentation can occur from natural barriers it can also be exacerbated by anthropogenic activities such as

hydroelectric power plant development. Whatever the source, fragmentation can have significant ecological effects, including disruptions of migratory processes and gene flow among populations. In Chile, the Biobío river basin exhibits a high degree of habitat fragmentation due to the numerous hydroelectric power plants in operation, the number of which is expected to increase following new renewable energy use strategies. Here, we assessed the effects of different kinds of barriers on the genetic structure of the endemic freshwater fish *Percilia irwini*, knowledge that is critically needed to inform conservation strategies in light of current and anticipated further fragmentation initiatives in the system. We identified 8 genetic units throughout the entire Biobío system with high effective sizes. A reduced effective size estimate was however observed in a single population located between two impassable barriers. Both natural waterfalls and human made dams were important drivers of population differentiation in this system, however, dams affect genetic diversity differentially depending on their mode of operation. Evidence of population extirpation was found in two river stretches limited by upstream and downstream dams. Significant gene flow in both directions was found among populations not separated by natural or anthropogenic barriers. Our results suggest a significant vulnerability of *P. irwini* populations to future dam development and demonstrate the importance of studying basin-wide data sets with genetic metrics to understand the strength and direction of anthropogenic impacts on fish populations.



## **KEYWORDS**

Fragmentation, connectivity, genetic diversity, dams, endangered species, conservation, microsatellite.



## **INTRODUCTION**

Understanding the factors that affect spatial distribution of genetic diversity in freshwater systems is fundamental for the design of robust management and conservation strategies. Theory predicts that, under migration-drift equilibrium, headwater populations in freshwater systems will exhibit lower genetic diversity

than downstream populations. Extrapolation of such modeling predictions to the wild is however complicated by the fact that natural systems are in general not expected to be under equilibrium (Raeymaekers et al. 2008; Ruzzante et al. 2019), even less so when they are affected by varying degrees of natural and human induced fragmentation.

Natural waterfalls lead to habitat fragmentation and promote diversification on evolutionary time scales (e.g., speciation; Dias, Cornu, Oberdorff, Lasso, & Tedesco, 2013; Fagan, 2002; Losos & Parent, 2009). When habitat fragmentation results from anthropogenic activities such as hydropower dams, changes in connectivity usually take place over relatively short time frames (Faulks, Gilligan, & Beheregaray, 2011). Irrespective of the source(s), however, fragmentation as a landscape-scale process (Fahrig 2003) is known to affect both, functional connectivity (e.g., dispersal and gene flow between habitat patches); as well as structural connectivity (e.g., habitat types and distance between habitat patches ) (Brooks, 2003; Goodwin, 2003). Furthermore, the impacts on both structural and functional connectivity resulting from human-induced habitat fragmentation will generally be exacerbated when numerous habitat alteration factors act synergistically. For instance, when numerous hydroelectric power plants are established within any given drainage and the drainage is further impacted by other anthropogenic effects (e.g., invasive species and water diversion/channeling initiatives that subtract water from its

regular course (Sheridan 1995), the ultimate effect on any given species' genetic diversity is likely to be higher than just the sum of individual effects.

Barrier impact, though generally a function of the physical characteristics of the barrier, will often include both upstream and downstream habitat changes such as changes in flow regime, sediment transport, and temperature (Liermann, Nilsson, Robertson, & Ng, 2012; Rosenberg et al., 1997). Such habitat type changes can often lead to changes in species abundances (Hanks & Hartman, 2018; Hu, Hua, Zhou, Wu, & Wu, 2015). Populations that remain on opposite sides of a barrier will likely lose genetic diversity and experience increases in structure. The loss of genetic diversity may lead to a decline in the populations' ability to adapt to changes in the local environment, ultimately leading to declines in population sizes and an increased risk of extirpation (Nielsen et al. 1997; Neraas and Spruell 2001; Morita et al. 2009; Horreo et al. 2011). Hydroelectric power development has been an important cause for the loss of connectivity, habitat fragmentation and degradation in streams and rivers worldwide, yet it is anticipated that by 2050 hydroelectric power generation capacity will be doubled from current levels to 3.121 TWh (Hancock and Sovacool 2018).

The present study was conducted in the Biobío River basin, the basin with the most exploitable hydroelectric potential in Chile (Ministerio de Energía 2016). The basin harbours three main rivers exhibiting different levels of human

intervention with overall eleven hydroelectric power plants currently in operation. Plants differ substantially in the mode of operation and in the extent and type of change they inflict on the habitat and water flow regime (See M&M). The basin is home to 18 out of 45 native fish species found throughout Chile (Campos, Ruiz, & Gavilán, 1993; Habit, Dyer, & Vila, 2006). Here we use *Percilia irwini* (Eigenmann, 1927), a species endemic to the basin (Arratia and Quezada-Romegialli 2019), as a model to examine the effects of fragmentation on genetic diversity. *Percilia irwini* is a small (length  $\leq 90$  mm) relatively short lived (4 years) benthopelagic fish usually found in shallow areas ( $<1$  m) with rocky substrate and slow ( $<0.5$  m s) moving waters (Habit and Belk 2007). At low flow rates (5-15 cm s<sup>-1</sup>) it maintains a fixed position on the bottom but higher flow rates (25-35 cm s<sup>-1</sup>) stimulate swimming behavior with individuals eventually taking refuge behind rocks in areas of low velocity and turbulence (García et al. 2012). The species is considered resident and non-migratory. It is also considered endangered due to its restricted distribution and habitat loss (Habit and Belk 2007; Ministerio de Medio Ambiente 2019). Its reproductive biology and life history have not been studied in detail; the risk to its genetic integrity in the face of increasing fragmentation is largely unknown.

Our aim in the present study is to estimate the genetic diversity (28 microsatellite markers), differentiation, and gene flow among *P. irwini* populations inhabiting the Biobío river basin. The ultimate goal is to understand

how anthropogenic and natural habitat fragmentation have influenced patterns of neutral genetic variability in *P. irwini*. We hypothesized that 1) The presence of anthropogenic barriers (hydropower dams) resulted in higher levels of population genetic structure compared to natural barriers. 2) The level of population structure depends on the type of hydropower plant, whether reservoir or run of the river (See M&M), with reservoir plants limiting gene flow more than run of the river plants. We assessed gene flow and population structure as a function of the type (natural vs. anthropogenic) of barriers between sampling sites, the time elapsed since their construction (if anthropogenic in origin) and their mode of operation (hydropeaking vs. run of the river). We report on two river sections located between power plants where *P. irwini* appears to have been extirpated from. Our study provides insights on the vulnerability of a resident non-migratory species in the face of increased habitat fragmentation. We discuss management implications of our findings providing guidance for stakeholders and government agencies.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **a) The study area and hydroelectric power plants**

The Biobío river basin is currently home to 11 hydroelectric plants in operation in three main rivers from north to south geographically: Laja, Biobío and Renaico-Malleco (Table 1, Fig. 1). The oldest plant (Abanico) started operations in 1948

with the remaining 10 plants built beginning in the 1970s and up to the recent past as follows: El Toro (1973), Antuco (1981), Pangué (1996), Rucúe (1998), Peuchén (2000), Mampil (2000), Ralco (2004), Quilleco (2007), Angostura (2014) and Laja (2015) (Table 1). Four plants (El Toro, Pangué, Ralco and Angostura) are “storage hydroelectric plants” which work through hydropeaking a process characterized by rapid fluctuations in flow regime, depending on the demand of energy production (Zimmerman et al. 2010; Bruder et al. 2016; Hauer et al. 2017). One plant (El Toro) is located in the Laja river and uses the natural Laja Lake as a reservoir. The other three (Ralco, Pangué and Angostura) are located in the main channel of the Biobío river and impound a total of 70 km of the river. The other seven (Abanico, Antuco, Rucúe, Mampil, Peuchén, Quilleco, Laja) are run of the river hydroelectric plants and use the flow of water from a canalized river to produce electricity on a continuous basis; the water is subsequently returned to the river without chemical or physical changes (Lazzaro et al. 2013). Regardless of the type of operation, whether storage or run of the river, each power plant may or may not have a physical barrier fragmenting the river channel. In this study “barrier” refers to a natural or anthropogenic wall. For natural walls, waterfalls > 10 m high were considered barriers preventing upstream movement of fish. Dams >10 m in height were considered barriers preventing both upstream and downstream fish movement. None of the existing hydropower plants exhibit fish passes or other mitigation measures to improve connectivity. One more hydroelectric power plant has

recently been approved and will be located directly downstream of Angostura in the Biobío River (Rucalhue; RCA No. 159, Servicio de Evaluación Ambiental, 2016). The basin also exhibits a natural waterfall, “Salto del Laja” (Fig. 1).

### **b) Sampling design and collections**

*Percilia irwini* were collected by seine netting or electrofishing, over two consecutive years (2016 and 2017) with 13 out of 21 sites (distributed among the three major rivers comprising the Biobío system) visited only once, either in 2016 or 2017 and 8 sites visited on both years to increase sample sizes (Table 2). A further 6 sites were visited but five provided no *P. irwini* individuals and one provided only 4 fish and was not considered further. Fish ( $N=927$ ) were measured (total length) and weighed. Fin clips were stored in 96% ethanol for subsequent DNA analysis. Fish were genotyped at a final total of 28 species specific microsatellites (see Yu et al., 2018) developed and genotyped in the Marine Gene Probe Laboratory at Dalhousie University, Nova Scotia, Canada.

### **c) DNA extraction and Microsatellite genotyping**

Fin clips (5-10 mg per individual) were digested at 55 °C for approximately 8 h using Proteinase K (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada). DNA was then extracted using a Multiprobe II plus liquid handling system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using a glassmilk protocol modified from (Elphinstone et al. 2003).

Identification and characterization of microsatellites were conducted as described in Yu et al., (2018). Microsatellites were scored with MEGASAT (Zhan et al. 2017) and were subsequently subject to a standard battery of analytical methods. Potential genotyping errors, presence of null alleles and stuttering were assessed with MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer 2010) was used to test for Linkage disequilibrium (LD) and Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE); these tests were conducted using 10,000 permutations and 1,000,000 Markov chain steps and 100,000 dememorization steps respectively, with a false discovery rate of 5%. Outlier analyses were performed using the Bayesian program BAYESCAN 2.1 (Foll and Gaggiotti 2008) to identify putative loci under selection. Out of the initial 33 microsatellites examined, 5 appeared to exhibit null alleles or departures from Hardy-Weinberg and were thus excluded from further analysis. We therefore conducted the present study with a battery of 28 microsatellite markers.

#### **d) Estimating genetic diversity and population structure**

We estimated allele frequencies and allelic richness ( $A_R$ ) per sample site using FSTAT 2.9.4 (Goudet 2001). We estimated observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosities ( $H_e$ ) for each sampling site using GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse 2006). GenAlEx was also used to estimate population structure with



$F_{ST}$ .  $F_{ST}$  estimates were then linearized ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) following the procedure by Rousset (1997). Linearized pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s were used in all subsequent analyses requiring pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s input. The level of genetic differentiation among sampling sites was visualized with a Principal Coordinates Analysis (PCoA) of the  $\hat{F}_{ST}$ s, conducted using GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse 2006).

Population structure was examined using STRUCTURE 2.2.2 (Falush et al. 2007). The analysis was conducted hierarchically. We first identified clusters examining the entire data set; clusters were then independently subject to further STRUCTURE analyses. This process was continued on individual clusters until no further evidence of population structure was detected. We estimated the most likely number of clusters based on the Evanno methodology (Evanno et al. 2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl and vonHoldt 2012a). Each independent STRUCTURE analysis was conducted using 5 replicate runs, where each run consisted of 2,000,000 iterations with an initial burn-in of 200,000. The results of these 5 separate replications were then combined into a single population output using the program CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) for the most likely value of K (number genetic groups), and visualized using the program DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004). A Spatial allele autocorrelation analyses was conducted in GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse 2006). Distance classes (waterway distances) were determined with Google Earth (Google, Mountain view, Chile).

### e) Population differentiation causes

To test if diversity and differentiation were affected by the number, type (reservoir, run of the river or natural) and age of the barriers, we conducted a series of Mantel tests (9999 iterations) in GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse 2012). We correlated linearized pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) (Rousset 1997) with:

- 1) Waterway distances (Wwd) between sampling sites.
- 2) Cumulative number of barriers between sampling sites (BaN) pondered by barrier type (see Supplemental Material).
- 3) Cumulative Age of the barriers (BaA: sum of the years in operation of each barrier between sampling sites).
- 4) Elevation difference (mean pairwise difference in elevation between sampling sites).
- 5) Slope (mean pairwise slope between sampling sites calculated according to (Stelkens et al. 2012).

Decomposed pairwise regression (DPR) after each test was used to identify and remove potential outlier sites, which could be masking the effects of the tested landscape variable (Koizumi et al. 2006; Mccracken et al. 2013). DPR was conducted manually. Sampling sites with 95% confidence intervals not including 0 were considered putative outliers and subsequently removed from the Mantel test until no putative outlier remained. The best model for each test was chosen based on the lowest corrected Akaike's Information Coefficient (AICc).

We also tested for the effect of distance on connectivity after controlling for the effects of the number (age) of barriers and vice versa with Partial Mantel tests. To support the Mantel correlations, we performed a Distance-based Redundancy Analysis (db-RDA) in R package, using the genetic differentiation matrix (linearized pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) versus Wwd, BaN, BaA, Elevation, Slope and  $A_R$ . This procedure provides options for finding out significant explanatory landscape variables affecting the genetic distances between all sampling sites of the Biobío system, as suggested by Legendre & Anderson (1999).



**f) Anthropogenic and natural fragmentation influences in connectivity**

Finally, to understand how anthropogenic and natural fragmentation influence connectivity we estimated contemporary migration rate among populations with BayesAss 3.0 (Wilson and Rannala 2003). All BayesAss analyses were conducted using 2,000,000 burn-in and 20,000,000 iterations. Mixing parameters for migration rate, allele frequencies, and inbreeding coefficients were set at 0.12 0.25, and 0.25 respectively to achieve acceptance rates within the ideal range of 20% and 60% (Rannala 2007). Migration estimates with 95% CI that did not include 0 were assumed significant.

We estimated effective population size ( $\hat{N}_e$ ) with the linkage disequilibrium method as implemented in LDNe (Waples and Do 2010) using the  $P_{crit} = 0.02$  as

all our sample sizes were  $>25$  (Waples & Do 2010), with 95% confidence intervals generated via jackknifing between pairs of loci. First, however, potential immigrants were identified with GeneClass2 (Piry et al. 2004) and removed from the data set prior to the estimation of effective population size.

## RESULTS

### a) Genetic quality control

A total of 927 individuals were sequenced and genotyped at a final tally of 28 microsatellite loci after excluding 5 from an initial 33 loci because of missing values in  $> 50\%$  individuals. Also, one marker (Per 50) exhibited signs of null alleles and departures from Hardy-Weinberg in 19 sampling sites; the analyses were performed both with and without this locus and the results did not change. The remaining 27 loci were free of null alleles and exhibited no LD in any sample site, they also showed no evidence of large allele dropout or scoring errors. Two markers (Per13 and Per 39) were identified as putatively under selection. Diversity indices ( $A_R$ ,  $H_o$ ,  $H_e$ ) and STRUCTURE results were however, similar (See Table S1 and Fig. S1) whether run with 28 or 26 loci. No genetic structure was detected between sampling years in any of the locations for which data were available for 2016 and 2017 (see Table S2 and Fig. S2). All subsequent analyses were carried out with 28 microsatellite loci and 927 individuals. Sample size per sample location and population as well as

estimates of  $A_R$ ,  $H_o$  and  $H_e$  are shown in Table 2. Allelic richness ranged from 5.73 to 9.39. Average heterozygosities over loci were  $H_e = 0.643$  and  $H_o = 0.603$  (Table 2). Wright's fixation index varied between 0.006-0.098 (Fig. S3).

### **b) Population structure**

When considering the entire data set, the most likely number of genetic clusters using STRUCTURE was  $K=3$  with clusters corresponding to each of three main rivers comprising the Biobío basin (Laja, Biobío, Renaico-Malleco river, Fig. 2; see also Fig. S4 for a similar pattern observed with PCoA). Hierarchical analyses considering these three initial clusters separately indicated that the final number of groups was 8. Individuals of the Laja river were pooled into two groups separated by the natural waterfall “Salto del Laja” (Fig. 2). Individuals from the Biobío river were pooled into four groups with three of these (BU, BC, and BD) separated by hydroelectrical power plants (Fig.2). The Renaico-Malleco collections grouped into two distinct pools (Fig. 2). In the Biobío river there was a positive autocorrelation ( $P < 0.001$ ) with distance with neighborhood size = 120 km (Fig. S5) indicating an Isolation-by-Distance pattern. A significant autocorrelation was also identified in the Renaico-Malleco river where the neighborhood size was only 30 km. No pattern of autocorrelation was evident for the Laja River.

### c) Causes of Population differentiation and barrier influences

**Isolation by distance:** In line with the autocorrelation analysis above, there was evidence of an Isolation by Distance (IBD) pattern when *P. irwini* inhabiting all three river systems were considered ( $R^2=0.5987$ ,  $P \leq 0.0001$ , Table S3 and Fig. S6). The number of barriers (BaN) also had an effect on connectivity when the entire Biobío system was considered ( $R^2=0.6751$ ,  $P \leq 0.0001$ ), thus waterway distance and number of barriers, both appear to have an effect on genetic differentiation when data from all three rivers are considered. No other variable (age of barrier BaA, Elevation or Slope) was correlated with genetic differentiation (Table S3) and were thus not considered further. An IBD pattern was also observed within the Biobío river ( $R^2=0.7730$ ,  $P \leq 0.0001$ ) but not within the Laja ( $R^2= 0.0080$ ,  $P \geq 0.384$ ) or within the Renaico-Malleco river ( $R^2= 0.0798$ ,  $P \geq 0.117$ ; Fig. 3, Table S4, S5 and S6). The correlation between the number of barriers (BaN) and genetic distance was significant only for the Biobío river ( $R^2= 0.6370$ ,  $P \leq 0.004$ ) (Table S5).

Given the collinearity between the number of barriers (BaN) and the pairwise waterway distances, two partial Mantel tests were conducted using the information from all locations, first controlling for distance and then testing for the number of barriers and second, controlling for the number of barriers and then testing for the effect of distance. While waterway distance slightly correlated with genetic distance after controlling for the number of barriers ( $R^2 =$

0.1907,  $P \leq 0.0001$ ), the correlation between the number of barriers and genetic distance was higher and significant ( $R^2 = 0.2671$ ,  $P \leq 0.0001$ ) after controlling for distance (Table S3).

The distance-based redundancy analysis (dbRDA) provided results consistent with the Mantel tests. The significant explanatory landscape variables affecting genetic differentiation were waterway distance and number of barriers (Wwd and BaN;  $P \leq 0.05$ ; See Table S7 and Fig. 4).

**Contemporary migration:** In all three rivers downstream gene flow was generally higher than upstream gene flow (Fig. 5). In the Laja river, gene flow was relatively high from LU to the Laja Downstream population (LD) and nil in the upstream direction. In the Biobío river gene flow was similarly significant from Biobío upstream (BU) to Biobío central (BC) and Biobío downstream (BD) but nil or nearly nil in the upstream direction as could be expected from the existence of the three hydropower plants with barriers present in this river (Pangue, Ralco and Angostura). A lower and symmetrical contemporary gene flow was detected from Niblinto (NI) population to Renaico-Malleco (RM) downstream population (Fig. 5).

**Effective population Sizes ( $\hat{N}_{eLD}$ ):** In general, all populations exhibited a relatively high  $\hat{N}_e$  as suggested by the lower bounds in the confidence intervals

(Table 2). The largest effective size was observed in RM ( $N_e \sim 9169$ , CI:2705- $\infty$ ) while the smallest effective size was detected in BC ( $N_e \sim 745$ , CI:322- $\infty$ ). This last population is bound by both upstream and downstream hydroelectric plants. Although data were insufficient for the estimation of effective sizes for some sites (LU, LD, BU and BD; Fig. 5, Table 2), the lower confidence bounds can still be considered as representative of the minimum size of the population.

**Evidence of population extirpation:** We visited 27 sites overall but were able to collect *P. irwini* from only 21 sites (Fig. 1). *Percilia irwini* were absent from two river sections, one in the Laja river (extirpation area 1: EA1, Fig. 5) and the other in the Biobío river (extirpation area 2: EA2, Fig. 5). Both sections are located between hydroelectric plants. In the Laja river, site EA1 is located between the upstream Abanico (run of the river) and El Toro (Storage hydropower) and the downstream Rucúe (run of the river) plants. In the Biobío river, site EA2 is located between the upstream Ralco and the downstream Pangué plants and both plants have reservoirs and operate by hydropeaking (See Fig. 1 and 5).

## DISCUSSION

In this study we have uncovered the influence of both natural and anthropogenic factors on the genetic structure of *P. irwini* inhabiting a spatially complex system that has been subject to varying degrees of human impact. Natural factors



including network structure, natural waterfalls, intermittent water flow regimes and the species' life history characteristics have clearly influenced the genetic structure of *P. irwini* in the two rivers either lacking anthropogenic physical barriers (Renaico-Malleco) or exhibiting waterfall and “run of the river” hydroelectric power plants (Laja). The influence of anthropogenic factors was most apparent in the upper reaches of the Laja river and in the river, most affected by fragmentation, the Biobío river. Below we discuss the implications of these results considering the species' life history and the type and age of the various anthropogenic barriers to dispersal in existence in these rivers.



#### **a) Influence of natural factors**

At the highest hierarchical level, population structure was detected largely only between rivers with some evidence of gene flow from Renaico-Malleco populations into the lower reaches of the Biobío and of a pattern of IBD when the populations from all three rivers were assessed together (Figs. 2 and 3). Structure within rivers was however observed when collections from each river were examined separately: Within the Laja river, *P. irwini* collected downstream of the natural barrier “Salto del Laja” were genetically distinguishable from the upstream aggregations (Fig. 2). This waterfall consisting of four falls with a combined altitude difference of > 35 m was formed 600ka BP during episodes of volcanism in the area (Thiele et al. 1998; Mardones Flores 2002).

There are no barriers to dispersal in the Renaico-Malleco river and the only variable influencing genetic differentiation in this river was waterway distance (Fig. 4). Most samples are genetically indistinguishable from each other except for the most upstream collection along the Malleco river (NI, Fig. 2 and 5). Gene flow between this upstream location and all other locations is relatively low but significant in both directions (Fig. 5). The Malleco river is subject to a varying rainfall regime with monthly water flow varying between 36 m<sup>3</sup>/s in winter and 2 m<sup>3</sup>/s in summer (DGA 2004; Dirección General de Aguas 2012). This dependence on rainfall generates intermittency in water flow leading to the disruption of hydrological connectivity and to temporary population isolation (see Gasith & Resh, 1999). Water is also extracted from the upper reaches of the Malleco river (i.e., near location NI, Fig. 1) for irrigation: Approximately 10,000 ha in the mountain area of this river are irrigated for agriculture, livestock pasture and forest growth (DGA 2004; Dirección General de Aguas 2012). We suspect the differentiation between the upstream location and all other ones in this river may at least in part be due to these disruptions in hydrological connectivity caused by the interaction of annual rainfall variation and water diversion in the upper reaches of this river for irrigation.

In the most fragmented river, the Biobío river, gene flow occurs in both directions when no barriers are present: for instance, upstream gene flow appears significant between populations BD and BD<sub>(outlet)</sub> (Fig. 5). Even here

though, gene flow is asymmetrical, and the two aggregations are genetically distinguishable. Although there may be various reasons for this genetic differentiation, the fact that  $BD_{(outlet)}$  (but not BD) receive migrants from the Renaico-Malleco river (RM) may be a contributing factor.

Although *P. irwini* exhibits low swimming capacity and is unlikely to swim for long periods of time (García et al. 2012) our results provide evidence that *P. irwini* is capable of dispersing in both the upstream and downstream direction in areas unaffected by natural or anthropogenic barriers but when these are present, dispersal occurs only in the downstream direction. Contemporary migration rates were relatively high in the downstream direction in the lower reaches of the Laja and Biobío rivers, and they were significant and high in both directions between the two groups in the Renaico-Malleco river (Fig. 5).

### **b) Influence of anthropogenic factors**

Aside from the natural “Salto del Laja” barrier, the Laja river also exhibits a total of five run of the river and one storage hydropower plant (which uses the natural Laja lake as reservoir). Five are located upstream of the “Salto del Laja”, and all are > 12 years old while the sixth is located downstream of the natural barrier and was constructed recently (2015). The five upstream hydroelectric power plants, which altogether are responsible for three low head dams with lateral intake (as opposed to bottom intake) appear to have had no effect on the

genetic structure of *P. irwini* since all collections in this region are genetically indistinguishable forming a single cluster (LU). Hydroelectric power plants with run of the river operation may have lower barrier effects due to their low head or mobile dams (Paish 2002; Abbasi and Abbasi 2011) yet they are known to affect the immediate physical habitat leading to hydrological impacts such as the reduction of stream width, depth, and current velocity (Anderson, Moggridge, Warren, & Shucksmith, 2015; Anderson, Freeman, & Pringle, 2006; Ovidio, Capra, & Philippart, 2008). Such alterations result in decreasing spawning and rearing grounds and food supply. No *P. irwini* were collected in the stretch of the Laja river located between two sets of power plants (Abanico and El Toro, and Antuco and Rucúe plants) despite considerable sampling effort and historical records that confirm their former presence in those sites (Habit, Belk, & Parra, 2007; Habit, Victoriano, & Parra, 2002). We refer to this stretch of river as Extirpation Area 1 (EA1, Fig. 5). In fact, our results in the upper Laja river are consistent with the suggestion that run of the river dams are responsible for the reduction of fish abundance (Anderson et al., 2006; Jesus, Formigo, Santos, & Tavares, 2004; Ovidio et al., 2008). Also, a translocation experiment conducted in 2001 as a mitigation measure for the interruption of the free displacement of fish in upper Laja river (Habit et al. 2002) involved the transfer of n=852 individuals from near sites LFU4 and LU3 to an upstream area between the Rucúe and the El Toro, Abanico and Antuco hydroelectric power plants (on the Laja river proper); and to LU1 and LU2 (on the Rucúe river, a tributary to Laja).

The absence of differentiation among collections from the upper Laja could in principle be due, at least in part, to this translocation experiment. However, the fact that 31% of all translocated individuals were released in EA1 (Habit et al. 2002) where no *P. irwini* were found is also consistent with the presumed extirpation of this species from this area. This absence or at least severe decline in the abundance of *P. irwini* in EA1 of the Laja river between two sets of long established (> 38 years, Table 1) hydroelectric power plants suggest a negative impact of these plants on the presence of *P. irwini*. Such negative impact could result from the changes in fluvial geomorphology and flow control following dam construction and operation (see Abbasi & Abbasi, 2011; Anderson et al., 2015), as well as from synergistic effects of other human interventions, such as irrigation channels; and invasive salmonids (Habit, Belk, & Parra, 2007; Habit, Gonzalez, Ruzzante, & Walde, 2012; Vera-Escalona, Habit, & Ruzzante, 2019)

The Biobío river is the only river in the drainage with three large dams (>50 m height) that create reservoirs, the effects of which have been described in numerous other systems (Dehais et al. 2010; Brinker et al. 2018; Argentina et al. 2018). None of the large dams in the Biobío river exhibit fish passage, ladders or any other mitigation devices for biological connectivity. The collections within the Biobío were classified into 4 genetic groups, 3 of them (BU, BC and BD) separated by dams. Dam 1 (Ralco) and 2 (Pangué) are >20 yr old and operate with hydropeaking. Dam 3 (Angostura), further downstream began operating in 2014 (Table 1), prior to the dam construction the river exhibited a canyon likely

acting as an old natural barrier. The canyon was flooded with the construction the Angostura power plant. Hydropeaking is known to lead to increases in stranding rates (Nagrodski et al. 2012) and reduced fish abundance (Freeman et al. 2001). *Percilia irwini* is highly susceptible to changes in flow regime as a result of a decrease in suitable area with increased water flow (García et al. 2011). Hydropeaking is therefore likely a major driving force affecting the population structure and ultimately the presence of *P. irwini* in the Biobío river. The fact that no *P. irwini* were collected in the section of the Biobío river between dams 1 and 2 is consistent with the hypothesis that the species has been extirpated from this section (EA2, Fig.5). Fluctuations in water level in this section following daily water discharge affect the riparian zone likely preventing successful recruitment. We suspect this is also what happened in the upper reaches of the Laja river as stated above.

Estimates of effective population size were generally high ( $\approx 300$  to 2,800 when they could be estimated). The effective size for the population in the central section of the Biobío, the section between dams 2 and 3 (BC) was the lowest of all ( $\hat{N}_e$  lower limit: 322), likely due to the presence of tandem barriers and a change in passive dispersal. Recent migration rates between BU-BC and BC-BD were high in the downstream direction, as also observed in other species (Dehais et al. 2010; Junker et al. 2012). Upstream gene flow was generally nil, as would be expected due to the anthropogenic barriers that prevent upstream

migration. Downstream gene flow in the Biobío river despite the numerous dams and their considerable height may be mediated through the passage and survival of *P. irwini* through the turbine system as has been described for other species (Dedual 2007; Amaral et al. 2015).

### **c) Management and conservation comments**

Natural barriers and hydroelectric plants with reservoir prevent the movement of *P. irwini* upstream, drastically reducing upstream contemporary gene flow. The size of the population plays an important role in retaining genetic diversity above barriers though, and large effective population sizes may explain why the effects of dams are not yet strongly manifested in the downstream population in Laja and Biobío rivers. The presence of tandem barriers, the consequent change in the characteristics of the physical habitat and the hydropeaking regimes operating in some of the plants however, are likely responsible for the two potential instances of population extirpation (EA1 and EA2), for the drastic reductions in estimated effective sizes (e.g., BC), allelic diversity and richness (e.g., BC4, Table 2), as has been observed in other studies (Banks et al. 2013). The largest effective size was estimated for the RM population, a population characterized by the absence of insurmountable physical barriers among sampling locations.

Our study demonstrates the importance of studying basin-wide data sets to understand the strength and direction of anthropogenic impacts on genetic diversity of fish populations. In the upper Laja river, where populations are influenced by run of the river power plants, the maintenance of habitat quality is likely a management priority. In contrast, in the central area of the Biobío river, where the BC population exhibits relatively low effective size, habitat restoration, and increasing connectivity between *P. irwini* populations using mitigation measures such as, fish passes or elevators (Gousskov et al. 2016; Wilkes et al. 2018) is a management priority. Increased research on the life histories of the native fish inhabiting the basin, including on their swimming capacity as well as on the design of fish passes for the maintenance of population connectivity is needed. Finally, we point out that a new run of the river hydroelectric power plant has been approved in the Renaico-Malleco river (Hydroelectric Agua Viva, Resolución Exenta N° 1032, 14 Septiembre 2017, Región del Biobío) where connectivity is highest. Once in operation this plant will likely generate great changes in the ecosystem including a decrease in habitat suitability.

Current efforts to increase power generation while reducing greenhouse gas emissions are promoting the development of small hydropower dams as non-conventional renewable energy sources (Ministerio de Energía 2016; Habit et al. 2019a) potentially resulting in increased habitat fragmentation (Díaz et al. 2019), yet ecological and genetic connectivity are either barely considered (ecological)



or not considered at all (genetic), in the Chilean environmental impact assessment process (Lacy et al. 2017). We suggest the inclusion of genetic analyses as part of an obligatory baseline, which will help monitor the genetic status of populations through genetic variability indicators (e.g., haplotypic diversity, allele richness, gene flow, fixation index, effective population size, among others; Schwartz, Luikart, & Waples, 2007), before, during and after the life of a project. With such measures in place, it will eventually be possible to discern what changes in genetic diversity are likely to have taken place and then take *in situ* or *ex situ* conservation measures necessary to safeguard this diversity in populations at risk.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Gustavo Díaz and Jorge González for assistance in the field. FV-A thanks Ruzzante Lab members Ivan Vera-Escalona, Angela Fuentes-Pardo, Lisette Delgado and Sarah Salisbury for feedback and comments on the manuscript. This research was supported by a FONDECYT Grant 1150154 to EH and collaborators and an NSERC Discovery grant to DER. FV-A was supported by Beca CONICYT Nacional Folio 21160882 and a Canada

Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD) Emerging Leaders of Americas Program (ELAP) scholarship.

## **DATA ARCHIVING STATEMENT**

Data for this study are available at: to be completed after manuscript is accepted for publication.

## **LITERATURE CITED**

- Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2011). Small hydro and the environmental implications of its extensive utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(4), 2134–2143. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.050>
- Amaral, S. V., Bevelhimer, M. S., Čada, G. F., Giza, D. J., Jacobson, P. T., McMahon, B. J., & Pracheil, B. M. (2015). Evaluation of Behavior and Survival of Fish Exposed to an Axial-Flow Hydrokinetic Turbine. *North American Journal of Fisheries Management*, 35(1), 97–113. <https://doi.org/10.1080/02755947.2014.982333>
- Anderson, D., Moggridge, H., Warren, P., & Shucksmith, J. (2015). The impacts of “run-of-river” hydropower on the physical and ecological condition of rivers. *Water and Environment Journal*, 29(2), 268–276. <https://doi.org/10.1111/wej.12101>
- Anderson, E. P., Freeman, M. C., & Pringle, C. M. (2006). Ecological consequences of hydropower development in Central America: impacts of small dams and water diversion on neotropical stream fish assemblages. *River Research and Applications*, 22(4), 397–411. <https://doi.org/10.1002/rra.899>
- Argentina, J. E., Angermeier, P. L., Hallerman, E. M., & Welsh, S. A. (2018). Spatial extent of analysis influences observed patterns of population genetic

- structure in a widespread darter species (Percidae). *Freshwater Biology*, 63(10), 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/fwb.13106>
- Arratia, G., & Quezada-Romegialli, C. (2019). The South American and Australian percichthyids and perciliids. What is new about them? *Neotropical Ichthyology*, 17(1), e180102. <https://doi.org/DOI: 10.1590/1982-0224-20180102>
- Banks, S. C., Cary, G. J., Smith, A. L., Davies, I. D., Driscoll, D. A., Gill, A. M., ... Peakall, R. (2013). How does ecological disturbance influence genetic diversity? *Trends in Ecology and Evolution*, 28(11), 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.005>
- Brinker, A., Behrmann-Godel, J., Basen, T., Baer, J., Matzinger, M., & Chucholl, C. (2018). River damming drives population fragmentation and habitat loss of the threatened Danube streber ( Zingel streber ): Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(3), 587–599. <https://doi.org/10.1002/aqc.2878>
- Brooks C.P. (2003). A Scalar Analysis of Landscape Connectivity. *Oikos*, 102(2), 433-439 (7 pages). <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0579.2003.11511.x>
- Bruder, A., Tonolla, D., Schweizer, S. P., Vollenweider, S., Langhans, S. D., & Wüest, A. (2016). A conceptual framework for hydropeaking mitigation. *Science of The Total Environment*, 568, 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.032>
- Campos, H., Ruiz, V.H., Gavilán, J. F. & F. A. (1993). *Peces del Río Bío-Bío. Serie Publicaciones de Divulgación EULA*. Universidad de Concepción, Chile.
- Dedual, M. (2007). Survival of Juvenile Rainbow Trout Passing through a Francis Turbine. *North American Journal of Fisheries Management*, 27(1), 181–186. <https://doi.org/10.1577/M05-174.1>
- Dehais, C., Eudeline, R., Berrebi, P., & Argillier, C. (2010). Microgeographic

- genetic isolation in chub (Cyprinidae: *Squalius cephalus*) population of the Durance River: Estimating fragmentation by dams. *Ecology of Freshwater Fish*, 19(2), 267–278. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00411.x>
- Dias, M. S., Cornu, J.-F., Oberdorff, T., Lasso, C. A., & Tedesco, P. A. (2013). Natural fragmentation in river networks as a driver of speciation for freshwater fishes. *Ecography*, 36(6), 683–689. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07724.x>
- Díaz, G., Arriagada, P., Górski, K., Link, O., Karelovic, B., Gonzalez, J., & Habit, E. (2019). Fragmentation of Chilean Andean rivers: expected effects of hydropower development. *Revista Chilena de Historia Natural*, 92(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40693-019-0081-5>
- Dirección General de Aguas. (2004). *Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad: Cuenca del río Bío Bío*.
- Dirección General de Aguas. (2012). *Estudio Hidrogeológico cuenca Bio Bío tomo I, informe final y planos*.
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Elphinstone, M. S., Hinten, G. N., Anderson, M. J., & Nock, C. J. (2003). An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Molecular Ecology Notes*, 3(2), 317–320. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00397.x>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- 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(3), 564–567.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fagan, W. F. (2002). Connectivity, fragmentation, and extinction risk in dendritic metapopulations. *Ecology*, 83(12), 3243–3249.  
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3243:CFAERI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3243:CFAERI]2.0.CO;2)
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 487–515.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- Faulks, L. K., Gilligan, D. M., & Beheregaray, L. B. (2011). The role of anthropogenic vs. natural in-stream structures in determining connectivity and genetic diversity in an endangered freshwater fish, Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Evolutionary Applications*, 4(4), 589.  
<https://doi.org/10.1111/J.1752-4571.2011.00183.X>
- 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(2), 977–993.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>
- Freeman, M. C., Bowen, Z. H., Bovee, K. D., & Irwin, E. R. (2001). Flow and Habitat Effects on Juvenile Fish Abundance in Natural and Altered Flow Regimes. *Ecological Applications*, 11(1), 179.  
<https://doi.org/10.2307/3061065>
- García, A., Jorde, K., Habit, E., Caamaño, D., & Parra, O. (2011). Downstream environmental effects of dam operations: Changes in habitat quality for native fish species. *River Research and Applications*, 27(3), 312–327.  
<https://doi.org/10.1002/rra.1358>
- García, A., Sobenes, C., Link, O., & Habit, E. (2012). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology Bioenergetic models of the threatened darter *Percilia irwini*, (July 2013), 37–41.  
<https://doi.org/10.1080/10236244.2012.668283>

- Gasith, A., & Resh, V. H. (1999). Streams in Mediterranean Climate Regions : Abiotic Influences and Biotic Responses to Predictable Seasonal Events Author ( s ): Avital Gasith and Vincent H . Resh Source : Annual Review of Ecology and Systematics , Vol . 30 ( 1999 ), pp . 51-81 Published. *Ecology*, 30(1999), 51–81.
- Goodwin, B. J. (2003). Is landscape connectivity a dependent or independent variable? *Landscape Ecology*, 18(7), 687–699. <https://doi.org/DOI:10.1023/B:LAND.0000004184.03500.a8>
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet J. (1995) FSTAT Version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *Heredity*, 86, 485–486. Retrieved from <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Gousskov, A., Reyes, M., Wirthner-Bitterlin, L., & Vorburger, C. (2016). Fish population genetic structure shaped by hydroelectric power plants in the upper Rhine catchment. *Evolutionary Applications*, 9(2), 394–408. <https://doi.org/10.1111/eva.12339>
- Habit, E., & Belk, M. C. (2007). Threatened fishes of the world: *Percilia irwini* (Eigenmann 1927) (Perciliidae). *Environmental Biology of Fishes*, 78(3), 213–214. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-0014-4>
- Habit, E., Belk, M. C., & Parra, O. (2007). Response of the riverine fish community to the construction and operation of a diversion hydropower plant in central Chile. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17, 37–49. <https://doi.org/10.1002/aqc.774>
- Habit, E., Dyer, B., & Vila, I. (2006). Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana (Concepción)*, 70(1), 100–113. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Habit, E., García, A., Díaz, G., Arriagada, P., Link, O., Parra, O., & Thoms, M. (2019). River science and management issues in Chile: Hydropower development and native fish communities. *River Research and*

- Applications*, 35(5), 489–499. <https://doi.org/10.1002/rra.3374>
- 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>
- Habit, E., Victoriano, P., & Parra, O. (2002). Translocación de peces nativos en la cuenca del río Laja (Región del Biobío, Chile). *Gayana (Concepción)*, 66(2), 181–190.
- Hancock, K. J., & Sovacool, B. K. (2018). International Political Economy and Renewable Energy: Hydroelectric Power and the Resource Curse. *International Studies Review*, 20, 615–632. <https://doi.org/10.1093/isr/vix058>
- Hanks, R. D., & Hartman, K. J. (2018). Evaluation of the Influences of Dam Release Types, Land Use, and Habitat Affecting Abundance, Richness, Diversity, and Community Structure of Larval and Juvenile Fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0107>
- Hauer, C., Holzapfel, P., Leitner, P., & Graf, W. (2017). Longitudinal assessment of hydropeaking impacts on various scales for an improved process understanding and the design of mitigation measures. *Science of the Total Environment*, 575, 1503–1514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.031>
- Horreo, J. L., Martinez, J. L., Ayllon, F., Pola, I. G., Monteoliva, J. A., Héland, M., & Garci-Vazquez, E. (2011). Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshwater Biology*, 56(12), 2567–2579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02682.x>
- Hu, M., Hua, Q., Zhou, H., Wu, Z., & Wu, X. (2015). The effect of dams on the larval abundance and composition of four carp species in key river systems in China. *Environmental Biology of Fishes*, 98(4), 1201–1205.



<https://doi.org/10.1007/s10641-014-0342-8>

Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>

Jesus, T., Formigo, N., Santos, P., & Tavares, G. R. (2004). Impact evaluation of the Vila Viçosa small hydroelectric power plant (Portugal) on the water quality and on the dynamics of the benthic macroinvertebrate communities of the Ardena river. *Limnetica*, 23(4), 241–256. Retrieved from [http://www.limnetica.net/Limnetica/Limne23/L23b241\\_Impact\\_hydroelectric\\_power\\_plant.pdf](http://www.limnetica.net/Limnetica/Limne23/L23b241_Impact_hydroelectric_power_plant.pdf)

Junker, J., Peter, A., Wagner, C. E., Mwaiko, S., Germann, B., Seehausen, O., & Keller, I. (2012). River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). *Conservation Genetics*, 13(2), 545–556. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0306-x>

Koizumi, I., Yamamoto, S., & Maekawa, K. (2006). Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling Dolly Varden charr. *Molecular Ecology*, 15(11), 3175–3189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03019.x>

Lacy, S. N., Meza, F. J., & Marquet, P. A. (2017). Can environmental impact assessments alone conserve freshwater fish biota? Review of the Chilean experience. *Environmental Impact Assessment Review*, 63, 87–94. <https://doi.org/10.1016/J.EIAR.2016.12.006>

Lazzaro, G., Basso, S., Schirmer, M., & Botter, G. (2013). Water management strategies for run-of-river power plants: Profitability and hydrologic impact between the intake and the outflow. *Water Resources Research*, 49(12), 8285–8298. <https://doi.org/10.1002/2013WR014210>



- Legendre, P., & Anderson, M. J. (1999). Distance-based Redundancy Analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69(1), 1–24. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1999\)069\[0001:DBRATM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1999)069[0001:DBRATM]2.0.CO;2)
- Liermann, C. R., Nilsson, C., Robertson, J., & Ng, R. Y. (2012). Implications of Dam Obstruction for Global Freshwater Fish Diversity. *BioScience*, 62(6), 539–548. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.6.5>
- Losos, J. B., & Parent, C. E. (2009). The speciation–area relationship. In R. E. (eds) Losos, J. B. and Ricklefs (Ed.), *The theory of island biogeography revisited* (pp. 415–438). Princeton Univ. Press.
- Mardones Flores, M. (2002). Evolución morfogenética de la hoya del río Laja y su incidencia en la geomorfología. *Revista Geográfica de Chile Terra Australis*, Nro 47, 97–127.
- Mccracken, G. R., Perry, R., Keefe, D., & Ruzzante, D. E. (2013). Hierarchical population structure and genetic diversity of lake trout (*Salvelinus namaycush*) in a dendritic system in Northern Labrador. *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/fwb.12179>
- Ministerio de Energía. (2016). *Estudio de Cuencas. Análisis de las condicionantes para el desarrollo hidroeléctrico en las cuencas del Maule, Biobío, Toltén, Valdivia, Bueno, Puelo, Yelcho, Palena, Cisnes, Aysén, Baker y Pascua*. Santiago. Retrieved from [http://www.energia.gob.cl/sites/default/files/estudio\\_de\\_cuencas\\_2.pdf](http://www.energia.gob.cl/sites/default/files/estudio_de_cuencas_2.pdf)
- Ministerio de Medio Ambiente. (2019). Inventario nacional de especies de Chile. Retrieved from <http://especies.mma.gob.cl/CNMWeb/Web/WebCiudadana/Default.aspx>
- Morita, K., Morita, S. H., & Yamamoto, S. (2009). Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: Lessons from white-spotted charr in Japan. *Ecological Research*, 24(4), 711–722. <https://doi.org/10.1007/s11284-008-0579-9>

- Nagrodski, A., Raby, G. D., Hasler, C. T., Taylor, M. K., & Cooke, S. J. (2012). Fish stranding in freshwater systems: Sources, consequences, and mitigation. *Journal of Environmental Management*, 103, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.007>
- Neraas, L. P., & Spruell, P. (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, 10(5), 1153–1164. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01269.x>
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M., & Loeschcke, V. (1997). Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology*, 6(5), 487–492. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00204.x>
- Ovidio, M., Capra, H., & Philippart, J.-C. (2008). Regulated discharge produces substantial demographic changes on four typical fish species of a small salmonid stream. *Hydrobiologia*, 609(1), 59–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9399-8>
- Paish, O. (2002). Micro-hydropower: Status and prospects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part A: Journal of Power and Energy*, 216(1), 31–40. <https://doi.org/10.1243/095765002760024827>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.-M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95(6), 536–539.

<https://doi.org/10.1093/jhered/esh074>

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2).
- Raeymaekers, J. A. M., Maes, G. E., Geldof, S., Hontis, I., Nackaerts, K., & Volckaert, F. A. M. (2008). Modeling genetic connectivity in sticklebacks as a guideline for river restoration. *Evolutionary Applications*, 1(3), 475–488. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00019.x>
- Rannala, B. (2007). BayesAss Edition 3.0 User`s Manual. Retrieved from <https://manualzz.com/doc/7334907/bayesass-edition-3.0-user-s-manual>
- Rosenberg, D. M., Berkes, F., Bodaly, R. A., Hecky, R. E., Kelly, C. A., & Rudd, J. W. M. (1997). Large-scale impacts of hydroelectric development. *Environmental Reviews*, 5(1), 27–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/a97-001>
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Rousset, F. (1997). Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from F-Statistics Under Isolation by Distance. *Genetics*, 145(4).
- Ruzzante, D. E., McCracken, G. R., Salisbury, S. J., Brewis, H. T., Keefe, D., Gaggiotti, O. E., & Perry, R. (2019). Landscape, colonization, and life history: their effects on genetic diversity in four sympatric species inhabiting a dendritic system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0416>
- Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.08.009>
- Sheridan, A. K. (1995). The genetic impacts of human activities on wild fish populations. *Reviews in Fisheries Science*, 3(2), 91–108. <https://doi.org/10.1080/10641269509388568>

- Stelkens, R. B., Jaffuel, G., Escher, M., & Wedekind, C. (2012). Genetic and phenotypic population divergence on a microgeographic scale in brown trout. *Molecular Ecology*, *21*(12), 2896–2915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05581.x>
- Thiele, R., Moreno, H., Elgueta, S., Lahsen, A., Rebolledo, S., & Petit-Breuilh, M. E. (1998). Evolución geológico-geomorfológica cuaternaria del tramo superior del valle del río Laja. *Revista Geológica de Chile*, *25*(2), 229–253. <https://doi.org/10.4067/S0716-02081998000200007>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, *4*(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vera-Escalona, I., Habit, E., & Ruzzante, D. E. (2019). Invasive species and postglacial colonization: their effects on the genetic diversity of a Patagonian fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1897), 20182567. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2567>
- Waples, R. S., & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, *3*(3), 244–262. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x>
- Wilkes, M. A., Webb, J. A., Pompeu, P. S., Silva, L. G. M., Vowles, A. S., Baker, C. F., ... Kemp, P. S. (2018). Not just a migration problem: Metapopulations, habitat shifts, and gene flow are also important for fishway science and management. *River Research and Applications*. <https://doi.org/10.1002/rra.3320>
- Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, *163*(3), 1177–1191. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663554>
- Yu, D., Ding, X., Zhang, Z., Zeng, Y., Liu, H., Wang, L., ... Zhang, Q. (2018).

Correction to: Microsatellite records for volume 10, issue 2. *Conservation Genetics Resources*, 1–2. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1056-6>

Zhan, L., Paterson, I. G., Fraser, B. A., Watson, B., Bradbury, I. R., Nadukkalam Ravindran, P., ... Bentzen, P. (2017). megasat: automated inference of microsatellite genotypes from sequence data. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 247–256. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12561>

Zimmerman, J. K. H., Letcher, B. H., Nislow, K. H., Lutz, K. A., & Magilligan, F. J. (2010). Determining the effects of dams on subdaily variation in river flows at a whole-basin scale. *River Research and Applications*, 26(10), 1246–1260. <https://doi.org/10.1002/rra.1324>



## TABLAS CAPÍTULO II

Tabla 1: Características de las centrales hidroeléctricas del sistema fluvial del río Biobío. El tipo de central indica si se trata de una central hidroeléctrica de almacenamiento (con presa y embalse) o de paso del río (RoR; sin embalse y toma de agua lateral). Año: indica el año en que comenzaron las operaciones. Se indicaron la presencia o ausencia de barrera física y embalse para cada planta. na: no aplicable.

Table 1: Characteristics of the hydroelectric power plants in the Biobío river system. Type of power plant indicates whether storage hydropower (with dam and reservoir) or run of the river (RoR; no reservoir and lateral water intake). Year: indicates year operations started. The presence or absence of a physical barrier and reservoir is given for each plant. na: not applicable.

River	Hydroelectric power plant	Type of power plant	Year	Power Capacity (MW)	Physical barrier	Reservoir size (mill. m <sup>3</sup> )
<b>Laja</b>	Abanico	RoR	1948	136,0	Yes	na
	El Toro	Storage	1973	450,0	No	7.700 (natural Laja Lake used as reservoir)
	Antuco	RoR	1981	320,0	No	na
	Rucúe	RoR	1998	178,4	Yes	na
	Quilleco	RoR	2007	70,8	No	na
	Laja	RoR	2015	34,4	Yes	na
	<b>Biobío</b>					
	Ralco	Storage	2004	690,0	Yes	1.222
	Pangue	Storage	1996	467,0	Yes	175
	Angostura	Storage	2014	323,8	Yes	100
	Mampil*	RoR	2000	55,0	No	na
	Peuchén*	RoR	2000	85,0	No	na

\*Located in the Duqueco river, tributary of the Biobío

Tabla 2: Información de los sitios de muestreo para *Percilia irwini* del sistema del río Biobío, incluye ID de la muestra, coordenadas (Lat. y Long.), elevación (msnm), tamaño de muestra N por año (2016, 2017), riqueza alélica (AR), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho), nombres de poblaciones finales (LU = Laja aguas arriba, LD = Laja aguas abajo, BU = Biobío aguas arriba, BC = Biobío central, BD = Biobío aguas abajo, BD (salida) = Biobío aguas debajo de BD, RM = Renaico-Malleco, NI = Niblinto), y tamaño efectivo de la población (con y sin migrantes, incluidos los límites inferior y superior.  $\infty$  = infinito).

Table 2: Sampling site information for *Percilia irwini* from the Biobío river system, including sample ID, coordinates (Lat. and Long.), elevation (masl), sample size, N (2016, 2017), allelic richness (AR), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), final population names (LU=Laja upstream, LD=Laja downstream, BU=Biobío upstream, BC=Biobío central, BD=Biobío downstream, BD(outlet)= Biobío downstream outlet, RM=Renaico-Malleco, NI=Niblinto), and effective population size ( $\hat{N}_{eLD}$ ) with and without migrants, including lower and upper limits.  $\infty$ =infinite.

Main Rivers	Site	Affluent river	Location	Sample ID	Latitude (S)	Longitude (W)	Elevation (masl)	N	$A_R$	$H_e$	$H_o$	Population name	$A_R$ Population	$H_e$ Population	$H_o$ Population	$N_e$ ( $N_{eLD}$ ) with migrants	$N_e$ ( $N_{eLD}$ ) without migrants
Laja	LU1	Laja	Laja upstream	BIO23	37°22'23.29	71°44'24.39	531	(49, -)	5.46	0.650	0.612						
	LU2	Laja	Laja upstream	BIO22	37°20'32.70	71°48'0.30	457	(30, 10)	5.36	0.645	0.610	LU	7.61	0.655	0.614	$\infty$ (2630- $\infty$ )	$\infty$ (2493- $\infty$ )
	LU3	Laja	Laja upstream	BIO25	37°19'18.78	71°57'54.56	312	(20, -)	5.32	0.626	0.620						
	LFU4	Laja	Laja fall upstream	BIO7	37°12'39.34	72°19'15.73	189	(38, -)	5.63	0.651	0.618						
	LFD5	Laja	Laja fall downstream	BIO9	37°13'55.15	72°34'25.46	108	(54, -)	6.47	0.697	0.679	LD	9.13	0.697	0.679	$\infty$ (1763- $\infty$ )	$\infty$ (2201- $\infty$ )
Biobío	BU1	Biobio	Biobio upstream	BIO1	38°28'23.60	71°14'10.14	895	(21, 15)	4.51	0.550	0.539	BU	5.73	0.567	0.544	$\infty$	$\infty$

Main Rivers	Site	Affluent river	Location	Sample ID	Latitude (S)	Longitude (W)	Elevation (masl)	N	$A_R$	$H_e$	$H_o$	Population name	$A_R$ Population	$H_e$ Population	$H_o$ Population	$N_e$ ( $N_{eLD}$ ) with migrants	$N_e$ ( $N_{eLD}$ ) without migrants
	BU2	Biobío	Biobío upstream	BIO2	38°12'43.99	71°17'46.13	745	(35, 16)	4.46	0.571	0.547					(849-∞)	(849-∞)
	BC3	Biobío	Biobío central	BIO5	37°48'55.56	71°40'34.72	342	(45, 12)	5.23	0.606	0.567	BC	7.60	0.606	0.568	935	745
	BC4	Biobío	Biobío central	BIO17	37°39'3.72	71°44'7.41	417	(14, -)	4.95	0.568	0.572					(372-∞)	(322-∞)
	BD5	Biobío	Biobío downstream	BIO6	37°42'41.67	71°54'6.98	263	(38, 44)	6.13	0.654	0.623	BD	8.99	0.654	0.623	∞	∞
	BD6	Biobío	Biobío downstream	BIO21	37°33'2.63	72°17'5.06	135	(42, -)	6.45	0.673	0.617	BD <sub>(outlet)</sub>	9.39	0.672	0.621	1048	1058
	BD7	Biobío	Biobío downstream	BIO15	37°29'43.54	72°38'56.97	56	(37, -)	6.40	0.660	0.625					(467-∞)	(475-∞)
<b>Renaico - Malleco</b>	RU1	Renaico	Renaico upstream	BIO18	38° 2'14.07	71°47'27.81	507	(22, 14)	6.46	0.662	0.599						
	RU2	Renaico	Renaico upstream	BIO28	38° 0'10.92	72° 0'9.78	306	(-, 26)	6.21	0.658	0.639						
	MU1	Malleco	Malleco upstream	BIO11	38° 9'19.06	72° 3'40.60	422	(47, -)	6.06	0.651	0.608						
	MU2	Malleco	Malleco upstream	BIO12	38° 5'6.33	72°12'58.68	283	(49, -)	6.14	0.648	0.6	RM	9.23	0.668	0.608	7701	9169
	MD3	Malleco	Malleco downstream	BIO27	37°55'0.41	72°30'32.04	139	(-, 28)	6.13	0.639	0.601					(2579-∞)	(2705-∞)
	MD4	Malleco	Malleco downstream	BIO13	37°51'35.62	72°37'32.93	93	(32, 40)	6.29	0.668	0.625						
	MD5	Malleco	Malleco downstream	BIO26	37°46'55.76	72°41'34.23	69	(-, 16)	6.00	0.639	0.593						
	MD6	Malleco	Malleco downstream	BIO14	37°34'36.91	72°38'17.87	57	(49, -)	6.42	0.667	0.591						
	NI1	Niblinto	Niblinto upstream	BIO10	38° 9'37.90	71°56'43.91	533	(55, 29)	5.30	0.629	0.569	NI	7.2	0.629	0.569	637	729
																(337-∞)	(339-∞)



## FIGURAS CAPÍTULO II

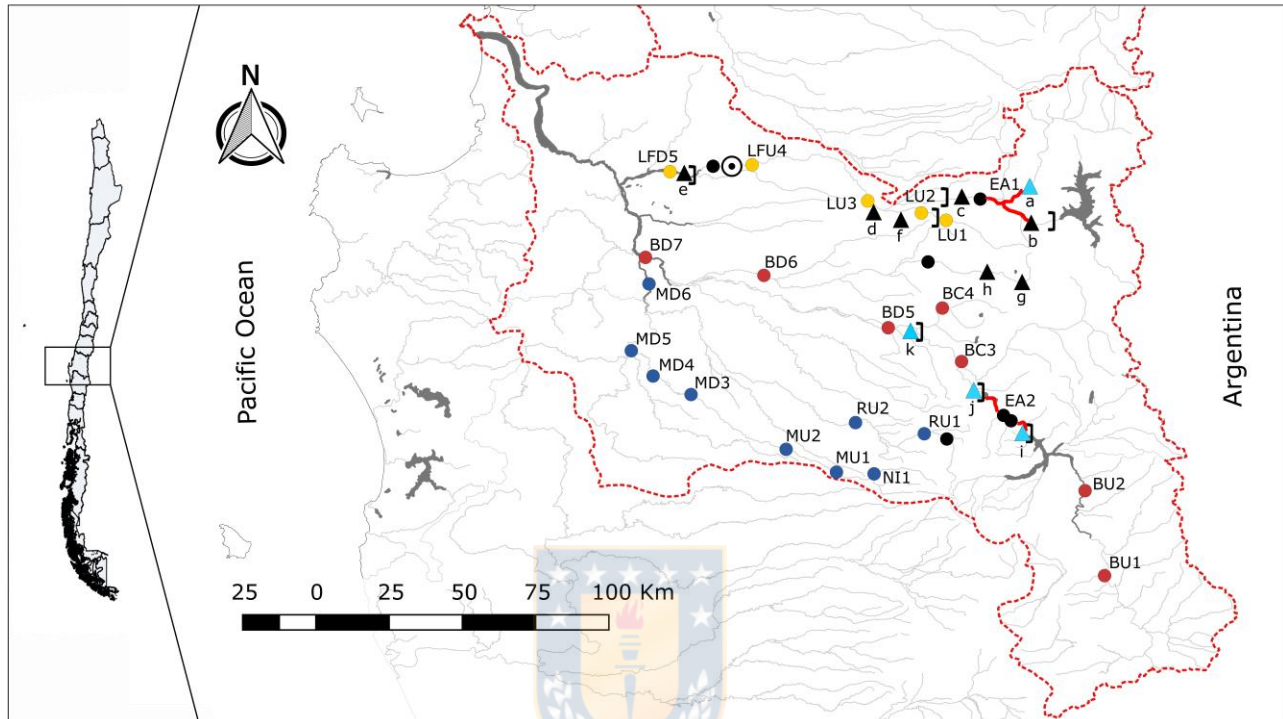


Figura 1: Cuenca del río Biobío en el centro de Chile. Muestra los sitios de muestreo y las centrales hidroeléctricas. Círculos amarillos: río Laja; Círculos rojos: río Biobío; Círculos azules: sitios de muestreo del río Renaico-Malleco. Círculos negros: sitios de muestreo donde *P. irwini* estuvo ausente. El círculo blanco y negro representa la cascada “Salto del Laja”. Los triángulos negros representan las centrales hidroeléctricas de pasada y los triángulos celestes representan las centrales hidroeléctricas de almacenamiento: (a) El Toro, (b) Abanico, (c) Antuco, (d) Quilleco, (e) Laja, (f) Rucúe, (g) Peuchén, (h) Mampil, (i) Ralco, (j) Pangué y (k) Angostura. Los corchetes negros muestran la localización de las barreras físicas. Líneas rojas (EA1 y EA2) corresponden a áreas del río sin individuos.

Figure 1: Biobío basin in central Chile, showing sampling sites and hydropower plants. Yellow circles: Laja river; Red circles: Biobío river; Blue circles: Renaico-Malleco river sample sites. Black circles: sample sites where *P. irwini* was absent. Black and white

circle represents the “Salto del Laja” waterfall. Black triangles represent run of the river hydropower plants and light blue triangles represent storage hydropower plants: (a) El Toro, (b) Abanico, (c) Antuco, (d) Quilleco, (e) Laja, (f) Rucúe, (g) Peuchén, (h) Mampil, (i) Ralco, (j) Pangué and (k) Angostura. Black square brackets show the localization of the physical barriers. Red lines (EA1 and EA2) correspond to areas of the river without individuals.



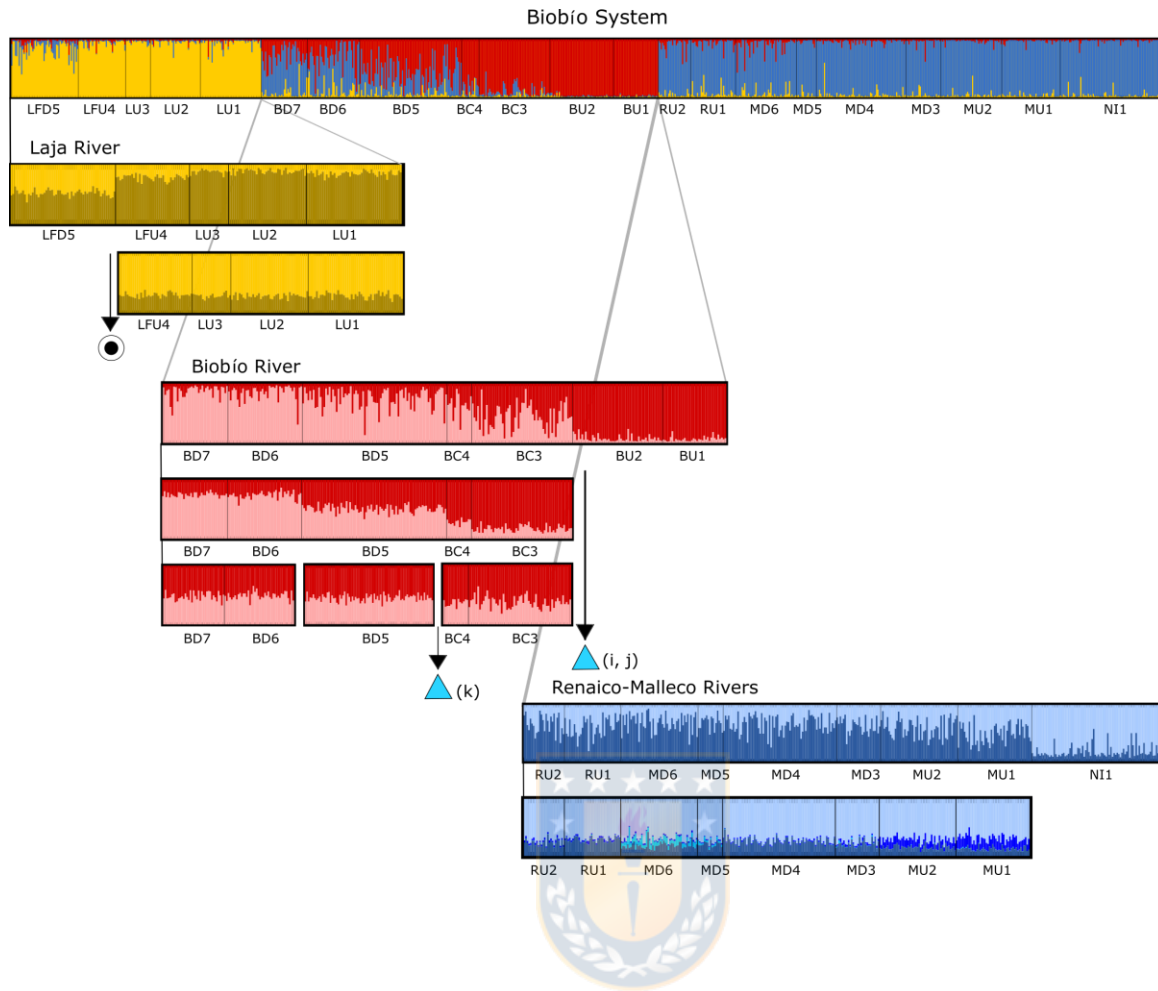


Figura 2: Análisis de estructuración genética STRUCTURE de *P. irwini* endémica de agua dulce (utilizando el método de Evanno) de 21 sitios de muestreo y caracterizada con 28 loci de microsatélites. Las líneas de color verticales indican los coeficientes de mezcla individuales (Q). El círculo blanco y negro representa la cascada “Salto del Laja”, (i) Ralco, (j) Pangue y (k) centrales hidroeléctricas Angostura.

Figure 2: Hierarchical STRUCTURE analysis of the freshwater endemic *P. irwini* (using Evanno method) from 21 locations and characterized at 28 microsatellite loci. Vertical color lines indicate individual admixture coefficients (Q). Black and white circle represents the “Salto del Laja” waterfall, (i) Ralco, (j) Pangue and (k) Angostura hydropower plants.

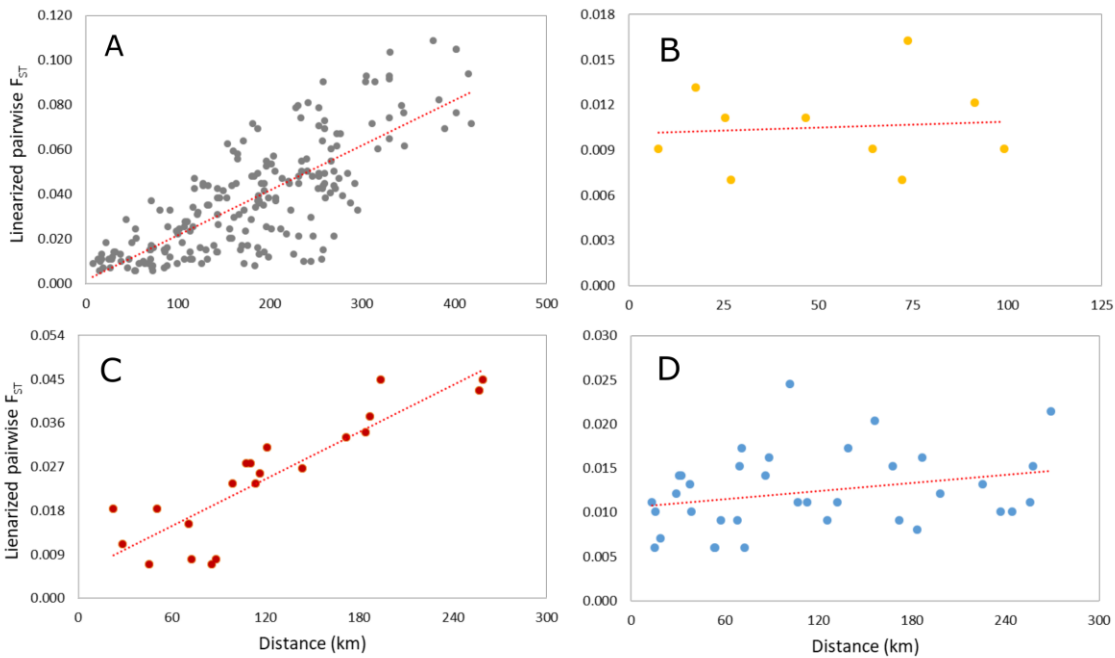


Figura 3: Gráficos de estimaciones de  $\hat{F}_{STS}$  ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) linealizadas por pares frente a la distancia geográfica (vía fluvial) (en km). La línea roja indica la línea de regresión: a) Sistema Biobío ( $R^2 = 0.5987$ , valor  $P \leq 0.0001$ ), b) río Laja ( $R^2 = 0.0080$ , Valor  $P \geq 0.384$ ), c) río Biobío ( $R^2 = 0.7730$ , valor  $P \leq 0.0001$ ), d) ríos Renaico-Malleco ( $R^2 = 0.0798$ , valor  $P \geq 0.117$ ).

Figure 3: Plots of linearized pairwise  $\hat{F}_{STS}$  ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) estimates vs. geographic (waterway) distance (km). The red line indicates the regression line: a) Biobío system ( $R^2=0.5987$ ,  $P\text{-value} \leq 0.0001$ ), b) Laja river ( $R^2=0.0080$ ,  $P\text{-value} \geq 0.384$ ), c) Biobío river ( $R^2=0.7730$ ,  $P\text{-value} \leq 0.0001$ ), d) Renaico-Malleco river ( $R^2=0.0798$ ,  $P\text{-value} \geq 0.117$ ).

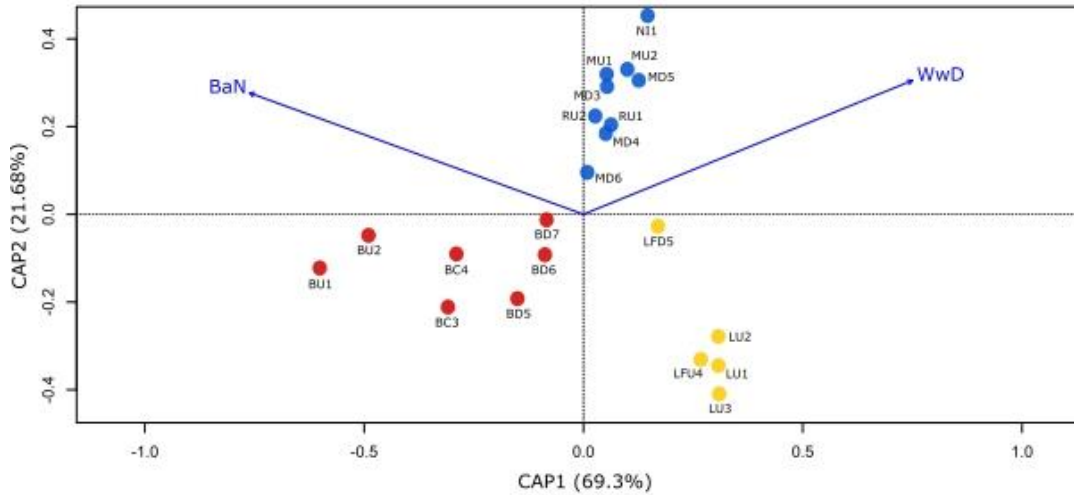


Figura 4: Gráfico de análisis de redundancia basado en distancia (dbRDA) que muestra las variables explicativas del paisaje con impacto significativo en las (dis) similitudes derivadas de la respuesta (diferenciación genética: valores  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) linealizados) en el sistema Biobío: Número de barreras (BaN) y Distancias fluvial (Wwd). Puntos amarillos: sitios de muestreo dentro del río Laja. Puntos rojos: sitios de muestreo dentro del río Biobío. Puntos azules: sitios de muestreo dentro de los ríos Renaiico-Malleco.

Figure 4: dbRDA plot showing the explanatory landscape variables with significant impact on the (dis)similarities derived from the response (genetic differentiation: linearized  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) values) in the Biobío system: Number of barriers (BaN) and Waterway distances (Wwd). Yellow points: sampling sites within the Laja river. Red points: sampling sites within Biobío river. Blue points: sampling sites within the Renaiico-Malleco river.

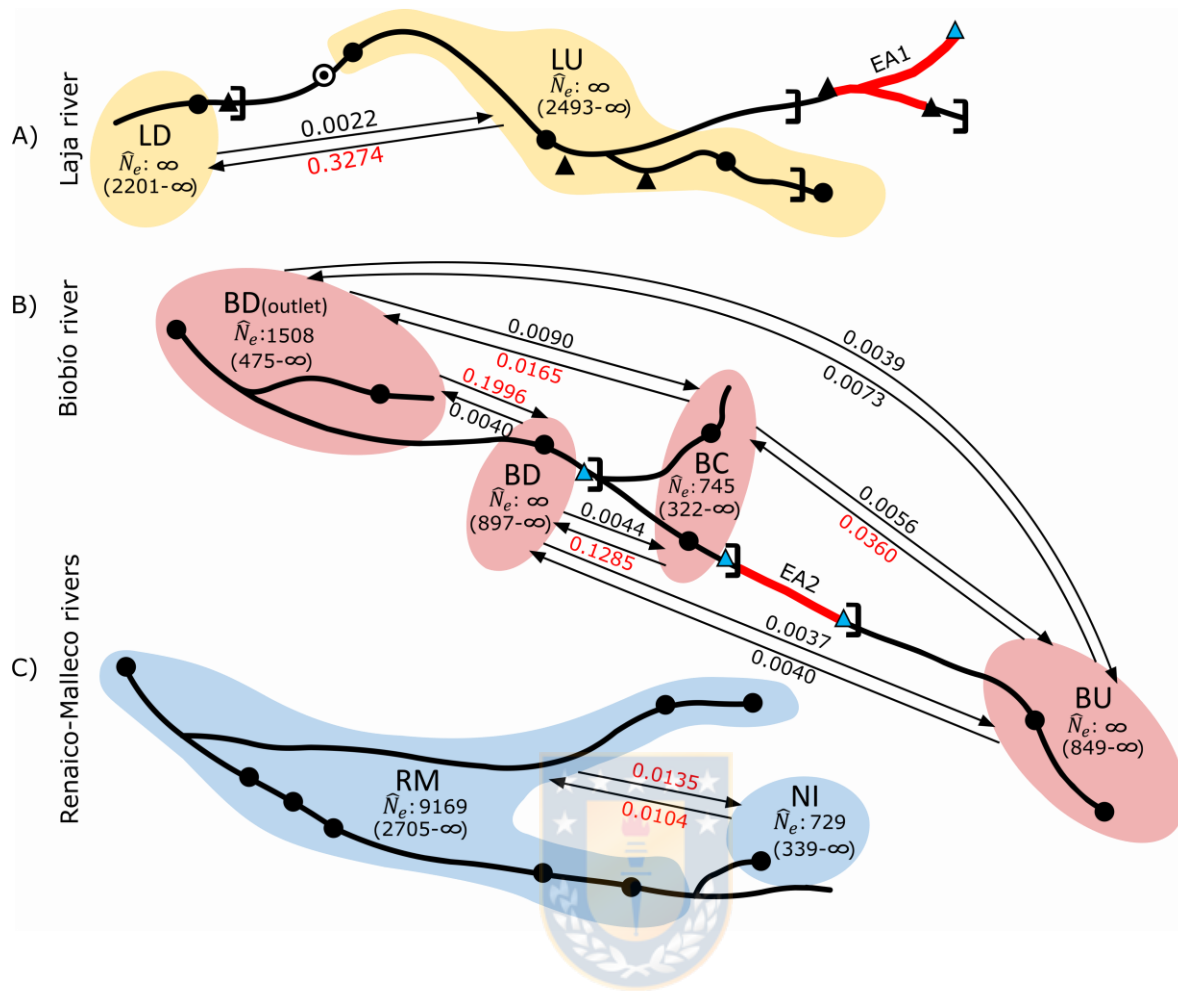


Figura 5: Estimaciones de las tasas de migración contemporáneas utilizando BAYESASS y tamaños efectivos calculados sin migrantes en LDNe para cada población del sistema del río Biobío: a) río Laja b) río Biobío, c) río Renaico-Malleco. Las líneas continuas muestran dónde está presente la conectividad entre las poblaciones y su dirección. Las tasas de migración contemporáneas rojas son distintas de cero. Círculos negros: sitios de muestreo. Círculo blanco y negro: Cascada “Salto del Laja”. Triángulos negros: centrales hidroeléctricas de pasada. Triángulos celestes: centrales hidroeléctricas de embalse. Paréntesis cuadrado: barrera física. Las líneas rojas representan áreas sin individuos de *P. irwini* (EA: Áreas de Extirpación 1 y 2).

Figure 5: Contemporary migration rates estimates using BAYESASS and effective sizes calculated without migrants in LDNe for each pool of Biobío system: a) Laja river pool b) Biobío river pool, c) Renaico-Malleco river pool. Continuous lines show where

connectivity is present between populations and their direction. Red contemporary migration rates are nonzero. Black circles: sample sites. Black and white circle: “Salto del Laja” waterfall. Black triangles: Run of the river hydropower plants. Light blue triangles: Storage hydropower plants. Square bracket: physical barrier. Red lines represent areas without *P. irwini* individuals (EA: Extirpation Areas 1 and 2).



## MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPITULO II

Tabla S1: Índices de diversidad: Riqueza alélica ( $A_R$ ), heterocigosidad esperada ( $He$ ) y heterocigosidad observada ( $Ho$ ), utilizando 28 o 26 loci microsatélites. N por año (2016, 2017) muestra el número de individuos muestreados por año.

Table S1: Diversity indexes Allelic richness ( $A_R$ ), Expected heterozygosity ( $He$ ) and Heterozygosity observed ( $Ho$ ), using 28 or 26 loci microsatellites. N by year (2016, 2017) shows the number of individuals sampled by year.

Site	N by year (2016, 2017)	N total	28 loci	26 loci	28 loci	26 loci	28 loci	26 loci
			$A_R$	$A_R$	$He$	$He$	$Ho$	$Ho$
LU1	(49, -)	49	5.46	5.46	0.65	0.642	0.612	0.604
LU2	(30, 10)	40	5.36	5.39	0.645	0.643	0.61	0.609
LU3	(20, -)	20	5.32	5.33	0.626	0.620	0.62	0.612
LFU4	(38, -)	38	5.63	5.57	0.651	0.645	0.618	0.611
LFD5	(54, -)	54	6.47	6.42	0.697	0.693	0.679	0.675
BU1	(21, 15)	36	4.51	4.69	0.55	0.579	0.539	0.566
BU2	(35, 16)	51	4.46	4.65	0.571	0.605	0.547	0.579
BC3	(45, 12)	57	5.23	5.42	0.606	0.636	0.567	0.593
BC4	(14, -)	14	4.95	5.15	0.568	0.593	0.572	0.594
BD5	(38, 44)	82	6.13	6.27	0.654	0.673	0.623	0.642
BD6	(42, -)	42	6.45	6.53	0.673	0.679	0.617	0.628
BD7	(37, -)	37	6.4	6.47	0.66	0.670	0.625	0.640
RU1	(22, 14)	36	6.46	6.50	0.662	0.661	0.599	0.610
RU2	(-, 26)	26	6.21	6.25	0.658	0.668	0.639	0.662
MU1	(47, -)	47	6.06	6.08	0.651	0.655	0.608	0.625
MU2	(49, -)	49	6.14	6.25	0.648	0.659	0.6	0.622
MD3	(-, 28)	28	6.13	6.17	0.639	0.647	0.601	0.619
MD4	(32, 40)	72	6.29	6.36	0.668	0.674	0.625	0.640
MD5	(-, 16)	16	6	6.01	0.639	0.649	0.593	0.607
MD6	(49, -)	49	6.42	6.44	0.667	0.676	0.591	0.604
NI1	(55, 29)	84	5.3	5.26	0.629	0.630	0.569	0.582



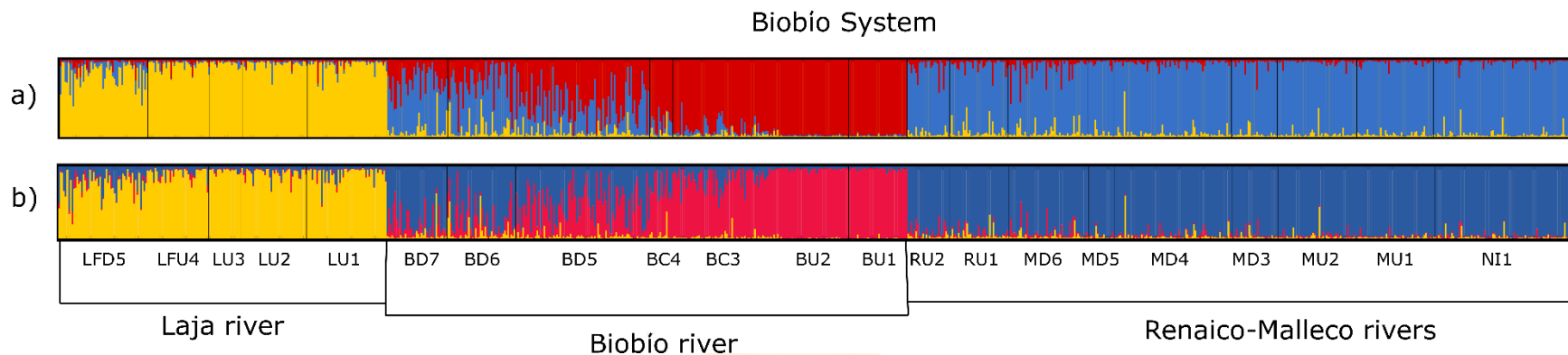


Figura S1: Análisis jerárquico del pez de agua dulce *Percilia irwini* de 21 sitios de muestreo y caracterizado en a) 26 y b) 28 loci. Las líneas de color verticales en los gráficos muestran coeficientes de mezcla individuales (Q). Estimamos el número más probable de agrupamiento según la metodología de Evanno (Evanno, Regnaut y Goudet, 2005) implementada en STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl y vonHoldt, 2012). Cada ejecución de STRUCTURE independiente se llevó a cabo utilizando 5 repeticiones, donde cada ejecución consistió en 2,000,000 de iteraciones con un burning inicial de 200,000.

Figure S1: Hierarchical analysis of freshwater fish *Percilia irwini* from 21 locations and characterized at a) 26 and b) 28 loci. Vertical color lines in the plots show individual admixture coefficients (Q). We estimated the most likely number of clusters based on the Evanno methodology (Evanno et al. 2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl and vonHoldt 2012a). Each independent STRUCTURE run was conducted using 5 replicate runs, where each run consisted of 2,000,000 iterations with an initial burn-in of 200,000.

Tabla S2: Estimaciones de  $F_{ST}$  por pares para los ocho sitios muestreados en 2016 y 2017.

Table S2: Pairwise  $F_{ST}$  estimates for the eight sites sampled in 2016 and 2017.

<b>2016 Samples</b>	<b>LU2</b>	<b>BD5</b>	<b>BC3</b>	<b>BU2</b>	<b>BU1</b>	<b>RU1</b>	<b>MD4</b>	<b>NI1</b>	
	0								<b>LU2</b>
	0.052	0							<b>BD5</b>
	0.074	0.015	0						<b>BC3</b>
	0.091	0.027	0.018	0					<b>BU2</b>
	0.104	0.039	0.032	0.01	0				<b>BU1</b>
	0.04	0.026	0.049	0.062	0.076	0			<b>RU1</b>
	0.042	0.021	0.047	0.059	0.072	0.014	0		<b>MD4</b>
	0.052	0.033	0.062	0.078	0.095	0.018	0.018	0	<b>NI1</b>
	30	38	52	35	21	22	32	55	<b>Individuals number</b>
<b>2017 Samples</b>									
	0								<b>LU2</b>
	0.046	0							<b>BD5</b>
	0.08	0.029	0						<b>BC3</b>
	0.089	0.027	0.034	0					<b>BU2</b>
	0.096	0.033	0.038	0.02	0				<b>BU1</b>
	0.043	0.028	0.062	0.071	0.072	0			<b>RU1</b>
	0.043	0.024	0.059	0.071	0.072	0.019	0		<b>MD4</b>
	0.049	0.032	0.066	0.08	0.083	0.023	0.018	0	<b>NI1</b>
	10	44	5	16	15	14	40	29	<b>Individuals number</b>
<b>2016 and 2017 samples together</b>									
	0								<b>LU2</b>
	0.046	0							<b>BD5</b>
	0.068	0.011	0						<b>BC3</b>
	0.085	0.023	0.015	0					<b>BU2</b>
	0.095	0.032	0.026	0.008	0				<b>BU1</b>
	0.035	0.021	0.045	0.058	0.067	0			<b>RU1</b>
	0.037	0.02	0.047	0.06	0.069	0.009	0		<b>MD4</b>
	0.047	0.029	0.058	0.074	0.086	0.015	0.014	0	<b>NI1</b>
	40	82	57	51	36	36	72	84	<b>Individuals number</b>

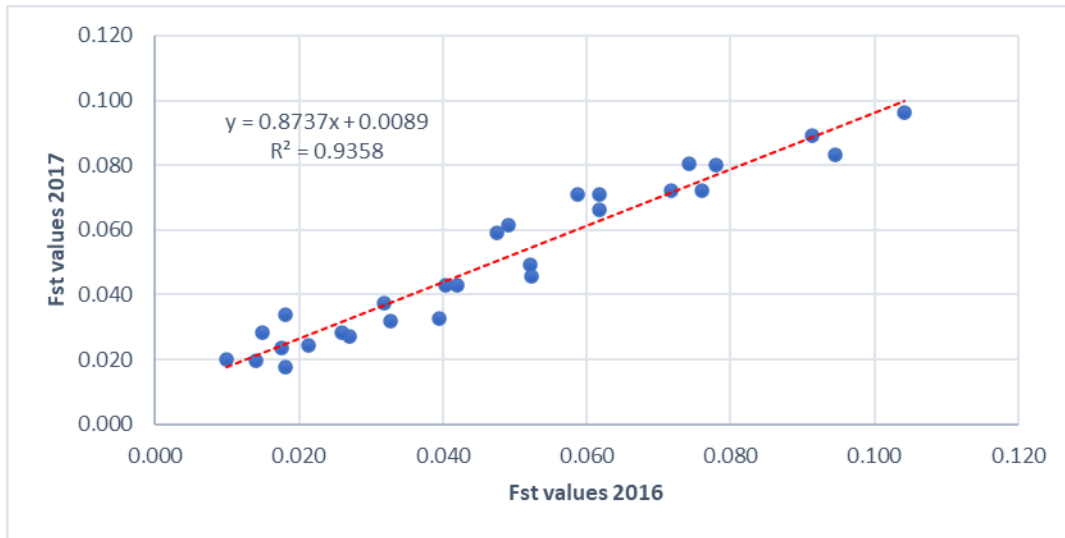
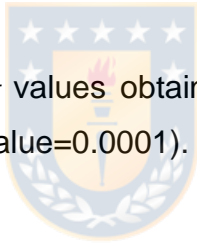


Figura S2: Correlación entre los valores de  $F_{ST}$  obtenidos para los años 2016 y 2017, usando 9999 permutaciones ( $R^2 = 0.9358$ , valor  $P = 0.0001$ ).

Figure S2: Correlation between  $F_{ST}$  values obtained for years 2016 and 2017, using 9999 Permutations ( $R^2= 0.9358$ ,  $P$ -value=0.0001).



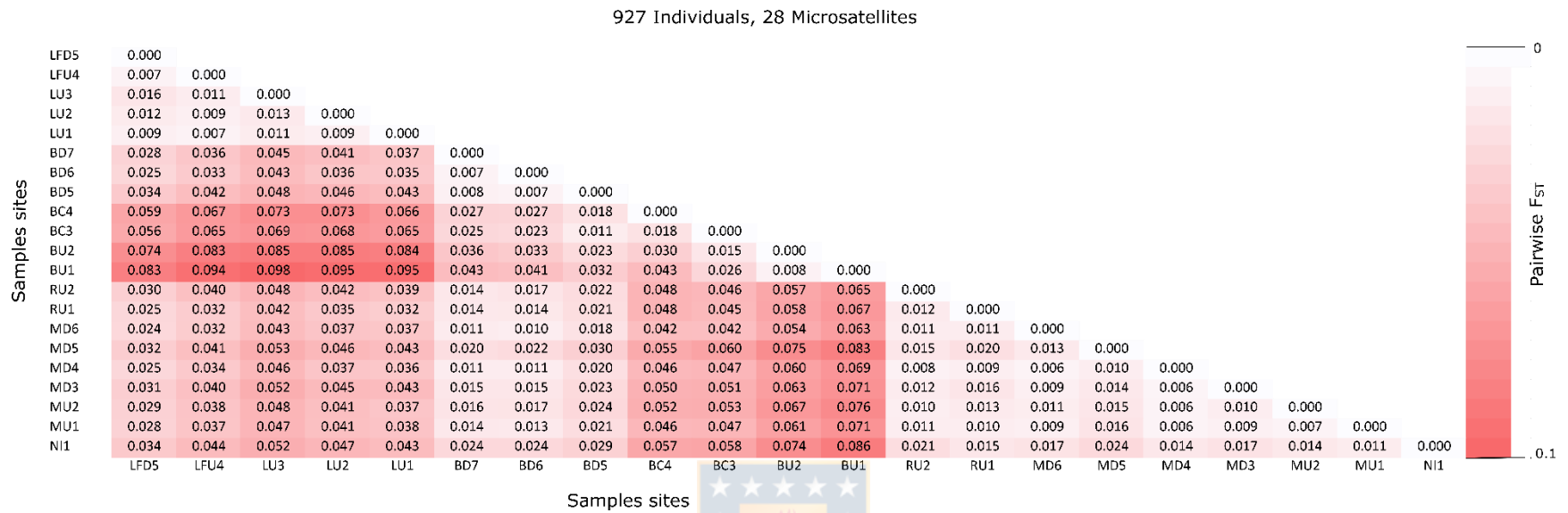


Figura S3: Mapa de calor que representa los valores de  $F_{ST}$  por pares calculados utilizando un conjunto de datos restringido de 927 individuos recolectados de veintiún sitios de muestreo, genotipados en 28 microsatélites.

Figure S3: Heat map depicting pairwise  $F_{ST}$  values calculated using a restricted dataset of 927 individuals collected from twenty-one sampling sites, genotyped at 28 microsatellites.

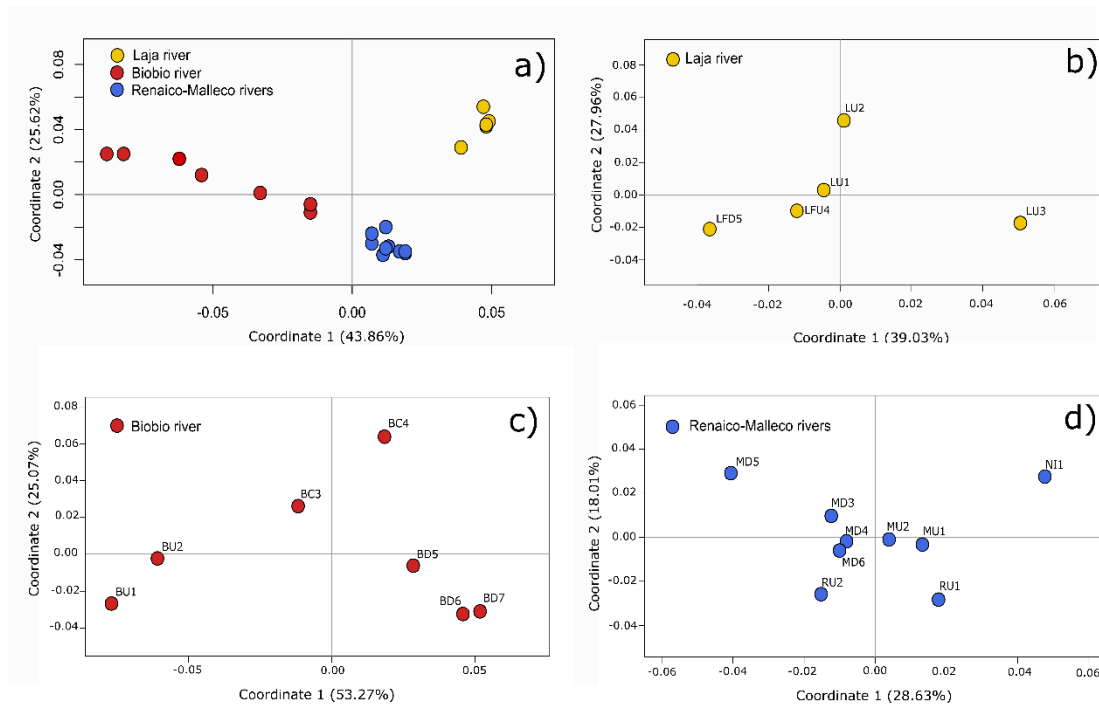


Figura S4: (a) Análisis de coordenadas principales basado en  $F_{ST}$  linealizados:  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ), a) incluyó todos los sitios del sistema Biobío, b) solo sitios del río Laja, c) solo sitios del río Biobío y d) solo sitios de los ríos Renaico-Malleco.

Figure S4: (a) Principal coordinates analysis based on linearized pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ), a) included all sites of the Biobío system, b) Laja river sites, c) Biobío river sites and d) Renaico-Malleco river sites.

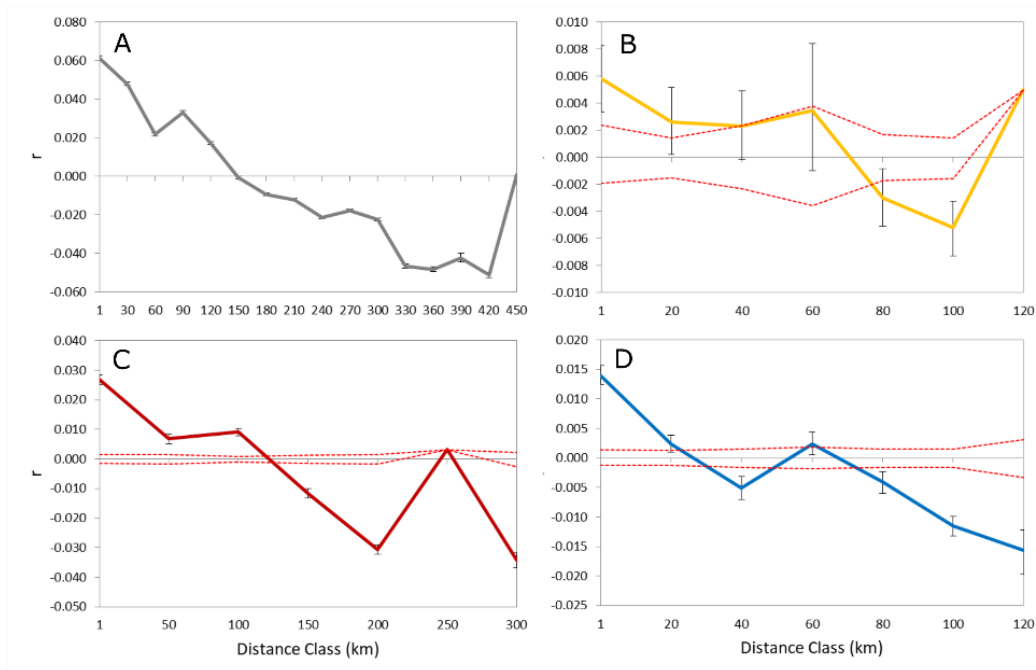


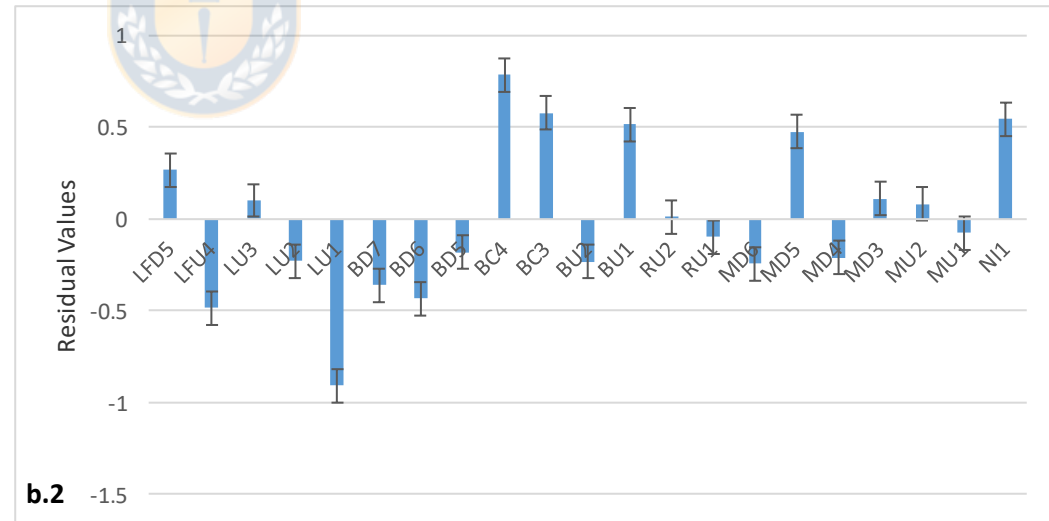
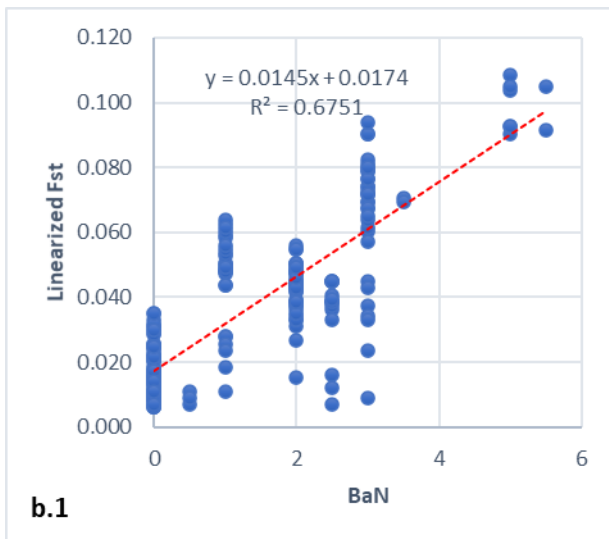
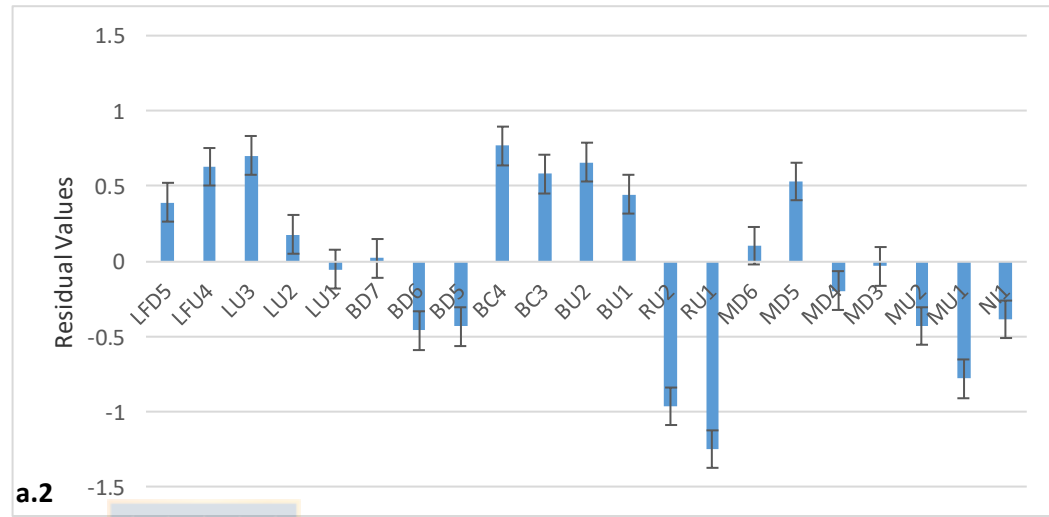
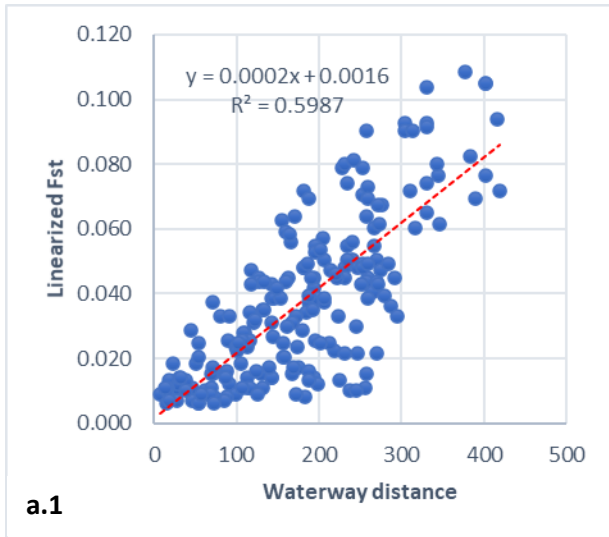
Figura S5: Autocorrelación espacial de alelos ( $r$ ) basada en distancia genética más errores estándar (barras) en función de la distancia (km) entre pares de individuos: a) Sistema Biobío, b) río Laja, c) río Biobío, d) ríos Renaico - Malleco.

Figure S5: Spatial allele autocorrelation ( $r$ ) based in genetic distance plus standard errors (bars) as a function of distance (km) between pairs of individuals: a) Biobío system, b) Laja river, c) Biobío river, d) Renaico-Malleco river.

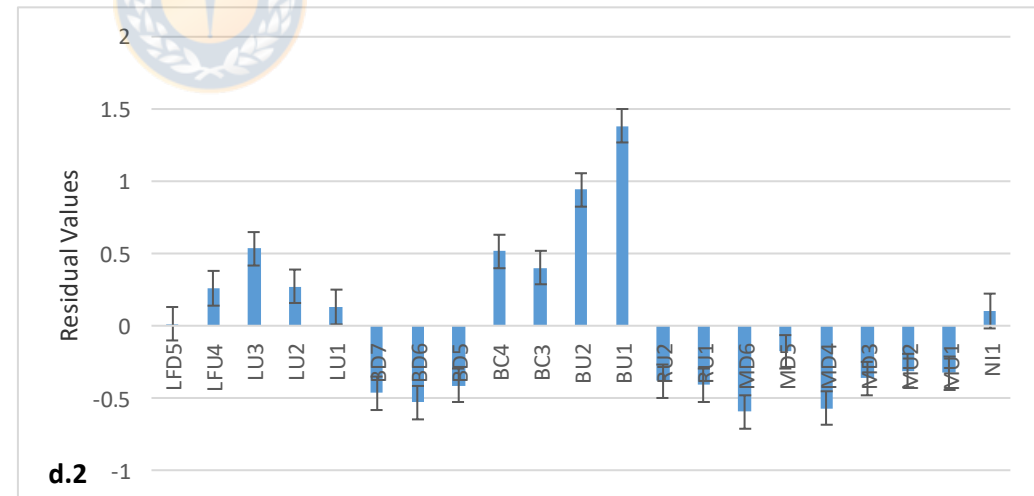
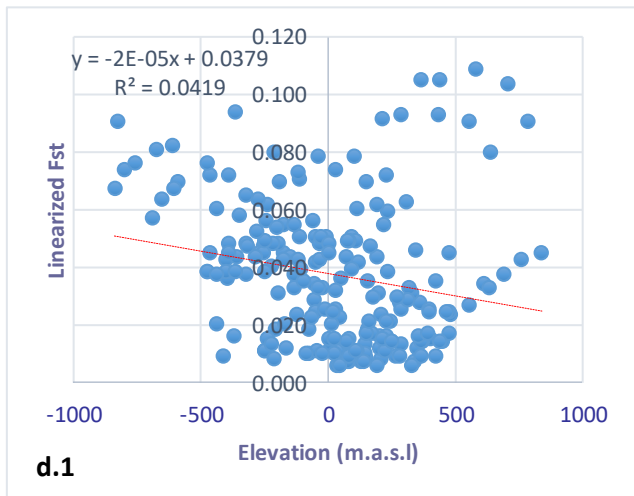
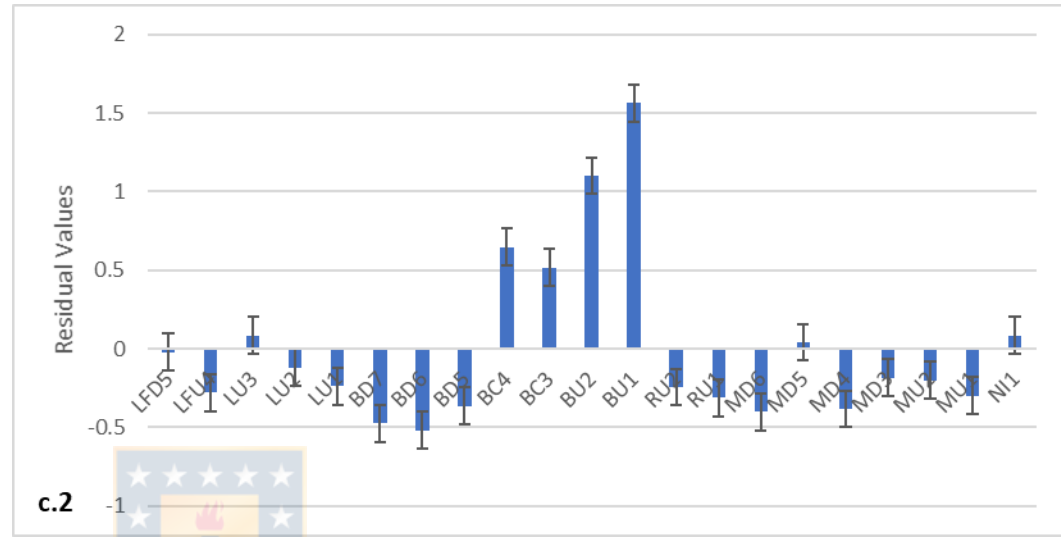
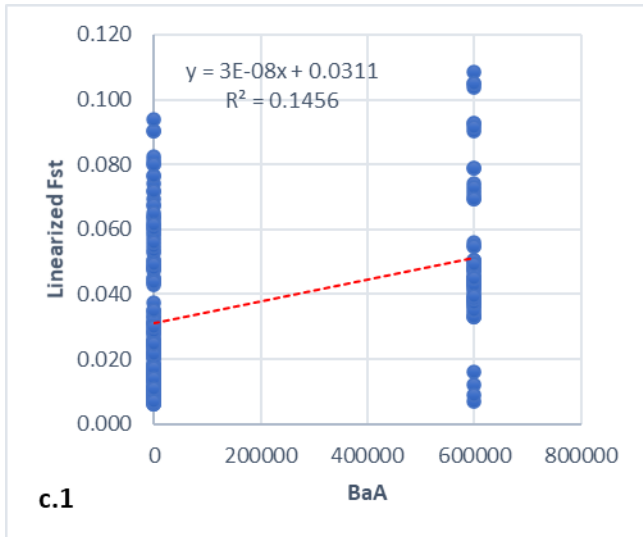
Tabla S3: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}^s$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y distancias de vías fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi, Yamamoto y Maekawa, 2006).

Table S3: Results of Mantel tests between linearized pairwise genetic distances  $\hat{F}_{ST}^s$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) and Waterway distances (Wwd), Number of Barriers (BaN), Age of Barriers (BaA), Elevation and, Slope, considering all sample sites. Potential outlier sites were identified and sequentially removed using a decomposed pairwise regression (Koizumi et al. 2006).

ALL BASIN	Model	Excluded sites	$R^2$	P	AICc
$\hat{F}_{ST}^s$ vs. Wwd	1	None	0.5987	0.0001	-137.7405416
	2	RU2	0.6454	0.0001	-134.9981760
	3	RU2, RU1	0.7416	0.0001	-136.0690234
	4	RU2, RU1, MU1	0.7734	0.0001	-133.0741413
	5	RU2, RU1, MU1, NI1	0.7939	0.0001	-129.0318904
	6	RU2, RU1, MU1, NI1, MU2	0.8239	0.0001	-125.9008207
$\hat{F}_{ST}^s$ vs BaN	1	None	0.6751	0.0001	-36.57000000
$\hat{F}_{ST}^s$ vs BaA	1	None	0.1456	0.0090	-27.87184266
$\hat{F}_{ST}^s$ vs Elevation	1	None	0.0419	0.0150	-26.84091513
$\hat{F}_{ST}^s$ vs. Slope	1	None	0.0104	0.2250	-26.54983743
Residual [ $\hat{F}_{ST}^s$ vs BaN] vs Wwd	1	None	0.1907	0.0001	38.28947936
Residual [ $\hat{F}_{ST}^s$ vs Wwd] vs BaN	1	None	0.2671	0.0001	48.12041370







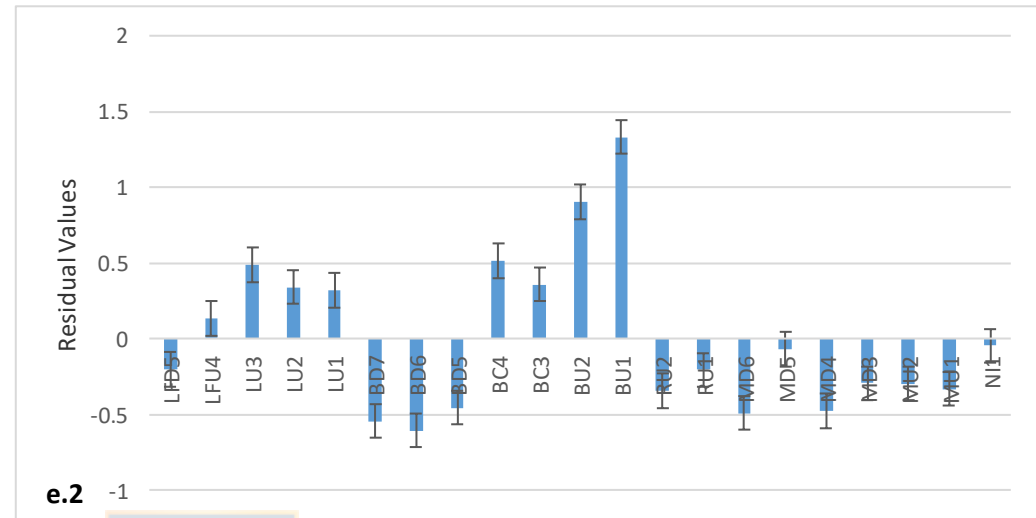
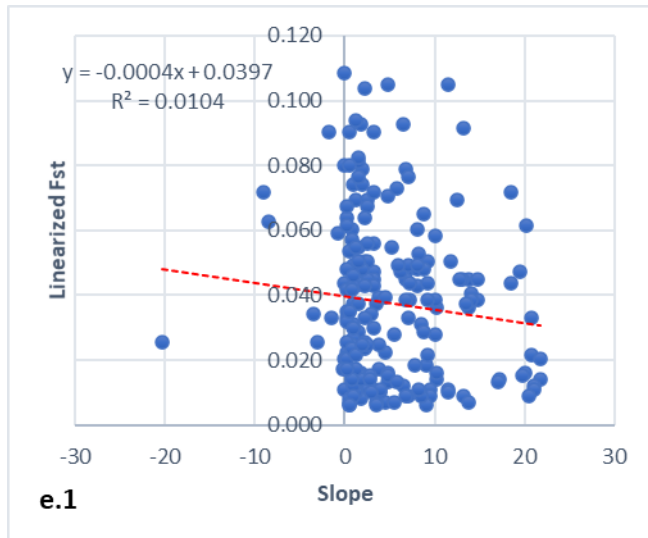


Figura S6: Correlaciones entre  $F_{ST}$  linealizados por pares  $\hat{F}_{ST}$  s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y a) Distancia fluvial (Wwd), b) Número de barreras (BaN), c) Edad de las barreras (BaA), d) Elevación y e) Pendiente, entre las muestras recolectadas de veintiún sitios de muestreo dentro de todo el sistema Biobío. 1) Inicialmente, todos los sitios de muestreo se incluyeron en la correlación y 2) una gráfica de barras de los residuos para cada sitio de muestreo que indica los posibles sitios atípicos.

Figure S6: Correlations between pairwise linearized  $\hat{F}_{ST}$  s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) and a) Waterway distances (Wwd), b) Number of Barriers (BaN), c) Age of Barriers (BaA), d) Elevation and e) Slope, among samples collected from twenty-one sampling sites within the entire Biobío system. 1) Initially all sampling sites were included in the correlation and 2) a barplot of the residuals for each sampling site indicating potential outlier sites.

Tabla S4: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}s$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra del sistema del río Laja. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006). Las exclusiones de sitios se verificaron utilizando el mejor modelo con el AICc más bajo.

Table S4: Results of Mantel tests between linearized pairwise genetic distances  $\hat{F}_{ST}s$  ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) and Waterway distances (Wwd), Number of Barriers (BaN), Age of Barriers (BaA), Elevation and Slope, considering all sample sites of the Laja river system. Potential outlier sites were identified and sequentially removed using a decomposed pairwise regression (Koizumi et al. 2006). Sites exclusions were verified using the best model with the lowest AICc.

LAJA RIVER	Model	Excluded sites	$R^2$	P	AICc
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Wwd	1	None	0.0080	0.3840	-90.77985636
	2	Bio07	0.0180	0.5020	-90.84387165
	3	Bio07, Bio25	0.1850	0.6810	-117.5781737
$\hat{F}_{ST}s$ vs. BaN	1	None	0.0110	0.4470	-90.80270008
	2	Bio07	0.0140	0.4920	-90.80828619
	3	Bio07, Bio25	0.1070	0.6770	-116.7411909
$\hat{F}_{ST}s$ vs. BaA	1	None	0.0345	0.3490	-91.00710126
	2	Bio07	0.0760	0.4990	-91.33064208
	3	Bio07, Bio25	0.2500	0.6710	-118.3100563
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Elevation	1	None	0.0060	0.4570	-90.76087094
	2	Bio25	0.1150	0.1710	-97.70398246
	3	Bio25, Bio22	0.4670	0.3390	-128.7705523
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Slope	1	None	0.1460	0.2330	-92.02572294
	2	Bio07	0.6260	0.0400	-98.57667397
	3	Bio07, Bio25	0.2780	0.3330	-118.6628457

Tabla S5: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), número de barreras (BaN), edad de las barreras (BaA), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestra del sistema fluvial del Biobío. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006).

Table S5: Results of Mantel tests between linearized pairwise genetic distances  $\hat{F}_{ST}$ s ( $\hat{F}_{ST} / (1 - \hat{F}_{ST})$ ) and Waterway distances (Wwd), Number of Barriers (BaN), Age of Barriers (BaA), Elevation and Slope, considering all sample sites of the Biobío river system. Potential outlier sites were identified and sequentially removed using a decomposed pairwise regression (Koizumi et al. 2006).

<b>BIOBIO RIVER</b>	<b>Model</b>	<b>Excluded sites</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>AICc</b>
<b><math>\hat{F}_{ST}</math>s vs. Wwd</b>	1	None	0.7730	0.0001	-88.34819721
	2	Bio15	0.7410	0.0030	-82.71808175
	3	Bio15, Bio21	0.7600	0.0080	-79.86766883
	4	Bio15, Bio21, Bio17	0.8310	0.0450	-84.60950592
	5	Bio15, Bio21, Bio17, Bio6	0.8380	0.3340	-102.0514991
<b><math>\hat{F}_{ST}</math>s vs. BaN</b>	1	None	0.6370	0.0040	-83.72646140
	2	Bio17	0.7700	0.0160	-81.35980706
	3	Bio17, Bio15	0.7270	0.0290	-77.56633582
	4	Bio17, Bio15, Bio21	0.7450	0.1240	-81.30503726
	5	Bio17, Bio15, Bio21, Bio01	0.9630	0.1630	-122.4916711
<b><math>\hat{F}_{ST}</math>s vs. BaA</b>	1	None	0.5450	0.0010	-81.53034272
	2	Bio17	0.6410	0.0170	-77.33414780
	3	Bio17, Bio15	0.5990	0.0180	-74.36933544
	4	Bio17, Bio15, Bio21	0.7030	0.1690	-80.08825290
	5	Bio17, Bio15, Bio21, Bio01	0.6860	0.1670	-103.1921326
<b><math>\hat{F}_{ST}</math>s vs. Elevation</b>	1	None	0.6701	0.0010	-84.67574557
	2	Bio17	0.8709	0.0010	-86.54790259
	3	Bio17, Bio21	0.8662	0.0090	-82.61179332
	4	Bio17, Bio21, Bio02	0.8732	0.0340	-81.32782988
	5	Bio17, Bio21, Bio02, Bio06	0.8067	0.1680	-97.87177964
<b><math>\hat{F}_{ST}</math>s vs. Slope</b>	1	None	0.0125	0.3040	-73.93037854
	2	Bio01	0.0320	0.2930	-73.78648009
	3	Bio01, Bio06	0.0009	0.4600	-71.37995997
	4	Bio01, Bio06, Bio02	0.0159	0.5040	-73.64369273
	5	Bio01, Bio06, Bio02, Bio17	0.9894	0.3310	-125.1142184
<b>Residuals [<math>\hat{F}_{ST}</math>s vs Wwd] vs BaN</b>	1	None	0.0880	0.1150	11.38929464
<b>Residuals [<math>\hat{F}_{ST}</math>s vs BaN] vs Wwd</b>	1	None	0.2209	0.0550	9.842388483

Tabla S6: Resultados de las pruebas de Mantel entre distancias genéticas por pares linealizadas  $\hat{F}_{ST}s$  ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) y distancias fluviales (Wwd), elevación y pendiente, considerando todos los sitios de muestreo del sistema fluvial Renaico-Malleco. Los posibles sitios atípicos se identificaron y eliminaron secuencialmente mediante una regresión por pares descompuesta (Koizumi et al., 2006).

Table S6: Results of Mantel tests between linearized pairwise genetic distances  $\hat{F}_{ST}s$  ( $\hat{F}_{ST}/(1-\hat{F}_{ST})$ ) and Waterway distances (Wwd), Elevation and Slope, considering all sample sites of the Renaico-Malleco river system. Potential outlier sites were identified and sequentially removed using a decomposed pairwise regression (Koizumi et al. 2006).

RENAICO-MALLECO	Model	Excluded sites	$R^2$	P	AICc
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Wwd	1	None	0.0798	0.1170	-108.6135098
	2	Bio10	0.0702	0.1760	-106.0630202
	3	Bio10, Bio26	0.2803	0.0110	-107.2197484
	4	Bio10, Bio26, Bio13	0.1870	0.0400	-102.9238114
	5	Bio10, Bio26, Bio13, Bio18	0.4024	0.0530	-106.0183220
	6	Bio10, Bio26, Bio13, Bio18, Bio11	0.1752	0.1710	-107.1794821
	7	Bio10, Bio26, Bio13, Bio18, Bio11, Bio12	0.8707	0.1610	-136.3986673
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Elevation	1	None	0.2289	0.0001	-110.6595875
	2	Bio26	0.1387	0.0100	-105.2272072
	3	Bio26, Bio13	0.1797	0.0280	-100.5995094
	4	Bio26, Bio13, Bio10	0.1587	0.0700	-102.6160528
	5	Bio26, Bio13, Bio10, Bio11	0.6417	0.0090	-105.1664580
	6	Bio26, Bio13, Bio10, Bio11, Bio14	0.8747	0.0360	-110.1162589
	7	Bio26, Bio13, Bio10, Bio11, Bio14, Bio28	0.9741	0.1780	-138.6139097
$\hat{F}_{ST}s$ vs. Slope	1	None	0.0062	0.3820	-107.7236500
	2	Bio26	0.0053	0.3570	-103.6914510
	3	Bio26, Bio10	0.2674	0.0540	-107.0449185
	4	Bio26, Bio10, Bio13	0.271	0.0820	-103.9048778
	5	Bio26, Bio10, Bio13, Bio11	0.3848	0.1490	-100.6607185
	6	Bio26, Bio10, Bio13, Bio11, Bio27	0.3386	0.2520	-109.1578316
	7	Bio26, Bio10, Bio13, Bio11, Bio27, Bio12	0.2500	0.6630	-138.0490300

Tabla S7: Resultados de los análisis de redundancia basados en la distancia, realizados para comparar las coordenadas principales de la distancia genética con  $\hat{F}_{ST}$ s pareado entre sitios de muestreo de la cuenca del Biobío con variables de paisaje significativas: distancias de vías fluviales (Wwd) y número de barreras (BaN). Wwd y BaN, se calcularon a partir de la selección de varias coordenadas principales (PC) entre los sitios de muestreo. Se informa el número de permutaciones (n), el valor del criterio de Akaike (AICc), los valores F (F), los grados de libertad (DF), los valores P (P) y los valores R<sup>2</sup> ajustados. Valores p significativos (P) \*.

Table S7: Results of distance-based redundancy analyses conducted to compare genetic distance principal coordinates based on pairwise  $\hat{F}_{ST}$ s between sampling sites of Biobío basin with significant landscape variables: Waterway distances (Wwd) and Number of Barriers (BaN). Wwd and BaN, were calculated from selecting a number of principal coordinates (PC) between sampling sites. Number of permutations (n), Akaike criterium value (AICc), F-values (F), degrees of freedom (DF), P-values (P) and adjusted R<sup>2</sup> values are reported. Significant p-values (P)\*.

<b>Variable</b>	<b>n permutation</b>	<b>AICc</b>	<b>F</b>	<b>DF</b>	<b>P</b>	<b>Adj R<sup>2</sup></b>
<b>PC1BaN</b>	999	-58.451	6.0595	1	0.002*	0.20190
<b>PC1Wwd</b>	999	-59.340	2.6548	1	0.002*	0.26584

## REFERENCIAS MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO II

- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Koizumi, I., Yamamoto, S., & Maekawa, K. (2006). Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling Dolly Varden charr. *Molecular Ecology*, 15(11), 3175–3189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03019.x>



## 6. CAPÍTULO III:

### CONNECTIVITY, DIVERSITY, AND HYBRIDIZATION BETWEEN TWO ENDEMIC FISH SPECIES (*Percilia* spp.) IN A COMPLEX TEMPERATE LANDSCAPE

Valenzuela-Aguayo, Francisca<sup>1,2</sup>, McCracken, Gregory R.<sup>2</sup>, Diaz, Gustavo<sup>1</sup>,  
Manosalva, Aliro<sup>1</sup>, Habit, Evelyn<sup>1</sup> & Daniel E. Ruzzante<sup>2</sup>

Publicado en: Conservation Genetics Agosto 2021





# CONNECTIVITY, DIVERSITY, AND HYBRIDIZATION BETWEEN TWO ENDEMIC FISH SPECIES (*Percilia* spp.) IN A COMPLEX TEMPERATE LANDSCAPE

Valenzuela-Aguayo, Francisca<sup>1,2</sup>, McCracken, Gregory R.<sup>2</sup>, Diaz, Gustavo<sup>1</sup>, Manosalva, Aliro<sup>1</sup>, Habit, Evelyn<sup>1</sup> & Daniel E. Ruzzante<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología y Conservación de Peces, Departamento de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Department of Biology, Dalhousie University. Halifax, Nova Scotia, B3H4R2 Canada.

## AUTHORS FOR CORRESPONDENCE

Francisca Valenzuela-Aguayo - email: [fvalenzuela@udec.cl](mailto:fvalenzuela@udec.cl)

<https://orcid.org/0000-0001-6152-8210>

Daniel Ruzzante - email: [daniel.Ruzzante@dal.ca](mailto:daniel.Ruzzante@dal.ca)

<https://orcid.org/0000-0002-8536-8335>

## ABSTRACT

The identification of closely related species with partially overlapping distributions is fundamental for effective conservation. Here we analyzed 28 sequenced microsatellites, mtDNA sequences, and morphological data, to describe the connectivity, genetic relationship, and distribution of *Percilia gillissi* and *Percilia irwini*, two endangered species inhabiting two contiguous watersheds in Chile (Itata and Biobío). We provide

evidence of discordance in the spatial distribution of the two genomes (nuclear and mitochondrial). Three large clusters were identified with microsatellites, with one cluster straddling both watersheds. Three clusters were also evident in mtDNA with one cluster straddling both watersheds and the other two restricted to the Itata watershed's northern reaches. Analyses of both microsatellite and mtDNA identified *P. gillissi* in the Itata watershed northern reaches and *P. irwini* in the Biobío watershed. Fish were detected in the Itata watershed that carried mtDNA characteristic of *P. irwini* but nuclear microsatellite profiles of *P. gillissi* suggesting an incomplete reproductive barrier between the species and connectivity between the watersheds. Additionally, fish were identified in the Itata northern reaches carrying mtDNA haplotypes sufficiently distinct from those of *P. gillissi* and *P. irwini* to suggest the existence of higher mtDNA diversity within *P. gillissi* than previously recognized. Finally, there was limited support for taxonomical classification based on morphological and meristic traits in this region.

## **KEYWORDS**

Connectivity, Hybridization, Conservation, Fish, Molecular markers.

## **DECLARATIONS**

**Funding:** This research was supported by a FONDECYT Grant 1150154 to EH and collaborators and an NSERC Discovery Grant to DER. FVA was supported by Beca CONICYT Nacional Folio 21160882 and a Canada Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD) Emerging Leaders of Americas Program (ELAP) scholarship.

**Conflicts of interest/competing interests:** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

**Availability of data and material:** Data have been deposited in DRYAD and are available for peer review.

[https://datadryad.org/stash/share/QB86ISKvIO8u4E4FTnVP2kc2QO21hWonM6PCB9U9h\\_w](https://datadryad.org/stash/share/QB86ISKvIO8u4E4FTnVP2kc2QO21hWonM6PCB9U9h_w)

**Code availability:** Not applicable.

**Authors' contribution:** This study is part of FVA Doctoral thesis at Universidad de Concepción, Chile under the co-supervision of EH and DER. The study was conceived and designed by EH, DER and FVA. FVA, GD, and AM, EH and DER participated in the fieldwork. GRM developed the microsatellite markers and GRM and FVA generated the molecular data. FVA conducted all population genetics analyses with assistance from DER and GRM. GD conducted the morphometric analysis. FVA wrote the first draft of the MS with assistance from DER and EH.

**Ethics approval:** The sampling was carried out based on the ethics and biosafety rules and procedures specified in Law 18.755 of the Agricultural and Livestock Service of Chile and the Ethics Committee of Universidad de Concepción.

**Consent to participate:** The authors give their consent to participate.

**Consent for publication:** The authors give their consent to publish.

## INTRODUCTION

A fundamental goal in conservation biology is the proper identification of the species of interest, their evolutionary relationships and geographic distributions (Milne et al. 2009; Hendry et al. 2010). Delineating species boundaries is best achieved through the integration of multiple and complementary approaches including phylogeographic, population genetic, and morphological approaches along with information on their ecology and behaviour (Dayrat 2005). An integrative approach to species identity and delineation is even more important when closely related, phenotypically similar species exist with contiguous and perhaps partially overlapping ranges where they may hybridize. Hybridization in the wild plays an important role in species divergence and indeed in speciation (Hewitt 1988; Harrison 1990). Hybrid zones can serve as foci for biodiversity via the introgression and assimilation of heterospecific alleles (Barton and Gale 1993; Martinsen et al. 2001). The identification of hybrid zones is therefore important for the study of speciation and for the conservation and management of biodiversity (Genovart 2009; Chan et al. 2019). When closely related species have overlapping ranges, their identification and the design of conservation measures is best achieved using multiple, complementary genetic and morphometric approaches.

One genetic approach widely used as a tool for species identification is DNA barcoding, which relies on the conserved nature of the mitochondrial gene *COI* (cytochrome oxidase subunit I) (Hebert et al. 2003a). The method has been used to differentiate animal species (e.g., insects (Hebert et al. 2004a, 2016); birds (Hebert et al. 2004b);

fish (Carvalho Gomes et al. 2015); spiders (Barrett and Hebert 2005). Due to the high mitochondrial substitution rate relative to nuclear genes, barcoding allows the discrimination of not only closely related species, but sometimes also of phylogeographic groups within a single species (Cox and Hebert 2001; Hebert et al. 2003a). Based on the empirical fact that the probability of conspecificity is very low in fishes when the divergence between sequences exceeds 2%, 2% was proposed as the cut-off for diagnosing distinct species (Ward 2009).

The genus *Percilia* comprises two species: *P. gillissi* and *P. irwini*, both found west of the Andes in Chile's central region. *Percilia irwini* is described as restricted to the Biobío River watershed (~ 37 ° S). In contrast, *Percilia gillissi* is described as being distributed both north and south of this watershed from the Aconcagua River in the north (~32 °S) to Llanquihue Lake in the south (~41°S) (Dyer 2000). Both species inhabit shallow water areas with rocky substrates in rivers; both are small (70-90 mm total length) and generally difficult to distinguish from each other, particularly in their juvenile stages (Arratia 1982; Dyer 2000). Both are considered endangered in Chile. Patterns of genetic variability and their geographic distribution remain poorly understood. *Percilia irwini* from the Biobío River are more closely related to *P. gillissi* inhabiting systems to the south than to *P. gillissi* inhabiting systems to the north (Ruzzante et al. 2006), suggesting differentiation between *P. gillissi* populations north and south of the Biobío watershed. This in turn suggests a greater taxonomic complexity within this genus than currently recognized.

Here we used 28 sequenced nuclear microsatellite DNA markers along with mitochondrial DNA sequences (COI), coupled with morphological analyses to quantify (a) connectivity within species, (b) the genetic relationship between *P. irwini* and *P. gillissi* in two adjacent river systems, the Itata and Biobío systems in south central Chile. Using microsatellite and mitochondrial DNA information along with morphological analyses, we describe a secondary hybrid zone straddling the Itata and Biobío watersheds. Last, we discuss the historical and contemporary biogeographic processes that likely influenced this distribution pattern and the conservation relevance of our findings.

## **MATERIAL AND METHODS**



### **a) The study area**

The study area includes the Itata and Biobío watersheds in Chile (Fig. 1). The Itata watershed comprises three rivers, from north to south: Ñuble, Diguillín and Itata. The Biobío watershed comprises four rivers, from north to south: Laja, Biobío, Renaico and Malleco. The Itata watershed has a natural barrier (the waterfall Salto del Itata, 20-25 m elevation, (Dirección General de Aguas 2004b) and is affected by large irrigation projects (Habit et al. 1998) that potentially increase physical connectivity in the system. Also, in the Biobío watershed, the Laja and Biobío Rivers harbor four storage hydroelectric plants, and seven run-of-river or diversion plants (operating without water storage, using the flow within a river channel). No plant has fish passage mitigation

measures (e.g., fish ladders, ramps) to enable river connectivity. The Biobío watershed also exhibits a natural waterfall, Salto del Laja (Fig. 1).

### **b) Sampling design and DNA extraction**

Fish were captured with seine nets or by electrofishing between 2016 and 2017 from 14 and 21 sites in the Itata and Biobío watersheds ( $N=1602$ ). Fin clip tissue samples were taken and stored in 96% ethanol until subsequent DNA analysis. Samples from Valenzuela-Aguayo et al. (2019) from the Biobío watershed were also used (See Table S1). The database used in the present study adds 675 individuals from 14 sites in the Itata River basin, expanding the data base to 1602 individuals.

Fin clip tissue subsamples were digested at 55 °C for approximately 8 h using Proteinase K (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada). DNA was then extracted using a Multiprobe II plus liquid handling system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using a glassmilk protocol modified from Elphinstone et al. (2003).

### **c) Microsatellite sequencing and scoring**

We characterized 33 microsatellite markers developed previously (Yu et al. 2018, 2020). Microsatellites were sequenced and scored with MEGASAT (Zhan et al. 2017), verified by eye and subsequently subject to tests for null alleles and departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (See Valenzuela-Aguayo et al. 2019). We excluded 5 microsatellite markers exhibiting null alleles or departures from Hardy-Weinberg (see Yu et al. 2018). The final panel consisted of 28 microsatellite markers.

#### **d) Genetic diversity and population structure using microsatellites.**

Allele frequencies and allelic richness ( $A_R$ ) were estimated for each sampling location using FSTAT 2.9.4 (Goudet 2001). Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities were assessed with GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse 2006), which was also used to estimate differentiation among sampling locations based on  $F_{ST}$  statistics and a Principal Coordinates Analysis (PCoA) of pairwise  $F_{ST}$  estimates (Peakall and Smouse 2006).

We examined the most likely number of clusters ( $K=1$  to  $K=35$ ) by using STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) and the Evanno method (Evanno et al. 2005) as implemented in STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl and vonHoldt 2012b). Each independent STRUCTURE analysis was conducted using 5 replicate runs, where each run consisted of 2 000 000 iterations with an initial burn-in of 200 000. The 5 replicates were combined using the program CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) for the most likely value of  $K$ . We used DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004) to visualize the consensus cluster assignment. No location prior information was considered.

#### **e) Mitochondrial DNA sequencing**

Four to ten individuals per site were randomly chosen for mtDNA analysis for a total of 290 individuals. From each individual, an approximately 690bp fragment of the mitochondrial COI gene was amplified via polymerase chain reaction using the “universal primers” LCO1490 and HC02198 (Folmer et al. 1994). COI sequences were



used to describe phylogenetic relationships as well as a barcode for species identification using the 2% divergence threshold (Ward 2009). Further technical details are available in the ESM. There are potential problems with barcoding that can lead to erroneous species identification (Folmer et al. 1994; Taylor and Harris 2012); however, for the purpose of this work we used *COI* together with microsatellite data to visualize the genetic relationship between *P. irwini* and *P. gillissi*.

#### **f) Phylogenetic reconstruction with Mitochondrial DNA**

Mitochondrial DNA sequences were trimmed and aligned using MUSCLE alignment and default parameters in GENEIOUS prime (2019.1.1, Auckland, NZ, <https://www.geneious.com>). We estimated number of Polymorphic sites (S), number of haplotypes, haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (Pi), average number of nucleotide differences (k) using DnaSP5.10 (Librado and Rozas 2009). A haplotype network based on redundant haplotypes was created using the trimmed sequences (583 bp), in Network 5.0.1.1. (Fluxus Technology Ltd. 1999-2019) and Median-joining network (Bandelt et al. 1999) with an Epsilon value of 0.

The phylogenetic tree for *Percilia* spp. was built using a representative sequence for each unique haplotype. The sequences were aligned with the reference haplotype set using a MUSCLE alignment in GENEIOUS prime 2019.1.1. The tree was inferred using Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001) plugin developed by Marc Suchard and the Geneious team (<https://www.geneious.com/plugins/mrbayes-plugin/>). We employed HKY85 model of

sequence evolution, selected by jModelTest 2.1.10 (Guindon and Gascuel 2003; Darriba et al. 2012) (Table S3), four simultaneous Monte Carlo Markov Chains with 1 100 000 generations and sampled every 200 generations. The first 110 000 points were discarded as burn-in. Chain convergence was confirmed visually when posterior probability distribution reached stationarity, and the support for the tree was assessed using the Bayesian posterior probabilities. *Percichthys trucha*, *Nannoperca vittata* and *Gadopsis marmoratus* were used as outgroup. The consensus tree was generated using FigTree v 1.4.4 (Rambaut 2006).

#### **g) Hybrid detection**

To estimate the posterior probability of belonging to a pure or hybrid category (e.g., Pure, F1, F2, or back-crossed classes) we used NEWHYBRIDS (Anderson and Thompson 2002). This method allows the identification of hybrids using multiple, unlinked markers and does not require allele frequencies in the parental species to be known nor that separate, pure samples of the parental species be available. The program was run, five times separately, using 28 microsatellites loci and the default parameters over 50 000 burn-in and 500 000 sweeps after burn-in. To avoid mixing problems in which the chain gets stuck in local maxima in parameter space, the Monte Carlo Markov chains (MCMC) were checked in every run. NEWHYBRIDS user guide suggestions were followed throughout. A threshold value of  $pp \geq 0.8$  was used to consider an individual as belonging to a given category.

#### **h) *Percilia* spp. genetic with morphological comparisons**

To corroborate species identity, we first performed the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in GENEIOUS prime 2019.1.1 (<https://www.geneious.com>) between haplotypes and within and between haplogroups, using each haplotype's sequence versus the sequence of the haplogroup's most frequent haplotype. Using BLAST we compared each haplotype's sequence to the *P. irwini* mtDNA COI sequence in Lavoué et al. 2014 (GenBank accession no. AP014528.1) as well as the *P. irwini* and *P. gillissi* in Arratia and Quezada-Romegialli 2019 (GenBank accession no. MK239312.1 and MK239310.1 respectively).

Morphological visual classification was performed on 134 individuals from both watersheds. Individuals were assigned to species using 8 morphological traits described as diagnostic for species identification by Arratia (1982) and Ruiz and Marchant (2004) (Table S1). Species identity was assigned using 6 external and 2 internal traits (See Table S1). The traits were considered present or absent. If the individual had at least five of the eight traits corresponding to a species, it was classified as a member of that species (i.e., *P. gillissi* or *P. irwini*). The morphological classification was then compared to the genetic classification (See ESM).

## **RESULTS**

#### **a) Microsatellite quality control**

A total of 1602 individuals were sequenced and genotyped at 28 microsatellites. One marker (Per 50) exhibited signs of null alleles and departures from Hardy-Weinberg in

19 sampling sites; analyses were performed both with and without this locus and results did not change. The remaining 27 loci exhibited no evidence of null alleles at significant frequencies. They also exhibited no LD in any site and no evidence of large allele dropout or scoring errors (see Valenzuela-Aguayo et al. 2019). All subsequent analyses were conducted with 28 microsatellite loci and 1602 individuals. Sample size per location as well as estimates of  $A_R$ ,  $H_o$  and  $H_e$  are shown in Table S2. Allelic richness ranged from 4.46 to 7.06. Average heterozygosities over loci were  $H_e = 0.658$  and  $H_o = 0.621$  (Table S2). Pairwise  $F_{ST}$  varied between 0.005-0.169 (Fig. S1).

#### **b) Population structure (microsatellites)**

Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the microsatellite markers demonstrated three main clusters of genetic differentiation (Fig. 2A). The most likely number of clusters using STRUCTURE was also  $K=3$  (Fig. 2B). From north to south, the first cluster includes individuals collected from the Ñuble, Chillán and downstream sites of the Itata River in the Itata watershed (magenta, Fig. 2C). A second cluster groups individuals from the upstream sites of the Ñuble and Itata rivers and the Diguillín river in the Itata watershed, along with the Laja River in the Biobío watershed. This cluster thus encompasses individuals from both watersheds (turquoise, Fig. 2C). The third cluster comprises individuals from the Biobío, Renaico and Malleco rivers in the Biobío watershed (blue, Fig. 2C).

### **c) COI Phylogeny and Haplotype distribution**

The edited COI alignment comprised 583 bp. Excluding the outgroup, there were 62 polymorphic sites and 41 haplotypes with overall haplotype diversity  $H_d = 0.825$  and nucleotide diversity  $P_i = 0.01073$  (Table S3). Substitution model details can be found in the ESM. The 41 mtDNA haplotypes are organized into 3 haplogroups in the haplotype network (green, red, and yellow, Fig. 2D). The phylogeny revealed three genetic clades supported by posterior probability values  $> 0.74$  (green, red, and yellow, Fig. 2E). Individuals carrying mtDNA haplotypes in the yellow clade are found in sympatry with individuals carrying haplotypes in the green haplogroup (found in Ñuble, Chillán, Diguillín and lower Itata rivers in Itata watershed) and with individuals in the red haplogroup. The red haplogroup is the only group found in both watersheds and is also the only in the Biobío watershed (Fig. 2F).

### **d) BLAST (mtDNA) and NEWHYBRIDS (microsatellite DNA) analyses and comparison of mtDNA with nuclear (microsatellite) structure**

We performed a BLAST comparing the most common haplotype within each of the three haplogroups to the other haplotypes within and outside their haplogroups (Fig. 3A and B). Haplotypes in the green and yellow haplogroups differed from each other by  $>3\%$  and from the red haplogroup by  $> 2.7\%$  and  $> 3\%$ , respectively (Fig. 3A). We also performed BLAST searches using *P. irwini* and *P. gillissi* mtDNA COI as reference sequences (Fig. 3B). All 28 haplotypes in the red haplogroup in Fig. 3B exhibited  $> 98.5\%$  pairwise identity with the reference sequence for *P. irwini*. The sequences of the remaining 13 haplotypes, all of them in the yellow and green haplogroups, differed from

the *P. irwini* sequences by > 2.3%. Mitochondrial DNA haplotypes in the yellow haplogroup were the most similar to the *P. gillissi* haplotypes, with two haplotypes (Hap\_39 and Hap\_40) exhibiting 98.3% pairwise identity.

The NEWHYBRIDS analysis assigned 434, 685 and 139 individuals to Pure 0 (putatively *P. gillissi*), Pure 1 (putatively *P. irwini*) and F2 categories, respectively with posterior probabilities  $pp > 0.80$  (Fig. 3C). Geographically, samples classified as Pure 0 were from the northern Itata basin (Ñuble, Diguillín, Chillán and Itata downstream of Laja waterfall). Those classified as Pure 1 were from the Biobío watershed (specifically from Biobío, Renaico and Malleco rivers). The individuals classified as F2 were from the Itata and Biobío watersheds. No evidence of F1 hybrids was detected.

We then compared the distribution of the three microsatellite clusters with that of the three mtDNA haplogroups (Fig. 3D) and interpreted these results considering the results of the BLAST and NEWHYBRIDS analyses above. Most of the *Percilia* spp. individuals in the Biobío watershed (blue microsatellite cluster) exhibited mtDNA haplotypes of the red haplogroup, and BLAST indicates all 28 haplotypes in this group exhibit > 98.5% pairwise identity with the reference sequence for *P. irwini* (Fig. 3B). Consistent with these results NEWHYBRIDS identifies all individuals in the blue microsatellite cluster as pure *P. irwini* individuals (Figs. 3B and 3D). Thus, *Percilia* spp. in the Biobío watershed carrying mtDNA haplotypes of the red haplogroup and nuclear multilocus genotypes of the blue group (Figs. 3B and 3D) are clearly *P. irwini*. Haplotypes classified as belonging to the red haplogroup are also present in individuals within the microsatellite

'turquoise' group, which were identified by NEWHYBRIDS as *P. gillisi* or backcrosses. Such individuals appear thus to be hybrids exhibiting *P. irwini* maternal ancestry. Most of the individuals in the magenta group, present only in the northernmost region of the Itata watershed (Ñuble, Chillán and downstream sites of the Itata River, Fig. 2C), carry haplotypes in the yellow haplogroup (Fig. 3D), which BLAST identifies as most similar to *P. gillisi* (Fig. 3B). Clearly, individuals in the northern reaches of the Itata watershed carrying haplotypes of the yellow haplogroup and microsatellite genotypes of the magenta group are thus, *P. gillisi*. Further, most of the individuals in the green mtDNA haplogroup (present only in Itata watershed) were assigned to the turquoise microsatellite group and were also identified as *P. gillisi* by NEWHYBRIDS (Fig. 3D) but exhibited >3% difference from either species in their haplotype composition (BLAST, Fig. 3B).



#### **e) Genetic and morphology species classification**

Out of 134 individuals for which we had microsatellite DNA, mtDNA sequence and morphological data, 97 and 37 originated from the Itata and Biobío watersheds, respectively (Fig. 3D). Using just mtDNA 92 individuals were classified as *P. irwini* (red haplogroup from Biobío and Itata watersheds) and 22 individuals were classified as *P. gillisi* (all of them from Itata watershed and yellow haplogroup). A further 20 individuals corresponded to the green haplogroup, which exhibited >3% difference from either species. Using just morphology, 54 individuals were classified as *P. irwini*, 40 as *P. gillisi* and 40 could not be classified as they had the same number of traits for both species (Fig. 3D). There was, however, low correspondence between the morphological

and either the microsatellite or the mtDNA derived genetic classification. Only 39 and 7 individuals were classified as *P. irwini* and *P. gillissi* respectively, based on both morphology and mtDNA (Fig. 3D).

## DISCUSSION

The literature recognizes two species of *Percilia* (*P. gillissi* and *P. irwini*), with *P. gillissi* distributed from the Aconcagua river in the north (Lat ~32°S) to Llanquihue Lake in the south (Lat 41°S), and *P. irwini* endemic exclusively to the Biobío system (Lat ~37°S) (Arratia and Quezada-Romegialli 2019). In this study, we use nuclear microsatellite and mitochondrial DNA sequence information along with morphological data to show that the diversity within *Percilia* spp. is vastly more complex than currently recognized. Below we discuss these results and their broader implications in detail.

### a) Description of the clustering pattern

Our results revealed three genetic groups using microsatellites with one cluster encompassing individuals from both the Itata and Biobío systems (cluster 2 in turquoise: from Diguillín, Itata and Laja rivers). The mtDNA data were consistent with the microsatellite clusters, with three haplogroups but with a slight biogeographical discordance. The yellow and green haplogroups were found exclusively in the northern section of the Itata watershed; and the red haplogroup was found in both watersheds. This discrepancy between the distribution of microsatellite cluster 2 and the red haplogroup might result from the patterns of inheritance of each marker. Given its



haploid and uniparental inheritance, mtDNA has a fourfold smaller effective population size than nuclear DNA. Full lineage sorting where ancestral polymorphisms are lost over time can therefore be achieved much faster in mtDNA than in nuclear DNA as this rate is inversely proportional to the effective population size (Funk and Omland 2003; Toews and Brelsford 2012).

### **b) Historical and current connectivity between the two watersheds**

While individuals classified as *P. irwini* using both microsatellite and mtDNA information are found throughout the Biobío watershed, those classified using mtDNA and microsatellite genotypes as *P. gillissi*, are found only in the northernmost reaches of the Itata watershed and not in the entire watershed. The existence of microsatellite and mtDNA groups that straddle the two watersheds suggests some degree of connectivity between the Itata and Biobío systems. Individuals carrying mtDNA haplotypes in the red group (*P. irwini*), and microsatellite genotypes in the turquoise group (*P. irwini* and/or *P. gillissi*) are present in both watersheds. We suspect that the spatial distribution of these presumed hybrids straddling both watersheds has likely resulted from two non-exclusive mechanisms: (a) *High discharge and increased connectivity during Pleistocene glacial melting and volcanic episodes.* The geological history of this area is poorly known. Stratigraphic analysis of the middle and upper reaches of the Laja river valley suggest the area was first carved out by glaciations and subsequently modified by post-glacial volcanic and fluvial processes during the early Holocene (Thiele et al. 1998). These processes gave rise to the damming and subsequent overflow of Laja Lake, promoting, the distribution of *Percilia* spp. between watersheds through river routes that do not

exist today. There is evidence from other studies on how these climatic events effected diversity of the freshwater biota throughout Patagonia (Ruzzante et al. 2008, 2011, 2020; Zemlak et al. 2011; Carrea et al. 2012; Vera-Escalona et al. 2015) and elsewhere in the Neotropics (e.g., Barreto et al. 2020). More detailed studies by glaciomorphologists may be needed for a better understanding of the historic connectivity in this area. (b) *Dispersal of Percilia spp. individuals through canals built for irrigation.* The Itata and Biobío watersheds are separated by ~2.3 km at the closest point between the Itata and the Laja rivers. These two rivers are artificially connected by two large irrigation canals that transfer water from the Laja into the Itata River. The oldest is the Zañartu channel opened in 1928. The Laja-Diguillín canal transfers water from the Laja into the Itata River since 1991. The stream-like conditions of these irrigation canals allow the founding of fish communities that include *Percilia* spp. populations (Habit and Parra 2001). Fish and macroinvertebrate communities persist year round within the canals even under no irrigation conditions (autumn-winter) (Habit et al. 1998). However, the opening of irrigation canals intakes during spring creates strong currents triggering fish entrance by drift (Habit and Parra 2001). Both passive and active movements may facilitate the dispersal of *Percilia* spp. between watersheds as has been suggested for the catfish *Diplomystes incognitus* in two other watersheds in Chile (Muñoz-Ramírez et al. 2016). The canals built for irrigation can explain the connectivity between the Laja river (Biobío system) and the Itata and Diguillín rivers in the Itata system, but these canals cannot easily explain the observed connectivity between the Laja and Ñuble or Diguillín and Ñuble rivers. Historical connectivity in these last two cases is likely a better explanation.

### c) Complex diversity patterns

The existence of a group of *Percilia* spp. carrying mtDNA haplotypes with high similarity to published *P. irwini* COI sequence but exhibiting microsatellite genotypes (turquoise) which a NEWHYBRIDS classifies as being pure *P. gillissi* (present in both watersheds but specifically restricted to the Laja river in Biobío watershed), suggests the existence of a hybrid zone. The origin of the hybridization can be primary or secondary (Hewitt 1988). The scarcity of historical connectivity records for the region suggests this is a secondary hybrid zone (Barton and Hewitt 1985; Hewitt 1988) formed between formerly allopatric populations that have come into secondary contact. Hybridization can also occur, however, when one species expands onto the distribution area of the other, a process facilitated by similarity in the habitat used for feeding and spawning in the absence of reproductive barriers (Hata et al. 2019). This may be the case for the *P. irwini* and *P. gillissi* populations in our study given the current haplogroup distribution which shows the red haplogroup expanding from the Biobío to the Itata watershed, likely promoted by irrigation canals and/or the historical process that affected the area. The absence of F1 hybrids and early generation backcrosses with a prevalence of F2 hybrids suggests that hybridization is rare. Similar results in a study describing hybrid zones in another freshwater environment have been interpreted as reflecting diminished hybridization due the hybrid lineage becoming reproductively independent from the parental lineages (Barreto et al. 2020). The existence of individuals within the green mtDNA haplogroup, found exclusively in the northernmost region of the Itata watershed and diagnosed as *P. gillissi* on the basis of their microsatellite data, suggests that there

is more intraspecific complexity in haplotype diversity within *P. gillissi* than is currently recognized or the existence of a still undescribed form of *Percilia* sp. in this region.

#### **d) Limited concordance between genetic and morphological classification**

The limited concordance in species assignment between the genetic and morphological classification suggest species assignment of *Percilia* spp. inhabiting the Biobío and Itata watersheds based only on morphological characters is of limited value. Only 29% of the individuals were consistently assigned to the same species, either *P. irwini* or *P. gillissi*, using both, morphology, and genetics. *Percilia gillissi* and *P. irwini* have been described as species difficult to distinguish as juveniles (Arratia 1982). They are similar in size (~80 mm), body shapes, head profile and infraorbital bones, which make their differentiation difficult (Arratia and Quezada-Romegialli 2019). Genetic markers including COI (DNA barcoding, Hebert et al. 2003a, b) are generally used for the identification of animal species based on DNA (Wilson 1995; Vanhaecke et al. 2012; Coissac et al. 2016; Raja et al. 2017; Porter and Hajibabaei 2018). This approach is even more successful when used in conjunction with more than one marker (nuclear and mitochondrial, Toews and Brelsford 2012) as we have done in the present study. However more intense sampling both within and outside these two watersheds along with the inclusion of other internal morphological traits are needed to clarify this discordant morphological and genetic classification.

### **e) Implications for conservation**

Our study revealed that individuals classified as *P. irwini* using microsatellite and mtDNA data are found throughout the Biobío basin while those classified as *P. gillissi* are found only in the northernmost reaches of the Itata basin. *Percilia gillissi* is thus not present throughout the entire Itata watershed as was hitherto assumed, but is instead, restricted to the northernmost reaches of the watershed. The study also revealed an intraspecific complexity in haplotype diversity within *P. gillissi* suggesting the existence of a yet undescribed form of *Percilia* sp. in this region, indicating that a proper identification and delineation of the distribution ranges for these species is sorely needed for the design of conservation initiatives. The remaining individuals exhibiting some degree of hybridization (F2 or backcrosses of *P. gillissi* x F1) and found in both basins suggests an incomplete reproductive barrier between *Percilia gillissi* and *Percilia irwini*, with *P. irwini* as the maternal ancestor. Hybridization is a process frequently observed in anthropogenically disturbed environments therefore, conservation policies must be designed to reduce natural hybridization facilitated by humans (Seehausen et al. 2008; Mimura et al. 2017). We expect our study to assist in future efforts to identify cryptic variation and clarify the taxonomic relationships within the *Percilia* taxon. Finally, the identification of *Percilia irwini* and *Percilia gillissi* based solely on morphology is challenging due to the number of overlapping morphological characters used for species identification. In recent years, species delineation based on morphology has been supplemented with DNA sequence data, and species identification through DNA analysis is increasingly used for conservation management and for monitoring occurrence of endangered species in nature and wildlife management areas.

Collaborative efforts involving taxonomists and geneticists are required to improve our understanding of the distribution and diversity within this group.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank three anonymous reviewers for their insightful comments that improved the clarity and quality of this manuscript. FVA thanks Sarah Salisbury and Ivan Vera-Escalona in the Ruzzante lab for feedback and comments on earlier versions of the manuscript. The research was supported by a FONDECYT Grant 1150154 to EH and collaborators and an NSERC Discovery Grant to DER. FV-A was supported by Beca CONICYT Nacional Folio 21160882 and a Canada Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD) Emerging Leaders of Americas Program (ELAP) scholarship.



## REFERENCES

- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217–1229. [https://doi.org/10.1175/1520-0442\(1992\)0052.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(1992)0052.0.CO;2)
- Arratia G (1982) A Review of Freshwater Percoids from South America (Pisces, Osteichthyes, Perciformes, Percichthyidae, and Peciliidae). *Abh senckenb naturforsch Ges* 15:1–52
- Arratia G, Quezada-Romegialli C (2019) The South American and Australian percichthyids and peciliids. What is new about them? *Neotrop Ichthyol* 17:. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180102>
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific

phylogenies. Mol Biol Evol 16:37–48.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

- Barreto SB, Knowles LL, Affonso PRA de M, Batalha-Filho H (2020) Riverscape properties contribute to the origin and structure of a hybrid zone in a Neotropical freshwater fish. *J Evol Biol* 33:1530–1542. <https://doi.org/10.1111/jeb.13689>
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool* 83:481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- Barton NH, Gale KS (1993) Genetic Analysis of Hybrid Zones. In: Harrison RG (ed) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Inc., New York, p 364
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* 16:113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
- Carrea C, Barriga JP, Cussac VE, Ruzzante DE (2012) Genetic and phenotypic differentiation among *Galaxias maculatus* populations in a Patagonian postglacial lake system. *Biol J Linn Soc* 107:368–382. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01939.x>
- Carvalho Gomes L, Pessali TC, Sales NG, et al (2015) Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica* 143:581–588. <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9856-z>
- Chan WY, Hoffmann AA, van Oppen MJH (2019) Hybridization as a conservation management tool. *Conserv Lett* 12:1–11. <https://doi.org/10.1111/conl.12652>
- Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, Taberlet P (2016) From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Mol Ecol* 25:1423–1428. <https://doi.org/10.1111/mec.13549>
- Cox AJ, Hebert PDN (2001) Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol Ecol* 10:371–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01188.x>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85:407–415.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>

- Dirección General de Aguas (2004) Diagnostico y Clasificación de los cursos y cuerpos de agua segun objetivos de calidad: Cuenca del río Itata. Gob Chile, Minist obras públicas y Dir obras Hidráulicas 1–127
- Dyer B (2000) Systematic Review and Biogeography of the Freshwater Fishes of Chile Revision Sistematicay Biogeografica De Los Peces Dulceacuicolas De Chile. *Estud Ocean* 19:77–98. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Elphinstone MS, Hinten GN, Anderson MJ, Nock CJ (2003) An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Mol Ecol Notes* 3:317–320. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00397.x>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299. <https://doi.org/10.1071/ZO9660275>
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Genovart M (2009) Natural hybridization and conservation. *Biodivers Conserv* 18:1435–1439. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9550-x>
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet J. (1995) FSTAT Version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485–486
- Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52:696–704.



<https://doi.org/10.1080/10635150390235520>

- Habit E, Bertrán C, Arévalo S, Victoriano P (1998) Benthonic fauna of the Itata river and irrigation canals (Chile). *Irrig Sci* 18:91–99. <https://doi.org/10.1007/s002710050049>
- Habit E, Parra O (2001) Impacto ambiental de los canales de riego sobre la fauna de peces. *Ambient y Desarro* XVII:50–58
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surv Evol Biol* 7:69–128
- Hata H, Uemura Y, Ouchi K, Matsuba H (2019) Hybridization between an endangered freshwater fish and an introduced congeneric species and consequent genetic introgression. *PLoS One* 14:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212452>
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, et al (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 270 (Suppl:S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Zakharov E V., et al (2016) Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 371:.. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0333>
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2:.. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hendry AP, Lohmann LG, Conti E, et al (2010) Evolutionary biology in biodiversity science, conservation, and policy: A call to action. *Evolution (N Y)* 64:1517–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00947.x>
- Hewitt GM (1988) Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol Evol* 3:158–167. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90033-X)
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Yang and Rannala

- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Lavoué S, Nakayama K, Jerry DR, et al (2014) Mitogenomic phylogeny of the Percichthyidae and Centrarchiformes (Percomorphaceae): Comparison with recent nuclear gene-based studies and simultaneous analysis. *Gene* 549:46–57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.033>
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution (N Y)* 55:1325–1335. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00655.x>
- Milne DJ, Jackling FC, Sidhu M, Appleton BR (2009) Shedding new light on old species identifications: Morphological and genetic evidence suggest a need for conservation status review of the critically endangered bat, *Saccolaimus saccolaimus*. *Wildl Res* 36:496–508. <https://doi.org/10.1071/WR08165>
- Mimura M, Yahara T, Faith DP, et al (2017) Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evol Appl* 10:121–139. <https://doi.org/10.1111/eva.12436>
- Muñoz-Ramírez CP, Habit E, Unmack PJ, et al (2016) Low genetic diversity in *Diplomystes camposensis*, an endemic and endangered catfish from South Chile. *Zool Stud* 55:1–14. <https://doi.org/10.6620/ZS.2016.55-16>
- Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Porter TM, Hajibabaei M (2018) Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Mol Ecol* 27:313–338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using

- Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* 80:756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rambaut A (2006) FigTree: tree figure drawing tool version 1.4.4.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Ruiz VH, Marchant M (2004) Ictiofauna de aguas continentales Chilenas. Universidad de Concepción, Chile, Concepción
- Ruzzante DE, Simons AP, McCracken GR, et al (2020) Multiple drainage reversal episodes and glacial refugia in a Patagonian fish revealed by sequenced microsatellites: Drainage reversals revealed by genomics. *Proc R Soc B Biol Sci* 287:1–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0468>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Cussac VE, et al (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Mol Ecol* 15:2949–2968. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03010.x>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, et al (2008) Climate control on ancestral population dynamics: Insight from Patagonian fish phylogeography. *Mol Ecol* 17:2234–2244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03738.x>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Macchi PJ, et al (2011) Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: The roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biol J Linn Soc* 103:514–529. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01682.x>
- Seehausen O, Takimoto G, Roy D, Jokela J (2008) Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Mol Ecol* 17:30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03529.x>
- Taylor HR, Harris WE (2012) An emergent science on the brink of irrelevance: A review of the past 8 years of DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 12:377–388. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03119.x>
- Thiele R, Moreno H, Elgueta S, et al (1998) Evolución geológico-geomorfológica

- cuaternaria del tramo superior del valle del río Laja. *Rev geológica Chile* 25:229–253. <https://doi.org/10.4067/S0716-02081998000200007>
- Toews DPL, Brelford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol Ecol* 21:3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
- Valenzuela-Aguayo F, McCracken GR, Manosalva A, et al (2019) Human-induced habitat fragmentation effects on connectivity, diversity, and population persistence of an endemic fish, *Percilia irwini*, in the Biobío River basin (Chile). *Evol Appl* 13:1–14. <https://doi.org/10.1111/eva.12901>
- Vanhaecke D, de Leaniz CG, Gajardo G, et al (2012) DNA barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered galaxiid fishes. *PLoS One* 7:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032939>
- Vera-Escalona I, Habit E, Ruzzante DE (2015) Echoes of a distant time: Effects of historical processes on contemporary genetic patterns in *Galaxias platei* in Patagonia. *Mol Ecol* 24:4112–4128. <https://doi.org/10.1111/mec.13303>
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol Ecol Resour* 9:1077–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x>
- Wilson KH (1995) Molecular Biology as a Tool for Taxonomy. *Clin Infect Dis* 20:S117–S121. [https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement\\_2.S117](https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement_2.S117)
- Yu D, Ding X, Zhang Z, et al (2018) Microsatellite records for volume 10, issue 2. *Conserv Genet Resour* 10:269–276. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1046-8>
- Yu D, Ding X, Zhang Z, et al (2020) Correction to: Microsatellite records for volume 10, issue 2 (*Conservation Genetics Resources*, (2018), 10, 2, (269-276), [10.1007/s12686-018-1046-8](https://doi.org/10.1007/s12686-018-1046-8)). *Conserv. Genet. Resour.* 12:155–156
- Zemlak TS, Walde SJ, Habit EM, Ruzzante DE (2011) Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: The influence of glacial cycling. *Mol Ecol* 20:5280–5294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05352.x>
- Zhan L, Paterson IG, Fraser BA, et al (2017) megasat: automated inference of microsatellite genotypes from sequence data. *Mol Ecol Resour* 17:247–256. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12561>

### FIGURAS CAPÍTULO III

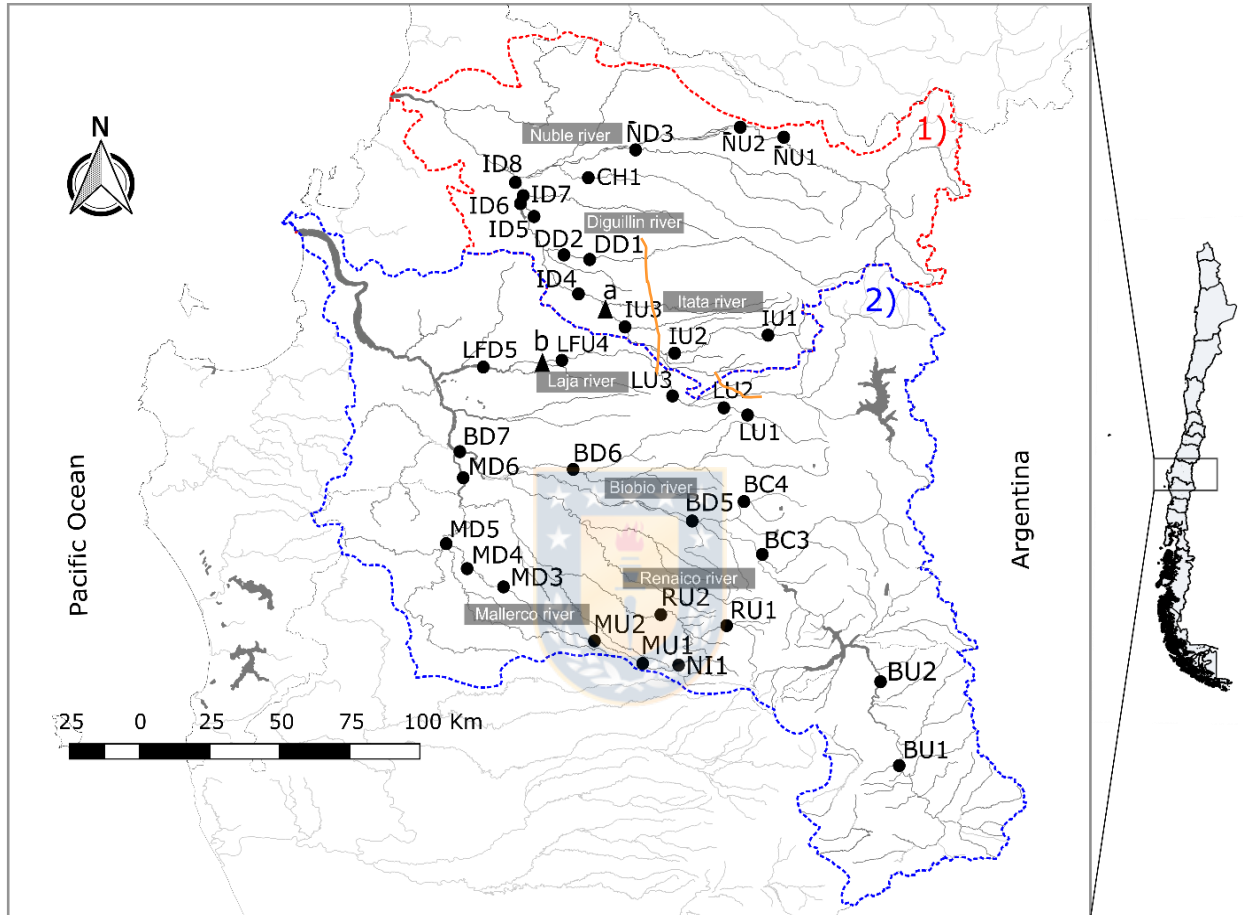


Figura 1: Cuencas hidrográficas de Itata (1) y Biobío (2) en el centro de Chile. Línea punteada roja: Cuenca del Itata. Línea punteada azul: Cuenca del Biobío. Círculos negros: sitios de muestreo. Triángulos: (a) Salto del Itata y (b) Salto del Laja. Muestra de etiquetas de ubicación como en la Tabla S1. Líneas naranjas representan canales de regadío entre Biobío e Itata.

Figure 1: Itata (1) and Biobío (2) watersheds in central Chile. Red dotted line: Itata watershed. Blue dotted line: Biobío watershed. Black circles: sample sites. Triangles: (a) Salto del Itata and (b) Salto del Laja natural waterfalls. Sample location labels as in TableS1. Orange lines represent irrigation channels between Biobío and Itata.



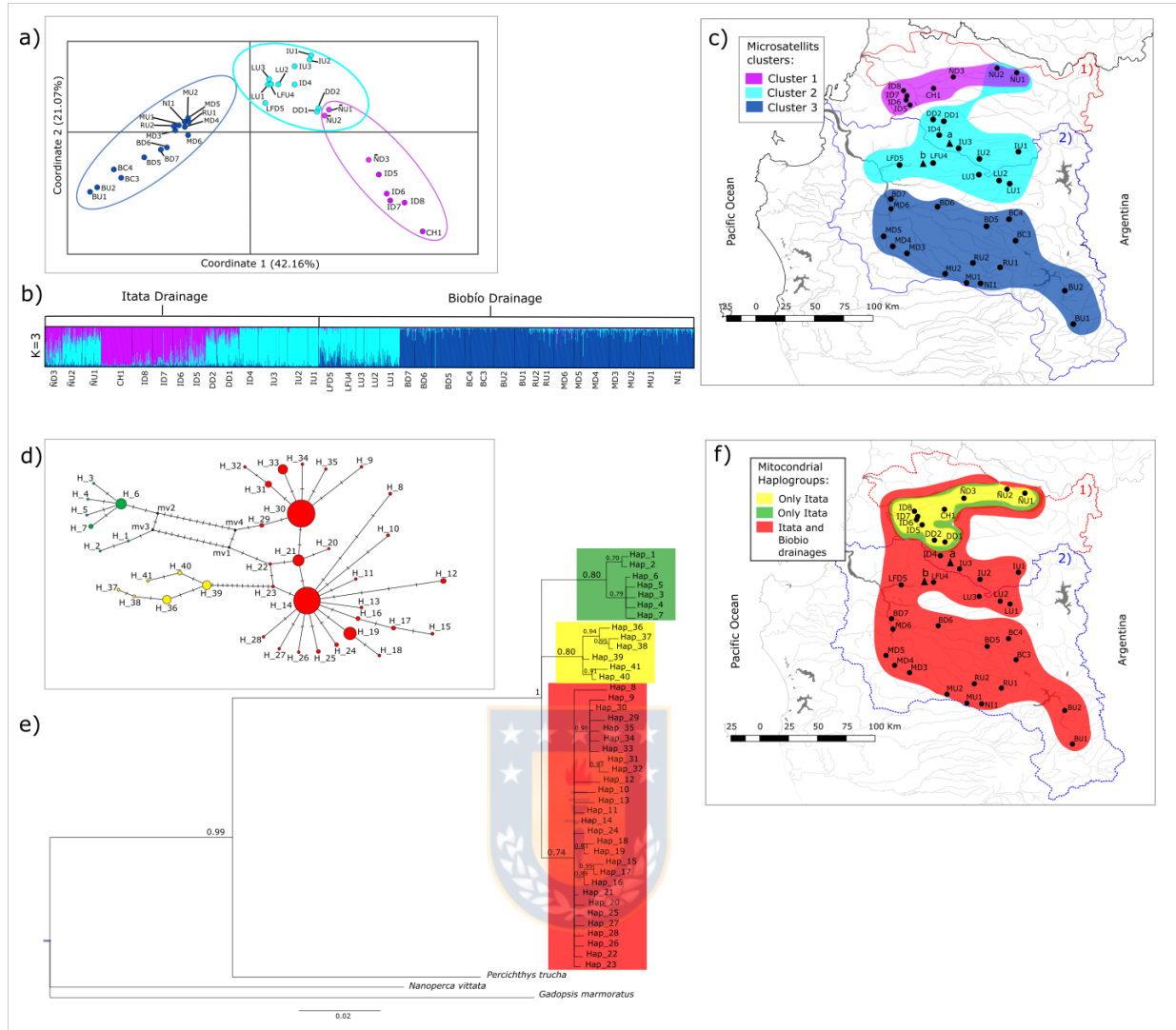


Figura 2: Diversidad de ADN nuclear de *Percilia* spp. (marcadores de microsatélites; n = 1602 individuos) y diversidad de ADN mitocondrial (ADNmt COI; n = 290 individuos). A) Análisis de coordenadas principales basado en estimaciones de pares  $F_{ST}$  entre todos los sitios de muestreo en las cuencas hidrográficas de Itata y Biobío. Cluster 1: magenta (Ñuble, Chillán y tramos aguas abajo del río Itata), Cluster 2: turquesa (Diguillín, tramos aguas arriba de Itata y Laja), Cluster 3: azul (Biobío, Renaico y Malleco). B) Plot de STRUCTURE de *Percilia* spp. (28 loci de microsatélites, 35 ubicaciones). Se distinguen tres conglomerados, uno exclusivamente en la cuenca del Itata (magenta), uno exclusivamente en la cuenca del Biobío (azul) y uno que se encuentra en ambas cuencas (turquesa). C) Distribución geográfica de los cluster de



*Percilia* spp. basado en microsatélites. D) Red de haplotipos que muestra haplogrupos rojos, amarillos y verdes. E) Árbol filogenético bayesiano de los haplogrupos (41 secuencias COI), los valores de probabilidad posterior para el análisis bayesiano se muestran en cada nodo. Los colores del haplogrupo coinciden con la distribución geográfica como se muestra en F). F) Distribución geográfica de *Percilia* spp. de los haplogrupos (mtDNA COI).

Figure 2: *Percilia* spp. nuclear DNA diversity (Microsatellites markers;  $n = 1602$  individuals) and mitochondrial DNA diversity (mtDNA COI;  $n = 290$  individuals). A) Principal coordinates analysis based on  $F_{ST}$  pairwise estimates among all sampling locations in the Itata and Biobío watersheds. Cluster 1: magenta (Ñuble, Chillán and downstream reaches of the Itata River), Cluster 2: turquoise (Diguillín, upstream reaches of Itata and Laja), Cluster 3: blue (Biobío, Renaico and Malleco). B) STRUCTURE plot of *Percilia* spp. (28 microsatellite loci, 35 locations). Three clusters are distinguished, one exclusively in the Itata watershed (magenta), one exclusively in the Biobío watershed (blue), and one found in both watersheds (turquoise). C) Geographic distribution of *Percilia* spp. genetic diversity based on microsatellite DNA clusters. D) Haplotype network showing red, yellow, and green haplogroups. E) Bayesian phylogenetic tree of the haplogroups (41 COI sequences), posterior probability values for Bayesian analysis are shown at each node. Haplogroup colors match geographic distribution as shown in F). F) Geographic distribution of *Percilia* spp. genetic diversity, Haplogroups (mtDNA COI).



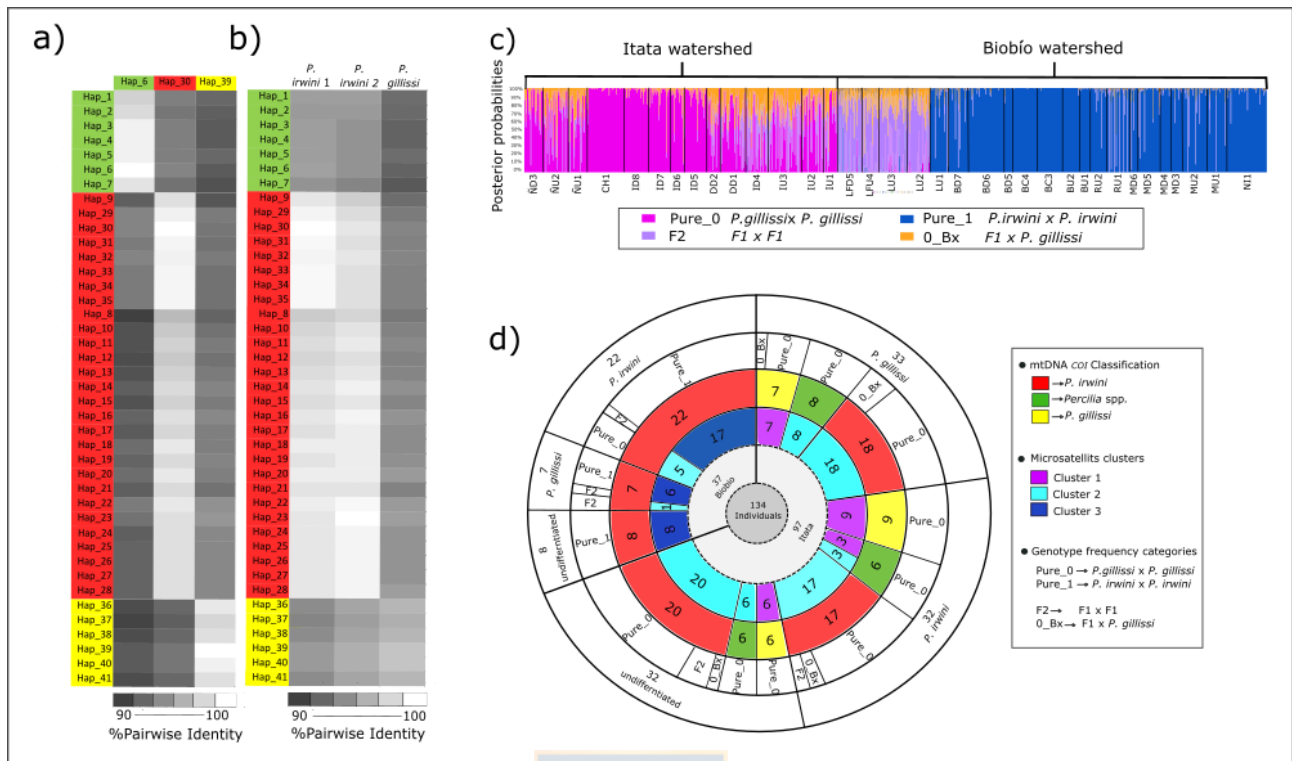


Figura 3: A) Mapa de calor de identidad pareada (%) entre haplotipos dentro y entre haplogrupos. B) Mapa de calor de identidad por pares (%) entre haplotipos dentro y entre las especies de referencia: *Percilia irwini* 1 de Lavoué et al. (2014), *Percilia irwini* 2 y *Percilia gillissi* de Arratia & Quezada-Romegialli, (2019). El grupo de haplotipos verdes difería de los grupos de haplotipos amarillos y rojos entre un 2,7% y un 3%. El grupo de haplotipos rojos probablemente sean *P. irwini*. El grupo de haplotipos amarillos probablemente sean *P. gillissi*. El grupo de haplotipos verdes no se parece a ninguno de los dos. C) Salida gráfica de la asignación genética de individuos de NEWHYBRIDS para 1602 individuos de *Percilia* spp. Las barras individuales muestran la probabilidad posterior de cada individuo de pertenecer a una categoría determinada: Puro\_0 (*P. gillissi*), Puro\_1 (*P. irwini*), F2 y retrocruzamientos O\_Bx. D) Diagrama circular de la consistencia entre datos genéticos y morfológicos. Círculo interno: número total de individuos analizados con los tres enfoques (ADN microsatélite, ADNmt y morfología) (N = 134). Segundo círculo: número de individuos por cuenca. Tercer círculo: agrupaciones de microsatélites. Cuarto círculo: haplogrupos COI de ADNmt por especies. Quinto círculo: categorías NEWHYBRIDS basadas en genotipos de microsatélites multilocus. Círculo más externo: clasificación según morfología.

Figure 3: A) Heatmap of pairwise identity (%) between haplotypes within and between haplogroups. B) Heatmap of pairwise identity (%) between haplotypes within and between the reference species: *Percilia irwini* 1 of Lavoué et al. (2014), *Percilia irwini* 2 and *Percilia gillissi* of Arratia & Quezada-Romegialli, (2019). The green haplotype group differed from the yellow and red haplotype groups by between 2.7-3%. The red haplotype group is likely *P. irwini*. The yellow haplotype group is likely *P. gillissi*. The green haplotype group is unlike either. C) Graphical output of genetic assignment of individuals from NEWHYBRIDS for 1602 individuals of *Percilia* spp. Individual bars show the posterior probability of each individual belonging to a given category: Pure\_0 (*P. gillissi*), Pure\_1 (*P. irwini*), F2 and backcrosses O\_Bx. D) Circular diagram of the consistency between and among genetic and morphological data. Inner circle: number of individuals analyzed with all three approaches (microsatellite DNA, mtDNA and morphology) (N=134). Second circle: number of individuals per watershed. Third circle: microsatellite clusters. Fourth circle: mtDNA COI haplogroups by species. Fifth circle: NEWHYBRIDS categories based on multilocus microsatellite genotypes. Outermost circle: morphology.



## MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO III

### Mitochondrial DNA sequencing

PCR was carried out in 25 $\mu$ L containing 2.5 $\mu$ L of 10x reaction buffer (Bio Basic, Markham Ontario), 2.5 $\mu$ L of MgSO<sub>4</sub> (Biobasic, Markham Ontario), 0.2mM of each dNTPs (Bio Basic, Markham Ontario), 0.1mM of each LCO1490 and HC02198 primer (IDT, Coralville Iowa), 1.25U of TSG (Bio Basic, Markham Ontario), 5ul of DNA, and the remaining volume was DDH<sub>2</sub>O. The PCR thermal profile was: an initial denature at 95°C for 5m followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 45s, annealing at 45°C for 45s, extension at 72°C for 45s, and a final extension at 72°C for 5m. The resulting PCR products were visually inspected via electrophoresis on a 1% agarose gel. PCR products were purified using an Exonuclease 1 - Antarctic Phosphatase PCR cleanup protocol (modified from [http://www.nucleics.com/DNA\\_sequencing\\_support/exonuclease1-SAP-PCR-protocol.html](http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/exonuclease1-SAP-PCR-protocol.html)) whereby 0.5U of Exonuclease 1 (New England Biolabs, Ipswich Massachusetts) 1.25U of Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich Massachusetts) 2.5 $\mu$ L of 10x AP Buffer (New England Biolabs, Ipswich Massachusetts) and 7.225 $\mu$ L of DDH<sub>2</sub>O were added to 22 $\mu$ L of PCR product. This mixture was then incubated at 37°C for 30 minutes. Following this incubation, a heat inactivation step was conducted at 80°C for 20 minutes. These purified PCR products were sent to Macrogen USA (Rockville, MD) for sequencing in both directions.

## Morphological visual classification

Was performed on 134 individuals from both watersheds randomly selected. Individuals were assigned to species using 8 morphological traits. The traits were counted as present or absent through an expert eye in each individual. If the individual had more than 4 traits corresponding to a species, it was classified as *P. gillissi* or *P. irwini* (without knowing its genetic classification previously).

Tabla S1: Rasgos morfológicos utilizados para identificar las especies de 134 individuos muestreados en las cuencas hidrográficas de Itata y Biobío. (-) sin información.

Table S1: Morphological traits used to identify the species of 134 individuals sampled in the Itata and Biobío watersheds. (-) not information.

Traits	<i>P. gillissi</i>	<i>P. irwini</i>
Number of scales - lateral line (Arratia 1982)	31 - 43	35 - 39
Longest dorsal spine (Arratia 1982)	fourth	third
Dorsal surface strongly inclined between supraoccipital and ethmoid (Arratia 1982)	concave	-
Dorsal border between occipital and origin of dorsal fin (Arratia 1982)	convex	convex

<b>Traits</b>	<i>P. gillissi</i>	<i>P. irwini</i>
Maxillary end touches orbit axis (Ruiz and Marchant 2004)	-	no
Curved jaw (Ruiz and Marchant 2004)	-	yes
Branchiostegal (Arratia 1982)	6 - 7	5 - 6
Pyloric ceca (Arratia 1982)	3	4



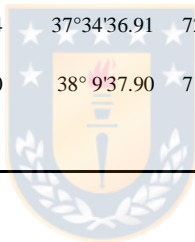
Tabla S2: Información del sitio de muestreo para *Percilia* spp. de las cuencas hidrográficas de los ríos Itata y Biobío incluyendo ID de muestra, coordenadas (Lat. y Long.), elevación (msnm), tamaño de muestra en 2016 y 2017, riqueza alélica ( $A_R$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) por sitios de muestreo.

Table S2: Sampling site information for *Percilia* spp. from the Itata and Biobío river watersheds including sample ID, coordinates (Lat. and Long.), elevation (masl), sample size in 2016 and 2017, allelic richness ( $A_R$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) by sampling sites.

Watershed	Main Rivers	Site	Affluent river	Location	Sample ID	Latitude (S)	Longitude (W)	Elevation (masl)	N (2016, 2017)	$A_R$	$H_e$	$H_o$
Itata	Ñuble	ÑD3	Ñuble	Ñuble downstream	ITA18	36°33'04.54	72°05'33.72	727	(-,51)	7.060	0.724	0.677
		ÑU2	Ñuble	Ñuble upstream	ITA11	36°29'02.51	71°45'13.10	276	(50,51)	7.060	0.725	0.674
		ÑU1	Ñuble	Ñuble upstream	ITA05	36°31'21.06	71°35'55.80	381	(44,8)	6.764	0.707	0.668
		CH1	Chillán	Chillán	ITA17	36°38'31.19	72°12'42.00	80	(-,91)	6.422	0.669	0.618
Itata	Itata	DD2	Diguillin	Diguillin	ITA16	36°52'01.83	72°19'31.69	92	(-,29)	6.782	0.709	0.669
		DD1	Diguillin	Diguillin	ITA09	36°53'28.27	72°15'42.78	106	(50,6)	6.732	0.701	0.673
		ID8	Itata	Itata downstream	ITA13	36°38'15.88	72°28'24.43	30	(51,-)	6.528	0.705	0.658
		ID7	Itata	Itata downstream	ITA12	36°39'24.43	72°27'05.13	32	(51,-)	6.606	0.712	0.678
		ID6	Itata	Itata downstream	ITA14	36°41'43.60	72°26'56.82	40	(-,57)	6.795	0.702	0.682
		ID5	Itata	Itata downstream	ITA15	36°45'29.11	72°24'53.10	49	(-,54)	6.808	0.719	0.661
		ID4	Itata	Itata downstream	ITA08	36°59'07.04	72°18'30.15	99	(50,-)	6.132	0.669	0.636

Watershed	Main Rivers	Site	Affluent river	Location	Sample ID	Latitude (S)	Longitude (W)	Elevation (masl)	N (2016, 2017)	A <sub>R</sub>	He	Ho
		IU3	Itata	Itata upstream	ITA07	37°06'02.55	72°07'49.15	189	(51,28)	5.688	0.644	0.607
		IU2	Itata	Itata upstream	ITA10	37°11'20.61	71°58'48.57	270	(50,9)	5.353	0.632	0.610
		IU1	Itata	Itata upstream	ITA06	37°08'25.20	71°40'16.69	601	(22,12)	4.983	0.610	0.586
<b>Biobío</b>	Laja	LU1	Laja	Laja upstream	BIO23	37°22'23.29	71°44'24.39	531	(49, -)	5.460	0.650	0.612
		LU2	Laja	Laja upstream	BIO22	37°20'32.70	71°48'0.30	457	(30, 10)	5.360	0.645	0.610
		LU3	Laja	Laja upstream	BIO25	37°19'18.78	71°57'54.56	312	(20, -)	5.320	0.626	0.620
		LFU4	Laja	Laja fall upstream	BIO7	37°12'39.34	72°19'15.73	189	(38, -)	5.630	0.651	0.618
		LFD5	Laja	Laja fall downstream	BIO9	37°13'55.15	72°34'25.46	108	(54, -)	6.470	0.697	0.679
	Biobío	BU1	Biobío	Biobío upstream	BIO1	38°28'23.60	71°14'10.14	895	(21, 15)	4.510	0.550	0.539
		BU2	Biobío	Biobío upstream	BIO2	38°12'43.99	71°17'46.13	745	(35, 16)	4.460	0.571	0.547
		BC3	Biobío	Biobío central	BIO5	37°48'55.56	71°40'34.72	342	(45, 12)	5.230	0.606	0.567
		BC4	Biobío	Biobío central	BIO17	37°39'3.72	71°44'7.41	417	(14, -)	4.950	0.568	0.572
		BD5	Biobío	Biobío downstream	BIO6	37°42'41.67	71°54'6.98	263	(38, 44)	6.130	0.654	0.623
		BD6	Biobío	Biobío downstream	BIO21	37°33'2.63	72°17'5.06	135	(42, -)	6.450	0.673	0.617
		BD7	Biobío	Biobío downstream	BIO15	37°29'43.54	72°38'56.97	56	(37, -)	6.400	0.660	0.625
	Renaico-Malleco	RU1	Renaico	Renaico upstream	BIO18	38° 2'14.07	71°47'27.81	507	(22, 14)	6.460	0.662	0.599
		RU2	Renaico	Renaico upstream	BIO28	38° 0'10.92	72° 0'9.78	306	(-, 26)	6.210	0.658	0.639

Watershed	Main Rivers	Site	Affluent river	Location	Sample ID	Latitude (S)	Longitude (W)	Elevation (masl)	N (2016, 2017)	A <sub>R</sub>	He	Ho
		MU1	Malleco	Malleco upstream	BIO11	38° 9'19.06	72° 3'40.60	422	(47, -)	6.060	0.651	0.608
		MU2	Malleco	Malleco upstream	BIO12	38° 5'6.33	72°12'58.68	283	(49, -)	6.140	0.648	0.600
		MD3	Malleco	Malleco downstream	BIO27	37°55'0.41	72°30'32.04	139	(-, 28)	6.130	0.639	0.601
		MD4	Malleco	Malleco downstream	BIO13	37°51'35.62	72°37'32.93	93	(32, 40)	6.290	0.668	0.625
		MD5	Malleco	Malleco downstream	BIO26	37°46'55.76	72°41'34.23	69	(-, 16)	6.000	0.639	0.593
		MD6	Malleco	Malleco downstream	BIO14	37°34'36.91	72°38'17.87	57	(49, -)	6.420	0.667	0.591
		NI1	Niblinto	Niblinto upstream	BIO10	38° 9'37.90	71°56'43.91	533	(55, 29)	5.300	0.629	0.569





1602 Individuals, 28 Microsatellites

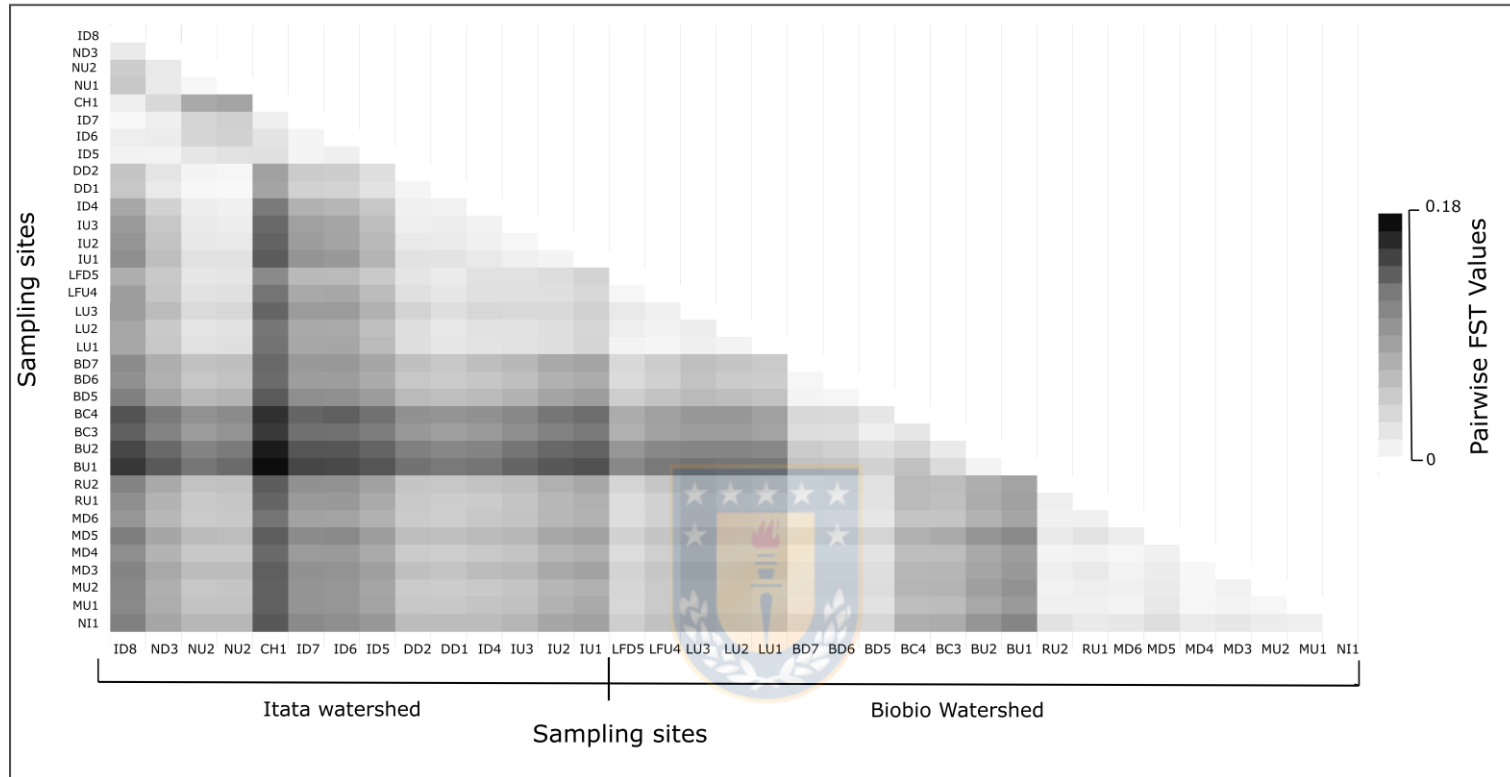


Figura S1: Mapa de calor que representa los valores de  $F_{ST}$  por pares calculados utilizando un conjunto de datos de 1602 individuos recolectados de 35 sitios de muestreo, genotipados en 28 microsatélites. 927 individuos de la colección Biobío se utilizaron previamente en (Valenzuela-Aguayo et al. 2019).

Figure S1: Heat map depicting pairwise  $F_{ST}$  values calculated using a restricted dataset of 1602 individuals collected from 35 sampling sites, genotyped at 28 microsatellites. 927 from Biobio collection were previously used in (Valenzuela-Aguayo et al. 2019).



Tabla S3: Índice de diversidad de las 290 secuencias COI, todos los sitios incluidos.

Table S3: Diversity index of the 290 COI sequences, all sites included.

	<b>All sites included</b>
Number of Polymorphic sites (S)	62
Number of Haplotypes	41
Haplotype diversity (Hd)	0.825
Nucleotide diversity (Pi)	0.01073
Average number of nucleotide differences (k)	6.039

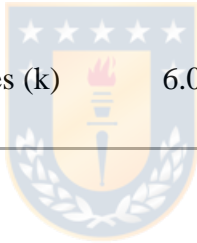


Tabla S4: Valores de incertidumbre de selección para el mejor modelo de sustitución probado, basado en tres diferentes criterios BIC, AIC y DT, utilizando JModel Test 2.1.10 (Guindon y Gascuel 2003; Darriba et al. 2012).

Table S4: Selection uncertainty values to best substitution model tested, based in three different criterion BIC, AIC and DT, using JModel Test 2.1.10 (Guindon and Gascuel 2003; Darriba et al. 2012).

	<b>Model</b>	<b>-lnL</b>	<b>K</b>	<b>BIC</b>	<b>delta</b>	<b>weight</b>	<b>cumWeight</b>
<b>BAYESIAN INFORMATION CRITERION (BIC)</b>	HKY+G	1377.604	583	6667.458	0	0.426800	0.427282
<b>AKAIKE INFORMATION CRITERION (AIC)</b>	HKY+G	1377.691	584	3921.200	0	0.092900	0.093306
<b>DECISION THEORY PERFORMANCE-BASED SELECTION (DT)</b>	HKY+G	1377.703	583	0.018300	0	0.023200	0.023078

Tabla S5: Frecuencias de nucleótidos del modelo de sustitución seleccionado HKY + G.

Table S5: Nucleotide Frequencies of the Substitution model selected HKY+G.

<b>Model</b>	<b>HKY+G</b>
<b>partition</b>	010010
<b>-lnL</b>	1377.604
<b>K</b>	583
<b>freqA</b>	0.2400
<b>freqC</b>	0.2638
<b>freqG</b>	0.1803
<b>freqT</b>	0.3159
<b>kappa</b>	6.6622
<b>ti/tv</b>	3.8101
<b>gamma shape</b>	0.2331

Both the Bayesian Information Criterion (BIC) and Akaike Information Criterion (AIC) supported the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) plus gamma shape (+ G) model as the best-fit substitution model.

Table S6: Provenance of red haplotypes.

	<b>Provenance</b>
<b>Hap_8</b>	Biobío
<b>Hap_9</b>	Biobío
<b>Hap_35</b>	Biobío
<b>Hap_32</b>	Biobío
<b>Hap_12</b>	Biobío
<b>Hap_10</b>	Biobío
<b>Hap_13</b>	Biobío
<b>Hap_11</b>	Biobío
<b>Hap_24</b>	Biobío
<b>Hap_18</b>	Biobío
<b>Hap_19</b>	Biobío
<b>Hap_15</b>	Biobío
<b>Hap_17</b>	Biobío
<b>Hap_16</b>	Biobío
<b>Hap_21</b>	Biobío
<b>Hap_20</b>	Biobío
<b>Hap_25</b>	Biobío
<b>Hap_27</b>	Biobío
<b>Hap_28</b>	Biobío
<b>Hap_22</b>	Biobío
<b>Hap_23</b>	Biobío
<b>Hap_26</b>	Biobío
<b>Hap_14</b>	Biobío
<b>Hap_29</b>	Itata

<b>Hap_34</b>	Itata	
<b>Hap_30</b>	Biobío	Itata
<b>Hap_33</b>	Biobío	Itata
<b>Hap_31</b>	Biobío	Itata



### REFERENCIAS MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO III

- Arratia G (1982) A Review of Freshwater Percoids from South America (Pisces, Osteichthyes, Perciformes, Percichthyidae, and Peciliidae). *Abh senckenb naturforsch Ges* 15:1–52
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52:696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Ruiz VH, Marchant M (2004) *Ictiofauna de aguas continentales Chilenas*. Universidad de Concepción, Chile, Concepción
- Valenzuela-Aguayo F, McCracken GR, Manosalva A, et al (2019) Human-induced habitat fragmentation effects on connectivity, diversity, and population persistence of an endemic fish, *Percilia irwini*, in the Biobío River basin (Chile). *Evol Appl* 13:1–14. <https://doi.org/10.1111/eva.12901>



## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se ha abordado la influencia de factores antropogénicos y naturales en la estructura genética, conectividad y distribución de las especies *P. irwini* y *P. gillissi* que habitan en las cuencas contiguas de los ríos Itata y Biobío, sistemas considerados complejos con diferentes grados de intervención humana. Principalmente se analizó la variabilidad genética, divergencia y conectividad entre poblaciones y también la distribución geográfica e hibridación de ambas especies utilizando un set de 28 marcadores moleculares microsatélites y 290 secuencias del gen mitocondrial COI. Los hallazgos de esta investigación generan información sobre el actual estado genético de las poblaciones de *P. gillissi* y *P. irwini*. Estos resultados aportan información relevante para ser utilizados en la generación de medidas de manejo y conservación de éstas y otras especies, además de revelar la importancia del uso del conocimiento genético para la gestión de la biodiversidad, inexistente hasta ahora en Chile.

### **Parte I: PRINCIPALES HALLAZGOS en términos de variabilidad, estructura genética, conectividad y persistencia de las poblaciones de *Percilia* spp.**

Esta tesis establece que tanto los factores naturales, incluida la estructura de la red dendrítica y barreras naturales, como factores antrópicos como barreras artificiales y

canalización, influyen de manera significativa en la estructura genética de las poblaciones de *P. irwini* y *P. gillissi* que habitan las cuencas de los ríos Biobío e Itata.

En un escenario sin fragmentación, en áreas de la cuenca del Biobío donde no existen barreras a la dispersión, ni naturales ni artificiales (e.g. en el río Renaico-Malleco), se observó una alta conectividad poblacional, evidenciada a través del flujo génico simétrico aguas arriba y aguas abajo y de la ausencia del patrón de aislamiento por distancia, donde la variable más influyente en la diferenciación genética fue la distancia de la vía fluvial (con un tamaño de vecindario de 30 km). Es conocido que las poblaciones naturales, en un ambiente sin intervención, están frecuentemente influenciadas tanto por la deriva (dependiente del tamaño poblacional) y el flujo de genes (Hanski and Gaggiotti 2004). También pueden surgir otras influencias propias del uso de la cuenca como intermitencias en el flujo de agua debidas al uso de riego para agricultura, pastoreo de ganado o crecimiento forestal, los que interrumpen la conectividad hidrológica y promueven el aislamiento temporal de la población (ver Gasith and Resh 1999). A pesar de lo anterior, la alta conectividad observada en esta área de la cuenca revela una gran capacidad de movimiento de *P. irwini*. Recientemente, Vivancos et al. (2020) han revelado que *P. irwini* es capaz de realizar movimientos a gran escala en relación al tamaño corporal de la especie, dentro de áreas sin barreras físicas de la cuenca del Biobío, no solo a favor de corriente. Ello proporciona pruebas de que *P. irwini*, incluso con baja capacidad de nado como ha sido reconocida (García et al. 2012), son capaces de moverse a distancias considerables. No obstante Vivancos et al. (2020) indican que los impulsores ecológicos que provocan

estos movimientos, aún desconocidos, es posible atribuirlos a interacciones biológicas como la competencia, la territorialidad e incluso estrategias de desove (Petty and Grossman 2007).

Bajo un escenario de fragmentación, en particular en la cuenca del río Biobío, la diferenciación poblacional de *Percilia irwini* fue determinada por efectos de la red dendrítica jerárquica de los ríos, no obstante, también por dos tipos de barreras generales: barrera natural (cascada de agua: Salto del Laja) y barreras artificiales (represas). La barrera natural, el Salto del Laja, ha promovido y mantenido la divergencia de las poblaciones, generando una diferenciación poblacional entre los individuos aguas arriba y aguas abajo de la cascada, transformándose en una barrera biogeográfica promotora de la biodiversidad como también ha sido observado en otro estudio con barreras naturales (Dias et al. 2013). En general este tipo de barreras, cuando son lo suficientemente alta para prevenir cualquier dispersión de peces río arriba (y la mayoría río abajo), disminuyen la colonización hacia aguas arriba y mantienen la divergencia de la población incluso promoviendo la especiación (Dias et al. 2013).

Respecto de las barreras artificiales correspondientes a represas de centrales hidroeléctricas en la cuenca del Biobío, hemos detectado un efecto en la diversidad genética intracuenca, dependiente del tipo de permeabilidad de cada barrera y del funcionamiento de las centrales hidroeléctricas. Por ejemplo, las centrales hidroeléctricas de pasada del río Laja, que en conjunto presentan tres presas de baja

altura (las dos más antiguas del año 1997, la más reciente de 2004), parecen no haber generado efectos en la estructura genética de *P. irwini*, ya que todos los individuos fueron genéticamente indistinguibles, formando una única población (LU) sin evidencia de aislamiento por distancia y con un tamaño de vecindario de 70 km (tamaño similar a la extensión geográfica que ocupa la población LU=80.5 km). Estas represas no tuvieron efectos visibles en la diferenciación poblacional, sin embargo, se les han reconocido efectos de barrera de baja altura o presas móviles (Paish 2002; Abbasi and Abbasi 2011), ya que afectan el hábitat físico y provocan impactos hidrológicos como la reducción del ancho, profundidad y velocidad del río (Anderson et al. 2006, 2015; Ovidio et al. 2008). Tales alteraciones, implican la reducción de las zonas de desove, crianza y suministro de alimentos transformando el hábitat en un nicho incompatible para el desarrollo de las especies en estudio. Sugerimos que de manera sinérgica con otras intervenciones humanas en el lugar, tales como la extracción de agua a través de canales de riego y la abundancia de salmónidos en el área (Habit et al. 2007, 2012; Vera-Escalona et al. 2019) han causado una disminución del tamaño poblacional y una posible extinción poblacional en el tramo del río Laja (EA1) situado entre dos conjuntos de centrales eléctricas (Abanico y El Toro – las más antiguas- y las centrales Antuco y Rucúe). En este tramo, a pesar del considerable esfuerzo de muestreo y de los registros históricos de la presencia de la especie (Habit et al. 2007, 2012; Vera-Escalona et al. 2019), no se encontraron ejemplares de *P. irwini*.

En tanto, las barreras artificiales de centrales hidroeléctricas de embalse presentes en el río Biobío (cauce principal), cuyos efectos genéticos han sido descritos por primera

vez en Chile a través de este estudio, han provocado la fragmentación poblacional en tres grupos genéticos (BU, BC y BD, ver capítulo 2) separados por tres represas de más de 50 metros de altura (Ralco, Pangué y Angostura) y una de ellas con más de 20 años de antigüedad (Pangué). Estas represas, además de imposibilitar la conectividad física y el flujo génico hacia aguas arriba por no contar con ningún tipo de dispositivo de mitigación como paso para peces u otros, operan con un régimen de punta o *hydropeaking*. Ello tiene consecuencias ecológicas ampliamente documentadas (e.g., aumento en las tasas de varamiento, reducción de la abundancia y cambios en las tasas de crecimiento de peces y en el comportamiento en algunas especies) (Freeman et al. 2001; Scruton et al. 2003; Korman and Campana 2009; Hasler et al. 2012; Nagrodski et al. 2012; Taylor et al. 2014; Finch et al. 2015; Jones and Petreman 2015; Bond et al. 2016; Rocaspana et al. 2016; Kelly et al. 2017). Al respecto, García et al. (2011) en un estudio sobre el efecto de la operación por *hydropeaking* sobre la disponibilidad de hábitat de *P. irwini*, determinó que los cambios en el régimen de caudal generan fuertes variaciones intradiarias en la cantidad, distribución e idoneidad de hábitats preferentes para la especie. Por lo tanto, es probable que esta variabilidad temporal en la disponibilidad de hábitat generada por el *hydropeaking* también sea una fuerza impulsora importante en la actual estructura de las poblaciones y, en parte causa de la ausencia de *P. irwini* en el área de extirpación poblacional EA2 y la estructura genética diferenciada entre las poblaciones BD y BD(outlet). Las intervenciones en la conectividad en este río también podrían estar perjudicando la persistencia de la población limitada por las barreras de Pangué y Angostura (BC, cuyo tamaño efectivo es de 322 individuos en el límite inferior). Aquí, la reducción del

tamaño efectivo puede ser atribuido a la presencia de barreras en tándem que direccionan la migración aguas abajo de *Percilia*, pero también debido al enorme cambio de hábitat en esta área debido al embalsamiento y al *hydropеaking*, que generan interrupciones de los movimientos pasivos y activos en la especie. Esta pérdida de conectividad en el tiempo podría producir una reducción aún mayor en el *Ne* a niveles donde la deriva génica y la endogamia pueden conducir drásticos cambios en la población (Frankham 2005), volviéndose particularmente vulnerable a la extinción.

Cuando se analizó la situación intercuenca (Biobío e Itata) se encontró evidencia de una estructura poblacional diferente, con la presencia de un clúster genético intermedio de *Percilias* spp. de Itata y Biobío (ver Figura 2 Capítulo 3). Además, otros dos clústeres fueron detectados, uno al norte y otro al sur de este clúster intermedio. El clúster del sur pudo clasificarse como *P. irwini* presente en la cuenca del Biobío y distribuido geográficamente en la zona central y sur de esta cuenca. El clúster del norte pudo clasificarse claramente como *P. gillissi*, pero estos individuos se encuentran confinados al norte de la cuenca del Itata y no en toda la cuenca, como es actualmente reconocida la distribución para esta especie.

Los individuos de *Percilia* spp. del clúster intermedio revelaron la complejidad de los patrones de diversidad genética y de distribución geográfica en el área de estudio. Algunos de estos individuos portaron (1) mtDNA característico de *P. irwini* (haplotipos en el grupo rojo, ver Figura 2 Capítulo 3), pero genotipos de microsatélites clasificados por NEWHYBRIDS como *P. gillissi* o retrocruzas (grupo de microsatélites turquesas);

tales individuos, aunque presentes en ambas cuencas, en la cuenca del río Biobío están restringidos a su tramo norte (es decir, al río Laja, el más cercano a la cuenca del Itata). Ello sugiere la existencia de una barrera reproductiva incompleta entre *Percilia gillissi* y *Percilia irwini*, con *P. irwini* como ascendencia materna (como hemos podido evidenciar gracias a la herencia materna del gen COI con el cual se han clasificado como *P. irwini*). Estos individuos reflejan una alta conectividad entre cuencas, ya sea por razones históricas naturales o contemporánea de tipo antropogénico. En el primer caso estaría explicado por la inversión del sistema de subcuencas Chillán, Lileo y Lonquimay hacia el final del Mioceno dado el alzamiento de la cordillera (Suarez and Emparan 1995; Radic 2010), pero también producto de una posible alta descarga y mayor conectividad entre cuencas durante el derretimiento glacial del Pleistoceno y los episodios volcánicos que dieron lugar a la formación y posterior desbordamiento del lago Laja (Thiele et al. 1998). Ello habría promovido la distribución de *Percilia spp.* entre ambas cuencas a través de rutas fluviales que no existen en la actualidad, tal como ha sido descrito para otras especies (Zemlak et al. 2011; Carrea et al. 2012; Barreto et al. 2020). El aumento en la conectividad contemporánea estaría fomentado por actividades antropogénicas como la dispersión de individuos de *Percilia spp.* a través de canales de riego que trasvasan agua desde el río Laja (cuenca del río Biobío) a la cuenca del río Itata (canal Zañartu inaugurado en 1928 y canal Laja-Diguillín desde 1991). Las condiciones parecidas a arroyos de estos canales de riego permiten la persistencia de comunidades de peces que incluyen poblaciones de *Percilia spp.* (Habit and Parra 2001), pudiendo mantenerse dentro de los canales todo el año, incluso en épocas de no riego (otoño-invierno) (Habit et al. 1998). Además, la apertura de las

tomas de los canales de riego durante la primavera crea fuertes corrientes que provocan la entrada de peces por deriva (Habit and Parra 2001). Por lo tanto, ya sea usando movimientos pasivos como activos se ha potenciado y facilitado la dispersión y conectividad de *Percilia irwini* entre estas cuencas hidrográficas como también ha sido sugerido para el bagre *Diplomystes incognitus* en otras dos cuencas hidrográficas en Chile (Muñoz-Ramírez et al. 2016).

Ante estos hallazgos, la comprensión del estado de las poblaciones en términos de diversidad genética y conectividad adquiere un valor fundamental para anticipar el efecto de nuevos proyectos en el área que interrumpan o incrementen la conectividad física de los ríos. De igual manera, estos hallazgos destacan las grandes oportunidades y desafíos que presentan los enfoques como la genética para la conservación, para comprender y predecir mejor las respuestas demográficas y evolutivas de las poblaciones naturales a las perturbaciones. Una correcta delimitación de las especies en estudio y sus límites de distribución geográfica, permitirá proponer medidas de conservación y/o mitigaciones adecuadas y eficientes (ver parte II, letra e). De otra manera, ¿cómo es posible conservar una especie que no se sabe con exactitud cuál es y dónde habita?

En función de los resultados descritos y basado en la literatura, teniendo en consideración la inclusión del monitoreo genético como herramienta de gestión en el futuro Servicio de Biodiversidad de Áreas Protegidas, a continuación, se sugieren recomendaciones para el manejo y conservación de las poblaciones.



## Parte II: RECOMENDACIONES E IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACION

### a) De las poblaciones fragmentadas de *P. irwini* en el cauce principal río Biobío en base a datos genéticos

El objetivo general de la gestión genética de poblaciones fragmentadas aisladas es reducir el riesgo de extinción de poblaciones y especies mediante la disminución de la endogamia y el aumento de la diversidad genética dentro de los fragmentos de población. Para esto, una de las más importantes medidas a adoptar es la mantención o el aumento del flujo de genes (Frankham et al. 2017). El flujo génico puede ser potenciado a través del manejo de hábitat (e.g corredores biológicos) o por translocaciones de individuos entre fragmentos (Taylor et al. 2017a; Berger-Tal et al. 2020). En lugares donde el flujo génico ha sido interrumpido por construcciones humanas como barreras por centrales hidroeléctricas estas pueden ser removidas o mitigadas por ejemplo a través de pasos de peces, por ejemplo de tipo Nature-like (Katopodis et al. 2001), que cumplan con los requerimiento hidráulicos de diseño para esta especie (Laborde et al. 2016). Cuando la restauración del flujo génico a través del manejo de hábitat no es posible o práctico, es requerido mover individuos a través de traslocaciones, pero no sin antes conocer efectivamente el estado genético de las poblaciones, desde donde se extraen individuos y donde se liberan. Algunas veces ambas técnicas pueden ser usadas simultáneamente para mejorar la conectividad.

En el caso del cauce central del Biobío los resultados de la presente tesis indican una fragmentación poblacional explicada principalmente por el número de barreras presentes, con evidencia de disminución del  $N_e$  en la población BC entre barreras (Capítulo 2, Tabla 2). Luego de evaluar la diferenciación genética poblacional (realizado en capítulo 2), sigue determinar si estas poblaciones están sufriendo erosión genética, para posteriormente proceder en una medida de rescate que permita el aumento del flujo de genes considerando a las poblaciones en conjunto y no de manera separada. En el caso particular de BC, dada la reciente diferenciación poblacional por los años de funcionamiento de las centrales, la recomendación más propicia está dirigida a la mantención del flujo génico a través de medidas de mitigación como lo son los pasos de peces que crucen las barreras de Pangué y Ralco. Geográficamente esto es complejo pues estos pasos debiesen recorrer varias decenas de kilómetros para conectar hábitats propicios para esta especie, la cual no es usuaria de áreas de embalse. Producto de esto, la posibilidad de translocar individuos desde una población donante, similar genéticamente, con mayor diversidad y tamaño poblacional como puede ser BU podría ser una buena opción de manejo, siempre y cuando también se lleve a cabo basado en el conocimiento de las estructuras genética entre las poblaciones fuente y receptora en conjunto a un plan de monitoreo genético y seguimiento apropiado. Las traslocaciones son una estrategia de manejo común, pero a pesar de su popularidad, tienen un amplio historial de fallas (Taylor et al. 2017a; Berger-Tal et al. 2020), principalmente debido al extenso conocimiento de ecología y comportamiento necesario para llevarlas a cabo, pero también debido a que se espera que exista una relación inversa entre la diferenciación genética de las poblaciones

aislados recientemente y su diversidad genética (e.g., el pez *Galaxiella pusilla*, Coleman et al. 2013). Por lo que realizar traslocaciones sin considerar la diversidad genética puede potenciar el aislamiento continuo de estas poblaciones diferenciadas y perpetuar la pérdida progresiva de diversidad genética, aumentando potencialmente el riesgo de extinción como consecuencia de la disminución del tamaño de la población.

Una experiencia de traslocación de *P. irwini* ya ha sido llevada a cabo en la cuenca el año 2001, específicamente en el río Laja, donde fueron translocados 760 individuos como medida de mitigación a la obstrucción del desplazamiento producto de una de las centrales de paso del área (Capítulo 2, Tabla 1). No obstante, si bien esta iniciativa facilitó el repoblamiento de *P. irwini* aguas abajo de la represa Rucue (en río Laja), esta se tornó infructuosa, aguas arriba, donde en este estudio se considera como zona de extirpación 1 (EA1). Por lo anterior, antes de proceder a tomar una medida como ésta es necesario tener claridad de diversos aspectos, tales como: ¿Cuál o cuáles son las poblaciones con mayor diversidad genética?, ¿Cuál o cuáles poblaciones necesitan aumentar la diversidad genética?, Desde qué población o desde cuántas poblaciones debemos ingresar diversidad? ¿Cuántos y cuáles individuos mover?, ¿Existen las condiciones propicias de hábitat para la posterior subsistencia y reproducción de los individuos traslocados? ¿Cuándo suspender tales traslados? Preguntas cuyas respuestas requieren de la continuidad de estudios en el área y en esta especie como modelo.

## **b) Conectividad de *Percilia* en áreas sin fragmentación de la cuenca del Biobío**

Un destacado hallazgo de esta tesis es la demostración de un único y gran cluster genético de *Percilia irwini* en los ríos Renaico-Malleco al sur del río Biobío y considerada como área de la cuenca sin fragmentación por centrales hidroeléctricas. En base a los resultados, en esta zona de la cuenca es claramente observable la capacidad de flujo génico asimétrico que puede alcanzar la especie cuando no hay intervención a la conectividad, y la importancia que juega la estructura espacial en la persistencia y distribución de esta especie de pequeño tamaño corporal, como también ha sido observado en Roberts et al. (2013).

Una de las mayores presiones en las subcuencas del Renaico y Malleco, está dado por el uso de agua para el desarrollo de la industria de la celulosa (celulosa del Pacífico, 1.800.000 m<sup>3</sup>/mes). Otras industrias como las forestales y actividades agrícolas también ejercen una demanda no menor sobre el uso del agua por efectos de riego (DGA 2004). No obstante, esta área de la cuenca del río Biobío es la única no afectada por barreras antropogénicas que dificulten la conectividad y flujo génico de las poblaciones de *Percilia*, a pesar de que si existen minicentrales hidroeléctricas en funcionamiento (e.g., Central Renaico y Alto Renaico). De aquí la importancia de mantener áreas protegidas que sirvan para la preservación de todos sus elementos (tanto genético, especies y ecosistemas) y que el proyecto de ley del Servicio de Biodiversidad y Áreas Protegidas (SBAP) sea concretado. Por esto, la recomendación para el manejo de la población en esta área de la cuenca es mantener la conectividad

natural. Sin embargo, dado a que existen centrales hidroeléctricas proyectadas (Díaz et al. 2019), es recomendable que éstas tengan en consideración tomar medidas que aseguren el flujo génico y la conectividad física fluvial a través de por ejemplo la implementación de pasos para peces con las características hidráulicas y la efectividad biológica adecuada para los peces nativos del área (FAO/DVWK 2002; Laborde et al. 2016, 2020).

**c) Sobre la delimitación de los rangos de distribución de *P. gillissi* y *P. irwini***

La falta de coincidencia entre la distribución geográfica determinada en este estudio con la distribución geográfica actualmente reconocida para estas especies en estas cuencas ha sido también un importante hallazgo. Bajo la utilización de la técnica barcoding, utilizando el gen COI, fue posible observar una distribución de los haplotipos identificados como de *P. gillissi* solo en la parte norte de la cuenca del río Itata. Los individuos clasificados a través de este método como *P. irwini*, se registraron en todos los principales ríos de la cuenca del río Biobío (ríos Renaico, Malleco, Biobío y Laja). Pero también la ascendencia materna de *P. irwini* observada en los híbridos presentes en Itata permiten deducir el movimiento de *P. irwini* fuera del actual rango de distribución para la especie. Las discrepancias entre los actuales rangos de distribución de ambas especies y la distribución basada en patrones de variación genética ya han sido discutidas por Ruzzante et al. (2006). Ruzzante et al. (2006) analizaron muestras de *P. gillissi* de los ríos Maipo, Mataquito y Maule en el norte, y de los ríos Imperial y Cruces en el sur y de *P. irwini* de los ríos Andalién y Biobío. Los resultados, basados tanto en ADNmt como en la variación de la secuencia del intrón nuclear GnRH3-2,

mostraron que *P. gillissi* del norte están fuertemente diferenciados de los *P. gillissi* del sur (imperial y Cruces) y estos últimos a su vez están estrechamente relacionados con *P. irwini*. Por ello, *P. irwini* podría corresponder a una especie con una distribución más amplia que lo actualmente reconocido, y por tanto los patrones filogeográficos dentro del género aún no se han resuelto. Tanto los resultados de Ruzzante et al. (2006) como los nuestros, evidencian la necesidad de nuevos estudios sobre la delimitación de los rangos de distribución de estas especies a nivel nacional. El rango de distribución geográfica de una especie es un atributo dinámico que cambia, expandiéndose y contrayéndose a lo largo del tiempo (Zunino and Zullini 2003) y su conocimiento tiene múltiples implicancias respecto a la historia evolutiva, la ecología y las necesidades fisiológicas de cada especie (Rosenfield 2002; Maciel-Mata et al. 2015). Por ello, es relevante estudiar y comprender adecuadamente el rango de distribución de estas especies para generar iniciativas de conservación apropiadas.

Desde otra perspectiva el rango de distribución de *P. irwini* también es importante de esclarecer ya que actualmente está descrita como una especie endémica de la VIII región, pero restringida a solo algunos ríos de la cuenca del río Biobío y del río Andalién. En general, los rangos de distribución restringidos, en especies de peces de agua dulce, se deben a la limitación de oportunidades históricas de dispersión, sumado a otras características idiosincráticas de cada especie como la capacidad de dispersión, los límites fisiológicos, la competencia entre otros (Rosenfield 2002). Además, especies de rango restringido son indicador importante de áreas de endemismo, revelando patrones evolutivos subyacentes y procesos de especiación

biogeográfica (Nogueira et al. 2010), los cuales aún no han sido estudiados para las especies en cuestión. También existe la posibilidad de que *P. irwini* ocupe áreas restringidas debido al submuestreo genético del área donde habita y a la confusión taxonómica que produce que esta especie y *P. gillissi* sean morfológicamente tan similares.

Finalmente, el gran tamaño efectivo poblacional estimado en la zona sur de la cuenca del río Biobío, la similitud entre *P. irwini* del Biobío con *P. gillissi* del sur encontrada por Ruzzante et al. (2006) y la capacidad de dispersión sugerida por Vivancos et al.(2020), indican la posibilidad de que muestreos adicionales al sur de la cuenca del Biobío revelen un rango de distribución aún más amplio para *P. irwini*, por lo que futuros muestreos genéticos al Sur del Biobío y al norte del Itata serian importantes de llevar a cabo cuando se replantee el rango de distribución de estas especies.

#### **d) Zona híbrida entre Itata-Laja**

Se hipotetizó que la zona de hibridación encontrada en esta tesis es producto de dos mecanismos no excluyentes que combinan la conectividad histórica probable entre la cuenca del río Itata y Biobío, y la conectividad contemporánea potenciando la dispersión a través del uso de canales de riego en la zona. Independiente de éstos mecanismos, la importancia de reconocer una zona híbrida radica en que estas pueden ser estables y persistentes en el tiempo, y permitir la pérdida de combinaciones de alelos que han evolucionado dentro del genoma a lo largo del tiempo evolutivo a través del mecanismo de introgresión (Allendorf et al. 2001, 2013). Estudios futuros más profundos sobre los procesos ocurriendo dentro de esta zona (e.g., usando data

genómica, Grabenstein and Taylor 2018), las consecuencias en el *fitness* de la población híbrida, y también monitoreos del tamaño y composición de la población (e.g., frecuencia de genotipos híbridos frente a genotipos de pura raza en diferentes generaciones y retrocruzas), diversidad genética entre otros, son sugeridos para complementar la actual información con el fin de entender los impactos que esta zona híbrida tendrá en el tiempo y que estos conocimientos tengan una incidencia positiva en las futuras políticas y/o decisiones de manejo de poblaciones híbridas en esta área altamente intervenida por actividades humanas.

Respecto al manejo de este tipo de población, en la actualidad se sugiere tomar medidas para reducir la hibridación de poblaciones naturales producto de actividades antropogénicas (Allendorf et al. 2013). No obstante, Chan et al. (2019) sugiere un cambio en la percepción de lo que implica una población híbrida, considerando a la hibridación como un enfoque de conservación capaz de preservar el potencial adaptativo de una especie, en lugar de preservar la especie en su estado original. Esta mirada puede ser valiosa en el caso entre *P. gillissi* y *P. irwini* en Chile, donde ambas son especies endémicas, merecedoras de protección y conservación, pero para las cuales aún no existen acciones (planes, programas u otros) que se dicten o ejecuten, en el marco de las presentes leyes ni del futuro SBD.



### **e) Futuras investigaciones en cuanto a delimitación de especies e identificación de unidades de conservación**

Respecto a la ambigua claridad taxonómica entre *P. irwini* y *P. gillissi* y respecto a la complejidad genética observada en el haplogrupo verde respecto al haplogrupo amarillo, los resultados también sugieren la posibilidad de que estas sean poblaciones conespecífica, muy diferenciadas o estructuradas. Si bien, la delimitación de especie no fue un objetivo abordado en la presente tesis, futuros estudios respecto a la serán necesarios para poder resolver el estatus taxonómico de ambas especies. En la actualidad, métodos integrativos que utilicen información genética como por ejemplo metodologías probabilísticas basadas en la teoría de la coalescencia (e.g., Fujita et al. 2012; Yang and Rannala 2014) en conjunto con técnicas de análisis morfológicos de mayor resolución como la Morfometría geométrica (Slice 2007), haría más robustas las inferencias y a la vez facilitaría la descripción formal a nivel de especie e incluso subespecie (Ibañez et al. 2007; Davis et al. 2016). El uso en conjunto de múltiples marcadores moleculares con caracteres morfométricos puede entonces ser una efectiva aproximación para el futuro esclarecer los linajes evolutivos, ayudando además a discernir los procesos adaptativos que han generado esta similitud morfológica entre ambas especies.

Futuras investigaciones, después de delimitar las especies, requerirán la identificación de unidades intraespecíficas de priorización para fines de conservación, dentro de cada especie. Dos de las más utilizadas categorías son las Unidades evolutivamente significativas (ESUs) y las Unidades de Manejo (MUs). Una ESU puede definirse ampliamente como una población o grupo de poblaciones que ameritan una gestión

separada o una prioridad para la conservación debido a su alto carácter distintivo, tanto genética como ecológicamente (Allendorf et al. 2013). Esta clasificación puede tener múltiples definiciones, pero para propósitos de conservación, los conceptos que incluyen un aislamiento reproductivo y/o la diferenciación adaptativa pueden ser usados para designar ESUs siempre y cuando haya una concordancia entre múltiples tipos de data que se estén utilizando para poder definirla (eg., genética, morfológica, comportamiento, entre otros) (Allendorf et al. 2013; Frankham et al. 2017). Para la sugerencia de un ESU en la presente investigación sería necesaria la inclusión de data morfométrica y biológica en complemento a nuestros resultados, lo que ha quedado fuera de los objetivos de esta tesis. Las Mus, son poblaciones demográficamente independientes importantes para la persistencia a largo plazo de una ESU o especie. En términos genéticos, Moritz (1994) definió a una MUs como poblaciones que tienen frecuencias alélicas sustancialmente divergentes en los loci nucleares o de ADNmt, que están conectadas por un flujo génico bajo y por tanto demográficamente tienen cierta independencia (independencia demográfica basada en el número de migrantes <10% de la población, Waples and Gaggiotti 2006). Identificar estas unidades es útil para el manejo a corto plazo como monitoreos del estado genético de una población (Moritz 1994; Allendorf et al. 2013). En base a nuestros resultados es posible distinguir como MUs las poblaciones detectadas en la cuenca del Biobío no obstante más información relacionada a la ecología de las poblaciones será necesaria para categorizar las poblaciones detectadas como MUs.

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El cumplimiento de los objetivos de este trabajo de tesis generó información relevante sobre la variabilidad genética de las poblaciones de *Percilia* spp. en las cuencas de los ríos Biobío e Itata y la importancia del conocimiento de variabilidad genética para la gestión de la biodiversidad a través del análisis de la influencia de los factores naturales y antropogénicos sobre la conectividad, estructura genética y distribución poblacional en un contexto de alta fragmentación intracuenca e incremento de conectividad intercuenca. A partir de los resultados correspondientes, los tres capítulos desarrollados permiten plantear las siguientes conclusiones y recomendaciones:



### Capítulo 1:

1. El monitoreo genético podrá ser una de las herramientas importantes a aplicar a través del futuro Servicio de Biodiversidad de Áreas Protegidas. A través de estos monitoreos se podrán comparar datos relevantes en el análisis de los indicadores de variabilidad genética, evaluar tendencias y proporcionar indicadores de salud genética de las poblaciones.
2. La recopilación de información genética deberá incluir fundamentalmente: el número de poblaciones genéticamente distintas dentro de un rango geográfico respecto a datos históricos en lo posible. Y comprender la diversidad genética dentro y entre las poblaciones y el tamaño efectivo de la o las poblaciones.

3. Conocer el estado del patrimonio genético presente en las especies amenazadas en Chile servirá para esclarecer problemas de conservación más amplios (e.g, efectos antropogénicos como la fragmentación, efectos de la historia demográfica, aumento de la conectividad e hibridación, entre otros), información que es clave en las decisiones de conservación.

## Capítulo 2:

1. La diferenciación poblacional de *P.irwini* en la cuenca del Biobío está determinada por efectos de la estructura jerárquica y longitudinal de los ríos en la cuenca, pero también por dos tipos de barreras generales: la barrera natural Salto del Laja y las barreras artificiales.
2. Las barreras naturales y las plantas hidroeléctricas con embalse impiden el movimiento de *P. irwini* río arriba en el cauce principal del río Biobío, reduciendo estas últimas drásticamente el flujo de genes río arriba y promoviendo la divergencia poblacional por efecto de la barrera.
3. Las barreras de las centrales hidroeléctricas de pasada (del río Laja), permiten la conectividad de las poblaciones sin efectos visibles en la diferenciación poblacional.
4. La presencia de una secuencia de barreras infranqueables, el cambio consecuente en las características del hábitat físico, son probablemente responsables del caso de extirpación poblacional en el área de extirpación 2 (EA2) y de la drástica reducción en el tamaño efectivo poblacional estimado en BC (entre Pangué y Angostura).

5. El alto flujo génico y tamaño efectivo poblacional en los sitios de Renaico y Malleco (población RM sin fragmentación por centrales hidroeléctricas) revelan la gran capacidad de movimiento de *P. irwini* en zonas sin fragmentación.

### Capítulo 3:

- 1) La especie *P. irwini* fue detectada habitando en toda la cuenca del Biobío y sus haplotipos están presentes también en Itata. Al mismo tiempo, *P. gillissi* está restringida a los tramos más al norte de la cuenca y su distribución se limita al sur con el Salto del Itata. Tales distribuciones difieren de las actualmente reconocidas para estas especies en estas cuencas, por lo que futuros muestreos al sur del Biobío y al norte del Itata son recomendados para en un futuro redefinir el rango de distribución de ambas especies.
- 2) El estudio también reveló una complejidad intraespecífica en la diversidad de haplotipos dentro de *P. gillissi*, lo que sugiere la existencia de una forma aún no descrita de *Percilia* spp. en esta región. La adecuada identificación y delimitación de los rangos de distribución de estas especies será muy necesaria para el diseño de iniciativas de conservación.
- 3) Los individuos restantes que exhiben cierto grado de hibridación (F2 o retrocruzas de *P. gillissi* x F1) y que se encuentran en ambas cuencas sugieren una barrera reproductiva incompleta entre *Percilia gillissi* y *Percilia irwini*, con *P. irwini* como ancestro materno. La hibridación es un proceso que se observa con frecuencia en ambientes alterados antropogénicamente, por lo tanto, las

políticas de conservación deben diseñarse para reducir la hibridación natural cuando es facilitada por el hombre.

- 4) Finalmente, la identificación de *P. irwini* y *P. gillissi* basada únicamente en la morfología es un desafío debido al número de caracteres morfológicos superpuestos utilizados para la identificación de especies.

Para concluir se sugiere 1) una mayor investigación sobre las historias de vida *Percilia* spp. que habitan las cuencas los ríos Biobío e Itata, y toda la distribución del género, incluida su capacidad de natación, así como sobre el diseño de pasos de peces para el mantenimiento de la conectividad de las poblaciones especialmente en el río Biobío. Se requieren esfuerzos de colaboración que involucren a biólogos taxónomos, genetistas e ingenieros para mejorar nuestra comprensión de la distribución y diversidad dentro de este grupo y la mejora de la conectividad actual. También sugerimos 2) la inclusión de análisis genéticos como parte de una línea de base obligatoria, que ayudará a monitorear el estado genético de las poblaciones a través de indicadores de variabilidad genética (e.g, diversidad haplotípica, riqueza de alelos, flujo de genes,  $F_{ST}$ , tamaño efectivo de la población, entre otros) antes, durante y después de la vida de útil de los futuros proyectos. Con tales medidas implementadas, eventualmente, será posible discernir qué cambios en la diversidad genética es probable que hayan tenido lugar y luego tomar las medidas de conservación in situ necesarias para salvaguardar la diversidad genética en las poblaciones en riesgo.

## 9. GLOSARIO GENÉTICO

Extraído de Allendorf et al. (2013)

1. **Alelo:** forma alternativa de un gen.
2. **Aislamiento por distancia:** caso en el que la diferenciación genética es mayor cuanto más alejados están los individuos (o poblaciones) entre sí, porque el flujo de genes disminuye a medida que aumenta la distancia geográfica. Originalmente utilizado cuando los individuos se distribuyen de manera continua y no se subdividen en poblaciones locales discretas por barreras al flujo de genes.
3. **Barcoding:** uso de una secuencia corta de ADN para una estandarizada región del genoma para ayudar a descubrir, caracterizar y distinguir especies y asignarlas individuos no identificados a una especie.
4. **Depresión endogámica:** reducción relativa en la aptitud de la progenie dado apareamientos entre individuos emparentados en comparación con la progenie de individuos no emparentados.
5. **Depresión exogámica:** la reducción de la aptitud de la progenie en comparación con los tipos parentales, dado el apareamiento entre individuos genéticamente distantes.
6. **Diversidad genética:** es el componente más básico de la biodiversidad, se refiere a las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie, en

condiciones naturales más o menos estables. En ese contexto la genética de poblaciones y la evolución son las disciplinas que se ocupan de entender, describir y dar las pautas para que la diversidad genética se comprenda, se proteja y se conserve.

7. **Divergencia genética:** el cambio evolutivo en la frecuencia de alelos entre poblaciones.
8. **Deriva génica:** cambios aleatorios en las frecuencias de los alelos en una población entre generaciones debido al muestreo de individuos que se convierten en padres y al muestreo binomial de alelos durante la meiosis. la deriva genética es más pronunciada en poblaciones pequeñas.
9. **Equilibrio de Hardy-Weinberg:** un estado en el que las proporciones de genotipos de una población son iguales a las esperadas con la distribución binomial.
10. **Endogamia:** apareamiento entre individuos emparentados que resulta en un aumento de homocigosidad en la progenie porque poseen alelos que son idénticos por descendencia.
11. **Enjambre híbrido:** una población de individuos que son todos híbridos mediante un número variable de generaciones de retrocruzamiento con tipos parentales y apareamientos entre híbridos.
12. **Fitness:** la habilidad de un individuo o genotipo a sobrevivir y producir descendencia viable. Cuantificado como el número o relativo a la proporción de descendencia contribuida a la siguiente generación.



13. **F<sub>ST</sub>**: el aumento proporcional de la homocigosidad a través de la subdivisión de la población. A veces, el F<sub>ST</sub> se denomina índice de fijación.
14. **Flujo génico**: intercambio de información genética entre demes a través de la migración.
15. **Genética del paisaje**: estudio de la influencia del paisaje o las características ambientales en la genética de las poblaciones.
16. **Genotipo**: la composición genética de un organismo.
17. **Heterocigosidad**: una medida de variación genética que estima la proporción observada o esperada de individuos en una población que son heterocigotos.
18. **Heterocigoto**: un organismo que tiene diferentes alelos en un locus.
19. **Hibridación**: apareamiento exitoso entre individuos de dos linajes genéticamente diferentes. Puede ser interespecífica (es decir, entre diferentes especies), intraespecífica (es decir, entre poblaciones divergentes de la misma especie) o involucrar subespecies.
20. **Haploide**: la condición en la que una célula o individuo tiene una copia de cada cromosoma.
21. **Haplotipo**: la combinación de alelos en los loci que se encuentran en un solo cromosoma o molécula de ADN mitocondrial.
22. **Introgresión**: la incorporación de genes de una población a otra a través de la hibridación que da como resultado una descendencia fértil que se hibrida y retrocruza aún más con las poblaciones parentales.
23. **Locus**: la posición de un gen u otro marcador en un cromosoma.

24. **Principio de Hardy-Weinberg:** principio de que las frecuencias de alelos y genotipos alcanzarán el equilibrio en proporciones binominales después de una generación y permanecerán constantes en grandes poblaciones con apareamiento aleatorio que no experimentan migración, mutación, selección o apareamiento no aleatorio.
25. **Riqueza de alelos:** una medida del número de alelos por locus.
26. **Rescate genético:** el aumento de la aptitud y el tamaño de la población tras la introducción de nuevos alelos por hibridación.
27. **Tamaño efectivo de la población:** el tamaño de una población ideal que debería experimentar el mismo monto de deriva génica como una población observada.
28. **Variabilidad genética:** se refiere a la diversidad en las frecuencias de los genes. La variabilidad genética puede referirse a las diferencias entre individuos o las diferencias entre poblaciones. Las mutaciones son la causa fundamental de la variabilidad genética, pero mecanismos tales como la reproducción sexual y la deriva genética también contribuyen a la misma.
29. **Vigor híbrido:** la condición en la que la descendencia híbrida (generalmente F1) muestra una mayor aptitud en relación con sus padres.
30. **Zona híbrida:** área de simpatría entre dos poblaciones genéticamente distintas donde la hibridación ocurre sin formar un enjambre híbrido en ninguna de las poblaciones parentales más allá del área de coincidencia.

## 10. REFERENCIAS

- Abbasi T, Abbasi SA (2011) Small hydro and the environmental implications of its extensive utilization. *Renew Sustain Energy Rev* 15:2134–2143. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.050>
- Abdurakhmonov IY (2016) Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights. In: *Microsatellite Markers*. InTech, p 15
- Al-Samarai FR, Al-Kazaz AA (2015) Molecular Markers: an Introduction and Applications. *Eur J Mol Biotechnol* 9:118–130. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Allan DJ, Castillo MM (2007) *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. Second Edition. Springer
- Allendorf FW, F. LR, Paul S, John KW (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613–622. [https://doi.org/DOI:10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/DOI:10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN (2013) *Conservation and the Genetics of Populations*, Second edi. Wiley-Blackwell
- Amaral S V., Bevelhimer MS, Čada GF, et al (2015) Evaluation of Behavior and Survival of Fish Exposed to an Axial-Flow Hydrokinetic Turbine. *North Am J Fish Manag* 35:97–113. <https://doi.org/10.1080/02755947.2014.982333>
- Anderson D, Moggridge H, Warren P, Shucksmith J (2015a) The impacts of “run-of-river” hydropower on the physical and ecological condition of rivers. *Water Environ J* 29:268–276. <https://doi.org/10.1111/wej.12101>
- Anderson D, Moggridge H, Warren P, Shucksmith J (2015b) The impacts of ‘run-of-river’ hydropower on the physical and ecological condition of rivers. *Water Environ J* 29:268–276. <https://doi.org/10.1111/wej.12101>
- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217–1229. [https://doi.org/10.1175/1520-0442\(1992\)0052.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(1992)0052.0.CO;2)

- Anderson EP, Freeman MC, Pringle CM (2006) Ecological consequences of hydropower development in Central America: impacts of small dams and water diversion on neotropical stream fish assemblages. *River Res Appl* 22:397–411. <https://doi.org/10.1002/rra.899>
- Araya-Jaime C, Lam Pastén N, Vila Pinto I, et al (2017) Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Comp Cytogenet* 11:463–475
- Argentina JE, Angermeier PL, Hallerman EM, Welsh SA (2018) Spatial extent of analysis influences observed patterns of population genetic structure in a widespread darter species (Percidae). *Freshw Biol* 63:1185–1198. <https://doi.org/10.1111/fwb.13106>
- Arratia G (1982) A Review of Freshwater Percoids from South America (Pisces, Osteichthyes, Perciformes, Percichthyidae, and Peciliidae). *Abh senckenb naturforsch Ges* 15:1–52
- Arratia G, Quezada-Romegialli C (2019) The South American and Australian percichthyids and peciliids. What is new about them? *Neotrop Ichthyol* 17:.. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180102>
- Arratia G, Rojas G, Chang A (1981) Géneros de peces de aguas continentales de Chile. Santiago, Chile
- Arriagada P, Dieppois B, Sidibe M, Link O (2019) Impacts of Climate Change and Climate Variability on Hydropower Potential in Data-Scarce Regions Subjected to Multi-Decadal Variability. *Energies* 12:.. <https://doi.org/doi:10.3390/en12142747www.mdpi.com/journal/energies>
- Arroyo MTK, Marquet P, Marticorena, Clodomiro Simonetti J, et al (2006) El hotspot chileno, prioridad mundial para la conservación. *Divers Chile patrimonios y desafíos* 90–95
- Bailey JK, Schweitzer JA, Úbeda F, et al (2009) From genes to ecosystems: A synthesis of the effects of plant genetic factors across levels of organization. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:1607–1616. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0336>
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11:155–165.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x>

- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Banks SC, Cary GJ, Smith AL, et al (2013) How does ecological disturbance influence genetic diversity? *Trends Ecol Evol* 28:670–679. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.005>
- Baranzelli MC, Johnson LA, Cosacov A, Sérsic AN (2014) Historical and ecological divergence among populations of *Monttea chilensis* (Plantaginaceae), an endemic endangered shrub bordering the Atacama Desert, Chile. *Evol Ecol* 28:751–774. <https://doi.org/10.1007/s10682-014-9694-y>
- Barreto SB, Knowles LL, Affonso PRA de M, Batalha-Filho H (2020) Riverscape properties contribute to the origin and structure of a hybrid zone in a Neotropical freshwater fish. *J Evol Biol* 33:1530–1542. <https://doi.org/10.1111/jeb.13689>
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool* 83:481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- Barton NH, Gale KS (1993) Genetic Analysis of Hybrid Zones. In: Harrison RG (ed) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Inc., New York, p 364
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* 16:113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
- Bastías E, Choque-Ayaviri E, Flores J, et al (2020) Genetic diversity and population structure of the Chilean native, *Tillandsia landbeckii* (Bromeliaceae), from the Atacama Desert. *Rev Mex Biodivers* 91:
- Berger-Tal O, Blumstein DT, Swaisgood RR (2020) Conservation translocations: a review of common difficulties and promising directions. *Anim Conserv* 23:121–131. <https://doi.org/10.1111/acv.12534>
- Bernatchez L (2016) On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes. *J Fish Biol* 89:2519–2556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfb.13145>
- Blazek R, Polacik M, Reichard M (2013) Rapid growth, early maturation and short

- generation time in African annual fishes. *Evodevo* 4:24.  
<https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-24>
- Boizard J, Magnan P, Angers B (2009) Effects of dynamic landscape elements on fish dispersal: The example of creek chub (*Semotilus atromaculatus*). *Mol Ecol* 18:430–441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04044.x>
- Bond MJ, Jones NE, Haxton TJ (2016) Growth and Life History Patterns of a Small-bodied Stream Fish, *Cottus cognatus*, in Hydropeaking and Natural Rivers of Northern Ontario. *River Res Appl* 32:721–733. <https://doi.org/10.1002/rra.2886>
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331
- Boulton AJ, Ekeboom J, Gíslason G már (2016) Integrating ecosystem services into conservation strategies for freshwater and marine habitats: a review. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 26:963–985. <https://doi.org/10.1002/aqc.2703>
- Bozkurt D, Rojas M, Boisier JP, Valdivieso J (2017) Climate change impacts on hydroclimatic regimes and extremes over Andean basins in central Chile. *Hydrol Earth Syst Sci Discuss* 2017:1–29. <https://doi.org/10.5194/hess-2016-690>
- Brinker A, Behrmann-Godel J, Basen T, et al (2018) River damming drives population fragmentation and habitat loss of the threatened Danube streber ( *Zingel streber* ): Implications for conservation. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 28:587–599. <https://doi.org/10.1002/aqc.2878>
- Brooks C.P. (2003) A Scalar Analysis of Landscape Connectivity. *Oikos* 102:433-439 (7 pages). <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0579.2003.11511.x>
- Brown SM, Harrisson KA, Clarke RH, et al (2013) Limited Population Structure, Genetic Drift and Bottlenecks Characterise an Endangered Bird Species in a Dynamic, Fire-Prone Ecosystem. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059732>
- Bruder A, Tonolla D, Schweizer SP, et al (2016) A conceptual framework for hydropeaking mitigation. *Sci Total Environ* 568:1204–1212. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.032>
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards S V. (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol Evol*

18:249–256. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00018-1)

- Campos, H., Ruiz, V.H., Gavilán JF & FA (1993) Peces del Río Bío-Bío. Serie Publicaciones de Divulgación EULA. Universidad de Concepción, Chile
- Carrea C, Barriga JP, Cussac VE, Ruzzante DE (2012) Genetic and phenotypic differentiation among *Galaxias maculatus* populations in a Patagonian postglacial lake system. *Biol J Linn Soc* 107:368–382. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01939.x>
- Carroll EL, Bruford MW, DeWoody JA, et al (2018) Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evol Appl* 11:1094–1119. <https://doi.org/10.1111/eva.12600>
- Carvalho Gomes L, Pessali TC, Sales NG, et al (2015) Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica* 143:581–588. <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9856-z>
- Carvalho SB, Brito JC, Crespo EJ, Possingham HP (2011) Incorporating evolutionary processes into conservation planning using species distribution data: A case study with the western Mediterranean herpetofauna. *Divers Distrib* 17:408–421. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00752.x>
- CBD (2021) List of Parties. <https://www.cbd.int/information/parties.shtml>
- Chan KO, Grismer LL, Brown RM (2018) Comprehensive multi-locus phylogeny of Old World tree frogs (Anura: Rhacophoridae) reveals taxonomic uncertainties and potential cases of over- and underestimation of species diversity. *Mol Phylogenet Evol* 127:1010–1019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.07.005>
- Chan WY, Hoffmann AA, van Oppen MJH (2019) Hybridization as a conservation management tool. *Conserv Lett* 12:1–11. <https://doi.org/10.1111/conl.12652>
- Chen X, Sullivan PF (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. 77–96
- Cid P, Aguirre C, Sánchez MÁ, et al (2017) An Internet-based platform for the estimation of outcrossing potential between cultivated and Chilean vascular plants. *Ecol Evol* 7:2480–2488. <https://doi.org/10.1002/ece3.2854>
- Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, Taberlet P (2016) From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Mol Ecol* 25:1423–1428.



<https://doi.org/10.1111/mec.13549>

- Coleman RA, Weeks AR, Hoffmann AA (2013) Balancing genetic uniqueness and genetic variation in determining conservation and translocation strategies: A comprehensive case study of threatened dwarf galaxias, *Galaxiella pusilla* (Mack) (Pisces: Galaxiidae). *Mol Ecol* 22:1820–1835. <https://doi.org/10.1111/mec.12227>
- Corporación Reguemos Chile (2021) Reguemos Chile. <http://www.reguemoschile.cl/>
- Costello AB, Down TE, Pollard SM, et al (2003) The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: An examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution* (N Y) 57:328–344. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00267.x>
- Cox AJ, Hebert PDN (2001) Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol Ecol* 10:371–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01188.x>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Darwall W, Bremerich V, De Wever A, et al (2018) The Alliance for Freshwater Life: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 28:1015–1022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aqc.2958>
- Davis MA, Douglas MR, Collyer ML, Douglas ME (2016) Deconstructing a Species-Complex: Geometric Morphometric and Molecular Analyses Define Species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS One* 11:e0146166
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85:407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- De Groot RS, Wilson MA, Boumans RMJ (2002) A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecol Econ* 41:393–408. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(02)00089-7)
- De Kort H, Prunier JG, Ducatez S, et al (2021) Life history, climate and biogeography interactively affect worldwide genetic diversity of plant and animal populations. *Nat*



Commun 12:

- Dedual M (2007) Survival of Juvenile Rainbow Trout Passing through a Francis Turbine. *North Am J Fish Manag* 27:181–186. <https://doi.org/10.1577/M05-174.1>
- Dehais C, Eudeline R, Berrebi P, Argillier C (2010) Microgeographic genetic isolation in chub (Cyprinidae: *Squalius cephalus*) population of the Durance River: Estimating fragmentation by dams. *Ecol Freshw Fish* 19:267–278. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00411.x>
- Demaria EMC, Maurer EP, Thrasher B, et al (2013) Climate change impacts on an alpine watershed in Chile: Do new model projections change the story? *J Hydrol* 502:128–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.08.027>
- Des Roches S, Pendleton LH, Shapiro B, Palkovacs EP (2021) Conserving intraspecific variation for nature's contributions to people. *Nat Ecol Evol* 5:574–582
- DGA DG de A (2013) Modelación Hidrogeológica Cuenca Itata-Bajo, Región del Biobío
- DGA DG de A (2004) Diagnostico y Clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad de agua según objetivos de calidad: Cuenca del río Biobío. pp 1–185
- Dias MS, Cornu J-F, Oberdorff T, et al (2013) Natural fragmentation in river networks as a driver of speciation for freshwater fishes. *Ecography (Cop)* 36:683–689. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07724.x>
- Díaz G, Arriagada P, Górski K, et al (2019) Fragmentation of Chilean Andean rivers: expected effects of hydropower development. *Rev Chil Hist Nat* 92:1. <https://doi.org/10.1186/s40693-019-0081-5>
- Diaz VBM (2020) Evidencias hidrológicas y geomorfológicas de cambios en los estilos fluviales de la cuenca del río Laja, VIII región del Biobío, Chile. Universidad Andrés Bello
- Dirección General de Aguas (2004a) Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad: Cuenca del río Bío Bío
- Dirección General de Aguas (2012) Estudio Hidrogeológico cuenca Bio Bio tomo I, informe final y planos
- Dirección General de Aguas (2004b) Diagnostico y Clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad: Cuenca del río Itata. Gob Chile, Minist

obras públicas y Dir obras Hidráulicas 1–127

- Dixon HJ, Murphy MD, Sparks SJ, et al (1999) The geology of Nevados de Chillán volcano, Chile. *Rev geol* 26:227–253
- Donoso G, Montero JP, Meza F, Vicuña S (2013) Adaptación a los impactos del cambio climático en la agricultura de riego en Chile central
- Durance I, Bruford MW, Chalmers R, et al (2016) *The Challenges of Linking Ecosystem Services to Biodiversity: Lessons from a Large-Scale Freshwater Study*, 1st edn. Elsevier Ltd.
- Dyer B (2000) Systematic Review and Biogeography of the Freshwater Fishes of Chile. *Estud Ocean* 19:77–98. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Earl DA, vonHoldt BM (2012a) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Earl DA, vonHoldt BM (2012b) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Elphinstone MS, Hinten GN, Anderson MJ, Nock CJ (2003) An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Mol Ecol Notes* 3:317–320. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00397.x>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fabres F (2010) Dos siglos en riego en Chile
- Fagan WF (2002) Connectivity, fragmentation, and extinction risk in dendritic metapopulations. *Ecology* 83:3243–3249. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3243:CFAERI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3243:CFAERI]2.0.CO;2)

- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:487–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574–578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- FAO/DVWK (2002) Fish passes – Design, dimensions and monitoring Published. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Faulks LK, Gilligan DM, Beheregaray LB (2011) The role of anthropogenic vs. natural in-stream structures in determining connectivity and genetic diversity in an endangered freshwater fish, Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Evol Appl* 4:589. <https://doi.org/10.1111/J.1752-4571.2011.00183.X>
- Figueroa E, Simonetti J (2003) Globalización y Biodiversidad: Oportunidades y desafíos para la sociedad chilena. *Rev. Ambient. y Desarro.* 73–74
- Finch C, Pine WE, Limburg KE (2015) Do Hydropeaking Flows Alter Juvenile Fish Growth Rates? A Test with Juvenile Humpback Chub in the Colorado River. *River Res Appl* 31:156–164. <https://doi.org/10.1002/rra.2725>
- Fisher RA (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford
- Flannigan MD, Krawchuk MA, De Groot WJ, et al (2009) Implications of changing climate for global wildland fire. *Int J Wildl Fire* 18:483–507. <https://doi.org/10.1071/WF08187>
- 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. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299. <https://doi.org/10.1071/ZO9660275>
- Frankham R (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol Conserv* 143:1919–1927. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.011>
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126:131–140.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>

Frankham R, Ballou JD, Ralls K, et al (2017) Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations. Oxford University Press., Oxford

Frankham R, Bradshaw CJA, Brook BW (2014) Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol Conserv* 170:56–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.036>

Freeman MC, Bowen ZH, Bovee KD, Irwin ER (2001) Flow and Habitat Effects on Juvenile Fish Abundance in Natural and Altered Flow Regimes. *Ecol Appl* 11:179.  
<https://doi.org/10.2307/3061065>

Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, et al (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol Evol* 27:480–488.  
<https://doi.org/10.1016/J.TREE.2012.04.012>

Funk DJ, Omland KE (2003) Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:397–423.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>

García A, Jorde K, Habit E, et al (2011) Downstream environmental effects of dam operations: Changes in habitat quality for native fish species. *River Res Appl* 27:312–327. <https://doi.org/10.1002/rra.1358>

García A, Sobenes C, Link O, Habit E (2012) Marine and Freshwater Behaviour and Physiology Bioenergetic models of the threatened darter *Percilia irwini*. 37–41.  
<https://doi.org/10.1080/10236244.2012.668283>

Gasith A, Resh VH (1999) Streams in Mediterranean Climate Regions: Abiotic Influences and Biotic Responses to Predictable Seasonal Events Author ( s ): Avital Gasith and Vincent H . Resh Source : Annual Review of Ecology and Systematics , Vol . 30 ( 1999 ), pp . 51-81 Published. *Ecology* 30:51–81

Genovart M (2009) Natural hybridization and conservation. *Biodivers Conserv* 18:1435–1439. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9550-x>

Golden H, Holsinger K, Deegan L, et al (2021) River drying influences genetic variation and population structure in an Arctic freshwater fish. *Conserv Genet* 22:.

<https://doi.org/10.1007/s10592-021-01339-0>

- González-Wevar C, Salinas P, Hüne M, et al (2015) Contrasting Genetic Structure and Diversity of *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) Along the Chilean Coast: Stock Identification for Fishery Management. *J Hered* 2015:439–447. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv005>
- Gonzalez J (2014) Phylogenetic position of the most endangered Chilean bird: The Masafuera Rayadito (*Aphrastura masafuerae*; Furnariidae). *Trop Conserv Sci* 7:677–689. <https://doi.org/10.1177/194008291400700407>
- Goodwin BJ (2003) Is landscape connectivity a dependent or independent variable? *Landsc Ecol* 18:687–699. <https://doi.org/DOI:10.1023/B:LAND.0000004184.03500.a8>
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet J. (1995) FSTAT Version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485–486
- Gouin N, Bertin A, Espinosa MI, et al (2019) Pesticide contamination drives adaptive genetic variation in the endemic mayfly *Andesiops torrens* within a semi-arid agricultural watershed of Chile. *Environ Pollut* 255:113099. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113099>
- Gousskov A, Reyes M, Wirthner-Bitterlin L, Vorburger C (2016) Fish population genetic structure shaped by hydroelectric power plants in the upper Rhine catchment. *Evol Appl* 9:394–408. <https://doi.org/10.1111/eva.12339>
- Grabenstein KC, Taylor SA (2018) Breaking Barriers: Causes, Consequences, and Experimental Utility of Human-Mediated Hybridization. *Trends Ecol Evol* 33:198–212. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.12.008>
- Guindon S, Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52:696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Habit E, Belk MC (2007) Threatened fishes of the world: *Percilia irwini* (Eigenmann 1927) (Perciliidae). *Environ Biol Fishes* 78:213–214. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-0014-4>
- Habit E, Belk MC, Parra O (2007) Response of the riverine fish community to the

- construction and operation of a diversion hydropower plant in central Chile. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 17:37–49. <https://doi.org/10.1002/aqc.774>
- Habit E, Bertrán C, Arévalo S, Victoriano P (1998) Benthonic fauna of the Itata river and irrigation canals (Chile). *Irrig Sci* 18:91–99. <https://doi.org/10.1007/s002710050049>
- Habit E, Dyer B, Vila I (2006) Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana (Concepción)* 70:100–113. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Habit E, García A, Díaz G, et al (2019a) River science and management issues in Chile: Hydropower development and native fish communities. *River Res Appl* 35:489–499. <https://doi.org/10.1002/rra.3374>
- Habit E, Gonzalez J, Ruzzante DE, Walde SJ (2012) Native and introduced fish species richness in Chilean Patagonian lakes: inferences on invasion mechanisms using salmonid-free lakes. *Divers Distrib* 18:1153–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00906.x>
- Habit E, Górski K, Alò D, et al (2019b) Biodiversidad de ecosistemas de agua dulce
- Habit E, Parra O (2001) Impacto ambiental de los canales de riego sobre la fauna de peces. *Ambient y Desarro XVII*:50–58
- Habit E, Victoriano P, Parra O (2002) Translocación de peces nativos en la cuenca del río Laja (Región del Biobío, Chile). *Gayana (Concepción)* 66:181–190
- Haig SM, Miller MP, Bellinger R, et al (2016) The conservation genetics juggling act: Integrating genetics and ecology, science and policy. *Evol Appl* 9:181–195. <https://doi.org/10.1111/eva.12337>
- Hancock KJ, Sovacool BK (2018) International Political Economy and Renewable Energy: Hydroelectric Power and the Resource Curse. *Int Stud Rev* 20:615–632. <https://doi.org/10.1093/isr/vix058>
- Hanks RD, Hartman KJ (2018) Evaluation of the Influences of Dam Release Types, Land Use, and Habitat Affecting Abundance, Richness, Diversity, and Community Structure of Larval and Juvenile Fish. *Can J Fish Aquat Sci.* <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0107>
- Hanski I (2011) Habitat Loss, the Dynamics of Biodiversity, and a Perspective on Conservation. *Ambio* 40:248–255. <https://doi.org/10.1007/s13280-011-0147-3>



- Hanski I, Gaggiotti OE (2004) Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations. Elsevier Academic Press
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surv Evol Biol* 7:69–128
- Hasler CT, Mossop B, Patterson DA, et al (2012) Swimming activity of migrating Chinook salmon in a regulated river. *Aquat Biol*. <https://doi.org/10.3354/ab00460>
- Hata H, Uemura Y, Ouchi K, Matsuba H (2019) Hybridization between an endangered freshwater fish and an introduced congeneric species and consequent genetic introgression. *PLoS One* 14:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212452>
- Hauer C, Holzapfel P, Leitner P, Graf W (2017) Longitudinal assessment of hydropeaking impacts on various scales for an improved process understanding and the design of mitigation measures. *Sci Total Environ* 575:1503–1514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.031>
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, et al (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *PNAS* 99:11742–11747
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, et al (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 270 (Suppl:S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Zakharov E V., et al (2016) Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 371:. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0333>
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2:. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hendry AP, Lohmann LG, Conti E, et al (2010) Evolutionary biology in biodiversity

- science, conservation, and policy: A call to action. *Evolution* (N Y) 64:1517–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00947.x>
- Herrera R, Arias M, Moya-leon MA, et al (2005) Genetic Variation in a Chilean Endangered Endemic: *Gomortega keule* (molina) Baillon. *Biodivers Conserv* 14:2871–2881. <https://doi.org/10.1007/s10531-004-0221-2>
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913. <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Hewitt GM (1988) Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol Evol* 3:158–167. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90033-X)
- Hoban S, Bruford M, D'Urban Jackson J, et al (2020) Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol Conserv* 248:108654. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654>
- Hofmeister NR, Werner SJ, Lovette IJ (2021) Environmental correlates of genetic variation in the invasive European starling in North America. *Mol Ecol* 30:1251–1263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.15806>
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nat Rev Genet* 10:639–650. <https://doi.org/10.1038/nrg2611>
- Horreo JL, Martinez JL, Ayllon F, et al (2011) Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshw Biol* 56:2567–2579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02682.x>
- Hu M, Hua Q, Zhou H, et al (2015) The effect of dams on the larval abundance and composition of four carp species in key river systems in China. *Environ Biol Fishes* 98:1201–1205. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0342-8>
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Yang and Rannala*
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, et al (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11:609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Hughes JM, Schmidt DJ, Finn DS (2009) Genes in streams: Using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *Bioscience* 59:573–583. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.7.8>



- Ibañez A, Cowx I, O'Higgins P (2007) Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. *Can J Fish Aquat Sci* 64:1091–1100. <https://doi.org/10.1139/F07-075>
- IUCN (2021) The River Bank. <https://www.iucn.org/theme/species/our-work/freshwater-biodiversity/global-projects/river-bank>
- Jackson JM, Pimsler ML, Oyen KJ, et al (2018) Distance, elevation and environment as drivers of diversity and divergence in bumble bees across latitude and altitude. *Mol Ecol* 27:2926–2942. <https://doi.org/10.1111/mec.14735>
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Jamieson IG, Allendorf FW (2012) How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends Ecol Evol* 27:578–584. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.001>
- Jesus T, Formigo N, Santos P, Tavares GR (2004) Impact evaluation of the Vila Viçosa small hydroelectric power plant (Portugal) on the water quality and on the dynamics of the benthic macroinvertebrate communities of the Ardena river. *Limnetica* 23:241–256
- Jones NE, Petreman IC (2015) Environmental Influences on Fish Migration in a Hydropeaking River. *River Res Appl* 31:1109–1118. <https://doi.org/10.1002/rra.2810>
- Jorquera-Jaramillo C, Vega JMA, Aburto J, et al (2012) Conservación de la biodiversidad en Chile: Nuevos desafíos y oportunidades en ecosistemas terrestres y marinos costeros. *Rev Chil Hist Nat* 85:267–280. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2012000300002>
- Junker J, Peter A, Wagner CE, et al (2012) River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). *Conserv Genet* 13:545–556. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0306-x>
- Katopodis C, Kells JA, Acharya M (2001) Nature-like and conventional fishways: Alternative concepts? *Can Water Resour J* 26:211–232.

<https://doi.org/10.4296/cwrj2602211>

- Kelly B, Smokorowski KE, Power M (2017) Impact of river regulation and hydropeaking on the growth, condition and field metabolism of Brook Trout ( *Salvelinus fontinalis* ). *Ecol Freshw Fish* 26:666–675. <https://doi.org/10.1111/eff.12310>
- King AJ, O'Connor JP (2007) Native fish entrapment in irrigation systems: A step towards understanding the significance of the problem. *Ecol Manag Restor* 8:
- Koizumi I (2011) Integration of ecology, demography and genetics to reveal population structure and persistence: A mini review and case study of stream-dwelling Dolly Varden. *Ecol Freshw Fish* 20:352–363. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00480.x>
- Koizumi I, Yamamoto S, Maekawa K (2006) Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling Dolly Varden charr. *Mol Ecol* 15:3175–3189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03019.x>
- Korman J, Campana SE (2009) Effects of Hydropeaking on Nearshore Habitat Use and Growth of Age-0 Rainbow Trout in a Large Regulated River. *Trans Am Fish Soc* 138:76–87. <https://doi.org/10.1577/T08-026.1>
- Laborde A, González A, Sanhueza C, et al (2016) Hydropower Development, Riverine Connectivity, and Non-sport Fish Species: criteria for Hydraulic Design of Fishways. *River Res Appl* 32:1949–1957. <https://doi.org/10.1002/rra.3040>
- Laborde A, Habit E, Link O, Kemp P (2020) Strategic methodology to set priorities for sustainable hydropower development in a biodiversity hotspot. *Sci Total Environ* 714:136735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136735>
- Lacy SN, Meza FJ, Marquet PA (2017) Can environmental impact assessments alone conserve freshwater fish biota? Review of the Chilean experience. *Environ Impact Assess Rev* 63:87–94. <https://doi.org/10.1016/J.EIAR.2016.12.006>
- Laikre L, Allendor FW, Aroner LC, et al (2010a) Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity. *Conserv Biol* 24:86–88. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01425.x>
- Laikre L, Hoban S, Bruford MW, et al (2020) Post-2020 goals overlook genetic diversity. *Science (80- )* 367:2–5

- Laikre L, Larsson LC, Palmé A, et al (2008) Potentials for monitoring gene level biodiversity: Using Sweden as an example. *Biodivers. Conserv.* 17:893–910
- Laikre L, Lundmark C, Jansson E, et al (2016) Lack of recognition of genetic biodiversity: International policy and its implementation in Baltic Sea marine protected areas. *Ambio* 45:661–680. <https://doi.org/10.1007/s13280-016-0776-7>
- Laikre L, Nilsson T, Primmer CR, et al (2009) Importance of Genetics in the Interpretation of Favourable Conservation Status. *Conserv Biol* 23:1378–1381. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01360.x>
- Laikre L, Schwartz MK, Waples RS, et al (2010b) Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends Ecol Evol* 25:520–529
- Lavoué S, Nakayama K, Jerry DR, et al (2014) Mitogenomic phylogeny of the Percichthyidae and Centrarchiformes (Percomorphaceae): Comparison with recent nuclear gene-based studies and simultaneous analysis. *Gene* 549:46–57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.033>
- Lazzaro G, Basso S, Schirmer M, Botter G (2013) Water management strategies for run-of-river power plants: Profitability and hydrologic impact between the intake and the outflow. *Water Resour Res* 49:8285–8298. <https://doi.org/10.1002/2013WR014210>
- Leder EH, André C, Le Moan A, et al (2020) Post-glacial establishment of locally adapted fish populations over a steep salinity gradient. *J Evol Biol* 34:138–156. <https://doi.org/10.1111/jeb.13668>
- Legendre P, Anderson MJ (1999) Distance-based Redundancy Analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol Monogr* 69:1–24. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1999\)069\[0001:DBRATM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1999)069[0001:DBRATM]2.0.CO;2)
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, et al (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liermann CR, Nilsson C, Robertson J, Ng RY (2012) Implications of Dam Obstruction

- for Global Freshwater Fish Diversity. *Bioscience* 62:539–548.  
<https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.6.5>
- Link O, Habit E (2015) Requirements and boundary conditions for fish passes of non-sport fish species based on Chilean experiences. *Rev Environ Sci Bio/Technology* 14:9–21. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9357-z>
- Losos JB, Parent CE (2009) The speciation–area relationship. In: Losos, J. B. and Ricklefs RE (eds) (ed) *The theory of island biogeography revisited*. Princeton Univ. Press, pp 415–438
- Lott MJ, Wright BR, Kemp LF, et al (2020) Genetic Management of Captive and Reintroduced Bilby Populations. *J Wildl Manage* 84:20–32.  
<https://doi.org/10.1002/jwmg.21777>
- Luck GW, Daily GC, Ehrlich PR (2003) Population diversity and ecosystem services. *Trends Ecol Evol* 18:331–336. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00100-9)
- Luikart G, England PR, Tallmon D, et al (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* 4:981–994.  
<https://doi.org/10.1038/nrg1226>
- Lundmark C, Sandström A, Andersson K, Laikre L (2019) Monitoring the effects of knowledge communication on conservation managers' perception of genetic biodiversity – A case study from the Baltic Sea. *Mar Policy* 99:223–229.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.10.023>
- Maciel-Mata CA, Manríquez-Morán N, Octavio-Aguilar P, Sánchez-Rojas G (2015) El area de distribución de las especies: revisión del concepto. *Acta Univ* 25:3–19
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol* 18:189–197.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Mardones Flores M (2002) Evolución morfogenética de la hoya del río Laja y su incidencia en la geomorfología. *Rev Geográfica Chile Terra Aust Nro* 47:97–127
- Marengo JA, Jones R, Alvesa LM, Valverde MC (2009) Future change of temperature and precipitation extremes in South America as derived from the PRECIS regional climate modeling system. *Int J Climatol* 2241–2255
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively

- filter gene introgression between species. *Evolution* (N Y) 55:1325–1335. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00655.x>
- Mccracken GR, Perry R, Keefe D, Ruzzante DE (2013) Hierarchical population structure and genetic diversity of lake trout (*Salvelinus namaycush*) in a dendritic system in Northern Labrador. *Freshw Biol.* <https://doi.org/10.1111/fwb.12179>
- McNeely JA, Miller KR, Reid W V., et al (1990) Conserving the world's biological diversity
- Meldgaard T, Nielsen EE, Loeschcke V (2003) Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conserv Genet* 4:735–747. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000006115.14106.de>
- Miller AD, Roxburgh SH, Shea K (2011) How frequency and intensity shape diversity-disturbance relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5643–5648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018594108>
- Milne DJ, Jackling FC, Sidhu M, Appleton BR (2009) Shedding new light on old species identifications: Morphological and genetic evidence suggest a need for conservation status review of the critically endangered bat, *Saccolaimus saccolaimus*. *Wildl Res* 36:496–508. <https://doi.org/10.1071/WR08165>
- Mimura M, Yahara T, Faith DP, et al (2017) Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evol Appl* 10:121–139. <https://doi.org/10.1111/eva.12436>
- Ministerio de Energía (2015) Hoja de Ruta 2050: Hacia una energía sustentable e inclusiva para Chile
- Ministerio de Energía (2016) Estudio de Cuencas. Análisis de las condicionantes para el desarrollo hidroeléctrico en las cuencas del Maule, Biobío, Toltén, Valdivia, Bueno, Puelo, Yelcho, Palena, Cisnes, Aysén, Baker y Pascua. Santiago
- Ministerio de Energía C (2021) Hidroelectricidad sustentable. <http://www.hidroelectricidadsustentable.gob.cl/hidroenergia/importancia>
- Ministerio de Medio Ambiente (2019) Inventario nacional de especies de Chile. In: Chile. <http://especies.mma.gob.cl/CNMWeb/Web/WebCiudadana/Default.aspx>
- Miraldo A, Li S, Borregaard MK, et al (2016) An Anthropocene map of genetic diversity.

Science (80- ) 353:

- Morales P, Vila Pinto I, Poulin E (2018) Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conserv Genet* 12:1639–1643
- Moreira M, Hayes DS, Boavida I, et al (2019) Ecologically-based criteria for hydropeaking mitigation: A review. *Sci Total Environ* 657:1508–1522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.107>
- Moreno R. H, Varela B. J (1985) *Geología, volcanismo y sedimentos piroclásticos cuaternarios de la región central y sur de Chile*
- Morita K, Morita SH, Yamamoto S (2009) Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: Lessons from white-spotted charr in Japan. *Ecol Res* 24:711–722. <https://doi.org/10.1007/s11284-008-0579-9>
- Moritz C (2002) Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. *Syst Biol* 51:238–254. <https://doi.org/10.1080/10635150252899752>
- Moritz C (1994) Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends Ecol & Evol* 9:373--375
- Morrissey MB, de Kerckhove DT (2009) The Maintenance of Genetic Variation Due to Asymmetric Gene Flow in Dendritic Metapopulations. *Am Nat* 174:875–889. <https://doi.org/10.1086/648311>
- Muñoz-Ramírez CP, Habit E, Unmack PJ, et al (2016) Low genetic diversity in *Diplomystes camposensis*, an endemic and endangered catfish from South Chile. *Zool Stud* 55:1–14. <https://doi.org/10.6620/ZS.2016.55-16>
- Muñoz-Ramírez CP, Victoriano PF, Habit E (2015) Inter-basin dispersal through irrigation canals explains low genetic structure in *Diplomystes cf. chilensis*, an endangered freshwater catfish from Central Chile. *Limnologica* 53:10–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.limno.2015.04.004>
- Muñoz-Rojas P, Quezada-Romegialli C, Véliz D (2012) Isolation and characterization of ten microsatellite loci in the catfish *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae), with cross-amplification in seven Trichomycterinae species. *Conserv Genet Resour* 4:443–445. <https://doi.org/DOI: 10.1007/s12686-011-9569->



- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858
- Nagrodski A, Raby GD, Hasler CT, et al (2012) Fish stranding in freshwater systems: Sources, consequences, and mitigation. *J Environ Manage* 103:133–141. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.007>
- Nardi CF, Sánchez J, Fernández DA, et al (2020) Detection of lamprey in Southernmost South America by environmental DNA (eDNA) and molecular evidence for a new species. *Polar Biol* 43:369–383. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02640-3>
- Neraas LP, Spruell P (2001) Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Mol Ecol* 10:1153–1164. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01269.x>
- Nichols JD, Williams BK (2006) Monitoring for conservation. *Trends Ecol Evol* 21:668–673. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.007>
- Nielsen EE, Hansen MM, Loeschcke V (1997) Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Mol Ecol* 6:487–492. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00204.x>
- Nogueira C, Buckup PA, Menezes NA, et al (2010) Restricted-Range fishes and the conservation of Brazilian freshwater. *PloS one* 5:e11390
- Otto SP (2018) Adaptation, speciation and extinction in the Anthropocene. *Proc R Soc B Biol Sci* 285:. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2047>
- Ovidio M, Capra H, Philippart J-C (2008) Regulated discharge produces substantial demographic changes on four typical fish species of a small salmonid stream. *Hydrobiologia* 609:59–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9399-8>
- Paish O (2002) Micro-hydropower: Status and prospects. *Proc Inst Mech Eng Part A J Power Energy* 216:31–40. <https://doi.org/10.1243/095765002760024827>
- Palsbøll PJ, Bérubé M, Allendorf FW (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol Evol* 22:11–16. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.003>
- Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. *Population genetic*

- software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28:2537–9.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Perez-Quezada J (2018) Metodologías aplicadas para la conservación de la biodiversidad en Chile. Santiago
- Petty JT, Grossman GD (2007) Size-Dependent Territoriality of Mottled Sculpin in a Southern Appalachian Stream. *Trans Am Fish Soc* 136:1750–1761.  
<https://doi.org/10.1577/T06-034.1>
- Piedra P, Habit E, Oyanedel A, et al (2012) Patrones de desplazamiento de peces nativos en el Río San Pedro (cuenca del Río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)* 76:59–70. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382012000100006>
- Pierson JC, Coates DJ, Oostermeijer JGB, et al (2016) Genetic factors in threatened species recovery plans on three continents. *Front Ecol Environ* 14:433–440.  
<https://doi.org/10.1002/fee.1323>
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, et al (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *J Hered* 95:536–539.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esh074>
- Poblete Y, Soto GE, Campagna L, et al (2020) Deforestation patterns shape population structure of the Magellanic Woodpecker (*Campephilus magellanicus*) in southern Chile. *Avian Conserv Ecol* 15:. <https://doi.org/10.5751/ACE-01692-150219>
- Porter TM, Hajibabaei M (2018) Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Mol Ecol* 27:313–338.  
<https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Pressey RL (2004) Conservation Planning and Biodiversity : Assembling the Best Data for the Job. *Conserv Biol* 18:1677–1681
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959
- Prunier JG, Dubut V, Loot G, et al (2018) The relative contribution of river network structure and anthropogenic stressors to spatial patterns of genetic diversity in two



- freshwater fishes: A multiple-stressors approach. *Freshw Biol* 63:6–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/fwb.13034>
- Quezada-Romegialli C, Guerrero JC, Véliz Baeza D, Vila Pinto I (2016) The complete mitochondrial genome of the endemic and threatened killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) from the High Andes. *27:2798–2799*
- Radic JP (2010) Las cuencas cenozoicas y su control en el volcanismo de los Complejos Nevados de Chillan y Copahue-Callaqui (Andes del Sur, 36-39°S). *Andean Geol* 37:220–246
- Raeymaekers JAM, Maes GE, Geldof S, et al (2008) Modeling genetic connectivity in sticklebacks as a guideline for river restoration. *Evol Appl* 1:475–488. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00019.x>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* 80:756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rambaut A (2006) FigTree: tree figure drawing tool version 1.4.4.
- Rannala B (2007) BayesAss Edition 3.0 User's Manual. 12
- Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, et al (2019) Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol Rev* 94:849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Reid SM, Wilson CC, Mandrak NE, Carl LM (2008) Population structure and genetic diversity of black redbreast (Moxostoma duquesnei) in a highly fragmented watershed. *Conserv Genet* 9:531–546. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9367-2>
- Roberts JH, Angermeier PL, Hallerman EM (2013) Distance, dams and drift: What structures populations of an endangered, benthic stream fish? *Freshw Biol* 58:2050–2064. <https://doi.org/10.1111/fwb.12190>
- Rocaspana R, Aparicio E, Vinyoles D, Palau A (2016) Effects of pulsed discharges from a hydropower station on summer diel feeding activity and diet of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) in an Iberian stream. *J Appl Ichthyol* 32:190–197. <https://doi.org/10.1111/jai.13022>
- Rosenberg DM, Berkes F, Bodaly RA, et al (1997) Large-scale impacts of hydroelectric

- development. *Environ Rev* 5:27–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/a97-001>
- Rosenberg NA (2004a) DISTRUCT : a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Rosenberg NA (2004b) DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Rosenfield JA (2002) Pattern and Process in the Geographical Ranges of Freshwater Fishes. *Glob Ecol Biogeograp* 11:323–332
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219–1228
- Ruiz VH, Marchant M (2004) Ictiofauna de aguas continentales Chilenas. Universidad de Concepción, Chile, Concepción
- Ruzzante DE, McCracken GR, Salisbury SJ, et al (2019) Landscape, colonization, and life history: their effects on genetic diversity in four sympatric species inhabiting a dendritic system. *Can J Fish Aquat Sci* 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0416>
- Ruzzante DE, Simons AP, McCracken GR, et al (2020) Multiple drainage reversal episodes and glacial refugia in a Patagonian fish revealed by sequenced microsatellites: Drainage reversals revealed by genomics. *Proc R Soc B Biol Sci* 287:1–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0468>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Cussac VE, et al (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Mol Ecol* 15:2949–2968. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03010.x>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, et al (2008) Climate control on ancestral population dynamics: Insight from Patagonian fish phylogeography. *Mol Ecol* 17:2234–2244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03738.x>
- Ruzzante DE, Walde SJ, Macchi PJ, et al (2011) Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: The roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biol J Linn Soc* 103:514–529. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01682.x>

- Ryman N, Palm S, André C, et al (2006) Power for detecting genetic divergence: Differences between statistical methods and marker loci. *Mol Ecol* 15:2031–2045. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02839.x>
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, et al (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* (80- ) 287:1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- Sanches A, Galetti PM, Galzerani F, et al (2012) Estructura genética poblacional de dos especies de peces migratorios de agua dulce (*Brycon orthotaenia* y *Prochilodus argenteus*) en la cuenca del Río San Francisco (Brasil) y su importancia para la conservación. *Lat Am J Aquat Res* 40:177–186. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-17>
- Sandoval Jeria J (2003) El riego en Chile. Gob Chile, Minist obras públicas y Dir obras Hidráulicas 94
- Scherson RA, Albornoz AA, Moreira-Muñoz AS, Urbina-Casanova R (2014) Endemicity and evolutionary value: a study of Chilean endemic vascular plant genera. *Ecol Evol* 4:806–816. <https://doi.org/10.1002/ece3.960>
- Schlotterer C (2004) The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5:63–69
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007a) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol Evol* 22:25–33. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.08.009>
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007b) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol Evol* 22:25–33. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.08.009>
- Scruton DA, Ollerhead LMN, Clarke KD, et al (2003) The behavioural response of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental hydropeaking on a Newfoundland (Canada) river. *River Res Appl* 19:577–587. <https://doi.org/10.1002/rra.733>
- Seeb JE, Carvalho G, Hauser L, et al (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Mol Ecol Resour* 11:1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02979.x>

- Seehausen O, Takimoto G, Roy D, Jokela J (2008) Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Mol Ecol* 17:30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03529.x>
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615–629
- Shafer ABA, Wolf JBW, Alves PC, et al (2015) Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends Ecol Evol* 30:78–87. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.009>
- Sheridan AK (1995) The genetic impacts of human activities on wild fish populations. *Rev Fish Sci* 3:91–108. <https://doi.org/10.1080/10641269509388568>
- Skujina I, Ougham H, Evans E, et al (2021) Ecological and Genetic Monitoring of a Recently Established Osprey (*Pandion haliaetus*) Population in Wales. *J Raptor Res*. <https://doi.org/10.3356/JRR-20-87>
- Slice D (2007) Geometric Morphometrics. *Annu Rev Anthropol* 36:. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.34.081804.120613>
- Smith TA, Kraft CE (2005) Stream Fish Assemblages in Relation to Landscape Position and Local Habitat Variables. *Trans Am Fish Soc* 134:430–440. <https://doi.org/10.1577/t03-051.1>
- Solberg KH, Bellemain E, Drageset OM, et al (2006) An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biol Conserv* 128:158–168. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.025>
- Steffen W, Richardson K, Rockstrom J, et al (2015) Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* (80- ) 347:1–12
- Stelkens RB, Jaffuel G, Escher M, Wedekind C (2012) Genetic and phenotypic population divergence on a microgeographic scale in brown trout. *Mol Ecol* 21:2896–2915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05581.x>
- Stockwell CA, Leberg PL (2002) Ecological genetics and the translocation of native fishes: Emerging experimental approaches. *West North Am Nat* 62:32–38
- Suarez M, Emparan C (1995) The stratigraphy, geochronology and paleophysiography of a Miocene fresh-water interarc basin, southern Chile. *J South Am Earth Sci* 8:17–31. [https://doi.org/10.1016/0895-9811\(94\)00038-4](https://doi.org/10.1016/0895-9811(94)00038-4)

- Takayama K, López Sepúlveda P, Kohl G, et al (2013) Development of microsatellite markers in *Robinsonia* (Asteraceae) an endemic genus of the Juan Fernández Archipelago, Chile. *Conserv Genet Resour* 5:63–67. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9734-2>
- Taylor G, Canessa S, Clarke RH, et al (2017a) Is Reintroduction Biology an Effective Applied Science? *Trends Ecol Evol* 32:873–880. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.08.002>
- Taylor HR, Dussex N, van Heezik Y (2017b) Bridging the conservation genetics gap by identifying barriers to implementation for conservation practitioners. *Glob Ecol Conserv* 10:231–242. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2017.04.001>
- Taylor HR, Harris WE (2012) An emergent science on the brink of irrelevance: A review of the past 8years of DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 12:377–388. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03119.x>
- Taylor MK, Hasler CT, Findlay CS, et al (2014) Hydrologic correlates of Bull trout (*Salvelinus confluentus*) swimming activity in a hydropeaking river. *River Res Appl* 30:756–765. <https://doi.org/10.1002/rra.2673>
- Thiele R, Moreno H, Elgueta S, et al (1998) Evolución geológico-geomorfológica cuaternaria del tramo superior del valle del río Laja. *Rev geológica Chile* 25:229–253. <https://doi.org/10.4067/S0716-02081998000200007>
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol Conserv* 183:4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Toews DPL, Brelford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol Ecol* 21:3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
- Tonkin JD, Heino J, Altermatt F (2018) Metacommunities in river networks: The importance of network structure and connectivity on patterns and processes. *Freshw Biol* 63:1–5. <https://doi.org/10.1111/fwb.13045>
- Torres-Florez JP, Johnson WE, Nery MF, et al (2018) The coming of age of conservation genetics in Latin America: what has been achieved and what needs to be done. *Conserv Genet* 19:1–15. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1006-y>

- Turner MG (2010) Disturbance and landscape dynamics in a changing world. *Ecology* 91:2833–2849
- Universidad de Chile (2016) Informe País: Estado del Medio Ambiente en Chile. Comparación 1999-2015.
- Urban MC (2015) Accelerating extinction risk from climate change. *Science* (80- ) 348:
- Valdivinos C, Parra O (2006) La Cuenca del Río Biobío Historia Natural de un Ecosistema de uso Múltiple. Publicaciones Cent EULA | 1–25
- Valenzuela-Aguayo F, McCracken GR, Manosalva A, et al (2019) Human-induced habitat fragmentation effects on connectivity, diversity, and population persistence of an endemic fish, *Percilia irwini*, in the Biobío River basin (Chile). *Evol Appl* 13:1–14. <https://doi.org/10.1111/eva.12901>
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vanhaecke D, de Leaniz CG, Gajardo G, et al (2012) DNA barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered galaxiid fishes. *PLoS One* 7:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032939>
- Vanhaecke D, Garcia de Leaniz C, Gajardo G, et al (2015) Genetic signatures of historical dispersal of fish threatened by biological invasions: the case of galaxiids in South America. *J Biogeogr* 42:1942–1952. <https://doi.org/10.1111/jbi.12568>
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, et al (1980) The River Continuum Concept. *Can J Fish Aquat Sci* 37:130–137. <https://doi.org/10.1139/f80-017>
- Vega-Retter C, Muñoz-Rojas P, Rojas-Hernández N, et al (2020) Dammed river: Short- and long-term consequences for fish species inhabiting a river in a Mediterranean climate in central Chile. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 30:2254–2268. <https://doi.org/10.1002/aqc.3425>
- Vega-Retter C, Véliz D (2014) Liver transcriptome characterization of the endangered freshwater silverside *Basilichthys microlepidotus* (Teleostei: Atherinopsidae) using next generation sequencing. *Mar Genomics* 18:147–150. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.margen.2014.10.004>
- Vera-Escalona I, Habit E, Ruzzante DE (2015) Echoes of a distant time: Effects of



- historical processes on contemporary genetic patterns in *Galaxias platei* in Patagonia. *Mol Ecol* 24:4112–4128. <https://doi.org/10.1111/mec.13303>
- Vera-Escalona I, Habit E, Ruzzante DE (2019) Invasive species and postglacial colonization: their effects on the genetic diversity of a Patagonian fish. *Proc R Soc B Biol Sci* 286:20182567. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2567>
- Victoriano PF, Victoriano PF, Vera I, et al (2012) Patrones idiosincráticos de diversidad genética de peces nativos del Río San Pedro (Cuenca del Río Valdivia), un sistema de la región glaciada del sur de Chile. *Gayana (Concepción)*
- Vicuña S, Garreaud RD, McPhee J (2011) Climate change impacts on the hydrology of a snowmelt driven basin in semiarid Chile. *Clim Change* 105:469–488. <https://doi.org/10.1007/s10584-010-9888-4>
- Vivancos A, Górski K, Manosalva A, et al (2020) Hydrological connectivity drives longitudinal movement of endangered endemic Chilean darter *Percilia irwini* (Eigenmann, 1927). *J Fish Biol* 98:. <https://doi.org/10.1111/jfb.14554>
- Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, et al (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467:555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25:2165–2176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200305922>
- Waples RS, Do C (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol Appl* 3:244–262. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x>
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for indentifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* 15:1419–1439
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol Ecol Resour* 9:1077–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x>
- West R, Potter S, Taggart D, Eldridge MDB (2018) Looking back to go forward: genetics

- informs future management of captive and reintroduced populations of the black-footed rock-wallaby *Petrogale lateralis*. *Conserv Genet* 19:235–247. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1030-y>
- Wheat RE, Allen JM, Miller SDL, et al (2016) Environmental DNA from residual saliva for efficient noninvasive genetic monitoring of brown bears (*Ursus arctos*). *PLoS One* 11:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165259>
- Whiteley AR, Spruell P, Allendorf FW (2004) Ecological and life history characteristics predict population genetic divergence of two salmonids in the same landscape. *Mol Ecol* 13:3675–3688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02365.x>
- Wilkes MA, Webb JA, Pompeu PS, et al (2018) Not just a migration problem: Metapopulations, habitat shifts, and gene flow are also important for fishway science and management. *River Res Appl*. <https://doi.org/10.1002/rra.3320>
- Willoughby JR, Sundaram M, Wijayawardena BK, et al (2015) The reduction of genetic diversity in threatened vertebrates and new recommendations regarding IUCN conservation rankings. *Biol Conserv* 191:495–503. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.025>
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163:1177–91
- Wilson KH (1995) Molecular Biology as a Tool for Taxonomy. *Clin Infect Dis* 20:S117–S121. [https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement\\_2.S117](https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement_2.S117)
- Wotton BM, Nock CA, Flannigan MD (2010) Forest fire occurrence and climate change in Canada. *Int J Wildl Fire* 19:253–271. <https://doi.org/10.1071/WF09002>
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97–159
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15:323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Wultsch C, Caragiulo A, Dias-Freedman I, et al (2016) Genetic Diversity and Population Structure of Mesoamerican Jaguars (*Panthera onca*): Implications for Conservation and Management. *PLoS One* 11:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162377>
- Yang W, Kang X, Yang Q, et al (2013) Review on the development of genotyping



- methods for assessing farm animal diversity. *J Anim Sci Biotechnol* 4:2–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>
- Yang Z, Rannala B (2014) Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Mol Biol Evol* 31:3125–3135. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu279>
- Yu D, Ding X, Zhang Z, et al (2020) Correction to: Microsatellite records for volume 10, issue 2 (*Conservation Genetics Resources*, (2018), 10, 2, (269-276), 10.1007/s12686-018-1046-8). *Conserv. Genet. Resour.* 12:155–156
- Yu D, Ding X, Zhang Z, et al (2018) Microsatellite records for volume 10, issue 2. *Conserv Genet Resour* 10:269–276. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1046-8>
- Zamora L, Vila A, Naspleda J (2009) Separata del capítulo 15, La biota de los ríos: los peces. In: Elosegi A, Sabater S (eds) *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*, Primera. p 23
- Zemlak TS, Walde SJ, Habit EM, Ruzzante DE (2011) Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: The influence of glacial cycling. *Mol Ecol* 20:5280–5294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05352.x>
- Zhan L, Paterson IG, Fraser BA, et al (2017) megasat: automated inference of microsatellite genotypes from sequence data. *Mol Ecol Resour* 17:247–256. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12561>
- Zhao L, Chenoweth EL, Liu J, Liu Q (2016) Effects of dam structures on genetic diversity of freshwater fish *Sinibrama macrops* in Min River, China. *Biochem Syst Ecol* 68:216–222. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.07.022>
- Zimmerman JKH, Letcher BH, Nislow KH, et al (2010) Determining the effects of dams on subdaily variation in river flows at a whole-basin scale. *River Res Appl* 26:1246–1260. <https://doi.org/10.1002/rra.1324>
- Zunino M, Zullini A (2003) *Biogeografía: La dimensión espacial de la evolución*, Segunda. Fondo de cultura Económica, Mexico