



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Historia de vida del salmón coho
(*Oncorhynchus kisutch*), el último salmónido
invasor detectado en Patagonia**

Tesis para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Joaquín Nicolás Reibel

Director de tesis: Tomás Chalde

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos Acuáticos, CADIC-CONICET, Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.

25 Septiembre 2023

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	14
CAPÍTULO 1	15
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Obtención de ADN	18
Diseño de cebadores	19
Programa PCR	21
RESULTADOS CAPITULO 1	23
Diseño <i>in-silico</i>	23
Cebadores	23
Comprobación in vitro	25
CONCLUSIONES CAPÍTULO 1	27
CAPÍTULO 2	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Sitios de muestreo	29
Captura de individuos	31
Lectura de escamas	35
Modelo estadístico	37
Registro de temperaturas	38
Permisos	38
RESULTADOS CAPÍTULO 2	39
DISCUSIÓN	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMEN

Una de las mayores amenazas para la conservación de la biodiversidad a escala global son las invasiones biológicas. Los salmónidos (truchas y salmones) se encuentran entre las especies de peces exóticas más invasoras de todo el mundo. En Argentina y Chile existen poblaciones establecidas de truchas marrón (*Salmo trutta*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) desde principios del siglo XIX. Por otro lado, recién en el año 2006 se registró la primera población establecida de salmón Chinook (*O. tshawytscha*) en Tierra del Fuego y en el año 2018 se obtuvieron las primeras evidencias de poblaciones establecidas de salmón coho (*O. kisutch*). Ambas especies se caracterizan por presentar una morfología similar, siendo frecuente identificar erróneamente los juveniles de una y otra especie, dificultando el estudio de sus poblaciones. Por eso, el primer objetivo de este trabajo fue desarrollar un método molecular sencillo para identificar las especies de los salmones presentes en Tierra del Fuego. Se diseñó una PCR-multiplex que permite amplificar de manera diferencial una zona conservada del genoma mitocondrial de ambas especies. Como segundo objetivo se prepuso documentar la distribución de salmón coho en ríos de Tierra del Fuego y caracterizar su historia de vida. Se realizaron muestreos mediante electropesca en enero y febrero de 2020, logrando capturar juveniles en ocho ríos (Lapataia, Olivia, Almanza, Lasifashaj, Varela, Cambaceres, Moat, Negro). Se registraron las tallas de los individuos, obteniendo tallas mínimas en el río Negro ($L_f = 29,9 \pm 1,0$ mm) y máximas en el río Almanza ($L_f = 92,4 \pm 2,3$ mm). Para detectar diferencias en las tasas de crecimiento de los individuos se extrajeron escamas y se midió el espacio *intercirculi*. Los peces de los ríos Varela, Cambaceres y Moat mostraron mayores espacios *intercirculi*, indicando una mayor tasa de crecimiento que los individuos encontrados en los otros ríos. Finalmente, se registraron las temperaturas de los ríos Lapataia y Almanza durante un año para estimar la relación entre la dinámica térmica de estos ríos y la historia de vida de los salmones. Las temperaturas máximas se registraron en febrero en ambos ríos (12,3°C), y las mínimas en agosto/septiembre para el río Lapataia (3,6°C) y en junio/julio para el río Almanza (0,2°C). Estas diferencias térmicas podrían explicar las diferencias en las tasas de desarrollo temprano del salmón coho en cada río. La presencia de esta especie invasora podría dar lugar a nuevos tipos de interacción (competencia y/o depredación) con las especies nativas de Tierra del Fuego.

ABSTRACT

Life history of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), the last invasive salmonid detected in Patagonia

One of the greatest threats to biodiversity conservation on a global scale is biological invasions. Salmonids (trout and salmon) are among the most invasive fish species worldwide. In Argentina and Chile there are established populations of brown trout (*Salmo trutta*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*), and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) since the beginning of the 19th century. Besides, it was not until 2006 that the first established population of Chinook salmon (*O. tshawytscha*) was recorded in Tierra del Fuego and, in 2018, the first evidence of established populations of coho salmon (*O. kisutch*) were obtained. Both species are characterized by presenting a similar morphology, and it is common to misidentify the juveniles of one species and the other, making it difficult to study their populations. Therefore, the first objective of this work was to develop a simple molecular method to identify the salmon species present in Tierra del Fuego. For this, a PCR-multiplex was designed that allows differential amplification of a conserved region of the mitochondrial genome of both species. As a second objective, we set out to document the distribution of coho salmon in rivers of Tierra del Fuego and to characterize the life history of each population found. Fish samplings were carried out in January and February 2020 through electrofishing, managing to capture juveniles in eight rivers (Lapataia, Olivia, Almanza, Lasifashaj, Varela, Cambaceres, Moat, Negro), all with their mouths towards the Beagle Channel. The sizes of the individuals were recorded, obtaining minimum sizes in the Negro River ($L_f = 29.9 \pm 1.0$ mm) and maximum sizes in the Almanza River ($L_f = 92.4 \pm 2.3$ mm). To detect differences in the growth rates of the individuals, scales were extracted and the *intercirculi* space was measured. The fish inhabiting the Varela, Cambaceres and Moat rivers showed larger *intercirculi* spaces, indicating a higher growth rate than the individuals found in the other rivers. Finally, the temperatures of the Lapataia and Almanza rivers were recorded with automatic recorders for one year to estimate the relationship between the thermal dynamics of these rivers and the life history of coho salmon. The maximum temperatures were registered in February in both rivers (12.3°C), and the minimum in August/September for the Lapataia River (3.6°C) and in June/July for the Almanza River (0.2°C). These thermal differences could explain the differences in early development rates of coho salmon in each river. The presence of this invasive

species could give rise to new types of interaction (competition and/or predation) with the native species of Tierra del Fuego.

La introducción de salmónidos exóticos en Argentina y Chile data de finales del siglo XIX (Pascual y col. 2004). A fines del 1800' se llevaron a cabo una serie de exploraciones en diversos ambientes acuáticos de la Patagonia, las cuales concluyeron que los lagos de origen glaciar y sus ríos caudalosos, alimentados por deshielo, ofrecían condiciones apropiadas para el establecimiento de distintas especies de salmónidos (Baigún y col. 1985). Así, en el año 1904, el Estado argentino impulsó, mediante el Ministerio de Agricultura de la Nación, la importación de ovas de salmónidos desde el hemisferio norte con el fin de establecer poblaciones silvestres en lagos y ríos de la Patagonia y desarrollar la acuicultura, así como también la pesca recreativa (Videla 1978; Welcomme 1988; Figura 2). Posteriormente, el establecimiento de criaderos en distintas localidades de la región fue lo que facilitó las actividades de siembra en varias cuencas fluviales de la Patagonia, logrando el establecimiento y expansión de estas especies (Pascual y col. 2004).



Figura 2: Carreta utilizada para transportar, entre la ciudad de Neuquén y San Carlos de Bariloche (Río Negro), los primeros embriones de salmónidos llegados al país en el año 1904. Tomado de Videla (1978).

En la provincia de Tierra del Fuego (TDF), los primeros intentos de introducir salmónidos fueron realizados por John Goodall en 1931 y por el Gobernador Mariano Loedel junto a la Dirección Técnica del Médico Veterinario Bruno Videla, creando la Estación de Piscicultura Río Olivia en la ciudad de Ushuaia el 16 de agosto de 1974 (Figura 3). Según los registros de la estación de piscicultura, entre los años 1931 y 1978 se realizaron siembras de trucha marrón (*Salmo trutta*, Linnaeus 1758), trucha de arroyo o fontinalis (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill 1814), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), y salmón del Atlántico (*Salmo salar*, Linnaeus 1758). Estas siembras fueron divididas en tres etapas; 1931-1937 realizadas por el particular John Goodall, 1944-1968 transportando ovas desde San Carlos de Bariloche hasta San Antonio Oeste en tren y luego desde esa locación hasta Río Grande, Tierra del Fuego, en avión postal, y finalmente entre 1976-1978 a cargo de la Estación de Piscicultura Río Olivia, confirmándose posteriormente el establecimiento de poblaciones de trucha marrón, arcoíris y fontinalis (Tabla 1).

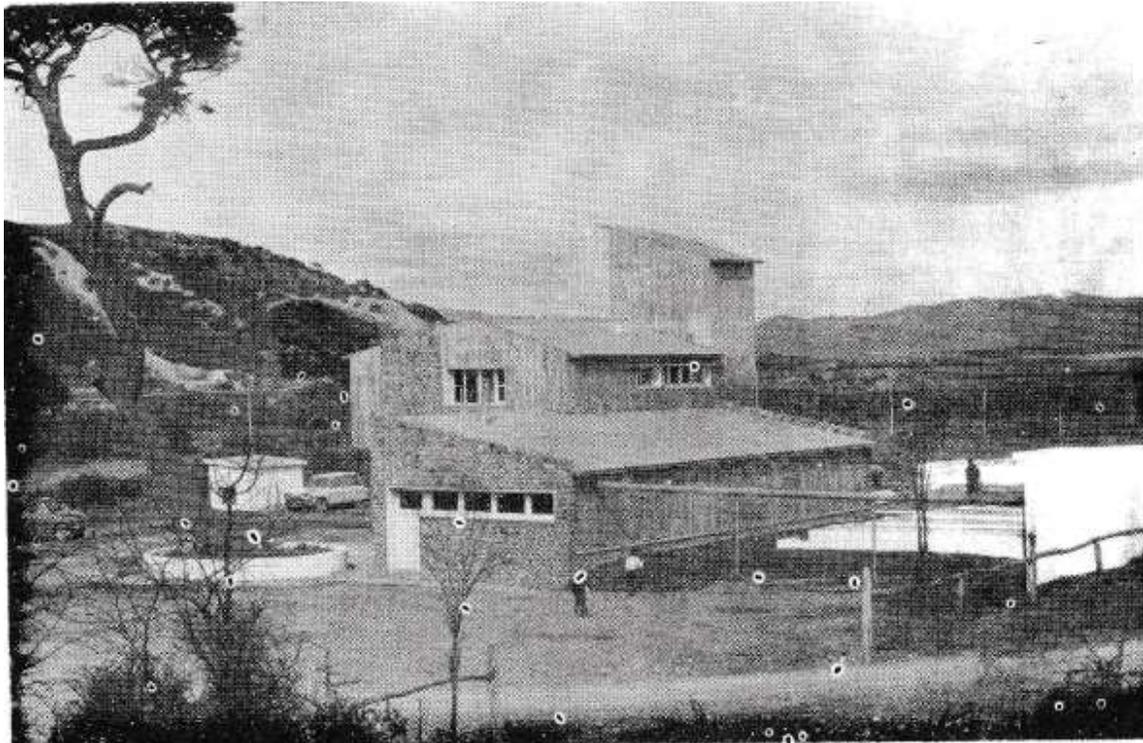


Figura 3: Vista de la piscicultura Río Olivia de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego, en 1974. Tomado de Videla (1978).

De un total de 15 especies de salmónidos exóticos introducidos en la Patagonia, al menos 11 se han establecido formando poblaciones autosuficientes tanto en Argentina como en Chile siendo la trucha arco iris, trucha marrón, y trucha de arroyo las que han logrado una mayor expansión (Pascual y col. 2007; Sandoval 2014).

Tabla 1: Recopilación cronológica de siembras de salmónidos en Tierra del Fuego efectuadas desde la Estación de Piscicultura Río Olivia (Tomado de Videla 1978).

Fecha	Especies (cantidad de peces)				Ambientes
	<i>S. salar</i>	<i>O. mykiss</i>	<i>S. fontinalis</i>	<i>S. trutta</i>	
26/02/1968		700	700	730	Río San Pablo y afluentes Lasifashaj
11/01/1976		440			Laguna Victoria
		176			Laguna Will
		100	100	76	Arroyo Tierra Mayor
31/01/1977	584				Río Moat
		500	500	651	Arroyo Grande
		1.140			Río Lasifashaj
				1.500	Laguna Victoria
		1.600			Arroyo Tierra Mayor
		3.240			Arroyo Remolino
12/01/1978					Río Rasmussen
				725	Río Menéndez
	400				Río Grande
13/01/1978	640			826	Río Rasmussen
					Río Moneta
13/01/1978		428		828	Río Moat
				400	Río Moneta
					Río Moneta
				680	Río Moat
			1.020	Río Remolino	

En contraste con el éxito de las introducciones de las truchas, los primeros esfuerzos a principios del 1900s para establecer poblaciones de salmón coho, salmón del Atlántico y salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum, 1792) no prosperaron (Davidson y Hutchinson 1938; Sandercock 1991). Otros intentos fallidos de introducción de salmón coho también ocurrieron en América del Norte, Europa y Asia, lo que muestra la baja capacidad invasiva de esta especie en comparación con otros salmónidos (Sandercock 1991). Sin embargo, el enorme desarrollo de la salmonicultura chilena en sistemas abiertos como el *sea-ranching* y las jaulas de cultivo abierto desde la década de 1980s ha sido una fuente continua de presión de propágulos tanto de salmón coho como de salmón Chinook y de salmón del Atlántico (Sepúlveda y col. 2009; Arismendi y col. 2014; Figura

4). Se estima que la tasa de escapes de estas especies en Chile alcanzaría los 4,4 millones de individuos por año (Niklitschek y col. 2013), lo cual llevó a Habit y col. (2014) a proponer que, si los escapes de la industria del salmón seguían aumentando, esta especie podría establecerse en el sur de Chile debido a la presencia de hábitats óptimos para su desarrollo.

Las consecuencias de estos escapes y el éxito en el establecimiento de estas tres especies de salmones han sido muy diferentes. En este sentido, el salmón Chinook se ha establecido y dispersado en varias cuencas patagónicas desde 1979 (Correa y Gross 2008; Chalde y col. 2019; Figueroa-Muñoz y col. 2023), mientras que, hasta el momento, no se han reportado poblaciones establecidas de salmón del Atlántico anádromo en la Patagonia.

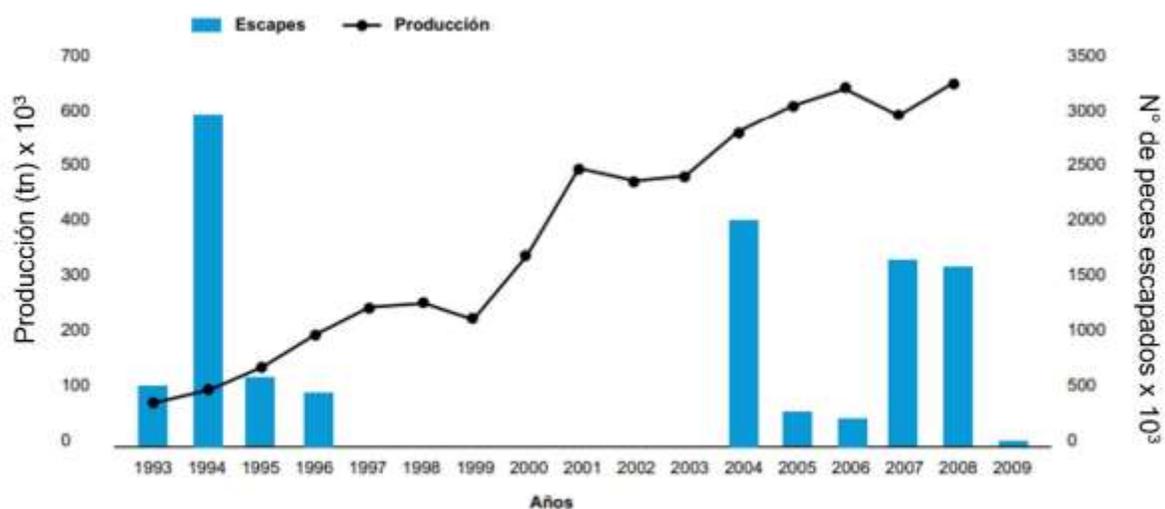


Figura 4: Producción anual y número de salmónidos (salmón del Atlántico, coho y trucha arcoíris) escapados en Chile. Tomado de Sepúlveda y col. (2009).

Varios autores han propuesto que tanto el salmón coho como el salmón del Atlántico son las especies de salmónidos con menor potencial para establecer poblaciones autosustentables en ríos de la Patagonia (Soto y col. 2006; 2022; Sepúlveda y col. 2013; Arismendi y col. 2014). Existiría una presión negativa del ambiente generando temporadas de desoves más tempranas que en las áreas donde son originarios y existiendo además una fuerte competencia e interacciones con especies ya establecidas

como por ejemplo la trucha arcoíris. Por otro lado, es posible que los procesos de selección histórica a los que fueron sometidos los planteles de reproductores de salmón coho para producción acuícola hayan reducido la plasticidad fenotípica de estas especies y, por lo tanto, la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes, disminuyendo el éxito de la invasión. Sin embargo, el gran número de individuos de salmón coho escapados de la salmonicultura chilena (Sepúlveda y col. 2013; Arismendi y col. 2014), su dieta generalista incluyendo la capacidad de consumir peces y crustáceos nativos (Soto y col. 2001; Niklitschek y col. 2013), y la existencia de eventos reproductivos en el área (Niklitschek y Aedo 2002) podrían favorecer las probabilidades de transformarse en una especie invasora en la Patagonia.

En el año 2016 se publicaron datos sobre las primeras evidencias de poblaciones de salmón coho establecidas en la región de Aysén, Chile (Górski y col. 2016). Posteriormente, Maldonado y col. (2020) reportaron la captura de juveniles en el río Róbalo ubicado en la Isla Navarino (Chile), el cual desemboca hacia la costa sur del Canal Beagle. El primer registro de la presencia de salmónes coho en TDF data del año 2007, cuando se capturó un individuo adulto en el río Lapataia, dentro del Parque Nacional Tierra del Fuego (Fernández y col. 2010). Sin embargo, estos autores no reportaron la presencia de juveniles o de actividad reproductiva, por lo que se estima que este registro corresponde a individuos aislados y no ha poblaciones establecidas. A partir de ese momento se han registrado varias capturas de salmón coho en el Canal Beagle por parte de pescadores artesanales, y en el año 2018 se obtuvieron las primeras evidencias de poblaciones establecidas en TDF a partir de trabajos de detección mediante ADN ambiental (Nardi y col. 2020).

Para que una especie introducida logre invadir un nuevo ecosistema debe pasar por varias fases (Figura 5). Estas fases se pueden dividir en introducción, naturalización, propagación e invasión según la caracterización realizada por Roiloa y col. (2015).

Introducción: La primera fase se lleva a cabo cuando una especie se transporta, por acción humana, desde su lugar nativo hasta un nuevo territorio en el cuál no pertenece naturalmente.

Naturalización: Cuando la especie introducida encuentra condiciones favorables para sobrevivir. Una vez establecida comienza a reproducirse para mantener poblaciones viables a lo largo del tiempo. Cuando esto ocurre se dice que la especie se naturalizó a su nuevo ambiente.

Propagación: Debido al éxito reproductivo, la especie logra aumentar su número poblacional y además se empieza a expandir territorialmente. Se puede ver un aumento en la distribución y en la abundancia de la especie exótica.

Invasión: Es el momento en que, debido al buen desarrollo de las fases anteriores, se produce una alteración o daño al medio ambiente receptor y también a las especies nativas que lo habitan. En ese momento se puede considerar a la especie exótica como invasora.

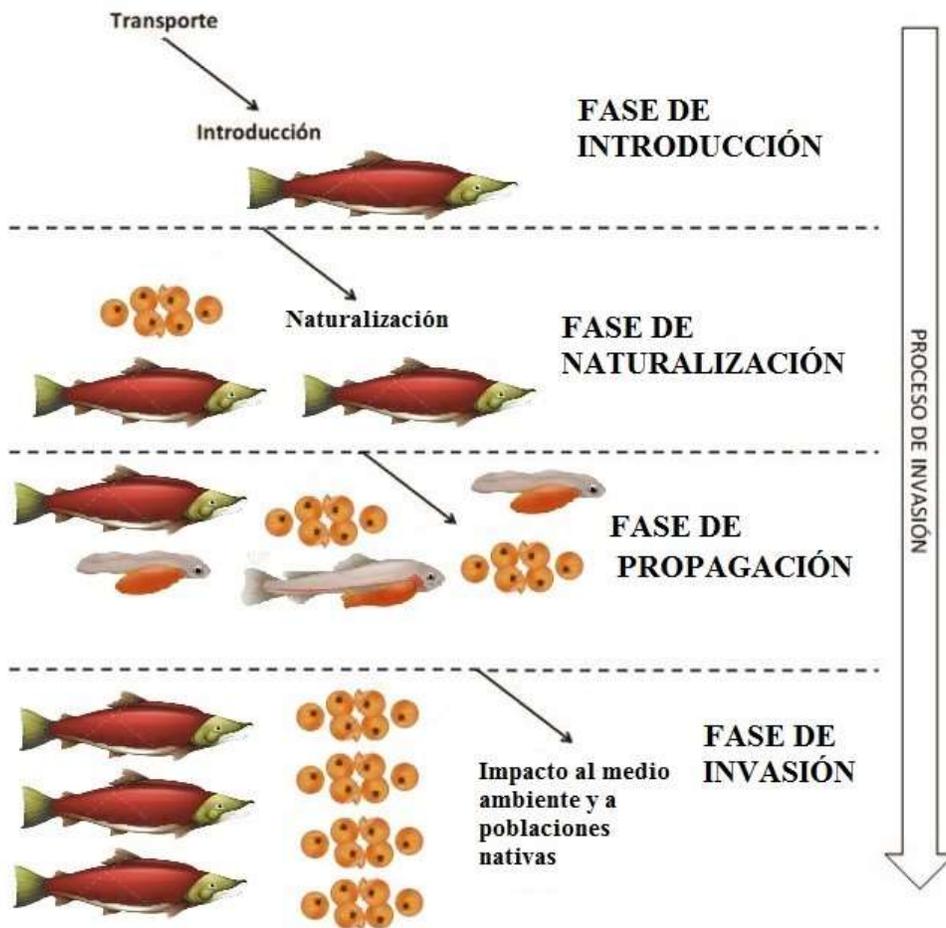


Figura 5: Esquema del proceso de invasión, ejemplificado con el salmón coho, detallando las distintas fases. Modificado de Roiloa y col. (2015).

El salmón coho es una especie cuyo ciclo de vida se caracteriza por ser anádromo y seméparo (Figura 6). Los peces nacen y pasan la primera parte de sus vidas en agua

dulce, luego migran al mar donde la tasa de crecimiento es mayor, maduran sexualmente y retornan a desovar por única vez a sus arroyos o ríos de origen guiados por el olor del agua, sabores de plantas y animales presentes en ese lugar, para luego morir (Quinn 2008). La temporada reproductiva ocurre generalmente a fines de verano y principios del otoño. Los adultos depositan los huevos sobre el fondo del río, a escasa profundidad, en zonas con corriente. Luego los cubren con grava formando lo que se conoce como cama de desove. El desarrollo embrionario y larval ocurre bajo la grava, hasta que finalmente, en primavera, emergen los juveniles con el saco vitelino ya absorbido. El desarrollo larval puede durar entre 4 a 6 semanas dependiendo la temperatura del agua (Beacham y Murray 1990). Los juveniles recién emergidos, llamados comúnmente *fry*, comienzan a alimentarse de macroinvertebrados acuáticos y pueden permanecer en los ríos durante 1 o 2 años. Durante el transcurso de los meses los peces van cambiando de color, adquiriendo a ambos lados unas marcas distintivas y pasándose a llamar "*parr*" hasta que finalmente migran hacia el mar, luego de una serie de cambios fisiológicos, donde permanecen de 1 a 5 años hasta que maduran sexualmente y retornar al río donde nacieron para reproducirse y finalmente morir (Sandercock 1991). Sin embargo, dentro de este fenotipo típico que muestran muchas de las poblaciones en su ambiente original, existen muchas variaciones que han evolucionado en respuesta a la oportunidad y presiones selectivas ejercidas por el ambiente.

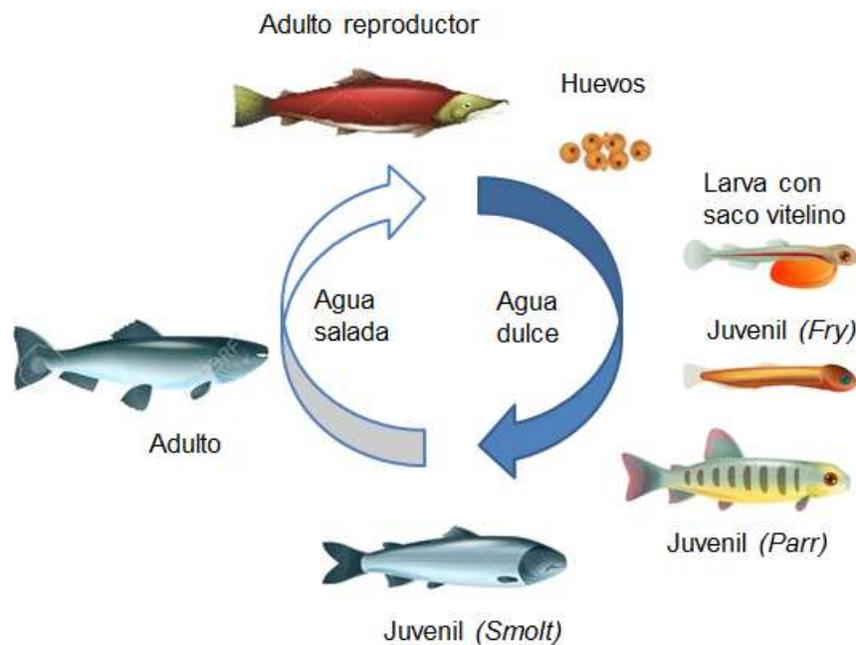


Figura 6: Ciclo de vida típico del salmón coho.

En los peces, tanto la edad como las fluctuaciones estacionales del crecimiento pueden ser determinadas a través del análisis de estructuras duras tales como las escamas. Esto hace que la “lectura” de las escamas sea una herramienta importante para poder describir la historia de vida de estos animales. Según Caballero (2013), las escamas de los salmónidos comienzan a formarse luego de la emergencia de los individuos desde la grava. El centro de las escamas se conoce como núcleo a partir del cual la escama crece formando estrías concéntricas alrededor de este, denominadas *circuli*. Cuando los *circuli* son gruesos espaciados entre ellos se puede inferir que el pez tuvo un crecimiento rápido; en cambio un crecimiento lento tiene como consecuencia *circuli* más finos y con poco espacio entre ellos (Fisher y Pearcy 1990). De esta manera, estudiando la separación entre los *circuli* es posible inferir si la tasa de crecimiento de los peces fue alta o baja. Es sabido que la tasa de desarrollo y de crecimiento de los peces, al igual que todos los organismos poiquiloterms, depende directamente de la temperatura en la que viven. En cada río el crecimiento de los peces puede ser distinto, y eso se verá reflejado en el patrón de desarrollo de las escamas (Fukuwaka 1998; Fukuwaka y Kaeriyama 1997).

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis fue documentar la presencia de poblaciones establecidas de salmón coho en Tierra del Fuego, así como también describir sus historias de vida temprana. Por otro lado, siendo que la morfología de los juveniles de salmón coho y Chinook son muy parecidas, sumado a la poca experiencia que se cuenta con estas especies debido a su reciente presencia en TDF, el primer objetivo de esta tesis fue desarrollar un método molecular para diferenciar ambas especies.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo 1: Desarrollar un método molecular sencillo para determinar las especies de los salmones presentes en Tierra del Fuego.

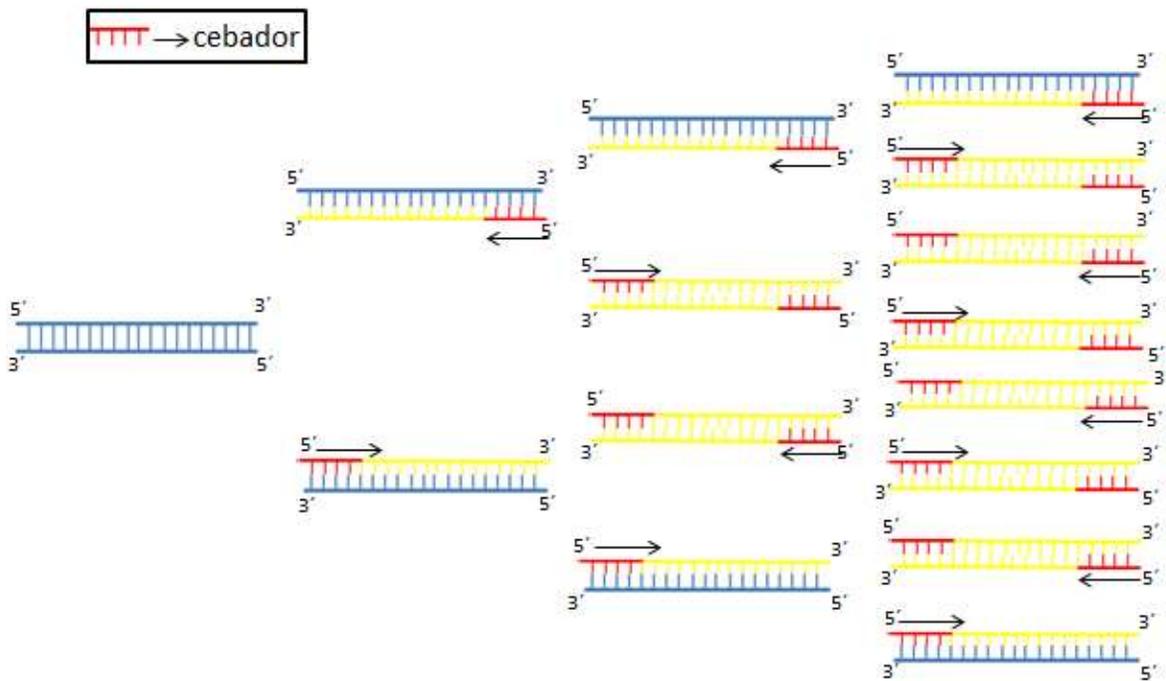
Hipótesis 1: Es posible diferenciar las especies de salmones presentes en Tierra del Fuego a través del método dúplex de amplificación de ADN con cebadores específicos.

Objetivo 2: Documentar la distribución de salmón coho en Tierra del Fuego y caracterizar la historia de vida de cada población establecida.

Hipótesis 2: Las poblaciones de salmón coho establecidas en Tierra del Fuego presentan distintas historias de vida asociadas a las características ambientales de cada río invadido.

Capítulo 1

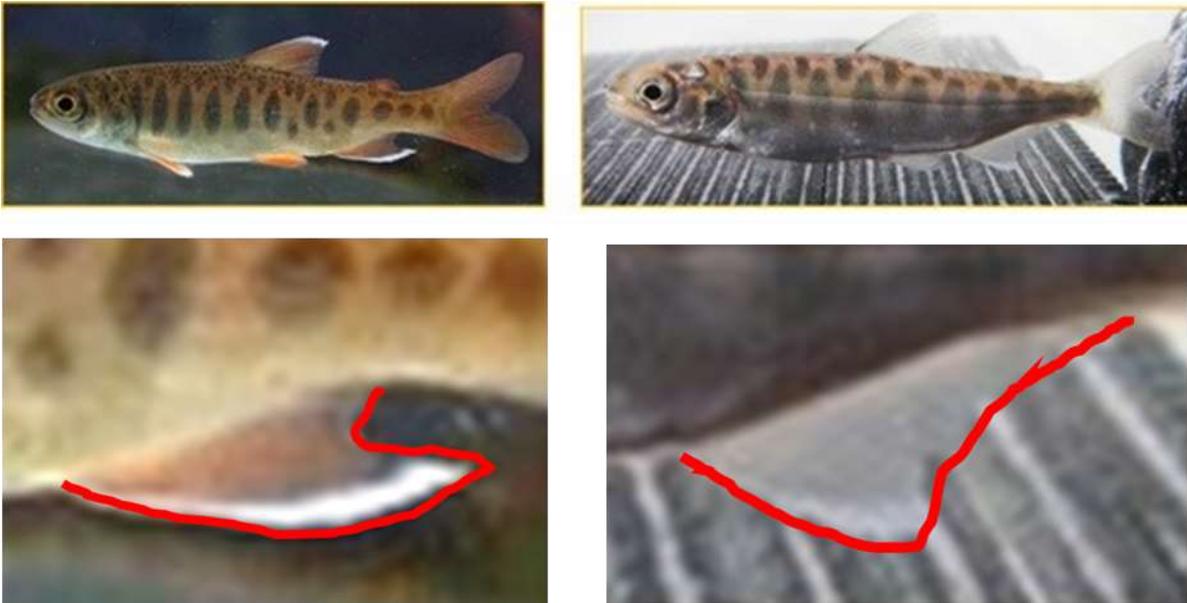
Desarrollar un método molecular sencillo para determinar las especies de los salmones presentes en Tierra del Fuego



INTRODUCCIÓN

Uno de los principales desafíos en el estudio de la introducción de especies exóticas es poder determinar a qué especie pertenece el organismo exótico, ya que es probable que el investigador no esté familiarizado con su taxonomía. En el caso particular de los salmónidos, características como su forma, ciclo de vida y ambientes que habitan son muy parecidas en muchas de sus especies, y en particular las del género *Oncorhynchus*. Debido a la posible presencia simultánea de todas estas especies en el mismo ambiente, al momento de querer identificar una especie en particular la tarea se vuelve engorrosa.

Algunas de las características morfológicas que diferencian a los juveniles de salmón Chinook del salmón coho, son que en este último la aleta anal presenta forma de hoz, el borde anterior es más largo que la base de la aleta; a diferencia del Chinook donde la base es más larga que el borde anterior de la aleta (Pollard y col. 1997). Además, los radios anteriores de la aleta dorsal y anal son de color blanco seguido de negro en el salmón coho (Figura 7). Sin embargo, las diferencias no siempre son tan claras ya que el fenotipo de estas especies puede variar significativamente según el ambiente en el que vivan, la estación del año y el estadio de desarrollo.



Salmón coho
(*Oncorhynchus kisutch*)

Salmón Chinook
(*Oncorhynchus tshawytscha*)

Figura 7: Diferencias morfológicas entre juveniles de salmón coho (izquierda) y de salmón Chinook (derecha). La principal diferencia que se observa son los radios anteriores de la aleta anal de color blanco en el salmón coho y su base más corta.

El gran parecido morfológico que presentan los juveniles de salmón coho y de salmón Chinook hace necesario contar con un método para poder identificarlos correctamente. En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciado del ADN es la técnica de reacción molecular más utilizada para este fin (Rea y col. 2001). La técnica consiste en poder replicar exponencialmente un fragmento de ADN de interés (amplificación), utilizando una enzima polimerasa resistente a altas temperaturas. También implica el diseño y uso de pequeños fragmentos sintéticos de ADN (cebadores) que se van a unir complementariamente a una de las hebras de la secuencia de ADN de interés para la posterior amplificación. Luego de la amplificación del fragmento de ADN de interés, normalmente se requiere análisis posterior de secuenciado para identificar la especie de origen. Otra estrategia empleada es el “revelado” del fragmento de ADN a través de electroforesis en gel de agarosa, lo que nos da la posibilidad de visualizar diferencias en los tamaños de cada amplicón (dependiendo la especie).

Un tipo particular de PCR es la PCR-multiplex desarrollada por primera vez por Chamberlain y col. (1988) para amplificar varias secuencias de ADN en una sola reacción

de PCR, utilizando en la misma mezcla de reacción diferentes pares de cebadores específicos para cada especie que se quiera identificar. En el presente objetivo se diseñó una PCR-multiplex para diferenciar salmones coho de Chinook presentes en ríos de Tierra del Fuego.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación de las especies de salmones capturadas se validó el método de amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex empleando dos pares de cebadores que permitieron amplificar de manera diferencial una zona conservada del genoma mitocondrial de *O. kisutch* y *O. tshawytscha*. Para esto diseñamos cebadores *in silico* para generar amplicones de diferentes tamaños para ambas especies y su posterior identificación mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se detallan los pasos llevados a cabo para desarrollar la PCR-multiplex.

1. Obtención de ADN

Las muestras de ADN fueron obtenidas de salmones juveniles de ambas especies capturados en el río Lapataia mediante electropesca (ver materiales y métodos del objetivo 2 para detalle de la metodología de captura). En total se emplearon tres individuos de cada especie previamente identificados mediante la clave desarrollada por Pollard y col. (1997). El ADN se extrajo de la aleta caudal mediante el método *salting-out* (Miller y col. 1988). Para esto, el tejido fue digerido a 37°C durante 12 hs en tubos eppendorf conteniendo 500 µl de solución de buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM pH 8, SDS 1% y NaCl 50 mM) más 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Una vez finalizada la digestión, se centrifugó a 2500 rpm durante 15', y se traspasaron 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio, evitando acarrear el precipitado y la fase oleosa. Luego se añadieron 300 µl de NaCl saturado (6 M) a cada tubo y se procedió a agitar vigorosamente durante 15 segundos, seguido de centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Se transfirió 600 µl del sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo limpio, se agregó igual volumen de isopropanol frío para precipitar el ADN y se centrifugó a 2500 rpm durante 15'. Se descartó todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet y se lavó con etanol 70%. Finalmente se dejó secar el etanol y se resuspendió el ADN en TE 1X, pH8.

El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior amplificación mediante PCR.

2. Diseño de cebadores

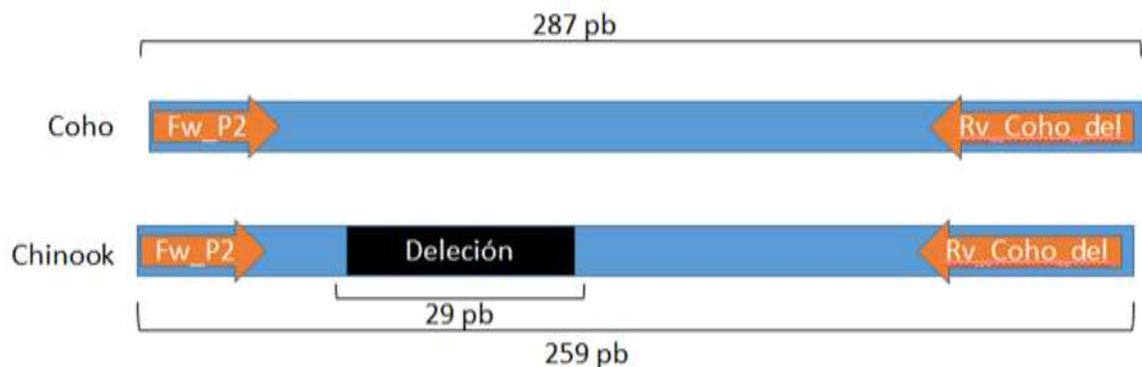
Para esto se realizó un diseño *in silico* de dos pares de cebadores sobre el extremo 3' altamente variable de la región de control y el ARNt adyacente de *Oncorhynchus* spp. descrito por Nielsen (1994), la cual presenta una deleción de 29 pb en el salmón Chinook (Figura 8A).

La estrategia empleada para diseñar los cebadores fue la siguiente:

Cebadores específicos de salmón coho, donde el cebador sentido hibride sobre una región presente solo en salmón coho, mientras que el cebador anti sentido hibride en ambas especies (Figura 8B). Para evitar amplificación cruzada con trucha arcoíris, el cebador sentido se diseñó sobre una secuencia que presenta 5 diferencias de bases en el extremo 5', mientras que el anti sentido presenta 2 diferencias de bases en el extremo 3'.

A su vez, se diseñó un segundo par de cebadores que amplifican ambas especies, pero flanquean la zona delecionada en salmón Chinook, obteniendo una diferencia de 29 pb entre ambas especies debido a la deleción presente en salmón Chinook (Figura 8A).

A



B



Figura 8: Tamaño de amplicones esperados como resultados del apareamiento de los cebadores en salmón coho y en salmón Chinook. **A)** Fw_P2 + Rv_Coho_del. **B)** Fw_Coho_del + Rv_Coho_del.

La Figura 9 muestra la especificidad de los cebadores y los amplicones generados la cual se verificó empleando la herramienta primer-blast del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

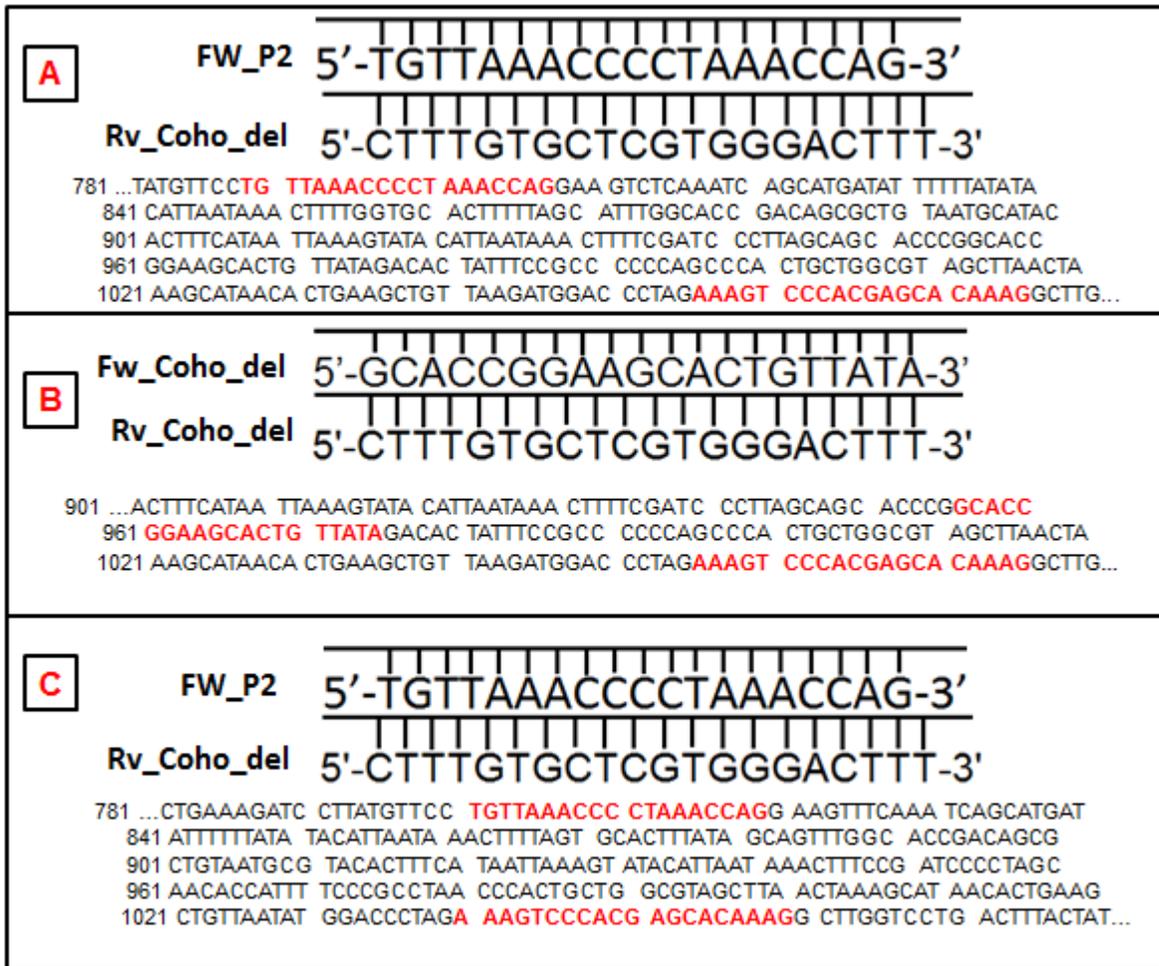


Figura 9: Secuencias de cebadores diseñados para la PCR-multiplex. En rojo se detallan los fragmentos de la secuencia correspondiente a salmón coho en donde los cebadores se aparean. **A)** Dará una banda como producto en coho. **B)** Dará una banda solo en coho. **C)** Dará una banda como producto en Chinook.

Programa de PCR

Para la amplificación se utilizó un programa diseñado para emplear Taq polimerasa (Promega). La enzima ADN polimerasa Taq, aislada de *Thermus aquaticus*, es una ADN polimerasa termoestable que cataliza la síntesis de ADN dependientes de cebadores de nucleótidos en ADN dúplex en la dirección 5' → 3' en presencia de Mg²⁺. Es la polimerasa de ADN termoestable estándar utilizada en aplicaciones de PCR (<https://worldwide.promega.com>). Para preparar la mix de PCR se mezclaron el fragmento de ADN de interés, la polimerasa, los cebadores, nucleótidos libres y las soluciones de reacción (Tabla 2), para luego colocarla en tubos de 0,6 ml en un termociclador que

somete la reacción a ciclos recurrentes de cambios de temperatura durante los cuales el ADN se desnaturaliza, los cebadores se hibridan con el objetivo y la polimerasa los extiende para crear una copia de la cadena de ADN de interés. Se puede ver detallado luego de la siguiente tabla.

Tabla 2: Preparación de mix para PCR con Taq polimerasa

Reactivo	Conc stock	Unidad	Conc final	Vol/tubo (µl)
Agua ultra pura				10.0
Buffer 10X	10	X	1	1.5
dNTPs	2	mM c/u	0.2	1.5
Fw	10	uM	0.3	0.5
Rv	10	uM	0.3	0.5
Taq	5	u/ul	0.03	0.1
ADN				1

Para realizar la PCR-multiplex se diseñó el siguiente protocolo de ciclos térmicos:

Desnaturalización: Como primera instancia se lleva la temperatura a 94 °C, durante 4 minutos para lograr la desnaturalización del ADN, es decir la separación de las 2 hebras.

Unión de los cebadores: Se regula la temperatura a 60°C durante 30 segundos. En esta etapa los cebadores van a unirse a su secuencia complementaria en el ADN molde.

Extensión de la cadena: En esta etapa la polimerasa, partiendo del cebador, utiliza a la cadena molde de ADN para sintetizar la cadena complementaria. Se lleva la temperatura a 72°C que es la temperatura óptima de funcionamiento de la ADN polimerasa.

Este proceso completo se repitió por 30 ciclos continuos. Luego se llevó a cabo una elongación final a 72°C por 10 minutos para asegurarnos que cualquier ADN simple cadena sea totalmente copiado y no nos dificulte la posterior electroforesis.

RESULTADOS

Diseño *in silico*

A continuación, se detallan los resultados obtenidos del alineamiento de los cebadores diseñados con la ayuda de la herramienta primer-blast del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Cebadores

Fw_P2 + Rv_Coho_del para Chinook

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTTAAACCCCTAAACCAG	19	51.95	42.11	5.00	1.00
Reverse primer	CTTTGTGCTCGTGGGACTTT	20	58.69	50.00	2.00	0.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>MW113719.1 *Oncorhynchus tshawytscha* isolate 7.4 D-loop, partial sequence; tRNA-Phe gene, complete sequence; and 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial

```
product length = 259
Forward primer 1 TGTTAAACCCCTAAACCAG 19
Template      230 ..... 248

Reverse primer 1 CTTTGTGCTCGTGGGACTTT 20
Template      488 ..... 469
```

Fw_P2 + Rv_Coho_del para coho

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTTAAACCCCTAAACCAG	19	51.95	42.11	5.00	1.00
Reverse primer	CTTTGTGCTCGTGGGACTTT	20	58.69	50.00	2.00	0.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[NC_009263.1](#) Oncorhynchus kisutch mitochondrion, complete genome

product length = 287

```

Forward primer 1 TGTTAAACCCCTAAACCAG 19
Template       789 ..... 807

Reverse primer 1 CTTTGTGCTCGTGGGACTTT 20
Template       1075 ..... 1056
    
```

Fw_Coho_del + Rv_Coho_del para coho

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCACCGGAAGCACTGTTATA	20	57.98	50.00	4.00	4.00
Reverse primer	CTTTGTGCTCGTGGGACTTT	20	58.69	50.00	2.00	0.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[NC_009263.1](#) Oncorhynchus kisutch mitochondrion, complete genome

product length = 120

```

Forward primer 1 GCACCGGAAGCACTGTTATA 20
Template       956 ..... 975

Reverse primer 1 CTTTGTGCTCGTGGGACTTT 20
Template       1075 ..... 1056
    
```

La Tabla 3 resume el tamaño de los amplicones estimados mediante un alineamiento de los cebadores en el servicio de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla 3: Número y tamaño de bandas esperadas según la especie de salmón presente en la muestra.

Especie	Mix de cebadores		
	Fw_P2 + Rv_Coho_del	Fw_Coho_d el + Rv_Coho_del	Fw_P2 + Fw_Coho_del + Rv_Coho_del
Coho	1 banda	1 banda	2 bandas
	287 pb	120 pb	287 pb 120 pb
Chinook	1 banda	No amplifica	1 banda
	259 pb		259 pb

En aquellas muestras de ADN a partir de las cuales se obtengan dos amplicones mediante PCR-multiplex se clasificarán como pertenecientes a salmón coho; en cambio las muestras donde se obtenga un solo amplicón se clasificarán como pertenecientes a salmón Chinook.

Comprobación *in vitro*

Las bandas correspondientes a los amplicones revelados en gel de agarosa obtenidos mediante PCR-multiplex se muestran en la Figura 10.

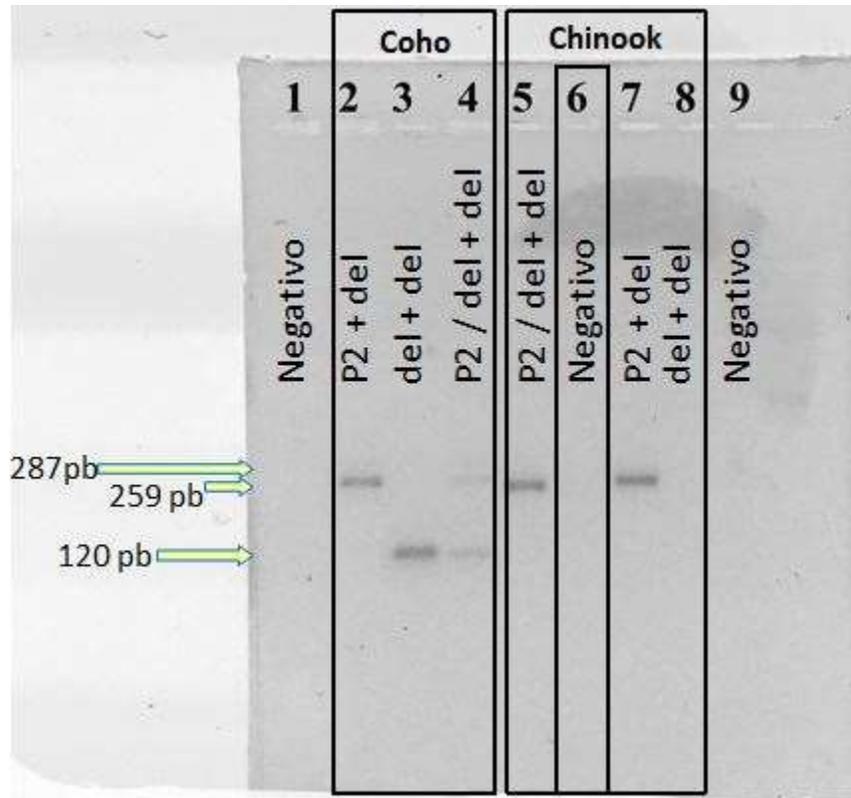


Figura 10: Corrida electroforética en gel de agarosa.

Lo primero que se puede observar es que en las calles 1, 6 y 9 no se obtienen ningún tipo de banda; ya que corresponden a las PCRs sin ADN genómico (control negativo). En las calles 2, 3 y 4 se observan las bandas de los amplicones obtenidos a partir de ADN de coho. En la calle 2 se observa una única banda correspondiente al amplicón de salmón coho obtenido con los cebadores Fw_P2 + Rv_Coho_del; en la calle 3, donde solo se sembraron los cebadores forward Coho_del + reverse Coho_del, se observa una sola banda; y en la calle 4, donde se sembraron los Fw_P2 y Fw_Coho_del + Rv_Coho_del, se observan 2 bandas. En las calles 5, 7 y 8 se sembró ADN de Chinook, y se observa solamente una banda (259 pb) en las calles donde se sembró, además, cebador forward P2 (calles 5 y 7). En la calle 8 solamente se colocó cebador Fw_Coho_del por lo que no se observan bandas.

CONCLUSIONES

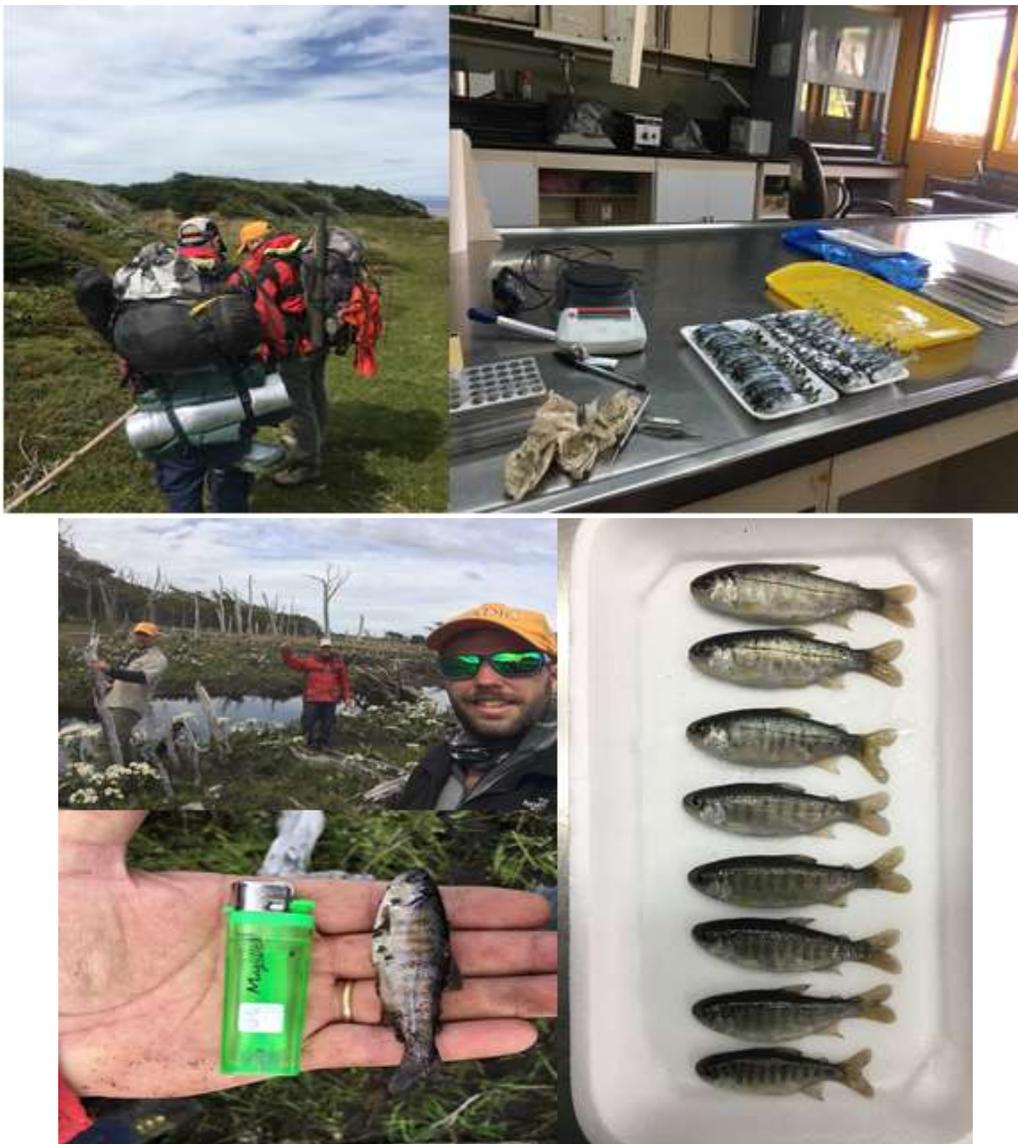
Llevando a cabo una amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa combinando dos pares de cebadores se logró amplificar de manera diferencial, dos zonas conservadas del genoma mitocondrial de salmón coho y una de salmón Chinook en una misma reacción. Esto constituye una herramienta práctica y efectiva para que investigadores que no estén familiarizados con estas especies puedan diferenciarlas fácilmente sin equivocaciones. Esto es clave en monitoreos de expansión de estas especies de salmónidos en nuevos ambientes, ya que es un método de gran ayuda, al momento de identificar especímenes capturados por primera vez.

Por otro lado, este método de determinación de especies es de gran utilidad para corroborar los datos obtenidos a través de reportes de pescadores recreativos quienes no suelen tener experiencia en la identificación de estas especies. Comúnmente cuando los pescadores no están seguros de la especie que capturaron suelen tomarles fotografías que luego envían a expertos para su posterior identificación. Sin embargo, pocas veces las fotografías se centran en caracteres morfológicos que permitan identificar a las especies. De esta manera, se puede solicitar a los pescadores una pequeña muestra de aleta de los peces capturados para su posterior identificación en laboratorio.

Otra utilidad de esta herramienta generada es que permite determinar la especie de individuos capturados históricamente y que hayan sido clasificados de manera errónea. Si este fuera el caso, es posible que la presencia de salmón coho en Tierra del Fuego sea anterior a los primeros registros de juveniles en el año 2019 realizados por Chalde y col (2019), es decir, que juveniles y adultos inicialmente identificados como Chinook en realidad pertenecerían a la especie de salmón coho.

Capítulo 2

Documentar la distribución de salmón coho en Tierra del Fuego y caracterizar la historia de vida de cada población establecida



INTRODUCCIÓN

El salmón coho es un pez anádromo y semélparo; crece hasta llegar a la madurez sexual en el océano, y vuelve a desovar en agua dulce tanto en pequeños arroyos como grandes ríos de deshielo (Fleming y Gross 1989). Los individuos de diferentes poblaciones de salmón coho pueden diferir considerablemente en su morfología e historias de vida (Ricker 1972; Carl y Healey 1984; Beacham 1985). Es de esperar que las historias de vida de los salmones hayan evolucionado en sus ambientes nativos de manera tal que exista una relación óptima entre la estacionalidad de las condiciones, la disponibilidad de recursos y sus fases de desarrollo para maximizar el crecimiento y la reproducción (Cody 1966; Williams 1966; Sibly y Calow 1986).

En el contexto de la invasión de una nueva especie de salmónido en Tierra del Fuego, planteamos como objetivo determinar la presencia de salmón coho en ríos que desembocan hacia el Canal Beagle y caracterizar sus historias de vida temprana

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

La Isla Grande de Tierra del Fuego se caracteriza por presentar cuatro zonas hidrogeográficas: Zona de Estepa localizada al norte de la isla, Zona de transición localizada en el centro, zona de cordillera localizada en el suroeste y zona de turbales localizada en el sureste (Iturraspe y Urciolo 2000). En este trabajo se realizaron muestreos de peces en ocho ríos, todos con desembocadura hacia el Canal Beagle, de los cuales seis se ubican en la zona hidrográfica de cordillera, y dos en la zona de turbales (Figura 11 y Tabla 4).

Tabla 4: Región hidrográfica y localización de los ríos, ordenados de oeste a este, donde se realizaron los muestreos de salmónidos. Coordenadas geográficas obtenidas de Google Earth Pro V7.3.4.8642.

Río	Región hidrográfica	Coordenada de desembocadura	
		Latitud	Longitud
Lapataia	Cordillera	54°51'7,7"S	68°34'4,1"O
Olivia	Cordillera	54°47'56"S	68°13'57,8"O
Almanza	Cordillera	54°52'24,6"S	67°34'2,1"O
Lasifashaj	Cordillera	54°53'11,5"S	67°22'48,3"O
Varela	Cordillera	54°53'6,2"S	67°17'28,7"O
Cambaceres	Cordillera	54°53'18,5"S	67°14'9,5"O
Moat	Turbera	54°58'264"S	66°44'57,6"O
Negro	Turbera	55° 0'20,1"S	66°42'15,6"O

Los ríos de la zona de cordillera se ubican entre la cordillera Fueguina y el Canal Beagle. En esta zona el drenaje es denso, de recorrido corto, pendientes fuertes y caudal moderado; el bosque mesófilo es característico, acompañado en los fondos de valle por turbales que pueden alcanzar profundidades de hasta 10 metros; esta gran acumulación se debe a la falta de oxígeno y el agua ácida presente en el ambiente que hace que el musgo *Sphagnum* se descomponga lentamente (Domínguez y Larraín 2012). Los turbales son comunidades de especies vegetales de especial adaptación a ambientes húmedos en las que predomina la producción de materia orgánica sobre la descomposición. Los *Sphagnum* son los musgos responsables del origen de la turba. Ésta se forma por la acumulación de los tejidos de esta y de otras plantas que crecen sobre los restos de otras ya descompuestas. Así forman una serie de estratos de tejidos vegetales muertos que se acumulan con el paso del tiempo, formando el material que llamamos turba, el cual puede alcanzar varios metros de espesor al cabo de miles de años (Domínguez y Larraín 2012). Estos ambientes presentan gran capacidad para retener agua. Además, la nieve estacional es el almacenamiento hídrico con mayor capacidad de regulación; los sedimentos en las altas cumbres sin vegetación acumulan detrito criogénico, también con función reguladora. El agua se libera lentamente en verano, y junto con las precipitaciones (alta frecuencia / baja intensidad), prolongan las crecidas de los ríos hasta diciembre. Estas cuencas son las que mayor caudal específico producen (caudal medio anual por unidad de superficie).

Los ríos de la zona de turbales se ubican en la región conocida como península Mitre, donde la cordillera va perdiendo altura, en la parte Este de la isla. En las laderas, con drenaje de agua elevado, se pueden llegar a observar bosques. En cambio, en los estratos inferiores predominan los turbales que forman amplios valles y planicies, donde escurren los cursos de agua provenientes de las laderas que ya perdieron pendiente como para poder escurrir de manera superficial. Los turbales pueden llegar a adoptar características de verdaderos pantanos, siendo el ambiente que mayor cantidad de agua almacena en TDF a excepción de los lagos. En su estado natural, las poblaciones de *Sphagnum* atrapan gran cantidad de agua debido a la particular morfología de sus hojas, que tienen células fotosintéticas que alternan con células vacías y porosas, que son las que atrapan el agua (Domínguez y Larraín 2012). La capa de *Sphagnum* vivo se encuentra en el estrato superficial, desarrollado sobre capas de fibras muertas, cuyo estado de degradación o grado de humificación se incrementa en profundidad (Iturraspe y Roig 2000). Esta capa es la que mayor capacidad dispone para incorporar agua, pudiendo alcanzar en niveles superficiales y en condiciones de saturación, una proporción entre el 94 y 98 % respecto del volumen total de turba (Päivänen 1982). Como almacenamiento de segundo orden se destaca la nieve estacional, de débil estabilidad, debido a las escasas posibilidades de acumulación en altura y a la mayor exposición a los vientos. En primavera se producen las crecidas más importantes, ya que se combina la saturación de los turbales junto al deshielo luego del invierno; aunque también en los veranos húmedos pueden darse crecidas significativas. Los cauces suelen ser relativamente profundos y de velocidad de corriente baja.

Captura de individuos

Para capturar los individuos se realizaron muestreos en seis ríos localizados en la región de cordillera y dos ríos localizados en la región de turba (Figura 11). Los muestreos se realizaron entre los días 13 de enero y 21 de febrero del año 2020, en los ríos Lapataia (20 de enero y 19 de febrero; n=8 y n=12; respectivamente), Almanza (13 de febrero; n=9), Lasifashaj (14 de febrero; n=2), Varela (14 de febrero; n=31), Cambaceres (14 de febrero; n=24), Moat (21 de enero y 20 de febrero; n=38 y n=0; respectivamente) y Negro (21 de enero; n=16). Los juveniles del río Olivia se capturaron el 14 de diciembre de 2022 (n=9) en campañas posteriores del CADIC. También se analizaron muestras y datos pertenecientes a campañas realizadas previamente por el personal del Laboratorio de

Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos Acuáticos del CADIC el 24 de septiembre de 2019 (n=6) y el 20 de diciembre de 2019 (n=12).

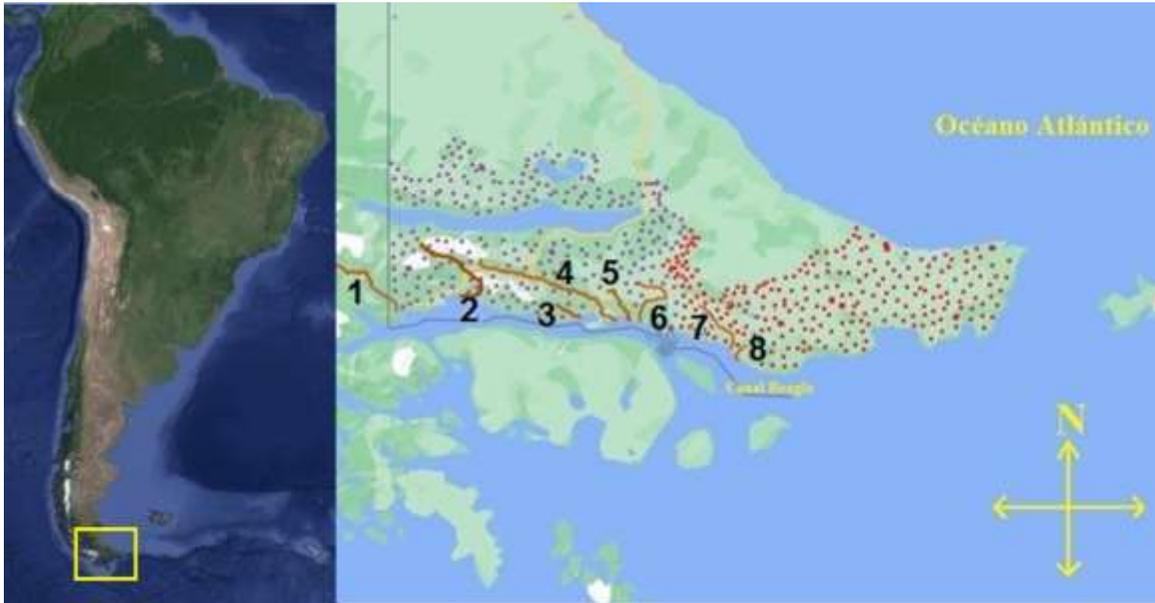


Figura 11: Ubicación de la isla grande de Tierra del Fuego, en el extremo sur de América (recuadro amarillo). Ríos donde se capturaron juveniles de salmón coho en la región de cordillera (puntos violetas) y en la región de turbera (puntos rojos) de Tierra del Fuego. **1:** Río Lapataia; **2:** Río Olivia; **3:** Río Almanza; **4:** Río Lasifashaj; **5:** Río Varela; **6:** Río Cambaceres; **7:** Río Moat; **8:** Río Negro.

Para capturar los peces se empleó un equipo de electropesca (Smith-Root LR24; Figura 12) seteado a 75 Hz, ciclo de funcionamiento del 25%, con pulso estándar de 450 V y 75 A (ancho de pulso 3 ms, 60 pulsos/ seg). El recorrido de los cuerpos de agua siempre fue en dirección río arriba abarcando la mayor distancia posible o hasta obtener al menos 20 ejemplares de cada río. Los sitios muestreados en cada río fueron principalmente las costas, lugares con refugios provistos por ramas o rocas y aguas calmas (Figura 13).



Figura 12: Equipo de electropesca Smith-Root empleado para capturar juveniles de salmón coho. Río Almanza.



Figura 13: Sitios característicos donde se capturaron juveniles de *O. kisutch* en los distintos ríos. **A)** Río Lapataia, restos de dique realizado por castores; **B)** Río Almanza, árboles caídos y restos de troncos; **C)** Río Negro, refugio sobre las barrancas del río; **D)** Río Moat, aguas quietas (línea discontinua).

Para identificar las especies se utilizó la guía de identificación de salmónidos “*Field Identification of Coastal Juvenile Salmonids*” (Pollard y col. 1997). En particular se prestó atención a diferenciar a los juveniles de salmón coho con juveniles de salmón Chinook ya que ambas especies presentan un gran parecido morfológico. En los casos en que no fuera posible distinguirlos con seguridad, se tomaron muestras de aleta caudal para realizar la PCR-multiplex puesta a punto en el **Objetivo 1**.

Los salmónidos capturados durante el muestreo se colocaron en un recipiente de cinco litros con agua del mismo río (Figura 14). Luego de finalizar el recorrido del río se trasladaron los peces a tanques de 120 litros con aireador y se los trasladó en camioneta hasta el Laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución del CADIC en la ciudad de

Ushuaia. Una vez allí los peces se sacrificaron con sobredosis de benzocaína. Se registró el peso total (con balanza digital precisión de 0,01 g) y la longitud furca hasta la horquilla de la aleta caudal (con calibre digital con precisión de 0,1 mm). Finalmente, se extrajeron escamas de ambos laterales de los peces por debajo de la aleta dorsal y por encima de la línea lateral.



Figura 14: Juveniles de salmón coho recién capturados. Se pueden observar cuatro ejemplares ya recuperados luego de ser capturados mediante electropesca.

Lectura de escamas

Las escamas utilizadas para el análisis fueron de individuos capturados en los muestreos realizados para esta tesis como además de individuos colectados por el personal del CADIC. Las mismas fueron limpiadas con detergente enzimático de uso doméstico 5% y se seleccionaron 3 de cada individuo para ser fotografiadas con la ayuda de lupa estereoscópica (Figura 15). Posteriormente, las imágenes fueron analizadas mediante el programa Image Pro-Plus versión 4.5.0.29, con el cual se midió el radio total de las mismas desde el núcleo hasta el borde, el número de *circuli* y el espacio *intercirculi* (Figura 16). A partir de estos datos se describieron las relaciones entre el radio de la

escama medido desde el núcleo y la longitud del pez con el siguiente modelo de regresión lineal.

Radio de la escama medido desde el núcleo = intersección + pendiente * longitud del pez

A partir de estos datos se infirieron diferencias en la tasa de crecimiento ya que cuanto mayor sea la proporción N° de *circuli* / radio de escama, se espera que la tasa de crecimiento del individuo haya sido menor (Craig y col. 2014). Para evaluar las tasas de crecimiento durante los primeros meses luego de la emergencia de las larvas se midió la distancia *intercirculi*. Solo se midió la distancia *intercirculi* de los primeros 6 pares de *circuli* ya que los pares de *circuli* superiores no estaban presentes en todos los peces



Figura 15: Lupa estereoscópica utilizada para observar y fotografiar las escamas de juveniles de salmón coho capturados en Tierra del Fuego.

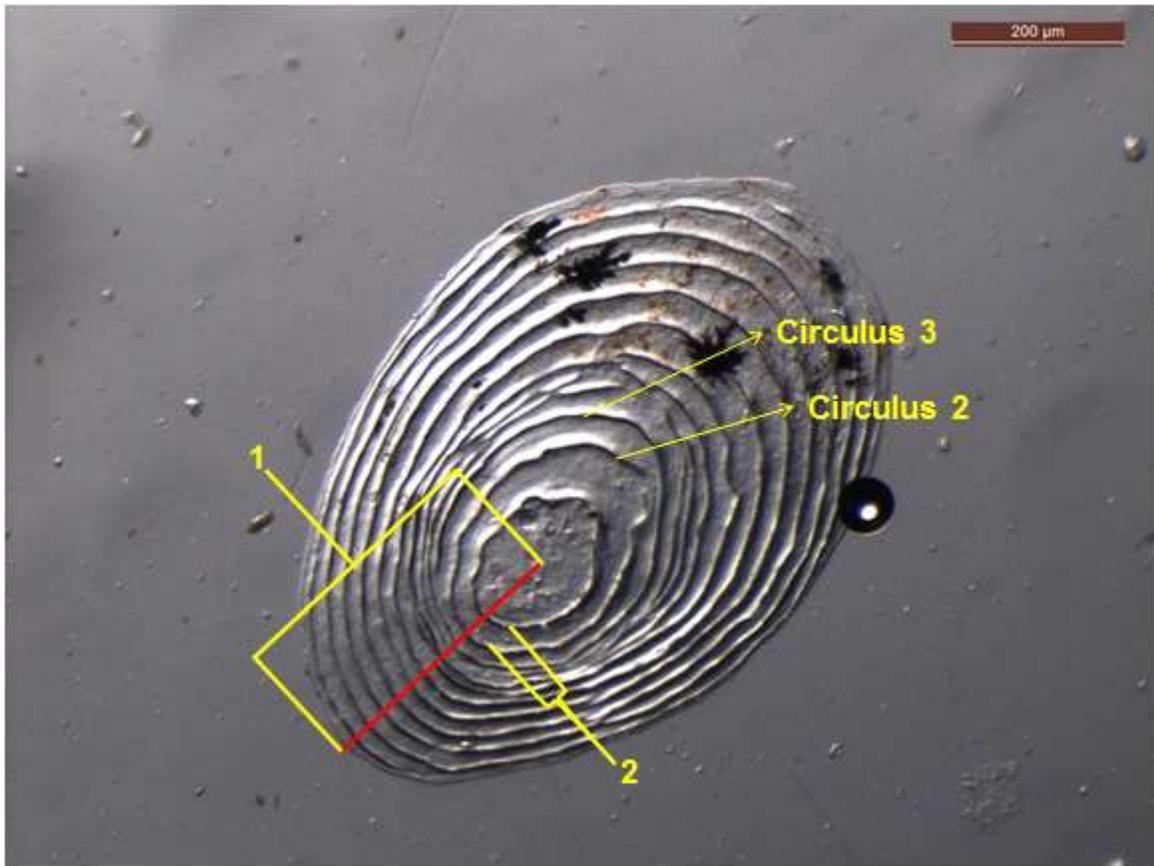


Figura 16: Escama de *Oncorhynchus kisutch* vista con lupa estereoscópica; se detallan las características a medir. **1:** Radio de la escama medida desde el núcleo. **2:** Intercirculi. También se detallan los *circuli* 2 y 3.

Supuestos de un modelo de regresión lineal

Relación lineal, Independencia residual, Normalidad y Homocedasticidad.

H₀: pendiente = 0 la variación de Y no se explica linealmente por la variación de X.

H₁: pendiente ≠ 0 la variación de Y sí se explica linealmente por la variación de X.

Radio de la escama vs longitud del pez.

Los datos se ajustaron a un modelo de regresión lineal con $P < 0,05$. Es decir que la relación entre el radio de la escama y la longitud del pez es positiva y lineal.

Radio de la escama (R) = intersección + pendiente * longitud del pez (Lf).

Y = variable dependiente = radio de la escama.

X= variable independiente = longitud del pez.

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de comparaciones múltiples de *Tukey* con un nivel de significancia del 5% para analizar las diferencias entre las distancias de cada *intercirculi*, con el programa *GraphPad Prism* versión 6.01.

Registro de temperaturas

Para analizar la posible relación entre el régimen térmico de los ríos y la historia de vida temprana del salmón coho se registró la temperatura de los ríos Lapataia y Almanza cada una hora durante un año mediante registradores automáticos (Hobo Pendant MX2201, Onset Computer Corp). Estos ríos fueron seleccionados porque difieren en régimen de caudal y características generales del paisaje (vegetación riparia, refugio, presencia de pozones, lago de cabecera, etc.), y también podrían diferir en cantidad y calidad de alimento disponible. El río Lapataia presenta un caudal promedio anual de 18,6 m³/s, mientras que el caudal medio del río Almanza alcanza solo los 1 m³/s (datos obtenidos de la Dirección General de Recursos Hídricos de TDF). Además, el río Lapataia nace en un glaciar, presenta un lago aguas arriba, y cuenta con un escaso bosque riveroño en su recorrido, mientras que la cuenca del río Almanza es completamente boscosa desde su origen hasta su desembocadura.

Permisos necesarios para la realización de esta investigación

El río Lapataia se encuentra dentro del Parque Nacional Tierra del fuego, debido a esto, se tramitó la autorización necesaria de investigación DRPA (Nº75). El resto de los ríos se encuentran en territorio provincial y contamos con el permiso de investigación Resolución (Nº3914-SD/2017).

Durante toda la investigación y las campañas realizadas se cumplió con el reglamento Interno del Comité Institucional de Bioética (CIB) –Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC) CIB-CADIC.

RESULTADOS

Las tallas de los individuos capturados fluctuaron entre un mínimo de 29.9 ± 1.0 mm ($n= 10$; media \pm EEM) en el río Negro y un máximo de $92,4 \pm 2,3$ mm ($n= 7$; media \pm EEM) en el río Almanza (Figura 17). En tanto, los pesos de los individuos fluctuaron entre un mínimo de $0,27 \pm 0,02$ g ($n= 10$; media \pm EEM) en el río Negro y un máximo de $11,83 \pm 1,11$ g ($n= 7$; media \pm EEM) en el río Almanza (Figura 18). En todos los ríos se encontró una sola cohorte de salmones, excepto en los ríos Almanza y Negro donde se pudieron distinguir dos cohortes contemporáneas.

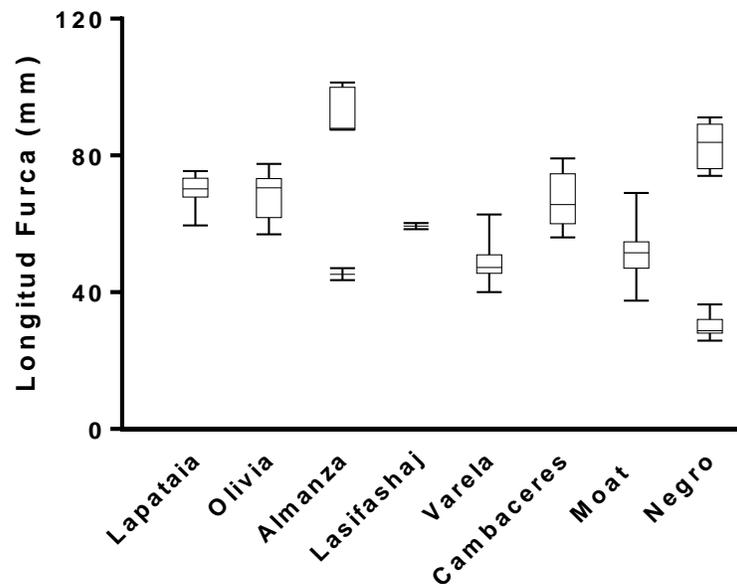


Figura 17: Longitud (media, mínimo y máximo) de los individuos capturados en los distintos ríos. Cabe aclarar que tanto en el río Almanza como en el río Negro se encontraron dos cohortes.

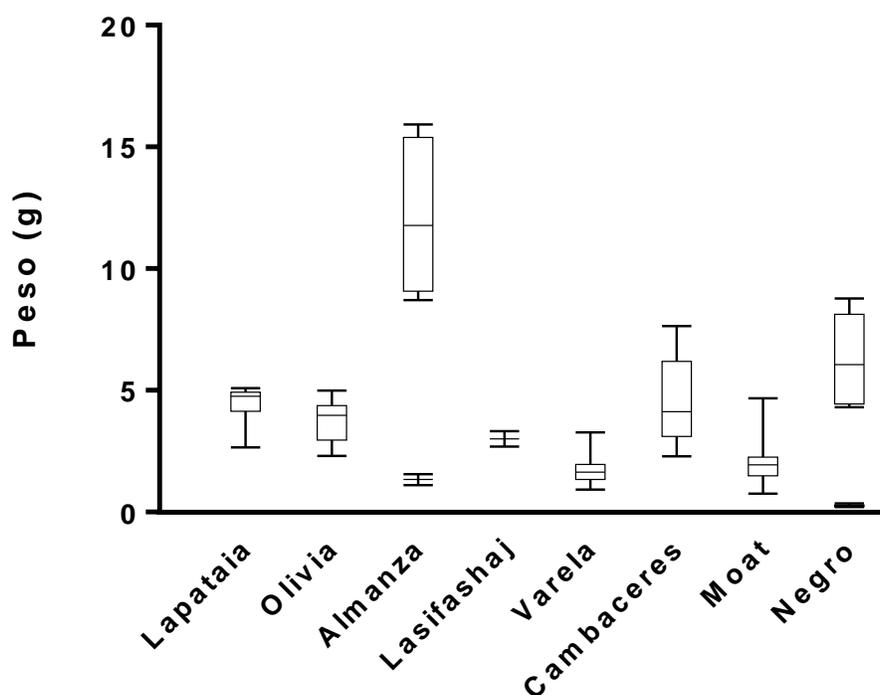


Figura 18: Peso (media, mínimo y máximo) de los individuos capturados en los distintos ríos. Cabe aclarar que tanto en el río Almanza como en el río Negro se encontraron dos cohortes.

La Tabla 5, al igual que la Figura 19, muestra las relaciones lineales entre el radio de las escamas y la longitud de los peces capturados en todos los ríos. Las escamas de los peces capturados en el río Lasifashaj se excluyeron del análisis estadístico debido a que solo se capturaron dos individuos y no es de utilidad en este caso realizar una regresión con solo dos datos. Los peces de la cohorte menor (0+) capturados en el Río Negro ($FL = 29.9 \pm 1.0$ mm (media \pm EEM); $N = 10$) no tenían escamas formadas y por lo tanto no se incluyeron en el análisis.

Tabla 5: Modelo lineal con regresión para la relación entre el radio de la escama (R) y la longitud (Lf) de los salmones capturados

Río	Modelo lineal	R²	P
Lapataia	R = 4,47 (± 0,26) * Lf - 137,2 (± 16,3)	0,9087	< 0,0001
Olivia	R = 4,31 (± 1,60) * Lf - 107,5 (± 109,8)	0,5092	< 0,05
Almanza	R = 4,88 (± 0,97) * Lf - 142,1 (± 82,1)	0,7827	< 0,001
Varela	R = 3,98 (± 0,84) * Lf - 54,8 (± 40,9)	0,6318	< 0,001
Cambaceres	R = 3,31 (± 0,43) * Lf - 64,4 (± 30,0)	0,8215	< 0,0001
Moat	R = 4,29 (± 0,63) * Lf - 70,5 (± 32,5)	0,7816	< 0,0001
Negro	R = 1,58 (± 2,81) * Lf + 140,6 (± 234,1)	0,07310	0,6043

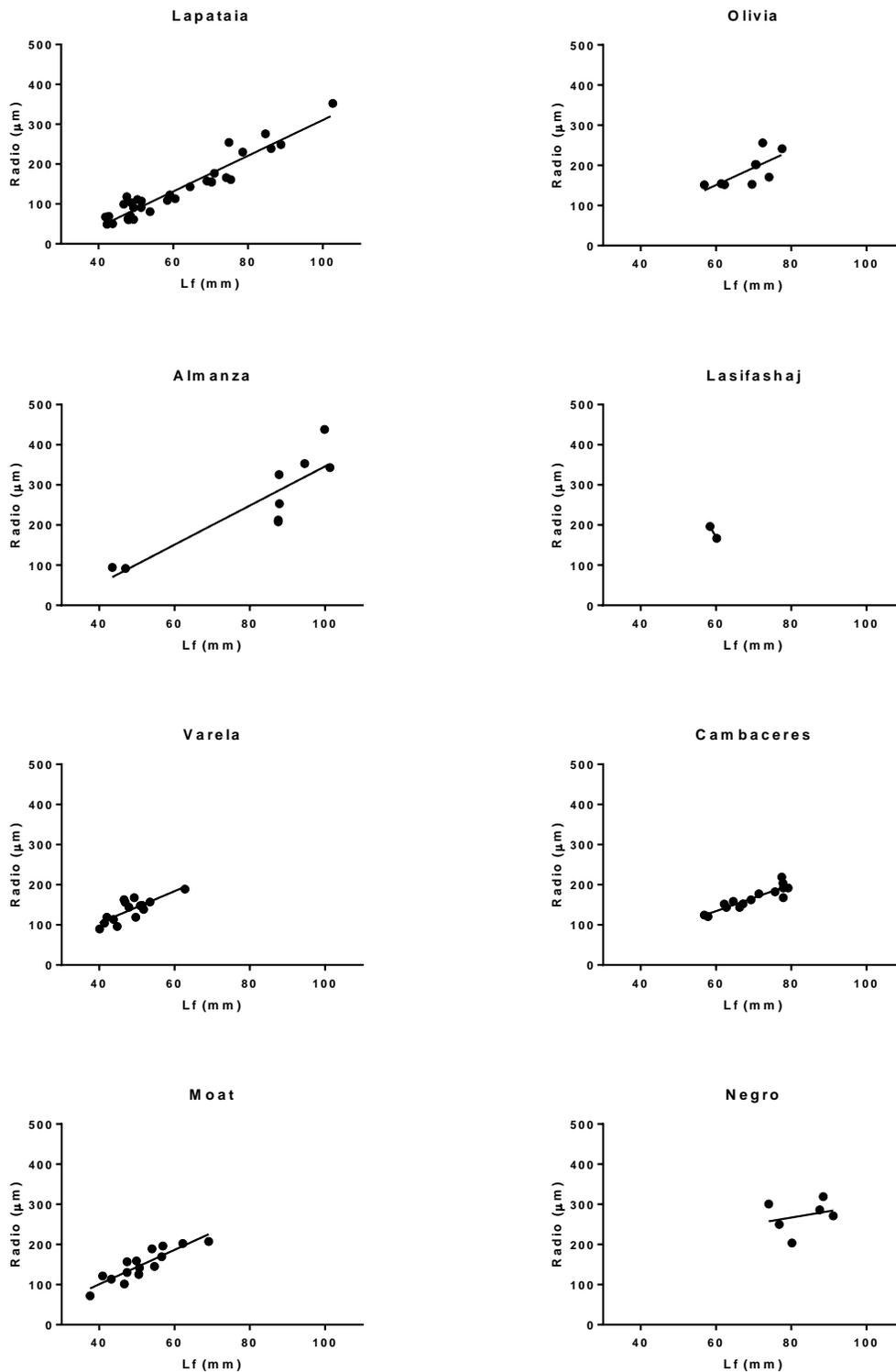


Figura 19: Relación entre el radio total de las escamas y la longitud de los individuos juveniles de salmón coho capturados en ocho ríos de Tierra del Fuego.

Excepto por la distancia entre *circuli* 1-2, las otras cinco distancias entre *circuli* analizadas mostraron diferencias significativas entre ríos (Figura 20 y Tabla 6). Letras iguales entre ríos significa que no va a haber diferencias significativas entre esos ríos que se están comparando. Luego se utilizó un método de comparaciones múltiples de Tukey's con un nivel de significancia del 5%.

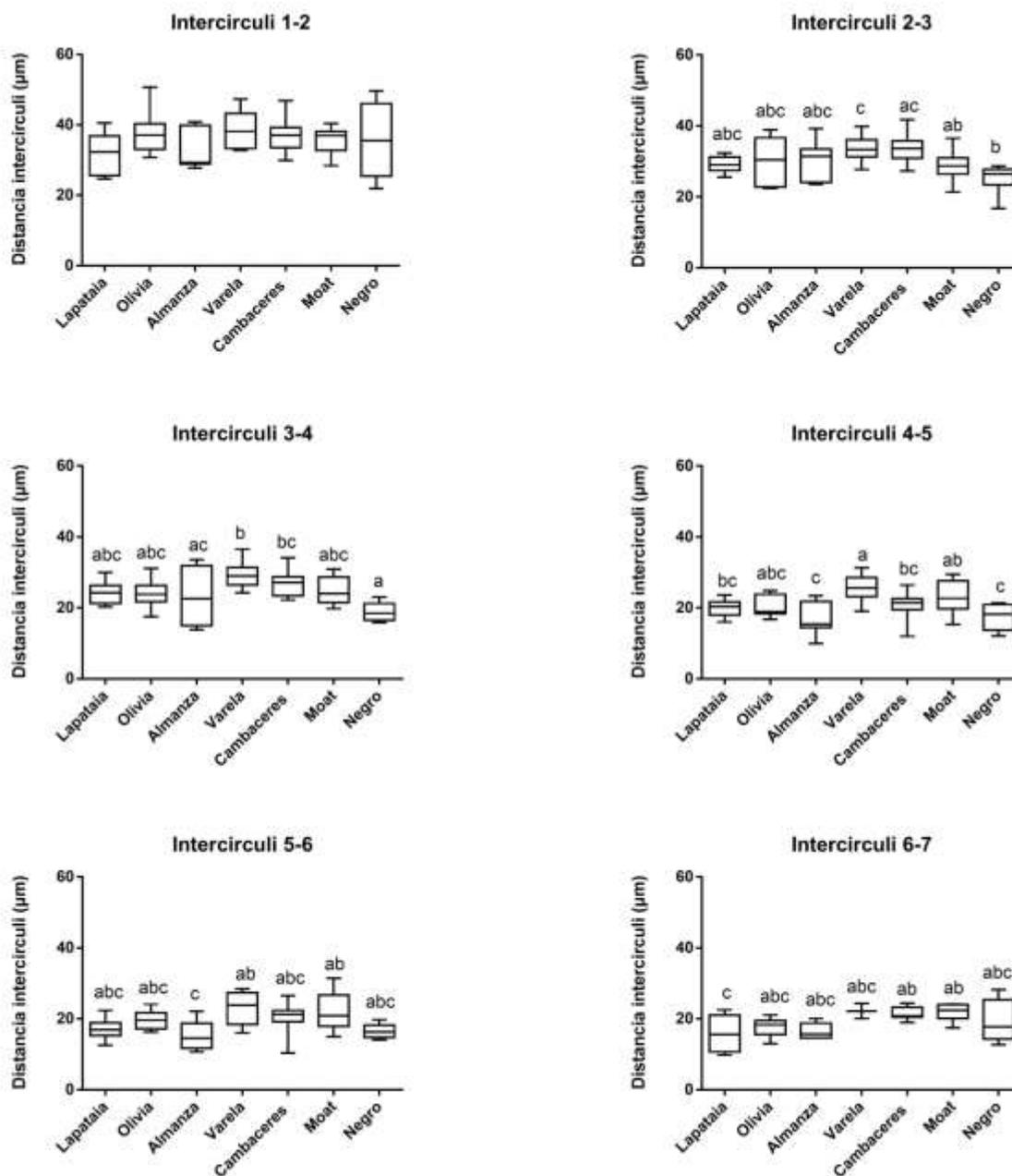


Figura 20: Distancia *intercirculi* de cada par de *circuli* en cada uno de los ríos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre ríos (Test de comparación múltiple de Tukey; $p < 0,05$).

Tabla 6: Media \pm Error estándar de la media (N= tamaño de la muestra) distancia *intercirculi* (μ) y resultados del análisis de varianza (ANOVA) de juveniles de *Oncorhynchus kisutch* capturados en ríos que desembocan en el Canal Beagle.

Río	<i>Circuli</i> 1-2	<i>Circuli</i> 2-3	<i>Circuli</i> 3-4	<i>Circuli</i> 4-5	<i>Circuli</i> 5-6	<i>Circuli</i> 6-7
Resultados de ANOVA	$F_{6,72} = 1.767$ $P=0.118$	$F_{6,70} = 4.906$ $P=0.0003$	$F_{6,69} = 5.322$ $P=0.0001$	$F_{6,64} = 6.315$ $P < 0,0001$	$F_{6,57} = 4.204$ $P=0.0014$	$F_{6,42} = 4.027$ $P=0.0028$
Lapataia	31.8 \pm 2.1 (8)	29.1 \pm 0.8 _{abc} (8)	24.3 \pm 1.1 _{abc} (8)	19.9 \pm 0.9 _{bc} (8)	17.0 \pm 1.0 _{abc} (8)	15.8 \pm 1.5 _c (8)
Olivia	37.5 \pm 1.9 (10)	30.3 \pm 2.2 _{abc} (9)	24.2 \pm 1.3 _{abc} (9)	20.7 \pm 1.0 _{abc} (9)	19.7 \pm 0.9 _{abc} (9)	17.6 \pm 0.9 _{abc} (9)
Almanza	33.2 \pm 1.9 (9)	29.7 \pm 1.8 _{abc} (9)	23.5 \pm 2.9 _{ac} (8)	16.8 \pm 1.8 _c (7)	15.3 \pm 1.5 _c (7)	16.4 \pm 0.8 _{abc} (7)
Varela	38.3 \pm 1.3 (15)	33.9 \pm 0.8 _c (15)	29.5 \pm 0.9 _b (15)	25.5 \pm 1.1 _a (12)	22.9 \pm 1.7 _{ab} (8)	22.2 \pm 2.1 _{abc} (2)
Cambaceres	37.3 \pm 1.3 (15)	33.5 \pm 1.0 _{ac} (15)	26.8 \pm 1.0 _{bc} (15)	20.9 \pm 0.8 _{bc} (15)	20.7 \pm 1.1 _{abc} (15)	21.6 \pm 0.6 _{ab} (9)
Moat	35.6 \pm 0.9 (15)	28.8 \pm 1.0 _{ab} (15)	25.1 \pm 0.9 _{abc} (15)	23.2 \pm 1.2 _{ab} (14)	22.0 \pm 1.6 _{ab} (11)	21.9 \pm 0.9 _{ab} (8)
Negro	35.5 \pm 3.8 (7)	25.3 \pm 1.7 _b (6)	18.9 \pm 1.1 _a (6)	17.5 \pm 1.5 _c (6)	16.5 \pm 0.9 _{abc} (6)	19.3 \pm 2.5 _{abc} (6)

Las diferencias entre las distancias inter *circuli* de los distintos ríos se observan a continuación:

- *Circuli* 1-2. Sin diferencias significativas entre los ríos, es decir que los *circuli* 1-2 son iguales para los peces de todos los ríos.
- *Circuli* 2-3. Hay diferencias significativas entre Varela y Moat, Varela y Negro; Cambaceres y Negro. Los *circuli* de Varela tienen mayor crecimiento que los de Moat y Negro; además los *circuli* de Cambaceres tienen también mayor crecimiento que los del río Negro.
- *Circuli* 3-4. Hay diferencias significativas entre Almanza y Varela, Varela y Negro, Cambaceres y Negro. Los *circuli* de Varela y Cambaceres tienen más crecimiento que con los que están comparados.
- *Circuli* 4-5. Hay diferencias significativas entre Lapataia y Varela, Almanza y Varela, Almanza y Moat, Varela y Cambaceres, Varela y negro, Moat y negro. Los *circuli* de Varela siempre tiene mayor crecimiento en comparación con los ríos en los que se lo compara. Con Moat ocurre lo mismo.
- *Circuli* 5-6. Hay diferencias significativas entre Almanza y Varela, Almanza y Moat. Los *circuli* de Almanza tienen un menor crecimiento que los otros 2 ríos.
- *Circuli* 6-7. Hay diferencias significativas entre los ríos Lapataia y Cambaceres, y Lapataia y Moat. Los *circuli* de Lapataia tiene menor crecimiento que los ríos con los que se los compara.

En cuanto a las temperaturas registradas en el río Lapataia y Almanza, se puede observar que el primero presentó temperaturas más elevadas en casi todo el periodo analizado (Figura 21). El pico de máxima temperatura para ambos ríos se registró en el mes de febrero con temperaturas de 12,3°C para ambos ríos; mientras que las temperaturas mínimas se observaron en los meses de agosto/septiembre para el río Lapataia (3,6°C) y en junio/julio para el río Almanza (0,2°C).

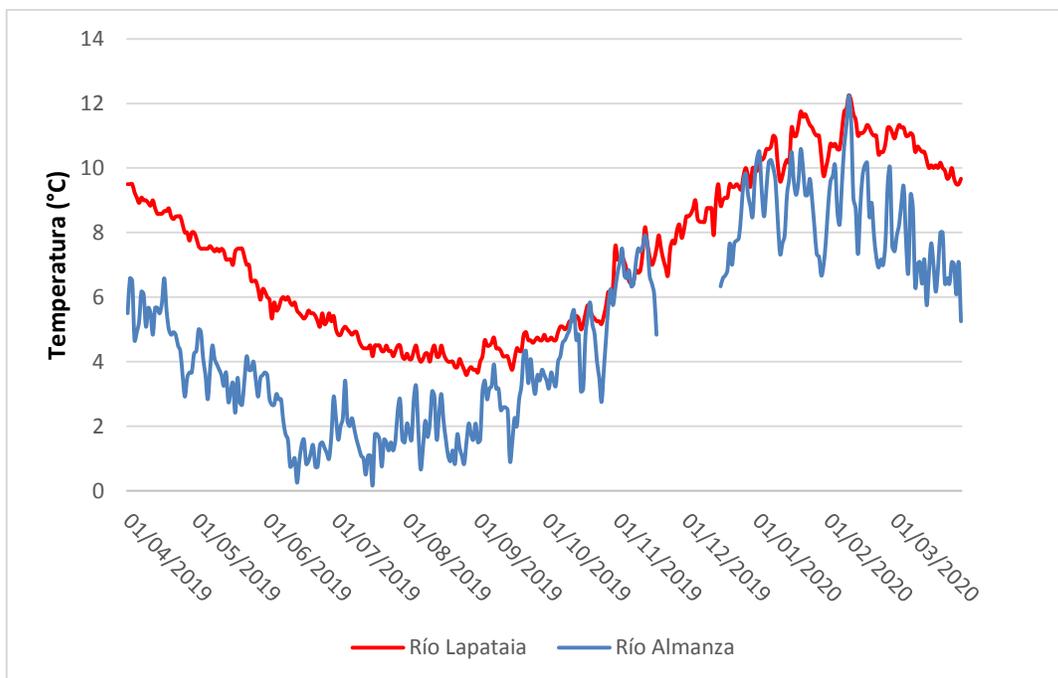


Figura 21: Temperatura media diaria del agua de los ríos Lapataia y Almanza registrada entre abril de 2019 y marzo de 2020.

Discusión

La detección de juveniles de salmón coho en ocho ríos que desembocan en el Canal Beagle confirma una nueva invasión de salmónidos en el extremo sur de la Patagonia tal como había sido propuesto por Chalde y col. (2019) y Maldonado y col. (2020). Estos resultados indican claramente que esta especie ya superó las etapas de introducción y naturalización propuestas por Roiloa y col. (2015), encontrándose en una clara etapa de propagación y expansión. Aún resta establecer si estas poblaciones están produciendo una alteración o daño al medio ambiente receptor y a sus especies nativas, momento en el cual se puede considerar a la especie exótica como invasora.

Los peces nativos de la Patagonia se encuentran bajo una constante presión por parte de las especies de peces introducidas, tanto por depredación como por competencia por uso del hábitat y el alimento (Habit y col. 2014). En su área de distribución nativa, los juveniles de salmón coho utilizan principalmente pequeños arroyos y aguas calmas, donde se alimentan de macroinvertebrados, presentando un comportamiento territorial (Sandercock 1991; Quinn 2018). Este mismo comportamiento se observó en ríos de Chile, solapándose el uso de hábitat con galáxidos nativos como son el puyen chico (*Galaxias*

maculatus, Jenyns 1842), el puyen grande (*G. platei*, Steindachner 1898) y la peladilla (*Aplochiton zebra*, Jenyns 1842), registrándose competencia por el alimento (Pérez y col. 2022). De esta manera, es esperable un efecto negativo del salmón coho sobre las especies de puyen presentes en Tierra del Fuego, ejercido a través de competencia por alimento y hábitat. Además, la dieta de los salmones puede ser ictiófaga cuando superan los 10 cm de longitud, causando aún mayor efecto negativo sobre las poblaciones de peces nativos de la Patagonia. Sin embargo, los resultados del presente trabajo sugieren que la talla máxima de los salmones capturados en agua dulce no superaría esas tallas, por lo que se espera que no puedan ejercer predación sobre las especies nativas. Sin embargo, algunos autores proponen que pudieran existir efectos positivos sobre las especies nativas (ver Quinn 2018 y Muñoz y col. 2021; 2022). Por ejemplo, la remoción de grava para realizar los nidos de desove por parte de las hembras deja disponibles insectos para que los peces los puedan consumir. Además, los cadáveres de salmónidos en descomposición luego de reproducirse promueven la producción primaria y secundaria en las comunidades acuáticas y ribereñas. Estos efectos han sido bien documentados en su área de distribución nativa por Quinn (2018), y también en ecosistemas patagónicos pobres en nutrientes (Muñoz y col. 2021; 2022).

En los ríos Almanza y Negro se encontraron dos cohortes contemporáneas, lo que indicaría, que en estos ríos, los adultos utilizaron ese ambiente como mínimo durante 2 años consecutivos para reproducirse y que los juveniles permanecen en ambientes dulceacuícolas al menos durante 1 año o más. La cohorte de mayor talla tendría aproximadamente un año y 5 meses mientras que la cohorte de menor talla correspondería a peces de solo unos meses de vida post eclosión. En los demás ríos muestreados se encontró una sola cohorte de peces, lo cual indicaría que la migración hacia el mar ocurre antes del año de vida. La tasa de éxito de las historias de vida de las cohortes de los distintos ríos probablemente varíe de un año a otro, dependiendo de las condiciones ambientales en los ríos, estuarios y ambientes marinos y los efectos potenciales de la mortalidad marina dependiente en gran parte del tamaño de los salmones (Craig y col. 2014).

Según Macchi y Vigliano (2014), el éxito en la introducción de una especie de pez depende de las acciones antrópicas, del ambiente, de la historia evolutiva, de interacciones ecológicas, como así también de la plasticidad de las especies introducidas. Comprender la historia de vida del salmón coho y la detección temprana en ambientes

recién invadidos es fundamental para predecir cambios futuros en sus historias de vida debido a las adaptaciones al entorno local y los efectos potenciales sobre las especies nativas (Chalde y col. 2023). De esta manera, la diversidad de historias de vida descritas en este trabajo, manifestadas a través de diferentes tasas de crecimiento y diferentes tiempos de uso de los ambientes de agua dulce, es lo que posiblemente haya favorecido la capacidad de invasión y establecimiento en estos ambientes.

El análisis lepidológico realizado nos aportó información útil para estimar diferencias en las tasas de crecimiento de los salmones en los diferentes ríos. En particular, se pudo determinar que los peces que habitan los ríos Varela, Cambaceres y Moat podrían tener mayores tasas de crecimiento que el resto de los peces de los otros ríos, ya que sus escamas presentaron mayores espacios *intercirculi*. Esta diferencia en las tasas de crecimiento puede deberse a diferencias en la temperatura del agua, la disponibilidad de alimento o la falta de competidores (Craig y col. 2014). Otros factores que pueden afectar el crecimiento del salmón son el caudal y velocidad de la corriente, factores que no fueron registrados en este trabajo (Iwamoto y Salo 1977; Simenstad y col. 1980; 1982). En este trabajo logramos detectar grandes diferencias en la dinámica de temperaturas entre los ríos Lapataia y Almanza. Las temperaturas registradas en el río Lapataia durante el invierno permitirían que los salmones emerjan de la grava en primavera, con condiciones óptimas en cuanto a disponibilidad de alimento. Por el contrario, las bajas temperaturas registradas en el río Almanza retrasarían la emergencia de los individuos, enfrentándolos a condiciones subóptimas durante los primeros meses y retrasando su crecimiento.

La presencia de una nueva especie exótica en Tierra del Fuego significa una nueva amenaza para la biodiversidad nativa de peces de agua dulce. Esta amenaza es aún mayor si consideramos que la isla de Tierra del Fuego es una de las pocas regiones del mundo donde el número de peces de agua dulce introducidos es mayor que el número de especies de peces nativos (Leprieur y col. 2008; Cussac y col. 2009). Algo importante para tener en cuenta es que los efectos y consecuencias del proceso de invasión del salmón coho van a sumarse a los efectos y consecuencias de otras especies ya establecidas, en el mismo ambiente. Como por ejemplo el caso del salmón Chinook que ya se encuentra ampliamente establecido en la Patagonia Argentina y Chilena, y presente en la cuenca de los ríos Lapataia y Grande en TDF (Fernández y col. 2010; Nardi y col. 2019). Debido a su comportamiento territorial los salmónidos pueden, potencialmente, competir por el hábitat y el alimento e incluso depredar sobre las especies de fauna íctica

nativa (Sandercock 1991; Quinn 2018). El establecimiento de una nueva especie de salmónido, en simultáneo con las especies exóticas de salmónidos ya establecidas, suma nuevos interrogantes en cuanto al impacto ambiental en los ecosistemas fueguinos, dado que entre cada especie puede variar sustancialmente su historia de vida (Reynolds y col. 2001). Algunas de las estrategias, dentro de cada historia de vida, que pueden variar entre las especies pueden ser, diferentes tiempos de desove, distinto tiempo a la hora de residir en agua dulce, tasa de crecimiento alcanzada, edad y tamaño al llegar a la maduración, fecundidad, esperanza de vida, tasa de mortalidad (Johnston y col. 2012), entre otras.

A partir de los datos reunidos en este trabajo, es posible proponer algunas recomendaciones para monitorear el avance de estas poblaciones, y desarrollar herramientas tendientes a mitigar el posible impacto sobre las especies nativas. En particular, es crucial describir con mayor detalle el comportamiento de los juveniles en cada río, realizando muestreos mensuales durante al menos dos años consecutivos. Uno de los aspectos claves para evaluar el potencial impacto sobre las especies nativas es desarrollar estudios de dieta y determinar la existencia, o no, de solapamiento y predación. Otra vía propuesta para conocer estas poblaciones es desarrollando y manteniendo una vía de contacto directa con los pescadores deportivos o artesanales que nos permita registrar la presencia de esta especie en otras cuencas. Finalmente sería de gran ayuda realizar una cooperación junto con centros de salmonicultura chilenos para que estén al tanto de las consecuencias de los escapes en los criaderos y fomentar mayor control y restricción de sus centros de cultivo.

Referencias bibliográficas

- Arismendi I, Penaluna BE, Dunham JB, García de Leaniz C, Soto D, Fleming IA, Gomez Uchida D, Gajardo G, Vargas PV, León-Muñoz J (2014). Differential invasion success of salmonids in southern Chile: patterns and hypotheses. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 24:919-941
- Baigún CRM, Quirós R (1985). Introducción de peces exóticos en la República Argentina. Informe técnico número dos. Instituto nacional de investigación y desarrollo pesquero. Departamento de aguas continentales. C.C. 175 Playa Grande - 7600 - Mar del Plata – Argentina
- Basulto S (2003). El largo viaje de los salmones. Una crónica olvidada, Maval Editorial, Santiago de Chile
- Beacham TD (1985). Meristic and morphometric variation in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in southern British Columbia and Puget Sound. *Canadian Journal of Zoology* 63:366-372
- Beacham TD, Murray CB (1990). Temperature, egg size, and development of embryos and alevins of five species of Pacific salmon: A comparative analysis. *Transactions of the American Fisheries Society* 119:927-945
- Caballero PJ (2013). Biología y ecología del salmón atlántico (*Salmo salar*) y el reo o trucha de mar (*Salmo trutta*). Servicio de Conservación de la Naturaleza. Xunta de Galicia. Pontevedra. España
- Carl LM, Healey MC (1984). Differences in enzyme frequency and body morphology among three juvenile life history types of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Nanaimo River. British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 41:1070-1077
- Casal C (2006). Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action. *Biological Invasions* 8:3–11
- Chalde T, Fernández DA (2017). Early migration and estuary stopover of introduced chinook salmon population in the Lapataia River Basin, southern Tierra del Fuego Island. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 199: 49-58
- Chalde T, Nardi CF, Fernández DA (2019). Early warning: detection of exotic Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by environmental DNA and evidence of establishment at the extreme south Patagonia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 76:2343–2349

- Chalde T, Nardi C, Reibel J, Quinn TP (2023). Detection of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) indicates widespread successful reproduction and different life-history strategies in the extreme south of Patagonia. *Biological Invasions*. Doi: 10.1007/s10530-023-03116-1
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16:11141-11156
- Cody ML (1966). A general theory of clutch size. *Evolution* 20:174-184
- Correa C, Gross M (2008). Chinook salmon invade southern South America. *Biological Invasions* 10:615
- Craig BE, Simenstad CA, Bottom DL (2014). Rearing in natural and recovering tidal wetlands enhances growth and life-history diversity of Columbia Estuary tributary coho salmon *Oncorhynchus kisutch* population. *Journal of Fish Biology* 85:31–51
- Crawford SS, Muir AM (2007). Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18:313–344
- Cussac VE, Fernández DA, Gómez SE, López HL (2009). Fishes of southern South America: a story driven by temperature. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:29-42
- Davidson F, Hutchinson S (1938). The geographic distribution and environmental limitations of the Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*), From Bulletin of the Bureau of Fisheries, Volume XLVIII
- Domínguez ED, Larraín JB (2012). *Sphagnum magallanicum* (pompón): el musgo de la turbera. INIA-CRI-KAMPENAIKE. INFORMATIVO N°31/2012
- Fernández DA, Ciancio J, Ceballos SG, Riva R, Carla M, Pascual MA (2007). Salmón chinook en el Parque Nacional Tierra del Fuego: ¿Un evento aislado o el inicio de un proceso de colonización? Informe Técnico Salmón chinook PNTDF
- Fernández DA, Ciancio J, Ceballos SG, Riva R, Carla M, Pascual MA (2010). Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum 1792) in the Beagle Channel, Tierra del Fuego: the onset of an invasion. *Biological Invasions* 12:2991-2997
- Figuroa Muñoz G, Olivos JA, Arismendi I, Fabiano G, Laporta M, Silveira S, González Bergonzoni I, Pavez G, Ernst B, Ciancio JE, Harrod C, Di Prinzio CY, Chalde T, Murphy CA, Gomez-Uchida D (2023). Contemporary distribution of non-native Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in South America. *Biological Invasions* doi.org/10.1007/s10530-023-03083-7

- Fisher JP, Pearcy WG (1990). Spacing of scale circuli versus growth rate in young coho salmon. *Fisheries Bulletin* 88:637-643.
- Fleming IA, Gross MR (1989). Evolution of adult female life history and morphology in a Pacific salmon (coho: *Oncorhynchus kisutch*). *Evolution* 43:141-157
- Fukuwaka M (1998). Scale and otolith patterns prove growth history of Pacific salmon. *North Pacific Anadromus Fish Commission Bulletin* 1:190-198.
- Fukuwaka M, Kaeriyama M (1997). Scale analyses to estimate somatic growth in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 54:631-636
- García de Leaniz C, Gajardo G, Consuegra S (2010). From best to pest: changing perspectives on the impact of exotic salmonids in the Southern Hemisphere. *Systematics and Biodiversity* 8:447–459
- Gilbert CH (1913). Age at maturity of the Pacific coast salmon of the genus *Oncorhynchus*. *U.S. Bulletin of the United States Bureau of Fisheries* 32:1-22
- Górski K, González JF, Vivancos A, Habit EM, Ruzzante DE (2016). Young of the year Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch* Recruit in Fresh Waters of Remote Patagonian Fjords in Southern Chile (51°S). *Biological Invasions* 19:1127–36
- Habit E, González J, Ortiz-Sandoval J, Elgueta A, Sobenes C (2014). Efectos de la invasión de salmónidos en ríos y lagos de Chile. *Las invasiones biológicas y su impacto en los ecosistemas. Asociación española de ecología terrestre*
- Hart JL (1973). Pacific fishes of Canada. *Fisheries Research Board of Canada Bulletin Number* 180
- Healey MC (1991). Life history of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). In: Groot GC, Margolis L. (Eds.), *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press, Vancouver, Canada:311-394
- Iturraspe R, Roig C (2000). Aspectos hidrológicos de turberas de *Sphagnum* de Tierra del Fuego – Argentina. *Conservación de ecosistemas a nivel mundial con énfasis en las turberas de Tierra del Fuego*.85:93.
- Iturraspe R, Urciuolo A (2000). Clasificación y caracterización de las cuencas hídricas de Tierra del Fuego. XVIII Congreso Nacional del Agua – Termas de Río Hondo, Santiago del Estero- 2000
- Iwamoto RN, Salo EO (1977). *Estuarine Survival of Juvenile Salmonids: A Review of the Literature*. Seattle, WA: Fisheries Research Institute, University of Washington

- Jensen Ø, Dempster T, Thorstad EB, Uglem I, Fredheim A (2010). Escapes of fishes from Norwegian sea-cage aquaculture: causes, consequences and prevention. *Aquaculture Environment Interactions* 1:71–83
- Johnston FD, Arlinghaus R, Dieckmann U (2012). Fish life history, angler behaviour and optimal management of recreational fisheries. *Fish and Fisheries* 2013. 14: 554-579
- Leprieur F, Beauchard O, Blanchet S, Oberdorff T, Brosse S (2008). Fish invasions in the worlds river systems: When natural processes are blurred by human activities. *PLoS Biol*, 6e28:404-410
- Macchi PJ, Vigliano PH (2014) Salmonid introduction in Patagonia: the ghost of past, present and future management. *Ecología Austral* 24:162-172
- MacCrimmon HR, Gots BL (1979). World distribution of Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36:422–457
- MacCrimmon HR, Marshall TL (1968). World distribution of Brown Trout, *Salmo trutta*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25:2527–2548
- Maldonado A, Contador T, Rendoll J, Moore S, Pérez C, Gómez D, Harrod C (2020). Southernmost distribution limit for endangered Peladillas (*Aplochiton taeniatus*) and non-native coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) coexisting within the Cape Horn biosphere reserve, Chile. *Journal of Fish Biology* 96:1495-1500
- Marr SM, Marchetti MP, Olden JD, García Berthou E, Morgan DL, Arismendi I, Day JA, Griffiths CL, Skelton PH (2010). Freshwater fish introductions in Mediterranean-climate regions: are there commonalities in the conservation problem? *Diversity and Distributions* 16:606–619
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215
- Muñoz NJ, Reid B, Correa C, Madriz RI, Neff BD, Reynolds JD (2022). Emergent trophic interactions following the Chinook salmon invasion of Patagonia. *Ecosphere* 13:3910
- Muñoz NJ, Reid B, Correa C, Neff BD, Reynolds JD (2021). Non-native Chinook salmon add nutrient subsidies and functional novelty to Patagonian streams. *Freshwater Biology* 66:495-508
- Nardi CF, Fernández DA, Vanella FA, Chalde T (2019). The expansion of exotic Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the extreme south of Patagonia: an environmental DNA approach. *Biological Invasions* 21:1415–1425

- Nardi CN, Sánchez J, Fernández DA, Casalnuovo MA, Rojo JH, Chalde T (2020). Detection of lamprey in southernmost South America by environmental DNA (eDNA) and molecular evidence for a new species. *Polar Biology* 43:369–383
- Nielsen JL, Gan C, Thomas WK (1994). Differences in genetic diversity for mitochondrial DNA between hatchery and wild populations of *Oncorhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 51:290–297
- Niklitschek E, Aedo E (2002). Estudio del ciclo reproductivo de las principales especies objetivo de la pesca deportiva en la XI región. Fondo de Investigación Pesquera, Universidad Austral de Chile, Chile
- Niklitschek EJ, Soto D, Lafon A, Molinet C, Toledo P (2013). Southward expansion of the Chilean salmon industry in the Patagonian Fjords: main environmental challenges. *Reviews in Aquaculture* 4:1-24
- Päivänen J (1982). Main physical properties of peat soils. Peatlands and their utilization in Finland. Finnish Peatland Society. Helsinki, Finland. 33-36
- Pascual MA, Rossi CR, Ciancio J, Lancelotti J, Arguimbau M, Pellanda L, Fernández P, Hudson R, Hidalgo F, Becker L (2004). Grupo de Ecología y Manejo de Salmónidos Centro Nacional Patagónico CONICET
- Pascual MA, Cussac V, Dyer B, Soto D, Vigliano P, Ortubay S, Macchi P (2007). Freshwater fishes of Patagonia in the 21st Century after a hundred years of human settlement, species introductions, and environmental change. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10: 212-227, DOI: 10.1080/14634980701351361
- Pérez S, Manosalva A, Colin N, González J, Habit E, Ruzzante DE, Górski K (2022). Juvenile salmon presence effects on the diet of native Puye *Galaxias maculatus* in lakes and estuaries of Patagonian fjords. *Biological Invasions* 24:81-92
- Pollard WR, Hartman GF, Groot C, Edgell P (1997). Field Identification of Coastal Juvenile Salmonids. 1: 20-22.
- Quinn TP, Myers KW (2004). Anadromy and the marine migrations of Pacific salmon and trout: rounsefell. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14:421-442.
- Quinn TP (2018). The behavior and ecology of pacific salmon and trout (2nd ed.). Seattle, 401 WA: University of Washington Press
- Rea S, Chikuni K, Branciarri R, Sangamayya RS, Ranucci D, Avellini P (2001). Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research* (2001) 68:689-698

- Reynolds JD, Jennings S, Dulvy NK (2001). Life histories of fishes and population response to exploitation. *Conservation of Exploited Species* (eds J.D. Reynolds, G.M. Mace, K.H. Redford and J.G. Robinson). Cambridge University Press, Cambridge, UK:147-168.
- Ricker WE (1972). Hereditary and environmental factors affecting certain salmonid populations:27-160. In Simon RC, Larkin PA (eds.). *The Stock Concept in Pacific Salmon*. MacMillan HR, Lectures in Fisheries. Institute of Fisheries, University of British Columbia, Vancouver, Canada
- Roiloa SR, Campoy JG, Retuerto R (2015). Importancia de la integración clonal en las invasiones biológicas. *Ecosistemas* 24: 76-83
- Sandercock FK (1991). Life history of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In *Pacific salmon life histories*. Edited by Groot C, Margolis L. University of British Columbia Press, Vancouver, B.C., Canada:395–445
- Sandoval JJ (2014). Interferencia trófica de salmónidos sobre peces ictiófagos nativos en lagos patagónicos de Chile
- Sepúlveda M, Arismendi I, Soto D, Jara F, Farias F (2013). Escaped farmed salmon and trout in Chile: incidence, impacts, and the need for an ecosystem view. *Aquaculture Environment Interactions* 4:273–283
- Sepúlveda M, Farías F, Soto E (2009). Escapes de salmones en Chile. Eventos, impactos, mitigación y prevención. WWF, Valdivia
- Sibly RM, Calow P (1986). *Physiological Ecology of Animals*. Blackwell, Oxford, U.K
- Simenstad CA, Salo EO (1980). Foraging success as a determinant of estuarine and nearshore carrying capacity of juvenile chum salmon in Hood Canal, Washington. In *Proceedings of the North Pacific Aquaculture Symposium* (Melteff B, Neve RA):21–37. Fairbanks AK: University of Alaska Sea Grant College Program
- Simenstad CA, Fresh KL, Salo EO (1982). The role of Puget Sound and Washington coastal estuaries in the lifehistory of Pacific salmon an unappreciated function. *Estuaries* 4:285–286
- Soto D, Jara F, Moreno CA (2001). Escaped salmon in the inner seas, southern Chile: facing ecological and social conflicts. *Ecological Applications* 11:1750–1762
- Soto D, Arismendi I, González J, Sanzana J, Jara F, Jara C, Guzmán E, Lara A (2006). Southern Chile, trout and salmon country: invasion patterns and threats for native species. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:97–117

- Soto D, Arismendi I, Olivos A, Canales-Aguirre C, Leon-Muñoz J, Niklitschek EJ, Sepúlveda M, Paredes F, Gomez-Uchida D, Soria-Galvarro Y (2022). Environmental risk assessment of non-native salmonid escapes from net pens in the Chilean Patagonia. *Reviews in aquaculture* 15:198-219
- Thorstad EB, Fleming IA, McGinnity P, Soto D, Wennevik V, Whoriskey F (2008). Incidence and impacts of escaped farmed Atlantic Salmon *Salmo salar* in nature. Norwegian Institute for Nature Research. Special Report 36:1–110
- Videla PHB (1978). Los salmónidos en Tierra del Fuego.
- Welcomme RL (1988). International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper. N°294. Pp 318
- Williams GC (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press Pp 307