



UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

Informe Final

Proyecto FIPA 2015-22

“DETERMINACIÓN DE UNIDADES POBLACIONALES DE ANCHOVETA
(*Engraulis ringens*) EN CHILE”

EDITADO POR:

Edwin Niklitschek, Cristóbal Garcés, Pamela Toledo

Universidad de Los Lagos, Centro i~mar

Puerto Montt, 09 de Enero de 2018



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



TABLA DE CONTENIDOS

Personal participante y horas trabajadas por objetivo.....	17
Resumen ejecutivo.....	18
Executive Summary.....	24
I.Antecedentes.....	29
II.Objetivos.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
III.Enfoque metodológico.....	31
IV.RESULTADOS por objetivos.....	32
Objetivo 1: Desarrollar un diseño experimental geográfico, temporal y biológicamente adecuado para la identificación de las unidades poblacionales de anchoveta en Chile.....	32
1. Área de estudio.....	32
2. Campañas de muestreo.....	32
3. Selección de muestras dentro de cada zona.....	33
3.1. Ejemplares juveniles (verano 2015-2016).....	33
3.2. Ejemplares adultos (agosto-octubre 2016).....	35
3.3. Otolitos históricos (año 2012-2013).....	35
3.4. Marcadores moleculares (año 2008).....	36
Objetivo 2: Determinar las unidades poblacionales de anchoveta en Chile y sus límites espaciales a través de análisis multi-metodológico, con énfasis en la química de núcleo y borde del otolito.....	37
1. Análisis de la composición elemental e isotópica de otolitos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i>	37
1.1. Antecedentes.....	37
1.2. Metodología de trabajo.....	38
1.3. Resultados.....	45
1.4. Análisis y discusión de resultados.....	74
1.5. Conclusiones.....	75
2. Composición de la fauna parasitaria de <i>E. ringens</i>	76
2.1. Antecedentes.....	76
2.2. Metodología de trabajo.....	78
2.3. Resultados.....	79
2.4. Análisis y discusión de resultados.....	81
2.5. Conclusiones.....	82
3. Análisis de la microestructura de otolitos (AMO).....	84
3.1. Antecedentes.....	84
3.2. Metodología de trabajo.....	86
3.2.1. Variables discriminantes.....	88
3.3. Resultados.....	90

3.3.1.Obtención de información micro-estructural derivada de los juveniles de origen conocido.....	90
3.3.2.Evaluación de la capacidad discriminatoria de las variables micro-estructurales de juveniles.....	97
3.3.3.Análisis de la micro-estructura de otolitos en adultos de origen desconocido.....	99
3.3.4.Determinación de niveles de mezcla en adultos con algoritmos de clasificación derivados de juveniles.....	102
3.3.5.Análisis micro-estructural y evaluación de su capacidad discriminatoria en un año de muestreo alternativo (2012-2013).....	103
3.4. Análisis y discusión de resultados.....	109
3.5. Conclusiones.....	113
4.Morfometría de otolitos.....	115
4.1. Antecedentes.....	115
4.2. Metodología de trabajo.....	116
4.2.1.Muestreo y preparación de otolitos.....	116
4.2.2.Análisis morfométrico de los otolitos.....	117
4.3. Análisis y discusión de resultados.....	123
4.3.1.Índices de Forma.....	123
4.3.2.Análisis de elíptica de Fourier.....	128
4.4. Conclusiones.....	134
5.Marcadores moleculares.....	136
5.1. Introducción.....	136
5.2. Metodología.....	138
5.2.1.Número de muestras.....	138
5.2.2.Sitios de muestreo y recolección de muestras.....	138
5.2.3.Extracción de ADN, visualización y cuantificación.....	139
5.2.4.Desarrollo de librería microsátélites mediante NGS.....	141
5.2.5.Prueba de polimorfismo en microsátélites obtenidos.....	142
5.2.6.Bases de datos genéticos para los análisis estadísticos.....	142
5.2.7.Determinación de calidad de base de datos de loci microsátélites.....	142
5.2.8.Parámetros de diversidad genética para loci microsátélites.....	143
5.2.9.Análisis de poder estadístico para loci microsátélites.....	143
5.2.10.Estructuración poblacional para loci microsátélites.....	143
5.2.11.Detección de estructura genética poblacional sin información a priori.....	144
5.2.12.Análisis de aislamiento por distancia.....	146
5.2.13.Análisis de componentes principales.....	146
5.3. Resultados.....	146
5.3.1.Extracción de ADN, visualización y cuantificación.....	146
5.3.2.Desarrollo de marcadores microsátélites mediante NGS.....	146
6.Análisis y discusión de resultados.....	163
7.Conclusiones.....	164

Objetivo 3: Desarrollar un modelo conceptual respecto a las migraciones ontogénicas de los individuos, los posibles procesos de conectividad, y su relación con las variables ambientales.....165

1.Introducción.....	165
2.Metodología.....	165
2.1. Geo-localización de áreas de crianza de anchoveta.....	166
3.Resultados y discusión.....	168
3.1.1.Patrones de estructuración genética poblacional.....	168
3.1.2.Composición elemental de otolitos.....	168
3.1.3.Composición isotópica de otolitos.....	169
3.1.4.Geolocalización.....	169
4. Conclusiones.....	172
4.1.1.Patrones de crecimiento temprano.....	182
4.1.2.Morfometría de otolitos y composición parasitaria.....	182
5.Conclusiones.....	182
Objetivo 4: Estimar el grado de mezcla entre las unidades poblacionales.....	183
5.1. Introducción.....	183
5.2. Metodología.....	183
5.3. Resultados.....	185
5.3.1.Modelos basados en hipótesis de dos orígenes.....	185
5.3.2.Modelos basados en hipótesis de tres orígenes.....	186
5.4. Discusión.....	188
5.5. Conclusiones.....	189
Conclusiones generales.....	191
Referencias.....	195
Anexo 1. Protocolo para análisis de otolitos mediante LA-ICPMS.....	210
Anexo 2. Taller de difusión de resultados proyecto fipa 2015-22.....	214
Programa Taller de Difusión Proyecto Fipa 2015-22.....	214
Asistentes.....	215
Notas sobre el Taller:.....	215
Anexo 3. Composición isotópica de otolitos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> en el Mar Interior de Chiloé.....	219
1.Composición isotópica de otolitos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> del Mar Interior de Chiloé.....	219
1.1. Antecedentes.....	219
1.2. Metodología de trabajo.....	219
1.3. Resultados.....	221
1.4. Análisis y discusión de los resultados.....	222
1.5. Conclusiones.....	223
1.6. Referencias.....	224

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Límites latitudinales entre zonas de estudio y entre estratos dentro de zonas utilizados para el muestreo de anchoveta <i>Engraulis ringens</i>	33
Tabla 2: Número de muestras de juveniles y adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> analizadas por las distintas aproximaciones metodológicas (2015-2016).....	35
Tabla 3: Número de muestras de otolitos de <i>Engraulis ringens</i> para análisis de isótopos estables. Números entre paréntesis indican cantidad de otolitos utilizado para la combinación de secciones.....	43
Tabla 4: Media observada y ajustada (X) de las concentraciones de Na ²³ , Mg ²⁵ , Mn ⁵⁵ , Sr ⁸⁸ y Ba ¹³⁸ relativas al ⁴³ Ca (µg·g ⁻¹) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (período 2012-2013). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	47
Tabla 5: Comparación de modelos lineales generalizados mixtos formulados para explicar la distribución multivariada de ²³ Na, ²⁵ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁸⁸ Sr y ¹³⁸ Ba relativas al ⁴³ Ca en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (periodos 2012-2013 y 2015-2016 DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield 2010). Modelos difieren respecto de las hipótesis de agrupación/segregación de zonas de estudio empleadas para explicar variable respuesta.....	49
Tabla 6: Medias observadas y ajustadas de las concentraciones de ²³ Na, ²⁵ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁸⁸ Sr y ¹³⁸ Ba relativas al ⁴³ Ca (µg·g ⁻¹) en secciones nucleares de otolitos de peces juveniles y adultos, dentro de cada zona y periodo de estudio. DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	52
Tabla 7: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la variabilidad en las concentraciones de ²³ Na, ²⁵ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁸⁸ Sr y ¹³⁸ Ba relativas al ⁴³ Ca (µg·g ⁻¹) en la sección nuclear de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (periodo 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas combinaciones de variables explicativas. La variable zona corresponde a la zona de captura y divide el área de estudio en Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. La variable etapa discrimina individuos juveniles y adultos. DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	56
Tabla 8: Medias observadas y ajustadas de las concentraciones de ²³ Na, ²⁵ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁸⁸ Sr y ¹³⁸ Ba relativas al ⁴³ Ca (µg·g ⁻¹) en secciones nucleares y marginales de otolitos de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (periodos 2012-2013 y 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar....	57
Tabla 9: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la variabilidad en las concentraciones de ²³ Na, ²⁵ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁸⁸ Sr y ¹³⁸ Ba relativas a ⁴³ Ca (µg·g ⁻¹) en secciones nucleares y marginales de otolitos de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (periodos 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas distintas combinaciones de variables explicativas. Variable zona divide el área de estudio en Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Variable sección discrimina secciones nuclear y marginal del otolito. DIC= Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	59
Tabla 10: Media observada y ajustada (X) de la concentración de cada elemento (µg·g ⁻¹) en borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2012-2013). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	62
Tabla 11: Media observada y ajustada (X) de la concentración de cada elemento (µg·g ⁻¹) en borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	63
Tabla 12: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones de Na ²³ , Mg ²⁵ , Mn ⁵⁵ , Sr ⁸⁸ y Ba ¹³⁸ en borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (periodo 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas	

de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos; DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	64
Tabla 13: Media observada y ajustada (X) $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$ en núcleo de otolitos de peces juveniles en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	67
Tabla 14: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{8}O) en otolitos de juveniles de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> son explicadas por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos. DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	68
Tabla 15: Media observada y ajustada (X) $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$ en núcleo de otolitos de peces juveniles y adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	69
Tabla 16: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la composición isotópica ($\delta^{13}C$ y $\delta^{8}O$) en la sección nuclear de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> (2015-2016) es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras y la etapa de los individuos. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos DIC= Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	70
Tabla 17: Media observada y ajustada (X) $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$ en núcleo (juvenil) y borde (adulto) de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	71
Tabla 18: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{18}O) en la sección nuclear y borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras y/o etapa de vida representada (juvenil y adulta). Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	72
Tabla 19: Media observada y ajustada (X) $\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$ en el borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio. DS=desviación estándar; EE=error estándar.....	73
Tabla 20: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{18}O) en el borde de otolitos de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> son explicadas por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos. DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).....	73
Tabla 21: Características de la muestra total analizada. DE = Desviación Estándar, n= tamaño muestral.....	79
Tabla 22: Prevalencia de infección (Prev) e Intensidad media de infección (IM) para los parásitos encontrados en las tres zonas analizadas.....	80
Tabla 23: Matriz de asignación correcta, basada en Intensidad de Infección para las tres zonas consideradas.....	81
Tabla 24: Coeficientes de regresión de modelos entre la dimensiones del tamaños del otolito derivadas de análisis micro-estructural en pre-reclutas y reclutas de anchoveta <i>E. ringens</i> colectados en la zona norte (Zona I), Atacama-Coquimbo (Zona II) y centro-sur (Zona III) de Chile, respectivamente. LO=longitud antero-posterior del otolito; RR: radio rostral; RC: radio caudal; RV. Radio ventral; RD: radio dorsal; EE: error estándar.....	92
Tabla 25: Estadísticas derivadas de análisis de medidas repetidas multivariado para datos balanceados hasta los primeros 40 y 50 días de vida <i>E. ringens</i> , para poner a prueba la hipótesis de ausencia de diferencias significativas en el radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos entre	

las Zonas I, II y III. GLh y GLe: Grados de libertad asociados al contraste de factor área-repeticiones y error, respectivamente. F: aproximación a un estimado del estadístico F-Fisher.....	95
Tabla 26: Funciones de clasificación derivadas de un Análisis Discriminante Lineal (ADL), utilizando variables provenientes del análisis del micro-estructura de otolitos de juveniles de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> recolectados en las tres zonas de muestreo.....	97
Tabla 27: Porcentajes de clasificación derivados de las funciones de clasificación descritas en la Tabla 26. Se destaca que las muestras utilizadas fueron de origen conocido, utilizando dos set de datos, i.e, hasta los primeros 40 y 50 días, respectivamente. Los porcentajes de clasificación fueron corregidos utilizando una aproximación jackknife.....	98
Tabla 28: Estadísticas derivadas de análisis de mediadas repetidas para datos balanceados hasta los primeros 40 y 50 días de vida de peces adultos de <i>E. ringens</i> , para poner a prueba la hipótesis de ausencia de diferencias significativas en el radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos entre la Zona I, Zona II y Zona III. GLh y GLe: Grados de libertadas asociadas al contraste de factor área-repeticiones y error, respectivamente. F: aproximación a un estimado del estadístico F-Fisher.....	99
Tabla 29: Porcentajes de clasificación derivados de las funciones de clasificación del radio y grosor del micro-incrementos de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta, para las mismas variables utilizadas en juveniles, donde se utilizaron dos tipos de datos balanceados hasta los primeros 40 (a) y 50 (b) días, respectivamente.....	101
Tabla 30: Identificación de la ocurrencia y porcentaje de mezcla (entre paréntesis) de ejemplares adultos de anchoveta recolectados en tres zonas de estudio, que se originaron en las zonas de crianza aledañas a los sitios de muestreo. La mezcla fue determinada usando algoritmos de clasificación en muestras balanceadas del grosor y radio para los primeros 40 (a) y 50 de vida (b), de acuerdo a las funciones de clasificación descritos en la Tabla 24, que fueron obtenidos de juveniles de origen conocido.....	102
Tabla 31: Porcentajes de clasificación derivados de un análisis discriminante lineal (ADL), donde las variables independientes correspondieron a radios caudales estandarizados y grosor medios de otolitos de juveniles de anchoveta, recolectados en las tres zonas de estudio entre primavera 2012 a verano 2013. Las variables fueron transformadas con logaritmo natural previo al análisis.....	108
Tabla 32: Número de otolitos utilizados en el análisis de morfometría, clasificados por estado ontogenético, zona y localidad de procedencia, para los años 2016 y 2013. Se incluye en rango de longitudes de pez por cada estrato.....	117
Tabla 33: Variables morfométricas e índices descriptores de forma del otolito. Se incluyen las ecuaciones de cada índice. (Fuente: Modificada de Pothin et al., 2006).....	121
Tabla 34: Variables morfométricas básicas e índices de forma de los otolitos de pre-reclutas y reclutas y adultos de anchoveta por zona de muestreo. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.....	124
Tabla 35: Resumen del análisis de devianza de los modelos aditivos generalizados (GAM) de cada índice de forma en su relación con la longitud del pez entre zonas de muestreo. La Zona I corresponde a las localidades de Arica-Antofagasta; Zona II a Atacama-Coquimbo y Zona III a Valparaíso-Valdivia.....	125
Tabla 36: Matriz de clasificación de otolitos de anchoveta juvenil de 2016 (longitud 6,5 a 9,5 cm LT) para las zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.....	128
Tabla 37: Matriz de clasificación de los otolitos de anchoveta adultas de 2016, para las tres zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.	130

Tabla 38: Matriz de clasificación de otolitos de anchoveta adultas de 2013, para las tres zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.	131
Tabla 39: Muestras de <i>Engraulis ringens</i> colectadas en 2008 para comparaciones de parámetros genéticos durante 2015-2016.	139
Tabla 40: Comparación de modelos de frecuencias alélicas correlacionadas y no correlacionadas obtenido en GENELAND mediante el Factor de Bayes para <i>Engraulis ringens</i> . Valores en negrita corresponden a los modelos que muestran mayor evidencia de ajuste a los datos en la base de datos base de datos adultos 2008, base de datos juveniles 2015, y la base de datos combinada genotipos 2008 y genotipos 2015.	145
Tabla 41: Detalles de 15 loci microsatélites polimórficos desarrollados para <i>E. ringens</i> (Ni: número de individuos analizados; NA: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; PI: probabilidad de identidad para cada locus; PHW: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. † indican los loci que muestras desviaciones al equilibrio de H&W y en negrita se destacan los loci con posible presencia de alelos nulos).	150
Tabla 42: Parámetros de variabilidad genética de <i>E. ringens</i> para muestras de 2008. (N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)	151
Tabla 43: Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2015-2016: Zona I vs Zona III. Estimadores para los 15 loci microsatélites para las Zonas I y Zona III de las muestras correspondientes a 2015-2016. (N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)	152
Tabla 44: Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2008 y muestras de 2015-2016. (N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)	153
Tabla 45: Parámetros de variabilidad genética utilizando criterio de grupos edad. Parámetros de variabilidad genética de <i>E. ringens</i> para 15 loci microsatélites, bajo el criterio de grupos de edad (Mes 2 entre 31 a 60 días; Mes 3 entre 61 a 90 días; Mes 4 entre 91 a 120 días. N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)	154
Tabla 46: Estimados del poder estadístico de 15 loci microsatélites. Valores de probabilidad Chi ² y Test de Fisher para detectar niveles de diferenciación poblacional (Fst) por promedio de test exacto de Fisher's y Xi ² , algoritmo implementado en POWSIM (Ryman & Palm, 2006).	154
Tabla 47: Índice de estructuración poblacional Fst y Rst por pares muestras de 2008 vs muestras de 2015-2016. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.	154
Tabla 48: Índice de estructuración poblacional Fst por pares de zonas para muestras del año 2008. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados. En negrita valores significativos.	155
Tabla 49: Índice de estructuración poblacional Rst por pares de zonas para muestras del año 2008. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.	155
Tabla 50: Índices de estructuración poblacional Fst y Rst por pares de zonas para muestras del año 2015-2016. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.	155

Tabla 51: Índice de estructuración poblacional F_{st}/R_{st} por pares utilizando criterio de grupos edad. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados. Columna MES indica mes de vida de los individuos.....	156
Tabla 52: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona I (Arica-Parinacota a Antofagasta). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes.....	186
Tabla 53: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona II (Atacama-Coquimbo). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes.....	186
Tabla 54: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona III (Valparaíso-Los Lagos). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes.....	186
Tabla 55: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona I (Arica-Parinacota a Antofagasta). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.....	187
Tabla 56: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona II (Atacama-Coquimbo). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.....	187
Tabla 57: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> presentes en la Zona III (Valparaíso-Los Lagos). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.....	188

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Área de estudio y zonas de muestreo de anchoveta *Engraulis ringens* en los distintos periodos de muestreo (2008: análisis microstatélites, 2012-2013: análisis otolitos, 2015-2016: análisis multimetodológico). círculos negros indican lances de muestras de juveniles y círculos rojos indican lances de muestras de ejemplares adultos.....34
- Figura 2: Longitud total media de ejemplares juveniles de anchoveta *Engraulis ringens*, muestreados entre diciembre 2015 y marzo 2016, por cada zona y estrato de muestreo.....34
- Figura 3: Longitud total media de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados entre agosto y septiembre de 2016, por zona y estrato de muestreo.....35
- Figura 4: A: Otolito entero de ejemplar juvenil de 4,4 cm de longitud total. B: Sección transversal del mismo otolito pulido y analizado por LA-ICPMS. En esta sección se observan siete puntos (μm) en el eje primordio-borde dorsal del otolito41
- Figura 5: Concentraciones de Na^{23} , Mg^{25} , Mn^{55} , Sr^{88} y Ba^{138} relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens*. Panel izquierdo corresponde a periodo 2012-2013 y panel derecho corresponde a periodo 2015-2016. Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo; y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).....48
- Figura 6: Diagrama de los tres primeros componentes principales de las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados en a) periodo 2012-13 (74 % de la varianza explicada) y b) período 2015-2016 (74 % de la varianza explicada). Zona I=Arica-Antofagasta, Zona II=Atacama-Coquimbo; Zona III=Valparaíso-Los Lagos.....50
- Figura 7: concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* dentro de cada zona (periodo 2012-2013). Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo; y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.....51
- Figura 8: Concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* dentro de zonas, para el periodo 2015-2016. Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos). Letras distintas indican diferencias significativas entre etapas, dentro de zonas.....53
- Figura 9: Diagrama de los tres primeros componentes principales de concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca en zonas nucleares de otolitos de peces juveniles (Juv) y adultos (Adu) de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados en el periodo 2012-13 (a; 73 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 68 % de la varianza explicada). ZI=Arica-Antofagasta, ZII=Atacama-Coquimbo; ZIII=Valparaíso-Los Lagos.....54
- Figura 10: Concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares (etapa juvenil) y bordes (etapa adulta) de otolitos de peces adultos de anchoveta *Engraulis ringens* en el periodo 2012-2013. Zona I=Arica-Antofagasta (blanco), Zona II=Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III=Valparaíso-Los Lagos (gris claro). Diferencias significativas ($p<0.05$) dentro de zonas se indican con letras diferentes.....55
- Figura 11: Concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares y marginales de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodo 2015-2016). Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y

Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro). Diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro de zonas se indican con letras diferentes.....	58
Figura 12: Diagrama de los tres primeros componentes principales de la concentración relativa de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba en zona nuclear (Juv) y borde (Adu) de otolitos de peces adultos muestreados en el periodo 2012-13 (a; 76 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 81 % de la varianza explicada). Z1=Arica-Antofagasta, Z2=Atacama-Coquimbo; Z3=Valparaíso-Los Lagos.....	60
Figura 13: Concentración relativa de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba en borde de otolitos de peces adultos. Panel izquierdo corresponde al periodo 2012-2013 y panel derecho corresponde al periodo 2015-2016 (Zona I: Arica-Antofagasta Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos). Diferencias significativas entre zonas ($p < 0.05$) se indican con letras diferentes.....	61
Figura 14: Diagrama de los tres primeros componentes principales de la concentración relativa de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba en borde de otolitos de peces adultos muestreados en el periodo 2012-2013 (a; 71 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 71 % de la varianza explicada). ZI=Arica-Antofagasta, ZII=Atacama-Coquimbo; ZIII=Valparaíso-Los Lagos.....	66
Figura 15: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles. Letras diferentes, indican diferencias significativas entre zonas.....	67
Figura 16: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> . Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).....	68
Figura 17: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles (juv) y adultos (adu). Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro).....	69
Figura 18: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles (triángulos) y adultos (círculos) de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> . Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).....	70
Figura 19: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en el núcleo (juv) y borde (adu) de otolitos de ejemplares adultos. Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro).....	71
Figura 20: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nuclear y borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> , que representan su fase juvenil (triángulos) y adulta (círculos). Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).....	72
Figura 21: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) en el borde de otolitos de ejemplares adultos en cada zona de estudio. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos.....	73
Figura 22: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> . Colores indican zonas de captura de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).....	74
Figura 23: Ilustración de micro-incrementos en otolitos de peces teleósteos. (1) Vista general de otolito pulido; (2) Incrementos diarios; (3) zona del primordio (P).....	85
Figura 24: Comparación del crecimiento de <i>E. ringens</i> entre la zona centro-sur y la zona norte a través del ajuste del crecimiento estacional (A) y el perfil de grosor de los micro-incrementos diarios (B).....	86

Figura 25: Fotografías bajo luz transmitida de otolitos pulidos en posición sagital de un juvenil de <i>E. ringens</i> de 10 cm de LT. (a) A:10X; (b) Zona del primordio A:400X; (c) Zona media A:200X; (d) Borde del otolito A:200X.....	87
Figura 26: Ilustración del proceso de medición de micro-incrementos diarios de ejemplares adultos de anchoveta, utilizando el análisis de imágenes “Otolith Reading System (RATOC Ltd).....	90
Figura 27: Ilustración de variables discriminatorias asociadas al diámetro de la marca de eclosión en una muestra de otolito pulido de <i>Engraulis ringens</i>	90
Figura 28: Relación entre dimensiones del tamaño del otolito extraídas de análisis micro-estructural en pre-reclutas y reclutas de <i>Engraulis ringens</i> , colectados en las zonas estudiadas. (a) Longitud otolito-radio rostral; (b) longitud otolito-radio caudal; (c) longitud otolito-radio ventral; (d) longitud otolito-radio dorsal.....	91
Figura 29: Imágenes combinadas de un otolito sagital derecho de un ejemplar pre-recluta de 4,6 cm de LT de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> recolectados en la zona norte de Chile (Zona I), en diciembre de 2015. pr: primordio; mp: micro-incrementos primarios (diarios); sd: micro-incrementos subdiarios....	93
Figura 30: Imagen combinada de un otolito sagital derecho de un ejemplar pre-recluta de 4,5 cm de LT de <i>E. ringens</i> colectados en la Zona III, en enero 2016. pr: primordio; mp: micro-incrementos primarios (diarios). La línea segmentada ilustra la secuencia de mp.....	93
Figura 31: Perfiles de radio caudal y grosores medios para los primeros 50 días de vida de ejemplares pre-reclutas de anchoveta <i>E. ringens</i> recolectados en las tres zonas de muestreo.....	94
Figura 32: Distribuciones de frecuencia de fechas de nacimiento de ejemplares pre-reclutas y reclutas de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> recolectados. (a) Zona I (norte); (b) Zona II (Atacama-Coquimbo) y (c) Zona III (Centro-Sur) de Chile. Los meses en el eje “X” corresponden al año 2015.....	96
Figura 33: Valores medios del diámetro a la marca de eclosión (DME) en otolitos sagitales de juveniles de anchoveta recolectados en las tres zonas de estudio. El DME se registró a la primera marca prominente a partir de la cual se observaron micro-incrementos distintivos.....	96
Figura 34: Valores canónicos derivados de una ADL, donde variables derivadas del radio y grosor de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes.....	98
Figura 35: Perfiles de radio caudal y grosores medios para los primeros 50 días de vida de ejemplares adultos de anchoveta <i>E. ringens</i> recolectados en las tres zonas de estudio.....	100
Figura 36: Valores canónicos derivados de una ADL para adultos de <i>E. ringens</i> , donde variables derivadas del radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes, en datos balanceados a los primeros 40 (a) y 50 (b) días de vida.	101
Figura 37: Ilustración de los niveles de mezcla de adultos de anchoveta recolectados entre zonas de muestreo, determinados utilizando algoritmos de clasificación derivados del análisis de la micro-estructura de juveniles de origen conocido.....	103
Figura 38: Relación entre dimensiones del tamaño del otolito extraídas de análisis micro-estructural en reclutas <i>E. ringens</i> , recolectados en la zona estudiadas para el periodo 2012-2013. Longitud otolito-radio rostral (a); longitud otolito-radio caudal (b); longitud otolito-radio ventral (c); longitud otolito-radio dorsal (d).....	104
Figura 39: Distribuciones de frecuencia de fechas de nacimiento de ejemplares reclutas de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> recolectados en la zona Norte (a), Atacama-Coquimbo (b) y Centro-Sur (c) de Chile. Los meses en el eje “X” corresponden al año 2012 y verano de 2013.....	105

Figura 40: Perfiles de radio caudal (a) y grosores (b) medios para los primeros 100 días de vida de ejemplares juveniles (reclutas) de entre 9 y 12 cm LT de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> , recolectados durante el otoño de 2012 y verano de 2013 en las tres zonas de estudio.....	107
Figura 41: Valores canónicos derivados de una ADL para juveniles (reclutas) de <i>Engraulis ringens</i> , recolectados durante el periodo 2012-2013 en las tres zonas de estudio y donde variables derivadas del radio y grosor o de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes, en datos balanceados a los primeros 40, 50, 60, 70 y 80 días de vida.....	108
Figura 42 . Ilustración del proceso de digitalización de un otolito derecho de 3 mm de longitud, de un ejemplar de anchoveta de 13 cm de LT con el Programa Image-Pro Plus. (A) Otolito digitalizado en fondo oscuro; (B) imagen binarizada del otolitos convertido a “gray scale 8”.....	118
Figura 43: Diagrama que muestra en forma resumida la secuencia de pasos para preparar una imagen y obtener las medidas morfométricas básicas y las coordenadas cartesianas utilizadas en el análisis de forma del otolito empleando descomposición elíptica de Fourier.....	119
Figura 44: Distribución de la longitud total de los peces juveniles y adultos por localidad y zona, colectados el 2013 y 2016, utilizados en el análisis morfométrico de otolitos.....	122
Figura 45: Porcentaje de desviación del contorno del otolito de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> reconstituido con distinto número de armónicos (DF) respecto del contorno original. Sobre 20 armónicos la varianza explicada es mayor al 95%.....	123
Figura 46: Gráficas de la izquierda ilustran el modelado GAM para el factor de forma, redondez, elipticidad, circularidad y rectangularidad como una función no-lineal de la longitud total de anchoveta de a Zona I (Arica-Antofagasta), Zona II (Atacama-Coquimbo) y Zona III (Valparaíso-Valdivia).....	127
Figura 47: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta juvenil de 2016 para las tres zonas de muestreo analizadas; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.....	129
Figura 48: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta adulta de 2016 para las tres zonas de muestreo: Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.....	130
Figura 49: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta para las tres zonas de muestreo en 2013; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.....	131
Figura 50: Reconstrucción de la forma del otolito promedio de anchoveta para cuatro rangos de longitudes que representan dos estados ontogenéticos de anchoveta para cada zona de muestreo, estimados a partir de los descriptores de Fourier. La línea azul solida corresponde a la Zona I, la verde cortada a la Zona II y la roja punteada a la Zona III.....	132
Figura 51: Densidad de frecuencias para cada número de conglomerado genéticos testeados. (A) resultados para el modelo no correlacionado, (B) resultados para el modelo correlacionado, y (C) resultados para el modelo que mejor ajusto según el Factor de Bayes para un K igual a 2, para la base de datos de genotipos combinada 2008-2015.....	156
Figura 52: Densidad de frecuencias para cada número de conglomerado genéticos testeados. (A) modelo correlacionado y (B) modelo no-correlacionado, ambos para la base de datos de individuos adultos (2008). (C) modelo correlacionado y (D) modelo no-correlacionado, ambos para la base de datos de individuos juveniles (2015).....	157

Figura 53: Mapa de isolíneas de probabilidades para los tres conglomerado genéticos (A-C) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos adultos (año 2008).....	158
Figura 54: Mapa de isolíneas de probabilidades para los dos conglomerado genéticos (A-B) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alelicas correlacionadas en la base de datos de individuos juveniles (año 2015).....	159
Figura 55: Análisis de aislamiento por distancia para la base de datos de anchovetas adultas del 2008. Izquierda: Gráfico del análisis de permutaciones (test de mantel) mostrando resultados no significativos. Derecha: Gráfico de la correlación entre distancia geográfica y distancia genética.....	160
Figura 56: Análisis de aislamiento por distancia para la base de dato anchovetas juveniles del 2015. Izquierda: Gráfico del análisis de permutaciones (test de mantel) mostrando resultados significativos. Derecha: Gráfico de la correlación entre distancia geográfica y distancia genética.....	160
Figura 57: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para ambas bases de datos 2008-2018 combinadas para $K = 2$	161
Figura 58: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para la base de datos de anchovetas adultas del año 2008 para $K = 6$	161
Figura 59: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para la base de datos de anchovetas juveniles del año 2015 para $K = 2$	162
Figura 60: Análisis de Coordenadas Principales para la base de datos de anchovetas juveniles del 2015 basado en distancias genéticas.....	162
Figura 61: Geo-localización de las áreas de crianza utilizadas por juveniles capturados dentro de la Zona I. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda (2×2 km ²). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.	173
Figura 62: Geo-localización de las áreas de crianza de juveniles capturados dentro de la Zona II. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda (2×2 km ²). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.....	174
Figura 63: Geo-localización de las áreas de crianza de juveniles capturados dentro de la Zona III. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda (2×2 km ²). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.....	175
Figura 64: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona norte (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	176
Figura 65: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona centro (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de	

probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	177
Figura 66: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona sur (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	178
Figura 67: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona norte (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	179
Figura 68: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona centro (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	180
Figura 69: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona sur (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).....	181

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para análisis de otolitos mediante LA-ICPMS.....	210
Anexo 2. Resumen del Taller de difusión de resultados.....	214
Anexo 3. Composición isotópica de otolitos de anchoveta <i>Engraulis ringens</i> del Mar Interior de Chiloé.....	219

PERSONAL PARTICIPANTE Y HORAS TRABAJADAS POR OBJETIVO

Institución	Nombre	Objetivo 1	Objetivo 2	Objetivo 3	Objetivo 4	Total
Universidad de Los Lagos	Edwin Niklitschek	35	35	35	35	140
	Audrey Darnaude		88			88
	Franck Ferraton		88			88
	J. Pamela Toledo	250	300	25	25	600
	Cristobal Garcés	250	250	250	250	1000
	Felix Leiva	100	150			250
	Luis Chávez		150			150
	Diego Mansilla		150			150
	Angélica Monsalve		150			150
Universidad de Concepción	Ricardo Galleguillos		50			50
	Sandra Ferrada	10	40			50
	Cristian Canales A.	10	40			50
	Victoria Herrera	50	150			200
	Rocio Barrios	150	50			200
Universidad de Antofagasta	Marcelo Oliva	10	150			160
	Técnico NN	50	250			300
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Guido Plaza	40	200	30	30	300
	Alejandra Hernández	40	680			720
	Técnico NN		720			720
Instituto de Fomento Pesquero	J. Francisco Cerna	40	160			200
	Juan Carlos Saavedra		44			44
	A. Cecilia Machuca	10	440			450
	Lizandro Muñoz		200			200

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo general del presente proyecto fue determinar el número de unidades poblacionales (demográficas) de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en las tres unidades de pesquería consideradas para el manejo de este recurso (Arica-Antofagasta, Copiapó-Coquimbo y Valparaíso-Los Lagos). Para lograr este objetivo, se aplicaron múltiples metodologías de análisis, las que incluyeron: análisis químico de otolitos (isótopos estables y microelementos), fauna parasitaria, análisis de microincrementos en otolitos, morfología de otolitos y análisis de marcadores moleculares. El presente documento corresponde al informe final corregido y se encuentra organizado en función de los cuatro objetivos específicos del mismo proyecto.

Se completó la campaña de muestreo de peces juveniles y adultos, desarrollada entre diciembre 2015 y diciembre 2016. En total, se colectaron 1537 ejemplares de *E. ringens*, entre los que se seleccionaron individuos juveniles y adultos para aplicar las distintas aproximaciones metodológicas: química de otolitos, carga parasitaria, micro-estructuras de otolitos, morfometría de otolitos y marcadores moleculares. Para evaluar variaciones interanuales en los resultados de los análisis de microquímica, de microincrementos y morfología de otolitos, se contó con 661 pares de otolitos saggita de *E. ringens* muestreados entre 2012 y 2013. Para complementar las muestras de marcadores moleculares, se contó con el análisis de 189 muestras de 2008.

Química de otolitos

Se analizó la composición elemental de otolitos de 137 y 302 ejemplares de anchovetas provenientes del periodo 2012-2013 y 2015-2016, respectivamente. El análisis elemental consideró 38 elementos (40 isótopos) de potencial interés, de los cuales 9 mostraron concentraciones sobre el límite de detección con frecuencias superiores al 95% de las observaciones. Un subconjunto de cinco de éstos 9 elementos (^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba), se utilizaron para realizar los análisis estadísticos. El análisis multivariado de esos mismos 5 elementos mostró que para el periodo 2012-2013 la separación de las muestras de juveniles en las tres zonas de crianza definidas por el proyecto representó un modelo más informativo (menor DIC). Mientras que para el periodo 2015-2016 el modelo más informativo fue aquel que consideró dos zonas de crianza, una representada por la combinación de la zona I y II, y la otra representada por la zona III.

Se analizó la concentración relativa de los isótopos de ^{13}C y ^{18}O de 193 muestras de otolitos de peces juveniles y 397 de peces adultos. Pese a los criterios definidos para la preparación de estas muestras previo a su análisis, del total de muestras analizadas, solo en 102 de juveniles y 287 de adultos se

alcanzó el umbral mínimo de detección, dada la restricción de material para el análisis. Se encontraron diferencias univariadas significativas entre zonas respecto de los valores de $\delta^{18}\text{O}$, con una tendencia creciente hacia el sur, pero no así respecto de los valores de $\delta^{13}\text{C}$. El análisis bivariado de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ mostró que la segregación de las muestras de juveniles entre las tres zonas de crianza definidas en el proyecto representó el modelo más informativo de la distribución de los datos. Los resultados obtenidos del análisis químico de los otolitos de juveniles permiten construir vectores de medias y matrices de varianza-covarianza característicos de cada zona de crianza, adecuados para la aplicación de modelos de mezcla de poblaciones finitas y, de este modo, para la estimación de la contribución de cada zona de crianza a las mezclas de adultos presentes en cada zona de captura.

Los cambios observados en la composición química del otolito ($\delta^{18}\text{O}$, ^{88}Mg , ^{88}Sr) entre la etapa juvenil y adulta evidencian un desplazamiento de los individuos adultos hacia áreas de surgencia y/o una profundización en la columna de agua. Los individuos adultos tienden a permanecer en las cercanías de sus respectivas áreas de crianza, donde migraciones latitudinales en la etapa adulta tendrían una relevancia limitada.

Fauna Parasitaria

Se analizó un total de 1109 ejemplares de *E. ringens* (665 adultos y 444 juveniles) provenientes de las tres zonas de muestreo definidas. Los resultados indican una fauna parasitaria muy pobre, en términos cualitativos y cuantitativos. Se obtuvieron representantes de solo cinco especies de parásitos metazoos, con un total de 336 especímenes. Los parásitos encontrados corresponden a los ectoparásitos *Livoneca* sp. (Isopoda) y *Pseudanthocotyloides heterocotyle* (Monogenea) y los endoparásitos *Anisakis* sp. (Nematoda), *Cleistobothrium crassiceps* (Cestoda) y representantes de un Acanthocephala no identificado, que estuvo representada en un solo ejemplar de una muestra proveniente de la zona II. Nematoda representó el 81,7% y *Livoneca* sp. El 16,4%, mientras que las otras tres especies explicaron el 1,9% restante de los parásitos encontrados. Aunque la pobre fauna parasitaria encontrada fue una limitante seria para la aplicación de esta técnica, el análisis multivariado sugirió la existencia de dos unidades demográficas, caracterizadas por la ausencia de *Anisakis* sp. en las zonas I y II, y su presencia en la Zona III. Considerando este gradiente norte-sur de prevalencia de *Anisakis* sp., y asumiendo que su prevalencia en las Zona I y II es explicada por mezcla desde las Zona II y III, respectivamente, se estimó que un $0,036\% \pm 0.011$ de los adultos de la Zona I procederían de la Zona II, y que un $1,14\% \pm 0.013$ de los adultos de la Zona II procederían de la zona III.

Microestructura en otolitos

Para el periodo 2015-2016, se analizaron 202 y 117 otolitos de peces juveniles y adultos, respectivamente. Para el periodo 2012-2013, se analizaron 195 otolitos de ejemplares juveniles. Los resultados obtenidos muestran una elevada proporcionalidad en las medidas morfométricas de tamaño del otolito sagital, *e.g.*, largo antero posterior (LTO) *vs.* radio caudal, LTO *vs.* radio rostral, LTO *vs.* radio ventral y LTO *vs.* radio caudal encontradas en los dos periodos de estudio (2012-2013 y 2015-2016). Esto es una primera evidencia de que los cambios micro-estructurales asociados a los cambios de grosor y radio con la edad no estuvieron relacionadas a una diferencia estructural del otolito, sino más bien fueron el producto de la variabilidad en los potenciales controladores del crecimiento que se tradujo en cambios en las tasa de crecimiento de los mismos. Esto pudo ser corroborado cuando se analizó el radio y grosor a cada día de vida, donde se demostró que las tres zonas pudieron ser discriminadas significativamente (Wilks' Lambda; $p < 0,001$) utilizando como variables independientes el radio y grosor registrados entre los primeros 30 y 50 días para el periodo 2015-2016, los cuales correspondieron a la etapa donde los cambios en el crecimiento del otolito se maximizaron. Las funciones de clasificación derivadas de los análisis discriminantes lineales reportaron porcentajes de clasificaciones correctas de 82, 64, y 95%, para las zonas Norte (Zona I), Atacama-Coquimbo (Zona II) y Centro-Sur (Zona III), respectivamente. Estos resultados demuestran la habilidad de la MO para actuar como un marcador natural de las condiciones ambientales asociadas al crecimiento temprano de esta especie.

Las variables discriminantes derivadas del análisis de la MO pudieron ser obtenidas de los otolitos preparados en adultos de entre 13 y 17 cm de LT, recolectados en las tres zonas de estudio en el periodo 2015-2016, donde se evidenció un gradiente norte-sur estadísticamente significativo (RM ANOVA $P < 0,001$), tanto en el grosor como en el radio. Cuando se aplicaron los algoritmos de clasificación obtenidos a partir de juveniles tempranos (pre-reclutas) de origen conocido a datos balanceados de radio y grosor en otolitos de 113 adultos, se demostró que las zonas extremas (norte y sur) no evidenciaron mezcla, independiente de la aproximación analítica utilizada. Contrariamente, en la Zona II se evidenció presencia de ejemplares de otras zonas que no fue consistente entre el tipo de set de datos, pero que en ningún caso superó un 40% de ocurrencia. En conclusión, los resultados derivados del análisis de la MO demuestran la existencia de unidades demográficas aisladas entre la zona norte y centro-sur de Chile, lo que sincroniza bien con los paradigmas recientes de filopatría en peces marinos.

Morfometría en otolitos

Se presenta el análisis basado en la forma de los otolitos de peces juveniles y adultos colectados en 2015-2016 y 2012-2013 procedentes de las tres zonas de muestreo, Zona I (Arica-Antofagasta), Zona II (Atacama-Coquimbo) y Zona III (Valparaíso-Valdivia), utilizando los índices de forma (circularidad, rectangularidad, factor de forma, redondez y elipticidad) y los descriptores de elíptica de Fourier.

El análisis de devianza del GAM de los índices de forma, a saber: factor de forma, redondez y elipticidad, mostró diferencias significativas entre las tres zonas de estudio. Esto es consistente con el análisis descriptivo de estos índices, que muestra una mayor elipticidad en los otolitos de la zona norte (Zona I y Zona II) que los provenientes de la Zona III (centro-sur de Chile), estos últimos más próximos a la forma circular. A su vez, los índices de circularidad y rectangularidad presentan diferencias significativas entre la Zona III y la Zona I, no existiendo diferencias entre la Zona I y Zona II.

Los resultados del análisis de DF de juveniles del 2016 y adultos de 2013 y 2016, muestran un alto poder discriminante del contorno de los otolitos para separar unidades poblacionales de anchoveta (*E. ringens*), entre zonas de la costa de Chile. Estos resultados muestran la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas, con altos porcentajes de clasificación a su zona de origen, mayores al 81%, lo cual sugiere que la Zona I (Arica-Antofagasta), Zona II (Atacama-Coquimbo) y Zona III (Talcahuano-Valdivia) corresponden a unidades demográficas independientes.

La clasificación similar de los peces a su zona de origen, obtenida el 2016 (año con “El Niño”) y el 2013 (año neutro, sin fenómeno ENSO), sugiere la ausencia de un movimiento generalizado de cardúmenes en sentido norte-sur durante los años en que, por efecto del evento ENSO “El Niño”, ingresan masas de aguas cálidas procedentes del norte.

Marcadores Moleculares

Para caracterizar genéticamente las poblaciones de *Engraulis ringens* en su distribución geográfica, se desarrolló un set de primers para un total de 35 loci microsatélites especie específicos con motivos de repetición desde dinucleótidos a hexanucleótidos. La estandarización de estos loci se llevó a cabo con un promedio de 41 individuos por loci. El número de alelos por locus varió entre 2 (50 μ ER) y 33 (53 μ ER), con un número promedio de 11 alelos por locus. La heterocigosidad observada varió entre 0.171 (38 μ ER) a 0.970 (50 μ ER). De 22 loci que mostraron desviaciones

significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg, 19 mostraron un déficit de heterocigotos como explicación a esta desviación. Finalmente, los loci identificados mostraron una tasa de error de amplificación menor al 18%. De los 35 loci estandarizados, 15 de ellos fueron seleccionados para su utilización a nivel poblacional, cinco loci más de lo propuesto, con la finalidad de alcanzar un mayor poder estadístico al momento de contrastar las hipótesis poblacionales.

Para caracterizar genéticamente las poblaciones de *E. ringens* se extrajo ADN genómico en un total de 400 ejemplares provenientes del norte (Zona I) y sur (Zona III) de la distribución geográfica de la especie en Chile, incluyendo muestras temporales de los años 2008 (i.e. adultos), 2015-16 (i.e. juveniles). Del total, 330 individuos generaron ADN en calidad y cantidad suficiente para análisis genéticos posteriores. Para identificar diferencias poblacionales se utilizaron dos aproximaciones, i) utilizando información *a priori* de las localidades muestreadas e índices convencionales de estructuración poblacional, F_{st} y R_{st} , para comparar temporadas de muestreo (año 2008 y años 2015-16), localidades dentro de años y grupos etarios; y ii) análisis bayesiano sin información *a priori*, evaluando modelos espaciales y no espaciales.

Los valores de F_{st} y R_{st} para el total de muestras fueron de 0.00048 y 0.00002, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas entre ambos períodos analizados ($p > 0.2$). Al analizar la estructuración entre zonas considerando los adultos muestreados en 2008, los valores de F_{st} y R_{st} fueron relativamente bajos (< 0.019 y 0.008, respectivamente), no significativos para R_{st} ($p > 0.2$), pero significativos para F_{st} ($p < 0.05$) cuando se comparó la localidad de Iquique (Zona I) con las localidades ubicadas al sur de la Zona III. Estos resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos al analizar la estructuración entre zonas considerando los juveniles muestreados en 2015-2016, donde los valores de F_{st} y R_{st} fueron bajos (0.002 y 0.003, respectivamente), siendo moderadamente significativos ($p < 0.1$) para F_{st} , pero no significativos para R_{st} ($p > 0.3$).

El análisis de estructuración poblacional sin información *a priori* no mostró evidencia de estructuración espacial ni temporal cuando se combinaron las bases de datos de ambas clases de edad (adultos y juveniles) y temporadas (2008 y 2015-16). Estos resultados fueron corroborados por el análisis de aislamiento por distancia, IBD, con patrones de ancestrías típicos de ausencia de estructura genética. Sin embargo, cuando se analizaron las bases de datos de 2008 y 2015-16 por separado, el análisis de estructuración poblacional sin información *a priori* mostró resultados discrepantes, dependiendo del año/grupo-etario y del modelo de frecuencias alélicas testeado (i.e. correlacionado y no correlacionado). Para las muestras de adultos de 2008, se identificaron tres conglomerados genéticos, los cuales no mostraron un patrón espacial latitudinal, sino parchoso. Los valores estimados de probabilidad de pertenencia ($p < 0.4$) no dieron soportes a la existencia de

múltiples unidades evolutivas. Para las muestras de juveniles del período 2015-16, en cambio, se identificaron dos conglomerados genéticos, los que mostraron un claro patrón latitudinal, diferenciando, con valores $p > 0.9$, un conglomerado al norte de los $\sim 25^{\circ}\text{S}$ (zona norte de Chile), y otro al sur de los $\sim 34^{\circ}\text{S}$ (zona centro-sur de Chile). Este patrón de segregación genética de los juveniles 2015-16 se vió apoyado por el patrón de aislamiento genético por distancia geográfica evidenciada a través del IBD, indicando niveles importantes de segregación de adultos durante el desove y de juveniles durante sus estadios tempranos, permaneciendo cercanos a sus áreas de desove. Esta segregación durante los estadios juveniles se disiparía, al menos parcialmente con la ontogenia, en la medida que subadultos y adultos solaparan sus respectivas áreas de alimentación, lo que podría explicar los resultados observados para los adultos muestreados en 2008.

La aparente contradicción entre los resultados del análisis de conglomerados y del análisis de índices de estructuración podría explicarse considerando la mezcla de adultos desovantes evidenciada por los análisis de microestructura y química de otolitos, cuyo nivel, aunque muy bajo, podría ser suficiente para limitar la diferenciación genética y arrojar resultados “no significativos” bajo la hipótesis nula de panmixia. Para corroborar estos resultados, resultaría importante genotipar los adultos del 2015-16, y realizar los análisis correspondientes.

Los resultados obtenidos del análisis molecular evidencian ciertos niveles de conectividad reproductiva en toda el área estudiada, al menos en una escala de tiempo evolutiva, lo que nos lleva a mantener la hipótesis nula de que *E. ringens* en la costa chilena conforma una única unidad evolutiva. Sin embargo, las diferencias que se observaron entre zonas a partir de los resultados de los análisis químico, microestructural y morfométrico en otolitos, y la misma existencia de conglomerados genéticos antes descrita, permite proponer la existencia de, al menos, dos y, probablemente, tres unidades demográficas de anchoveta en la costa chilena. Este número de unidades requiere de confirmación sustentada en estimaciones de base plurianual, que permitan apreciar la variabilidad asociada a fenómenos ambientales como El Niño. En el intertanto, se recomienda mantener, hasta entonces, como opción más precautoria, la segregación del recurso en tres unidades de manejo diferenciadas.

EXECUTIVE SUMMARY

The general objective of this project is to determine the number of demographic units of anchovy *Engraulis ringens* present in the three stock units considered for the management of this resource (Arica-Antofagasta, Copiapó-Coquimbo and Valparaíso-Los Lagos). To achieve this, multiple methodologies were applied, including: chemical analysis of otoliths (stable isotopes and microelements), parasitic fauna, microstructure analysis in otoliths, otolith morphology and analysis of molecular markers. The present document corresponds to the final report and is organized according to the four specific objectives of the same project.

The sampling campaign for juvenile and adult fish, developed between December 2015 and December 2016, was completed. In total, 1537 specimens of *E. ringens* were collected, from which juvenile and adult individuals were selected to apply the different methodological approaches: otolith chemistry, parasitic load, otolith microstructure, otolith morphometry and molecular markers.

To evaluate inter-annual variations in microchemical, microstructural and morphological results, there were 661 pairs of otoliths sagitta of *E. ringens* collected between 2012 and 2013. To complement the samples of molecular markers, 189 samples from 2008 were analysed.

Otoliths Chemistry

The elemental concentration of the committed otolith samples of juvenile *E. ringens* from different zones was analysed. The elemental analysis of these samples considered 38 elements (40 isotopes) of potential interest, from which 9 showed concentrations above the detection limit with frequencies greater than 95% of the observations. A subset of five of these 9 elements (^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba), were used to perform the statistical analyses. The multivariate analysis of these same 5 elements showed that the separation of the samples in the three breeding zones defined by the project represented a more informative model (lower DIC) than other alternative models where neighbouring zones were grouped.

The relative concentration of the ^{13}C and ^{18}O isotopes in 142 otolith samples from juveniles was analysed. Despite the criteria defined for the preparation of these samples prior to their analysis, from the total of analysed samples, only in 102 of them the minimum detection threshold was reached, given the restriction of material for the analysis. Significant univariate differences between zones were found with respect to the values of $\delta^{18}\text{O}$, with a growing tendency south, but not with respect to the values of $\delta^{13}\text{C}$. The bivariate analysis of $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ showed that the segregation of the samples between the three breeding zones defined in the project represented the most informative

model of the data distribution. The results obtained from the chemical analysis of juvenile otoliths allowed to construct vectors of means and matrices of variance-covariance characteristic to each breeding zone, suitable for the application of mixed models for finite populations, and thus, for the estimation of the contribution of each breeding zone to the adult mix present in each capture area.

Observed changes in chemical composition ($\delta^{18}\text{O}$, ^{88}Mg , ^{88}Sr) of *E. ringens* otoliths between juvenile and adult stages suggested a displacement of adults either to upwelling areas and/or to deeper layers within the water column. Adult individuals, nonetheless, would tend to stay in the proximity to their respective breeding zones as latitudinal migrations during the adult stage would be of limited relevance.

Parasite Fauna

A total of 1109 specimens of *E. ringens* (665 adults and 444 juveniles) from the three defined sample zones were analysed for metazoan parasites. Results indicated an impoverished parasite fauna at both qualitative and quantitative level. Representatives of 5 taxa, with a total of 366 specimens were obtained. Parasites belonged to two ectoparasites: the isopod *Livoneca* sp. and the monogenea *Pseudanthocotyloides heterocotyle*, and three endoparasites: the larval Nematoda (*Anisakis* sp), the tapeworm *Clestobothrium crassiceps* (Cestoda) and an unidentified member of Acanthocephala (only one specimen). Nematoda explained 81.7% of the collected parasites and *Livoneca* sp. 16.4%, the remainder three species explained 1.9% of the total number of parasites. Due to the impoverished parasite fauna, conclusions must be treated with caution. Multivariate analysis suggests the existence of two stocks, characterized by the presence of *Anisakis* sp. in zone III. Under the hypothesis of two stocks and a mix zone (zone II), an attempt to evaluate the degree of mixing revealed an input of $1.14\% \pm 0.013$ from zone III to the mixing zone, in a similar way an input reaching $0.036\% \pm 0.011$ from the mixing zone to zone I was estimated.

Otolith Microstructure

For the period 2015-2016, 202 and 117 otoliths of juvenile and adult fish were analysed, respectively. For the period 2012-2013, 195 otoliths of juvenile specimens were analysed. The obtained results showed a high proportionality in the morphometric measurements of the size of sagittal otolith, e.g., antero-posterior length (APL) vs. caudal radius, APL vs. rostral radius, APL vs. ventral radius and APL vs. caudal radius found in the two study periods (2012-2013 and 2015-2016). This is a first evidence that the microstructural changes associated with shift in thickness and radius with age were not related to a structural difference of otoliths, but rather were the product of the variability in the potential drivers of growth translated into changes in the growth rate. This

could be confirmed when the analysed radii-at-age among the three zones showed significant differences (Wilks' Lambda, $p < 0.001$), when radii-at-age and increment width-at-age were used as dependent between the first 30 and 50 days for the 2015-2016 period, which corresponded to the stage where changes in otolith growth were maximized. The classification functions derived from the linear discriminant analyses reported percentages of correct classifications of 82, 64, and 95% for the North (Zone I), Atacama-Coquimbo (Zone II) and Center-South (Zone III), respectively. These results demonstrated the ability of OM to act as a natural tag of the environmental conditions associated with the early growth of this species.

The discriminant variables derived from the OM analysis could be obtained from otoliths prepared in adults between 13 and 17 cm TL, collected in the three study areas during 2015-2016, where a statistically significant north-south gradient was evidenced (RM ANOVA $P < 0.001$), both in increment width and in radii-at-age. When classification algorithms obtained from early juveniles (pre-recruits) of known origin were applied to balanced data of radius and increment width-at-age in otoliths of 113 adults, the extreme zones (north and south) showed no significant mixing, irrespective of the analytical approach used. Conversely, in zone II there was evidence of the presence of specimens from other areas that was not consistent between the type of data set, but without exceeding 40% of occurrence.

In conclusion, the results derived from the MO analysis showed the existence of isolated demographic units between the north and centre-south of Chile, which matches with the recent paradigms of homing in marine fishes.

Otolith Morphometry

The analysis was based on the otolith shape of juvenile and adult anchovy collected in 2015-2016 and 2012-2013 from the three sampling areas, Zone I (Arica-Antofagasta), Zone II (Atacama-Coquimbo) and Zone III (Valparaíso-Valdivia), using the shape indices (circularity, rectangularity, shape factor, roundness and ellipticity) and the Elliptical Fourier harmonic.

The phenotypical variation in sagittal otolith, through Generalized Additive Model (GAM) of shape indexes and canonical discriminant analysis of Elliptical Fourier harmonic were used to test for significant differences between the three zones. Deviance analysis showed that form factor and ellipticity indexes varied significantly between the three zones, however roundness, circularity and rectangularity indexes showed differences only between zones I and III. The discriminant analysis of elliptical Fourier descriptors of juvenile and adult in 2016 and adult in 2013, showed a high discriminatory power of otolith outline to identify population units of *E. ringens*. The results showed

significant differences between the three zones, with high classification percentages over 81%, suggesting that zones I (Arica-Antofagasta), II (Atacama-Coquimbo) and III (Valparaíso-Valdivia) corresponded to independent demographic units.

Genetics

A set of primers for a total of 35 species-specific microsatellite loci with dinucleotides to hexanucleotides repeated motifs was developed and used to characterize *E. ringens* populations in the study area. The standardization of these loci was carried out with an average of 41 individuals per loci. The number of alleles per locus varied between 2 (50 μ ER) and 33 (53 μ ER), with an average number of 11 alleles per locus. The observed heterozygosity varied between 0.171 (38 μ ER) and 0.970 (50 μ ER). Twenty two loci showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, with 19 of them showing a deficit of heterozygotes. Selected loci showed an amplification error rate <18%. We used 15 of the 35 standardized loci (five more than offered in our proposal) to increase statistical power.

To characterize *E. ringens* genotypes, we extracted genomic DNA from a total of 400 specimens from Zones I and II, including seasonal samples from 2008 (adults) and 2015-16 (juveniles). From this total, samples from 330 individuals yielded DNA in sufficient quality and quantity for subsequent genetic analyses. Two approaches were used to identify population differences: i) conventional genetic structuring indexes based upon *a priori* information about the potential number of evolutionary units (i.e. two); and ii) Bayesian, without *a priori* information, spatial and non-spatial cluster analyses aimed to estimate the most informative number of evolutionary units.

When both sampling period/life stages were compared (i.e. adults from 2008 v/s juveniles from 2015-2016), low values of F_{st} and R_{st} were found (0.00048 and 0.00002, respectively), with no evidence of significant structuring between groups ($p > 0.2$). Structuring indexes for 2008 adults showed low F_{st} y R_{st} values (<0.019 and 0.008, respectively), which were not significant for R_{st} ($p > 0.2$), but significant for F_{st} ($p < 0.05$) when samples from Iquique (Zone I) were compared with the three southernmost sampling sites from Zone III. These results tended to match those obtained while comparing zones I and III using juvenile fish sampled in 2015-2016, whose F_{st} y R_{st} values were relatively low (0.002 y 0.003, respectively), but still significant ($p < 0.1$) for F_{st} .

The population structure analysis without a priori information showed no spatial or temporal structuring when analysing the databases of the 2008 season and of the 2015-16 season as a whole. The analysis identified only one genetic conglomerate in the analysed geographical distribution, which was corroborated by results from distance isolation analysis (IBD), which showed typical

ancestry patterns of absence of genetic structure; this evidence is the result of the STRUCTURE analysis. When adults from 2008 and juveniles from 2015-16 were analysed separately, population structuring analysis without *a priori* information showed contrasting results according to the model of allele frequencies tested (i.e. spatial and non-spatial). For the data set of individuals of the 2008 season, three genetic conglomerates were identified, which did not show a latitudinal spatial pattern, but rather a parchment. Estimated membership p -values for each conglomerate showed $p < 0.4$ values, which did not support the existence of genetic segregation for adults sampled in 2008. For the juveniles sampled in 2015-2016, two genetic conglomerates were identified, showing a clear latitudinal spatial pattern, with high probabilities of membership ($p > 0.9$). Genetic conglomerates were differentiated into a northern conglomerate down to $\sim 25^\circ\text{S}$ (northern Chile), and a southern one up to $\sim 34^\circ\text{S}$ (central-southern Chile). This pattern of genetic segregation of 2015-2016 juveniles was supported by IBD values.

The observed pattern of genetic isolation by geographical distance could be related to segregation during early phases of growth (i.e. samples of the season 2015-16), with juvenile individuals remaining close to spawning areas, but exhibiting some degree of mixing as they grow. It must be considered that even the small percentage of mixing showed by the different otolith-based techniques could be sufficient to cause genetic homogeneity within adult and juvenile samples. Alternatively, if the distance isolation pattern in juveniles of 2015-2016 were stable over time, it should have shown differences with the adult genotypes of 2008, and this pattern was not observed in the analysed database. To corroborate this result it is important to genotype the adults of 2015-16, and perform the corresponding analyses.

The relatively low genetic structuring observed in samples from the most distant zones (I and III) sustains the hypothesis that certain levels of reproductive connectivity exist in all the study area, at least in an evolutionary time scale. Thus, we did not find enough evidence against the null hypothesis that *E. ringens* conforms a single evolutionary unit along the Chilean coast. However, the clear differences found between zones regarding chemical, microstructural and morphometric analyses of otoliths, as well as the genetic clustering results, provide support to the existence of, at least, two, and probably three demographic units of anchovy along the Chilean coast. This number of demographic units needs to be verified through new mixing estimates based upon data from multiple-years, suitable for assessing the effect of environmental phenomena, such as El Niño. In the meantime, we recommend to keep the current segregation of the stock into three spatially separated management units.

I. ANTECEDENTES

Una interrogante fundamental en el ámbito de la evaluación y manejo de las poblaciones de peces, es la identificación de unidades de manejo que sean coherentes tanto con los aspectos político-administrativos que determinan el manejo, como con los procesos biológicos y demográficos determinen la eficacia de las medidas de conservación y manejo aplicadas. En años recientes, se ha tendido a reemplazar el ambiguo concepto de “stock” o “unidad poblacional” por conceptos más específicos, que definen con mayor precisión las distintas escalas espaciales y temporales y/o los criterios u objetivos utilizados para establecer estas categorías. Siguiendo a Luck et al (2003) es posible diferenciar al menos tres tipos de unidades poblacionales: unidades evolutivas, unidades demográficas y unidades de manejo. Una unidad evolutiva corresponde a una población genética clásica, es decir a un grupo de individuos que poseen un mismo acervo genético, lo cual implica la existencia de algún nivel de intercambio genético en una escala de cientos a miles de años. Una unidad demográfica corresponde, en cambio, a una población ecológica clásica, es decir, a un grupo de individuos que cohabitan una misma área y presentan atributos demográficos similares (reclutamiento, crecimiento, mortalidad, etc). Finalmente, la unidad de manejo o gestión es una unidad de límites más o menos arbitrarios, definida en función de factores socio-políticos, de la disponibilidad o accesibilidad del recurso y/o de la actividad humana que se desea regular.

Un manejo basado en unidades evolutivas pondrá énfasis en la conservación de la biodiversidad biológica en el largo plazo (escala evolutiva) y tenderá a estrategias menos precautorias, donde los agotamientos locales y temporales serán aceptables. Un manejo basado en unidades demográficas se orientará a recuperar, mantener o incrementar la productividad local, poniendo mayor énfasis en los beneficios humanos de corto y mediano plazo, donde los agotamientos locales y temporales no serán aceptables (Taylor & Dizon 1996, 1999). El grado de coherencia entre los límites geográficos espaciales y temporales de las unidades de manejo y las unidades demográficas (o evolutivas) subyacentes afectarán directamente todos los procedimientos de manejo, desde el monitoreo de la población hasta la aplicación de las medidas de control.

Desde el punto de vista administrativo, existen tres unidades de manejo (=unidades de pesquería) de este recurso en Chile, dos en la zona norte (Arica y Parinacota-Antofagasta y Atacama-Copiapó) y una en la zona centro sur (Valparaíso-Los lagos). Sin embargo, no se ha definido si estas unidades corresponden a tres unidades demográficas independientes entre sí. Los estudios realizados en esta materia han desarrollado variadas técnicas para la definición de unidades poblacionales, mezclando técnicas genéticas orientadas a la identificación de unidades evolutivas y técnicas orientadas a la

identificación de unidades demográficas, tales como el análisis de composición parasitaria, morfometría de otolitos, química de otolitos, patrones de historia natural y otras. Mientras Ferrada *et al.*, (2002) no encontraron evidencia significativa en contra de la hipótesis nula de una única unidad evolutiva en todo Chile, los resultados de los estudios orientados a identificar unidades demográficas no han arrojado resultados concluyentes. De esta manera, los usuarios de la pesquería han planteado reiteradamente la necesidad de evaluar la relevancia biológica de las tres unidades de manejo definidas por la administración, dando así origen al presente proyecto.

Aun cuando todas las técnicas de identificación de unidades demográficas poseen ventajas y desventajas, el estudio de la composición química de los otolitos (núcleo y borde) ha cobrado creciente importancia como una alternativa directa que provee información del origen natal y asociación geográfica de un determinado recurso. Esta técnica se basa en la suposición de que ciertos elementos presentes en los otolitos están relacionados con su medioambiente químico y físico, y que la reabsorción o alteración de estos elementos durante la ontogenia es mínima (Campana *et al.* 1994, 2000), de este modo es posible identificar el origen de una población determinada. La implementación de este método ha ayudado al entendimiento de las migraciones de peces, estructura poblacional, identificación de zonas de desove, entre otros (Swan *et al.* 2003, Guidetti *et al.* 2013, Niels *et al.* 2014). Sin perjuicio del potencial de esta técnica, se recomienda, en esta línea, una aproximación holística que involucre un amplio espectro de técnicas complementarias (Begg & Waldman 1999).

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las unidades de stocks de anchoveta en Chile, corresponden a unidades poblacionales independientes (XV-II, III-IV y V-X regiones) a través de análisis multi-metodológico o multidisciplinario, con énfasis en química de otolitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Objetivo 1: Desarrollar un diseño experimental geográfico, temporal y biológicamente adecuado para la identificación de las unidades poblacionales de anchoveta en Chile
- Objetivo 2: Determinar las unidades poblacionales de anchoveta en Chile y sus límites espaciales a través de análisis multi-metodológico, con énfasis en la química de núcleo y borde del otolito.

Objetivo 3: Desarrollar un modelo conceptual respecto de las migraciones ontogénicas de los individuos, los posibles procesos de conectividad, y su relación con las variables ambientales.

Objetivo 4: Estimar el grado de mezcla entre las unidades poblacionales.

III. ENFOQUE METODOLÓGICO

El enfoque general del presente proyecto apuntó a evaluar la existencia de unidades demográficas discretas en las unidades de pesquería Arica y Parincaota-Antofagasta, Atacama-Coquimbo y Valparaíso-Los Lagos y a estimar el grado de mezcla entre unidades demográficas, dentro de cada unidad de pesquería. Se utilizaron tres tipos de marcadores naturales: composición elemental (metales) en otolitos, composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$) en otolitos y carga parasitaria, dos tipos de respuestas fenotípicas: análisis micro-estructural del crecimiento temprano y morfometría de otolitos. Además se sometió a prueba la hipótesis de la existencia de una única unidad evolutiva concentrándose en las dos zonas extremas.

IV. RESULTADOS POR OBJETIVOS

OBJETIVO 1: DESARROLLAR UN DISEÑO EXPERIMENTAL GEOGRÁFICO, TEMPORAL Y BIOLÓGICAMENTE ADECUADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES POBLACIONALES DE ANCHOVETA EN CHILE.

1. Área de estudio

El área de estudio correspondió a la zona costera SE del Océano Pacífico, frente a Chile, entre su límite norte y el Canal de Chacao. Esta área se dividió en tres zonas, que corresponden a las unidades de manejo, utilizadas en la actualidad para la administración de la pesquería (Figura 1):

- Zona I: Región de Arica y Parinacota, de Tarapacá y de Antofagasta (Regiones XV-II)
- Zona II: Región de Atacama y de Coquimbo (Regiones III-IV)
- Zona III: Región de Valparaíso, de O'Higgins, del Maule, del Biobío, de La Araucanía, de Los Ríos y de Los Lagos (Regiones V-X)

Cada zona se subdividió en dos estratos, con el fin de asegurar un muestreo más representativo (en términos espaciales) de cada zona de estudio. Estos estratos se definieron inicialmente con relación a los principales puertos de desembarque asociados a ellos:

- Zona I, estrato A: Iquique; estrato B: Antofagasta;
- Zona II, estrato C: Caldera; estrato D: Coquimbo;
- Zona III, estrato E: estrato Talcahuano y estrato F: Corral.

Sin embargo, el límite entre los estratos de la Zona III fue desplazado al norte, respecto a la propuesta técnica, debido a la ausencia del recurso en gran parte del estrato sur durante la campaña de muestreo de juveniles (Tabla 1, Figura 1).

2. Campañas de muestreo

Se obtuvieron 1488 muestras de ejemplares juveniles y adultos provenientes de las tres zonas de muestreo durante la campaña 2015-2016. Para el análisis de otolitos históricos, se utilizaron otolitos de 661 ejemplares de anchovetas de los años 2012-2013. Para el análisis genético, de anchovetas del año 2008, se contó con los resultados de 189 muestras. En un esfuerzo de muestreo adicional, el año 2016 se logró coleccionar 122 ejemplares de anchoveta provenientes del Mar Interior de Chiloé (Figura 1).

3. Selección de muestras dentro de cada zona

3.1. Ejemplares juveniles (verano 2015-2016)

En total se recolectaron 721 ejemplares juveniles de *E. ringens* en el área de estudio durante la campaña de muestreo 2015-2016 (Zona I: 222; Zona II: 217 y Zona III: 282; Figura 1). Del total de muestras juveniles, sólo se consideraron para los análisis, aquellas colectadas entre los meses de noviembre (2015) y marzo (2016). Se seleccionó un número de muestras que, cumpliendo ciertos criterios de tamaño y representatividad, aseguraran el número mínimo de muestras comprometido en la propuesta técnica y permitieran el análisis de las distintas aproximaciones metodológicas en los mismos ejemplares. Adicionalmente, se obtuvieron 49 ejemplares de la Zona II, para el análisis de composición de carga parasitaria.

Los ejemplares fueron medidos (longitud total) y pesados, las tallas medias \pm error estándar (EE) de los ejemplares seleccionados fueron $6,9 \pm 1,16$ (EE); $9,3 \pm 0,21$ (EE) y $4,7 \pm 0,12$ (EE) cm, en las Zonas I, II y III, respectivamente (Figura 2). El par de otolitos *sagitta* fue extraído de cada ejemplar, el derecho fue almacenado en tubos Eppendorf de 0.2 ml para los análisis de microquímica (isotópico y elemental), mientras que el izquierdo fue almacenado en cartones que contenían receptáculos individuales cuyo destino fue para los análisis de microincrementos y morfometría. Cada par de otolitos fue debidamente rotulado para garantizar la trazabilidad de la muestra. Para análisis genético, se extrajo desde cada individuo un trozo de musculatura esquelética proveniente del pedúnculo caudal, conservandolo en etanol absoluto dentro de tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. Finalmente cada ejemplar fue fijado en etanol al 95% en bolsas individuales para el análisis de composición parasitaria. Un número entre 141 y 489 de estas muestras seleccionadas fue analizada por cada aproximación metodológica (Tabla 2).

Tabla 1: Límites latitudinales entre zonas de estudio y entre estratos dentro de zonas utilizados para el muestreo de anchoveta *Engraulis ringens*.

Zona	Límite norte	Límite sur	Límite estratos
I	18,24° S	26,00° S	21,50° S
II	26,01° S	32,16° S	28,85° S
III	32,17° S	41,77° S	36,60° S

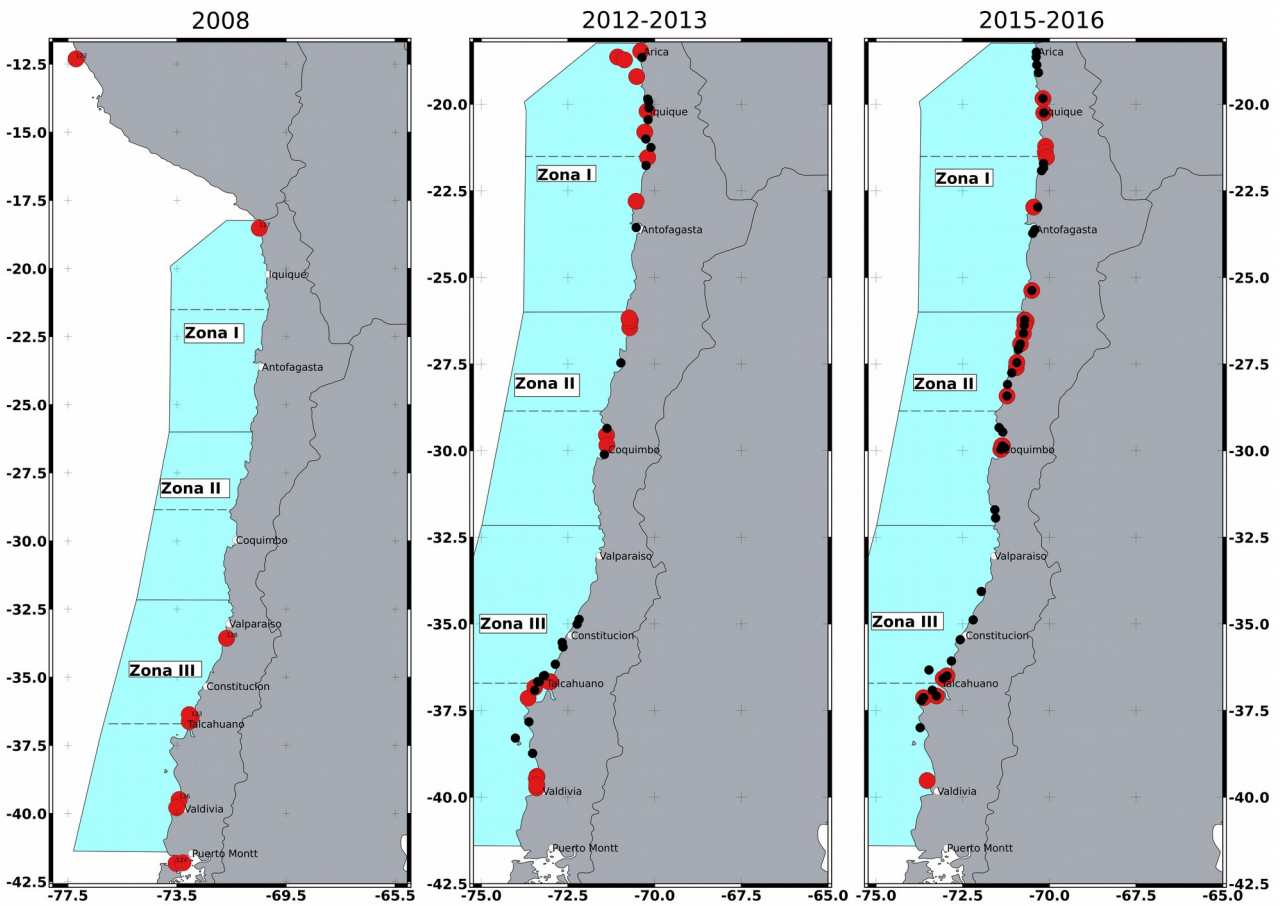


Figura 1: Área de estudio y zonas de muestreo de anchoveta *Engraulis ringens* en los distintos periodos de muestreo (2008: análisis microstatélites, 2012-2013: análisis otolitos, 2015-2016: análisis multimetodológico). círculos negros indican lances de muestras de juveniles y círculos rojos indican lances de muestras de ejemplares adultos.

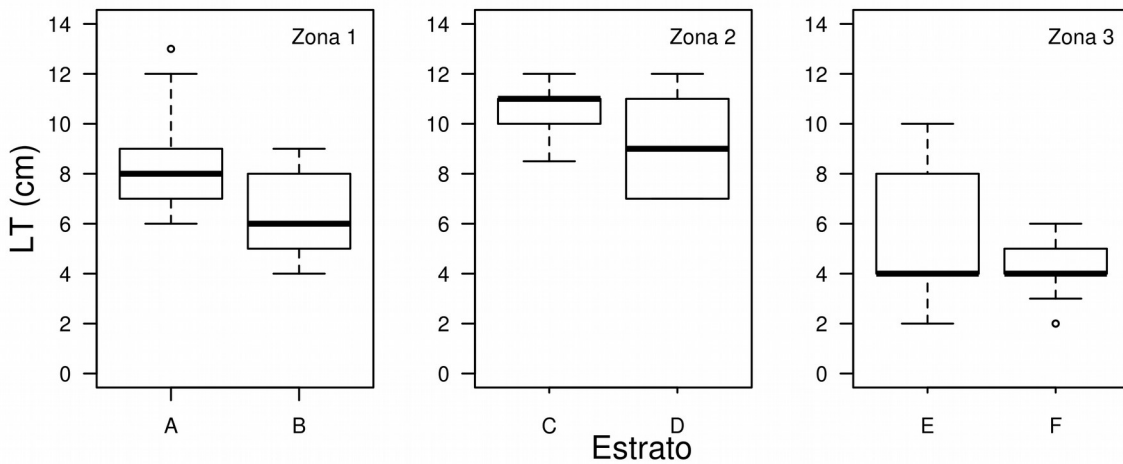


Figura 2: Longitud total media de ejemplares juveniles de anchoveta *Engraulis ringens*, muestreados entre diciembre 2015 y marzo 2016, por cada zona y estrato de muestreo.

3.2. Ejemplares adultos (agosto-octubre 2016)

Se colectaron 767 ejemplares adultos de *E. ringens* en el área de estudio (Zona I: 210; Zona II: 218 y Zona III: 339; Figura 3). La obtención de muestras para cada aproximación metodológica siguió el mismo procedimiento que para el muestreo de juveniles (ver sección 3.1). Para el análisis de todos los enfoques metodológicos, se consideraron ejemplares adultos muestreados entre agosto y octubre de 2016. La longitud total media de los ejemplares muestreados en este periodo fue de $13,1 \pm 0,04$ (EE), $13,7 \pm 0,06$ (EE) y $15,0 \pm 0,08$ (EE) cm, en las Zonas I, II y III respectivamente (Figura 3). Un número entre 117 y 665 de estas muestras seleccionadas fue analizada por cada aproximación metodológica (Tabla 2).

Tabla 2: Número de muestras de juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* analizadas por las distintas aproximaciones metodológicas (2015-2016).

Etapa	Microquímica de otolitos	Parásitos	Microestructura de otolitos	Morfometría de otolitos	Marcadores moleculares
Juvenil	193	444	202	489	200
Adulta	221	665	117	300	No aplica

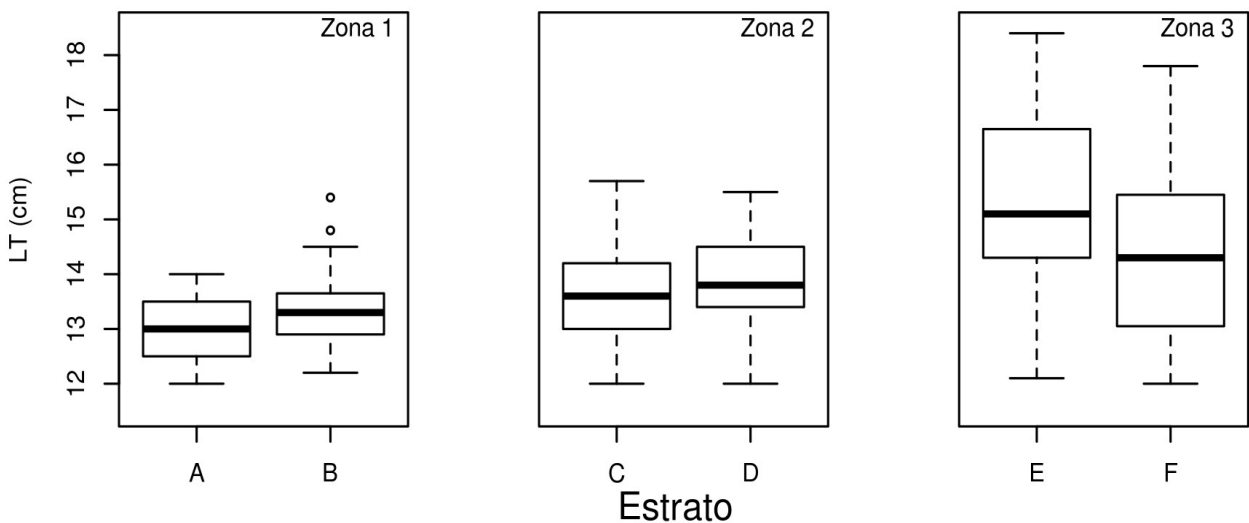


Figura 3: Longitud total media de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados entre agosto y septiembre de 2016, por zona y estrato de muestreo.

3.3. Otolitos históricos (año 2012-2013)

En total se recolectaron 661 pares de otolitos sagitta de *E. ringens* (255 y 406 de ejemplares juveniles y adultos, respectivamente) correspondiente a los años 2012-2013 (Figura 1). Del total

colectado, los otolitos derechos se destinaron para análisis de composición elemental y los otolitos izquierdos para análisis de microestructura y morfometría.

3.4. Marcadores moleculares (año 2008)

Para el análisis de microsatélites, se complementó las muestras del periodo 2015-2016, con 189 muestras de 2008. La Zona III fue representada con 128 muestras, mientras que la Zona I con 31. Las 30 muestras restantes provinieron de la costa Peruana (~18° S)

OBJETIVO 2: DETERMINAR LAS UNIDADES POBLACIONALES DE ANCHOVETA EN CHILE Y SUS LÍMITES ESPACIALES A TRAVÉS DE ANÁLISIS MULTI-METODOLÓGICO, CON ÉNFASIS EN LA QUÍMICA DE NÚCLEO Y BORDE DEL OTOLITO

1. Análisis de la composición elemental e isotópica de otolitos de anchoveta *Engraulis ringens*

Edwin Niklitschek¹, Cristóbal Garcés¹, Mathieu Leisen², Fernando Barra², Felix Leiva¹, Audrey Darnaude³.

¹Centro i-mar, Universidad de Los Lagos; ²Departamento de Geología, Universidad de Chile; ³CNRS-Francia

1.1. Antecedentes

Los principales métodos de identificación de unidades demográficas a partir del análisis químico de otolitos se basan en la cuantificación de las concentraciones de metales, principalmente Ba, Sr, Mg y Mn, y de las concentraciones relativas de isótopos estables, principalmente de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) y estroncio ($\delta^{87}\text{Sr}$). La concentración relativa de estroncio (Sr/Ca) es un indicador de salinidad y temperatura, existiendo una relación positiva, relativamente generalizable respecto de la salinidad, pero una relación más compleja, probablemente no-lineal y especie-específica respecto de la temperatura (Elsdon & Gillanders 2003, 2006). Lo contrario ocurre con Ba, cuya presencia en otolitos (Ba/Ca) mantiene una relación negativa con la salinidad del ambiente, dando cuenta de ambientes con baja concentración salina (Elsdon & Gillanders 2005). Los niveles de $\delta^{18}\text{O}$ en el otolito son directamente proporcionales a su concentración en el hábitat y, de esta manera, se encuentra positivamente correlacionada con la salinidad, pero negativamente correlacionado con la temperatura del mar. Aunque los niveles de $\delta^{13}\text{C}$ en el otolito son afectados por su concentración en el agua de mar, no existe una proporcionalidad directa ya que el $\delta^{13}\text{C}$ en el otolito es afectado también fuertemente por la composición de la dieta, el metabolismo y la actividad reproductiva (Kalish 1991, Wurster et al. 1999, Rooker & Secor 2004).

Aunque existen muy pocas comparaciones disponibles en la literatura de corriente principal sobre la potencia discriminante de metales e isótopos estables, existe evidencia no publicada que, al menos en ciertas poblaciones y hábitats, los isótopos estables tienden a alcanzar mayor potencia estadística con un número equivalente de muestras. Este ha sido, por ejemplo, el caso de la merluza de tres aletas alrededor de Sudamérica (Niklitschek et al. 2008), del atún de aleta amarilla en el Atlántico

norte (D. Secor, com. pers.). El alto potencial resolutivo de esta técnica ha sido también destacado por otros autores, incluyendo los trabajos de Thresher (1999) y Volpedo et al. (2006).

El uso de metales e isótopos estables para la identificación de unidades demográficas es de uso relativamente reciente en Chile. Niklitschek et al. (2010) combinaron estas técnicas con el análisis de fauna parasitaria para discriminar peces de merluza de tres aletas *Micromesistius australis* capturados en los océanos Atlántico y Pacífico, encontrando diferencias importantes de potencia entre técnicas, favoreciendo el uso de isótopos estables, al menos en esta especie. Otros estudios más recientes, desarrollados en Chile bajo este enfoque, han incluido especies como bacalao de profundidad *Disosstichus eleginoides* (Niklitschek & Toledo 2011), sardina austral *Sprattus fuegensis* (Niklitschek et al. 2012), jurel *Trachurus murphyi* (Serra, com. pers.), salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha* (Araya et al. 2014) y reineta *Brama australis* (Niklitschek et al. 2015).

En el presente proyecto, se sometió a prueba distintas hipótesis acerca del número de unidades demográficas de *E. ringens* presentes en Chile. Esto mediante el análisis isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$) de las secciones nucleares y borde de otolitos de juveniles y adultos de *E. ringens*, y mediante la determinación de perfiles radiales de concentración elemental (relativas al Ca) de Ba, Mg, Mn, Sr y otros metales que resultaron detectables y de interés.

1.2. Metodología de trabajo

El otolito derecho de cada ejemplar fue almacenados en tubos Eppendorf y trasladados a dependencias del Centro i~mar para su posterior preparación para análisis, siguiendo protocolos estandarizados de trabajo limpio. Como primer paso, cada otolito fue sonicado en agua ultrapura (18,2 M Ω), asegurándose de extraer cualquier tejido remanente. Luego fue fotografiado, sonicado otra vez en agua ultrapura durante 5 min y secado bajo campana de flujo laminar. Luego, cada otolito fue embebido en resina epóxica de alta pureza (Buehler), con ayuda de moldes plásticos y secado a temperatura constante (50°C) por cinco horas. Posteriormente, fue seccionado transversalmente utilizando una sierra de corte lento (ISOMET Buehler), obteniendo una sección central de 600-900 μm .

Cada sección fue pre-pulida con paños de carburo de silicio de graduación 1500, 2000 y 2400, para incrementar su transparencia y reducir su espesor a unos 200-400 μm . Esto con el fin de observar los anillos cercanos al primordio. Para evitar posibles fracturas del otolito y facilitar el pulido final, las secciones pre-pulidas fueron pegadas con resina epóxica (Buehler) a secciones de vidrio de aproximadamente 1000 μm de grosor, previamente descontaminadas con etanol y agua ultrapura. Para el pulido final, se continuó utilizando paños recubiertos de diamante de 3 μm (Diamond

Lapping Film, Buehler) a fin de evitar la contaminación de la muestra con material abrasivo de los paños de carburo de silicio. El pulido se detuvo al visualizar la presencia del primordio a una distancia de 10-20 μm , bajo la superficie, cabe destacar que se utiliza un paño por cada otolito para evitar la contaminación cruzada. Una vez finalizado el pulido, las secciones fueron sonicadas por 5 minutos en agua ultrapura, secadas bajo campana de flujo laminar y montadas en portaobjetos, utilizando pegamento termoplástico (Crystalbond™), siendo almacenadas para su posterior análisis químico en la Universidad de Chile.

Toda manipulación de las muestras fue efectuada con guantes, pinzas y material plástico esterilizado. Todo el material no desechable fue descontaminado mediante baños de ácido nítrico ultrapuro al 4%, enjuagado con agua ultrapura y secado en cámara de flujo laminar.

i. Composición elemental (peces 2012-2013 y 2015-2016)

El análisis de composición elemental de otolitos, se realizó siguiendo una transecta de 5-23 puntos, dependiendo del tamaño del otolito, cada uno de ellos de 30 μm de diámetro, separados 44-47 μm (entre centros), desplegados desde el primordio al borde de la sección transversal del otolito, en orientación (preferentemente) dorsal (Figura 4). En cada punto, la muestra fue extraída mediante ablación láser (LA) y transferida mediante flujo de Helio a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS). Dada la intensidad, frecuencia (10 Hz) y duración (30 s) de la ablación láser, la profundidad aproximada de los puntos alcanzó 20-30 μm . Antes y después de cada serie de 20-30 mediciones en las secciones de los otolitos de interés, se obtuvieron mediciones equivalentes (dos puntos de 30 μm) sobre el estándar NIST 612. Adicionalmente, 2-8 mediciones fueron efectuadas, cada día, sobre un segundo material de referencia, MACS-3, producido por el Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS).

Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Geoquímica del Departamento de Geología de la Universidad de Chile con el apoyo de los doctores Fernando Barra y Mathieu Leisen de la misma institución. Todas las sesiones de análisis siguieron el protocolo presentado en el primer informe de avance, que fue desarrollado en conjunto con la doctora Audrey Darnaude y el doctor Franck Ferraton de CNRS (Francia) y con los doctores Mathieu Leissen y Fernando Barra de la Universidad de Chile (ver Anexo 1)

El postproceso de los datos generados por el espectrómetro de masas fueron analizados mediante el paquete Iolite (Paton et al. 2011) V2.5, utilizando el método de estándares internos y externos (esquema de reducción “Trace Elements IS”). Como estándar externo se utilizó NIST612 y como estándar interno ^{43}Ca , asumiendo un valor estequiométrico de 56% de CaO en

la matriz de aragonita.). Se cuantificaron las concentraciones de 40 elementos y/o isótopos, cuyas concentraciones podrían ser de interés en otolitos (A. Darnaude, com. pers.): ^7Li , ^{11}B , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{27}Al , ^{31}P , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{83}Kr , ^{85}Rb , ^{86}Sr , ^{88}Sr , ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{120}Sn , ^{121}Sb , ^{125}Te , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{139}La , ^{140}Ce , ^{141}Pr , ^{146}Nd , ^{147}Sm , ^{169}Tm , ^{174}Yb , ^{175}Lu , ^{178}Hf , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , ^{232}Th y ^{238}U .

En total se analizaron mediante ablación láser 454 otolitos de *E. ringens* (periodo 2012-2013 y 2015-2016). Sin embargo, el número de muestras con resultados disponibles se redujo a 439, debido a problemas con el software del ICPMS y a la eliminación de muestras contaminadas en el postproceso de los datos. De las muestras disponibles, 302 son del periodo 2015-2016, y 137 muestras corresponden al periodo 2012-2013. Cabe destacar que en la oferta técnica se comprometieron solo 150 muestras provenientes del periodo 2015-2016 y que para el periodo 2012-2013 no se analizarían muestras en esta aproximación.

Para todos los análisis presentados en esta sección, se definió como fase juvenil los primeros 40 días de vida de *E. ringens*. Este periodo de tiempo, fue representado por los primeros siete, seis, y cuatro puntos de ablación en las Zonas I, II y III respectivamente. Para representar la fase adulta (últimos 5 meses de vida) de cada individuo, se definieron los últimos cinco puntos de ablación en otolitos de peces adultos. Las relaciones entre número de puntos de ablación y días de vida, se estimó en base al grosor medio de los microincrementos en otolitos (ver sección de microestructura de otolitos).

Se eliminó el primer punto de todos los otolitos, con el fin de excluir un posible efecto materno en la composición elemental de los otolitos. Adicionalmente, se eliminaron todos los puntos con posible contaminación, utilizando como criterio, altas concentraciones de ^{27}Al y ^{57}Fe (P_{99}). Se calculó el cociente entre cada elemento y el calcio y finalmente se calculó la media de los puntos de ablación que representaron la fase juvenil y adulta en cada otolito.

Sólo nueve (excluyendo ^{43}Ca) de los 40 elementos e isótopos analizados, presentaron >90% del total de mediciones realizadas por sobre el límite de detección de la concentración de cada elemento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) o isótopo: ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{31}P , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{86}Sr , ^{88}Sr , y ^{138}Ba . En el caso del Mg y del Sr, se seleccionaron sus isótopos ^{25}Mg y ^{88}Sr , los cuales presentaron mayor variabilidad entre zonas que sus isótopos ^{24}Mg y ^{87}Sr , respectivamente. Debido a la posible interferencia isobárica entre ^{31}P y los iones NO^- y NOH^+ (M. Leissen, com. pers.) y la contaminación por Fe al manipular las muestras, estos elementos se excluyeron de los análisis.

Se llegó así a una lista final de 5 elementos seleccionados para el análisis (^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba).

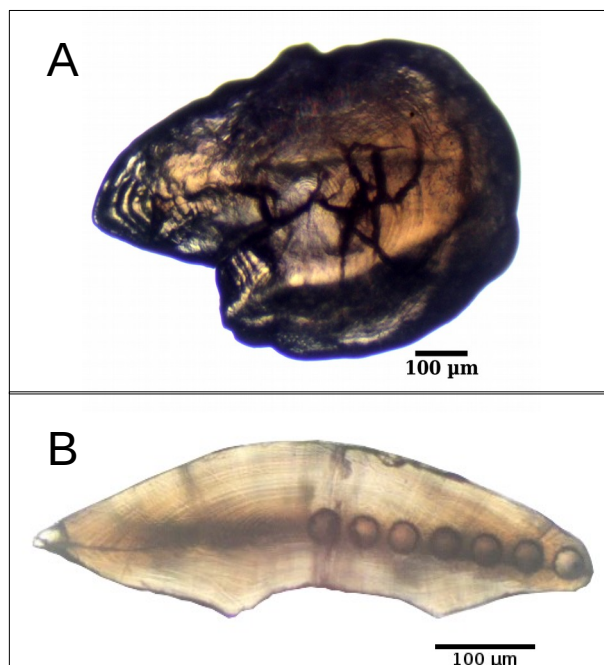


Figura 4: A: Otolito entero de ejemplar juvenil de 4,4 cm de longitud total. B: Sección transversal del mismo otolito pulido y analizado por LA-ICPMS. En esta sección se observan siete puntos (μm) en el eje primordio-borde dorsal del otolito .

ii. Isótopos estables (peces 2015-2016)

Dado que sólo se contó con el otolito derecho tanto para el análisis de composición elemental como de isótopos estables, ya que el otro fue destinado al análisis de morfometría y microincrementos; se hizo necesario seguir un procedimiento secuencial, donde el análisis isotópico sólo fue realizado, una vez finalizado el análisis elemental (LA-ICPMS) de cada otolito, con el consiguiente problema de disponer de poco material para ser analizado. Para tomar muestras del otolito, se utilizó un microtaladro (New Wave Research) provisto de una fresa de 500 μm de diámetro, buscando extraer una cantidad mayor a 30 μg del material calcáreo en secciones estandarizadas del otolito, representativas de los primeros 3 meses de vida de cada individuo muestreado, ya sea en la forma de prisma(s) y/o polvo.

Con el fin de obtener la señal isotópica de los primeros meses de vida (<3 meses) en peces juveniles y alcanzar la masa mínima (30 μg) requerida para el análisis de isótopos estables, se realizaron relaciones de edad-talla y edad-radio dorsal/ventral del otolito, definiendo los

siguientes criterios de extracción de prismas y/o polvo de las secciones de otolitos de ejemplares juveniles:

- Peces $\leq 6,4$ cm: se utilizó secciones del otolito extraídas y combinadas, para análisis, con otras 2 ó 3 secciones de peces del mismo tamaño y zona.
- Peces > 6.4 y ≤ 7.5 cm: se utilizó secciones del otolito extraídas y analizadas enteras
- Peces >7.5 cm: se utilizó secciones del otolito tratadas para eliminar la zona marginal (>4 meses de vida) y fueron analizadas enteras.

De manera adicional a las secciones de otolitos procedentes del análisis de composición elemental y con el fin de cubrir deficiencias muestrales asociadas a la combinación y/o pérdidas de muestras de pequeño tamaño, se analizaron 24 otolitos enteros (sin pulir, ni seccionar) de ejemplares juveniles de menos de 6 cm de longitud total (Tabla 3).

Para obtener la señal isotópica de los primeros meses de vida (<3 meses) en ejemplares adultos, se definió un polígono estandarizado (tomando como molde secciones de otolitos de peces de 7.5 cm) para la obtención de los prismas. El material remanente de otolito (borde), luego de la extracción del prisma, fue utilizada para representar la fase adulta de cada ejemplar. Cuando el material remanente no superó los 30 ug necesario para el análisis de isótopos estables, se reemplazó estas muestras, con una pequeña sección del rostrum de otolitos adicionales disponibles.

Los prismas o polvo de los otolitos fueron colectados y almacenados en microtubos Eppendorf limpios, previamente descontaminados en ácido nítrico (HNO_3 , 5%). Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio Ambiental de Geoquímica de Isótopos de la Universidad de Arizona mediante un dispositivo automatizado de preparación de carbonato KIEL-III, acoplado a un espectrómetro de radio-gas Finnigan MAT 252. Los prismas o polvo de otolitos se digirieron con ácido fosfórico deshidratado en vacío, a 70°C , donde el CO_2 generado por la reacción determina la concentración de isótopos $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Los resultados se expresaron en partes por mil relativas a un estándar (Vienna Pee Dee Belemnite, VPDB), utilizando los estándares internacionales NBS-19 y NBS-18.

Tabla 3: Número de muestras de otolitos de *Engraulis ringens* para análisis de isótopos estables. Números entre paréntesis indican cantidad de otolitos utilizado para la combinación de secciones.

Tratamiento	Fase representada	Individuo	Nº muestras analizadas	Nº muestras sobre límite detección
Sección entera	Juvenil	Juvenil	59	45
Combinación de secciones	Juvenil	Juvenil	29 (92)	17 (53)
Sección entera sin borde	Juvenil	Juvenil	51	44
Otolito entero	Juvenil	Juvenil	54	37
Prisma	Juvenil	Adulto	176	159
Borde	Adulto	Adulto	136	52
Sección rostrum	Adulto	Adulto	85	76

iii. Análisis estadísticos

Se utilizaron modelos lineales mixtos (LMM) implementados en la librería “lme4” de R (Littel et al. 1996, Pinheiro & Bates 2000) para llevar a cabo las siguientes comparaciones univariadas de concentraciones elementales e isotópicas, entre secciones y grupos de edad:

- a) Secciones nucleares de otolitos de peces juveniles, entre zonas de muestreo, dentro de cada período de análisis (2013 v/s 2015-2016). Comparación orientada a evaluar el potencial uso de la composición elemental o isotópica de las secciones juveniles del otolito como marcadores naturales de la zona de origen.
- b) secciones nucleares de otolitos de peces juveniles y de peces adultos, dentro de zonas de muestreo y períodos. Comparación orientada a evaluar desplazamientos de peces entre zonas. La existencia de diferencias significativas en la composición de las secciones nucleares entre juveniles y adultos es interpretada como evidencia de desplazamiento horizontal.
- c) Diferencias pareadas entre la sección nuclear (etapa juvenil) y marginal (etapa adulta) del otolito de cada pez adulto analizado, dentro de cada zona y período de muestreo. Comparación orientada a evaluar cambios ontogenéticos de hábitat. La existencia de diferencias significativas en la composición de las secciones nucleares y marginales de un mismo individuo son interpretadas como cambios horizontales o verticales de hábitat.
- d) Secciones marginales (etapa adulta) de individuos adultos entre zonas de muestreo, dentro de periodos. Comparación orientada a evaluar la resolución espacial de la técnica. La existencia de diferencias significativas en la composición de las secciones marginales entre zonas son

interpretadas como indicadores de diferencias ambientales relevantes y ausencia de desplazamientos aleatorios entre zonas.

El uso de modelos lineales mixtos buscó corregir los efectos de la falta de independencia entre observaciones procedentes de un mismo lance de pesca. Para tal fin, la identidad del lance fue incorporada como una variable aleatoria.

Los supuestos de normalidad univariada fueron verificados gráficamente, comparando las distribuciones teóricas y observadas de los residuales mediante diagramas quantil-quantil (Q-Q) (Venables & Ripley 2002). Los supuestos de homocedasticidad fueron evaluados mediante el test de Levene (1960), para cada variable respuesta utilizada. Las hipótesis nulas fueron rechazadas bajo un nivel de significancia (α) de 0,05 y los valores para cada variable fueron expresados como medias \pm error estándar (EE). Frente a la falta de normalidad y homocedasticidad en los datos (residuales) de las concentraciones elementales e isotópicas, se procedió a transformarlos utilizando las versiones multivariadas de los algoritmos de Box-Cox (Box & Cox 1964) y Yeo & Johnson (2000), respectivamente. Ambas transformaciones fueron implementadas mediante el paquete R “car” (Fox & Weisberg 2011). Aún transformados, los datos de concentración elemental no dieron soporte al supuesto de normalidad de residuales para todos los modelos evaluados. Por esta razón todas las pruebas de hipótesis relacionadas con composición elemental y sus comparaciones pareadas *a posteriori* fueron realizados mediante pruebas de permutaciones (Welham et al. 2004), $n=1000$, implementadas en la librería R “Predictmeans” (Luo & Koolgaard 2014). En el caso de los isótopos estables, las pruebas de hipótesis fueron efectuadas mediante un análisis de varianza (pruebas de F), donde los grados de libertad fueron ajustados mediante la aproximación de Kenward-Roger (Fox 2002). Las comparaciones pareadas *a posteriori* fueron efectuadas mediante pruebas de Tukey implementados para LMMs en el paquete R “multcomp” (Hothorn et al. 2008).

Las mismas cuatro comparaciones efectuadas a nivel univariado, fueron llevadas a cabo considerando las respuestas multivariadas de la composición elemental y de la composición isotópica de los otolitos disponibles. Estas comparaciones se basaron en el ajuste de modelos lineales mixtos multivariados (GLMM) utilizando la librería “MCMCglmm” de R (Hadfield 2010). En cada comparación se consideraron las mismas variables explicativas y aleatorias que en el análisis univariado. Los supuestos de normalidad multivariada fueron evaluados gráficamente, en las variables ya transformadas, mediante un diagrama Q-Q y mediante el test H de Royston (1983).

1.3. Resultados

i. Composición elemental

Comparación de secciones nucleares de otolitos de peces juveniles entre zonas, dentro de períodos

Los valores observados y las pruebas de hipótesis relacionadas con el análisis univariado de la composición elemental de otolitos de peces juveniles condujeron a conclusiones dispares, dependiendo del período analizado. Para el periodo 2012-2013, solo Mn⁵⁵ mostró diferencias significativas entre zonas (Figura 5). Este metal mostró concentraciones significativamente mayores en la zona II (7.2 ± 0.92 EE), que en las zonas I y III (4.0 ± 0.57 EE y 3.4 ± 0.56 EE, respectivamente, Tabla 4, Figura 5). El modelo multivariado más informativo para este mismo período fue, sin embargo, aquel que consideró separadamente las tres zonas de estudio (DIC=671, Tabla 5 y Figura 6a). En el periodo 2015-2016, en cambio, se encontró diferencias significativas entre zonas para tres elementos: Na²³, Mn⁵⁵ y Sr⁸⁸ (Figura 5), indicando tendencias decrecientes de las concentraciones de Mn⁵⁵ y Sr⁸⁸ en sentido norte-sur (Tabla 5 y Figura 5). Las concentraciones de Mn⁵⁵ llegaron a ser significativamente mayores en la zona III, sin diferencias significativas entre las zonas I y II. En el caso de Sr⁸⁸, el gradiente norte-sur llevó a diferencias significativas entre las tres zonas (Tabla 5 y Figura 5). El modelo multivariado más informativo para este segundo período, fue aquel que consideró separadamente la zona III de las zonas I y II, mientras que el modelo nulo fue el menos informativo (Tabla 5 y Figura 6b). La clara segregación entre la zona III y las otras dos zonas (I y II), se observa en el diagrama de componentes principales (Figura 6).

Comparación de la composición elemental de secciones nucleares de otolitos entre juveniles y adultos, dentro de zonas y períodos

Las comparaciones univariadas entre las secciones nucleares de otolitos de peces juveniles y de peces adultos mostraron diferencias significativas respecto de las concentraciones de algunos elementos, dependiendo de la zona y del período analizado (Tabla 6, Figura 7). Por ejemplo, para el periodo 2012-2013 se encontraron diferencias significativas en ²⁴Mg (Zonas I y III), ⁵⁵Mn (Zonas I y II) y ²³Na (Zonas II y III). Para el período 2015-2016 (Tabla 7, Figura 8), se encontraron diferencias significativas en ²⁴Mg (Zona III), ⁵⁵Mn (Zona I) y Ba¹³⁸ (zonas I y III). El análisis multivariado por su parte, no reveló diferencias relevantes entre las secciones nucleares de los otolitos de peces juveniles y adultos para el período 2012-2013, siendo el modelo (GLMM) más informativo aquel que consideró la zona de muestreo como única

variable explicativa (Tabla 7 y Figura 9a). Para el periodo 2015-2016, en cambio, el modelo GLMM que consideró tanto las diferencias entre zonas como entre etapas, es decir, entre juveniles y adultos, fue levemente más informativo que los modelos alternativos (Tabla 7).

Comparación de la composición elemental de otolitos entre secciones nucleares y marginales de adultos, dentro de zonas y períodos

Las concentraciones de Mg^{24} , Sr^{88} y Ba^{138} mostraron diferencias significativas entre etapas de vida (secciones de un mismo otolito), con patrones muy similares en ambos períodos de muestreo (2012-2013 y 2015-2016). Los dos primeros elementos fueron significativamente mayores en la fase juvenil (sección nuclear) que en la adulta (sección marginal), dentro de cada zona (Tabla 8; Figura 10 y 11). El Ba^{138} , en cambio, mostró valores significativamente menores en la fase juvenil que en la adulta, dentro de todas las zonas (Tabla 8, Figura 10 y 11). El Mn^{55} , también mostró patrones similares entre períodos de muestreo, mostrando mayores concentraciones en la fase juvenil que en la adulta, siendo esta diferencia significativa sólo para las zonas I y II (Tabla 8; Figura 10 y 11). Los análisis multivariados (GLMM) mostraron una tendencia clara a la segregación entre etapas (secciones nuclear y marginal), en ambos períodos. De esta manera, los modelos que consideraron la etapa como variable explicativa fueron los más informativos, tanto para el período 2012-2013, como para el 2015-2016 (Tabla 9). Esta segregación entre etapas, se observa claramente en los diagramas de componentes principales de cada período (Figura 12). En contraste, el modelo que sólo consideró segregación entre zonas de estudio, fue el menos informativo, en ambos periodos (Tabla 9).

Comparación de la composición elemental de secciones marginales de otolitos de peces adultos entre zonas, dentro de períodos

La comparación de las secciones marginales de otolitos de peces adultos reveló diferencias univariadas significativas en Na^{23} y Sr^{88} para el periodo 2012-2013 y en Mn^{55} y Ba^{138} para el periodo 2016-2016. En 2012-2013 la concentración relativa de ^{23}Na en la Zona II (9983 ± 176 EE) fue significativamente mayor que en la Zona I (8998 ± 208 EE, Tabla 10 y Figura 13). La concentración relativa de Sr^{88} , por otro lado, fue significativamente menor en la Zona III (803 ± 58 EE) fue significativamente menor que en la Zona I (1121 ± 102 EE) (Figura 13 y 10). El análisis multivariado seleccionó como modelo más informativo aquel que segregó las tres zonas de estudio (Tabla 12; Figura 14a). En 2015-2016, los valores de Mn^{55} y Ba^{138} en la Zona III (Mn^{55} : 1.8 ± 0.17 EE; Ba^{138} : 25 ± 33 EE), fueron significativamente mayores que en la Zona I (Mn^{55} : 1.1 ± 0.13 EE; Ba^{138} : 9 ± 1.4 EE) y Zona II (Mn^{55} : 1.1 ± 0.12 EE; Ba^{138} : 13 ± 1.8 EE) (Tabla

11 y Figura 13). El Sr⁸⁸ observado en las muestras del periodo 2015-2016 presentó una clara tendencia decreciente hacia el sur, con diferencias significativas entre las tres zonas de estudio (Tabla 12; Figura 14a). Los modelos multivariados más informativo para este período, fueron aquellos que dividieron el área de estudio en sólo dos zonas, siendo levemente más informativo el que consideró la Zona III separada de la combinación de las Zonas I y II (Tabla 12; Figura 14).

Tabla 4: Media observada y ajustada (\bar{X}) de las concentraciones de Na²³, Mg²⁵, Mn⁵⁵, Sr⁸⁸ y Ba¹³⁸ relativas al ⁴³Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* (período 2012-2013). DS=desviación estándar; EE=error estándar.

Elemento	Zona	Medias observadas \pm DS		Medias ajustadas \pm EE	
		2012-2013	2015-2016	2012-2013	2015-2016
Na ²³	I	9258 \pm 934	9198 \pm 843	9177 \pm 133	9254 \pm 224
Na ²³	II	9393 \pm 853	9665 \pm 797	9628 \pm 138	9374 \pm 233
Na ²³	III	8722 \pm 698	8991 \pm 671	8953 \pm 152	8726 \pm 232
Mg ²⁴	I	86 \pm 30	486 \pm 228	422 \pm 70	84 \pm 16
Mg ²⁴	II	108 \pm 34	395 \pm 306	290 \pm 43	104 \pm 21
Mg ²⁴	III	185 \pm 144	489 \pm 298	398 \pm 83	149 \pm 33
Mn ⁵⁵	I	4.2 \pm 2.09	3.7 \pm 1.66	3.4 \pm 0.25	4.0 \pm 0.57
Mn ⁵⁵	II	7.8 \pm 3.66	3.3 \pm 1.18	3.1 \pm 0.23	7.2 \pm 0.92
Mn ⁵⁵	III	3.8 \pm 1.83	2.3 \pm 1.58	2.0 \pm 0.18	3.4 \pm 0.56
Sr ⁸⁸	I	1982 \pm 358	2461 \pm 562	2365 \pm 91	1965 \pm 175
Sr ⁸⁸	II	2123 \pm 554	2096 \pm 490	2005 \pm 69	2026 \pm 194
Sr ⁸⁸	III	1530 \pm 251	1602 \pm 221	1571 \pm 53	1521 \pm 119
Ba ¹³⁸	I	2.8 \pm 2.06	2 \pm 1	1.3 \pm 0.16	2.4 \pm 0.97
Ba ¹³⁸	II	2.7 \pm 1.99	3 \pm 3	1.6 \pm 0.21	1.9 \pm 0.72
Ba ¹³⁸	III	1.3 \pm 0.74	2 \pm 2	1.3 \pm 0.19	1.1 \pm 0.36

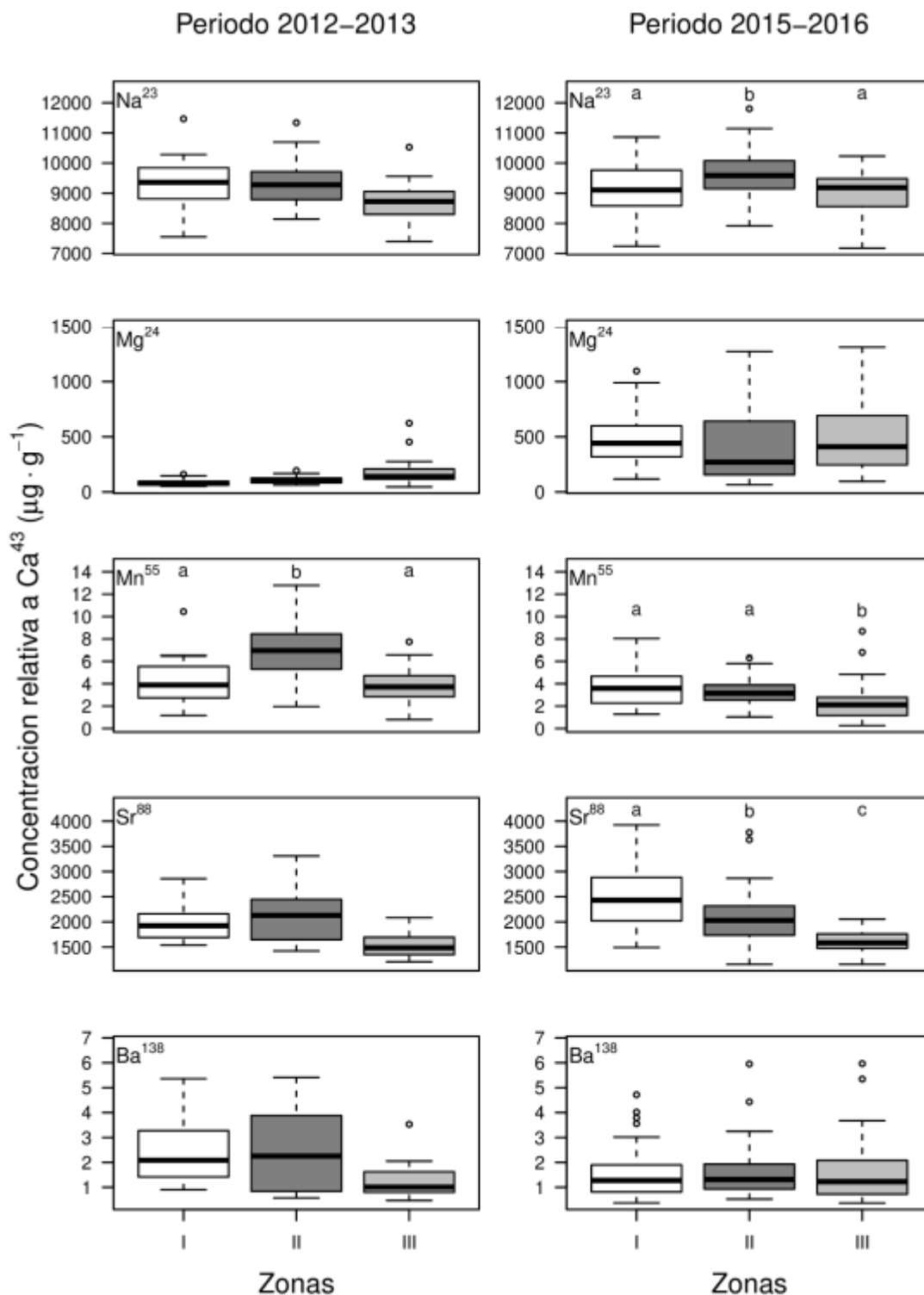


Figura 5: Concentraciones de Na²³, Mg²⁵, Mn⁵⁵, Sr⁸⁸ y Ba¹³⁸ relativas al ⁴³Ca (µg·g⁻¹) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens*. Panel izquierdo corresponde a periodo 2012-2013 y panel derecho corresponde a periodo 2015-2016. Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo; y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05).

Tabla 5: Comparación de modelos lineales generalizados mixtos formulados para explicar la distribución multivariada de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* (periodos 2012-2013 y 2015-2016 DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield 2010). Modelos difieren respecto de las hipótesis de agrupación/segregación de zonas de estudio empleadas para explicar variable respuesta.

Hipótesis (variables explicativas)	DIC 2012-2013	DIC 2015-2016
Modelo nulo (zona común I+II+III)	670.2	1567.1
Tres Zonas (I, II y III)	661.9	1527.0
Dos Zonas (I+II y III)	665.9	1525.3
Dos Zonas (I y II+III)	667.4	1562.6

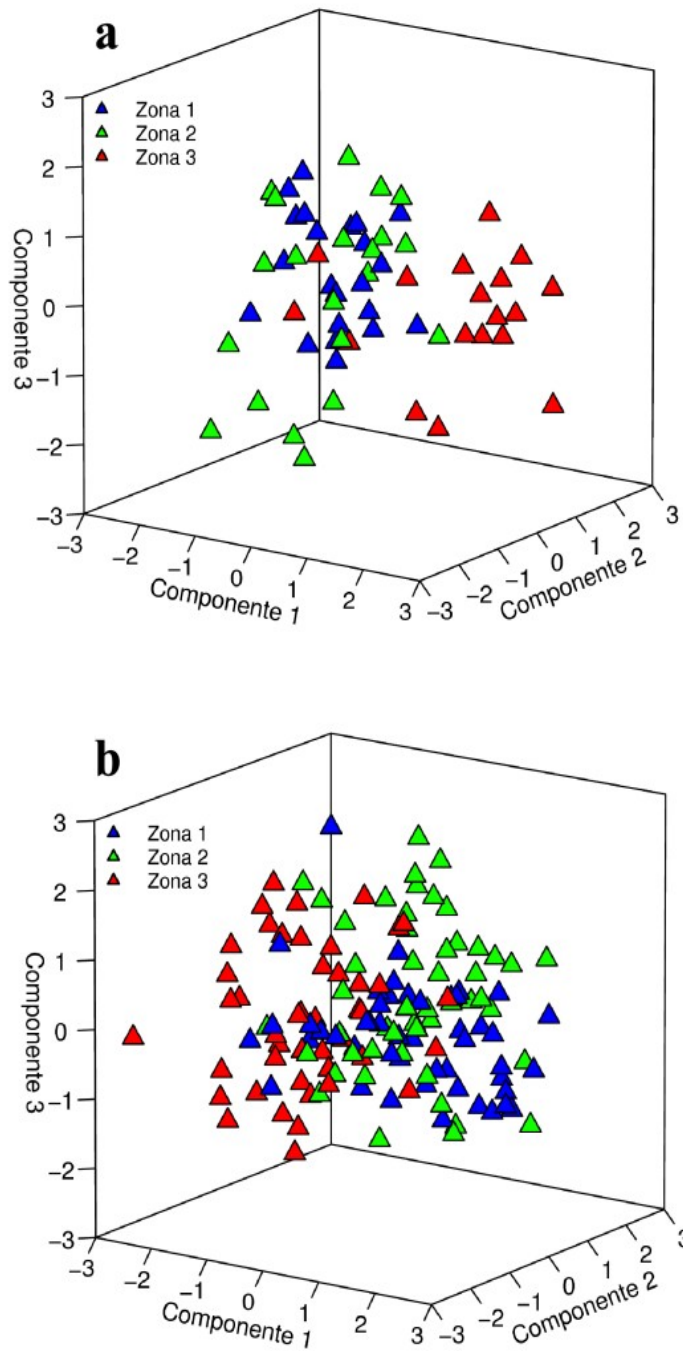


Figura 6: Diagrama de los tres primeros componentes principales de las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados en **a)** periodo 2012-13 (74 % de la varianza explicada) y **b)** periodo 2015-2016 (74 % de la varianza explicada). Zona I=Arica-Antofagasta, Zona II=Atacama-Coquimbo; Zona III=Valparaíso-Los Lagos.

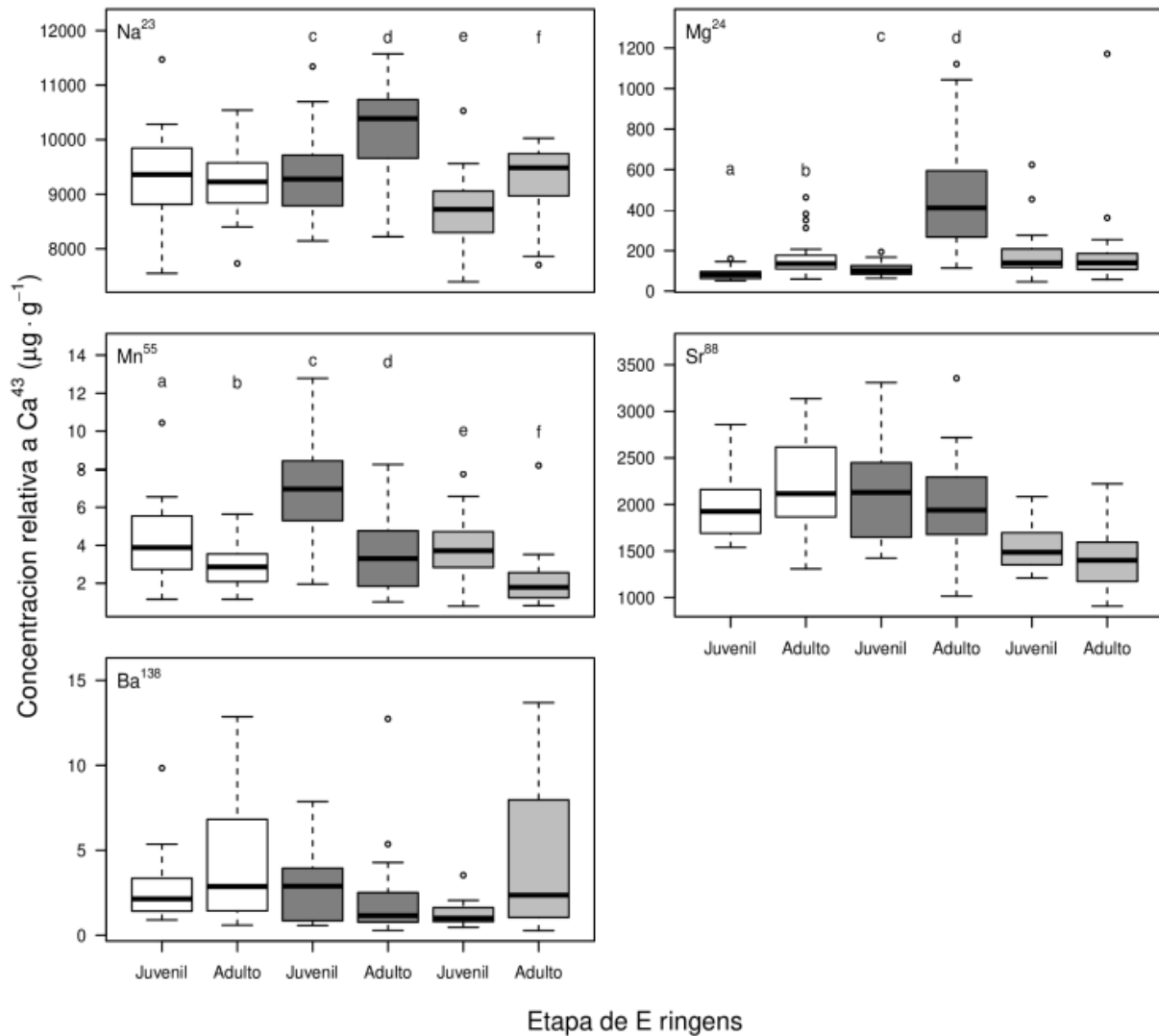


Figura 7: concentraciones de ²³Na, ²⁵Mg, ⁵⁵Mn, ⁸⁸Sr y ¹³⁸Ba relativas al ⁴³Ca (µg·g⁻¹) en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* dentro de cada zona (periodo 2012-2013). Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo; y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias.

Tabla 6: Medias observadas y ajustadas de las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares de otolitos de peces juveniles y adultos, dentro de cada zona y periodo de estudio. DS=desviación estándar; EE=error estándar

Elemento	Zona	Etapa	Media observada \pm DS		Media ajustada \pm EE	
			2012-2013	2105-2016	2012-2013	2105-2016
Na^{23}	I	adulto	9311 \pm 872	9311 \pm 872	9264 \pm 155	9270 \pm 156.2
Na^{23}	I	juvenil	9216 \pm 865	9216 \pm 865	9208 \pm 133	9210 \pm 132.1
Na^{23}	II	adulto	9696 \pm 864	9696 \pm 864	9762 \pm 147	9761 \pm 146.2
Na^{23}	II	juvenil	9584 \pm 817	9584 \pm 817	9567 \pm 135	9564 \pm 131.6
Na^{23}	III	adulto	8971 \pm 788	8971 \pm 788	9001 \pm 147	9001 \pm 144.4
Na^{23}	III	juvenil	8914 \pm 684	8914 \pm 684	8892 \pm 149	8887 \pm 149.7
Mg^{24}	I	adulto	317 \pm 165	317 \pm 165	255 \pm 137	254 \pm 137.1
Mg^{24}	I	juvenil	364 \pm 265	364 \pm 265	244 \pm 127	241 \pm 132.7
Mg^{24}	II	adulto	506 \pm 221	506 \pm 221	496 \pm 326	492 \pm 300.7
Mg^{24}	II	juvenil	310 \pm 288	310 \pm 289	200 \pm 101	202 \pm 102.6
Mg^{24}	III	adulto	284 \pm 184	284 \pm 187	229 \pm 121	234 \pm 118.9
Mg^{24}	III	juvenil	402 \pm 296	402 \pm 297	278 \pm 143	276 \pm 148.9
Mn^{55}	I	adulto	2.5 \pm 1.09	2.5 \pm 1.09	2.5 \pm 0.52	2.5 \pm 0.51
Mn^{55}	I	juvenil	3.9 \pm 1.80	3.9 \pm 1.80	3.9 \pm 0.66	3.9 \pm 0.66
Mn^{55}	II	adulto	3.3 \pm 1.75	3.3 \pm 1.75	3.2 \pm 0.58	3.2 \pm 0.59
Mn^{55}	II	juvenil	4.6 \pm 3.01	4.6 \pm 3.01	4.3 \pm 0.71	4.3 \pm 0.71
Mn^{55}	III	adulto	2.4 \pm 2.11	2.4 \pm 2.11	2.0 \pm 0.43	2.0 \pm 0.43
Mn^{55}	III	juvenil	2.7 \pm 1.79	2.7 \pm 1.79	2.6 \pm 0.52	2.6 \pm 0.52
Sr^{88}	I	adulto	2242 \pm 533	2242 \pm 533	2168 \pm 99	2166 \pm 100.6
Sr^{88}	I	juvenil	2315 \pm 553	2315 \pm 553	2234 \pm 99	2235 \pm 98.5
Sr^{88}	II	adulto	1990 \pm 492	1990 \pm 492	1900 \pm 82	1899 \pm 84.2
Sr^{88}	II	juvenil	2104 \pm 506	2104 \pm 506	2007 \pm 88	2006 \pm 87.5
Sr^{88}	III	adulto	1505 \pm 323	1505 \pm 323	1440 \pm 59	1440 \pm 59.6
Sr^{88}	III	juvenil	1581 \pm 230	1581 \pm 230	1546 \pm 66	1545 \pm 66.9
Ba^{138}	I	adulto	4 \pm 5	4 \pm 5	2 \pm 0.5	2.2 \pm 0.47
Ba^{138}	I	juvenil	2 \pm 2	2 \pm 1.5	2 \pm 0.2	1.5 \pm 0.23
Ba^{138}	II	adulto	3 \pm 4	3 \pm 4	2 \pm 0.3	1.6 \pm 0.28
Ba^{138}	II	juvenil	3 \pm 3	3 \pm 23	2 \pm 0.3	1.6 \pm 0.26
Ba^{138}	III	adulto	12 \pm 17	12 \pm 17	3 \pm 1	3.2 \pm 0.69
Ba^{138}	III	juvenil	2 \pm 2	2 \pm 1.5	1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.21

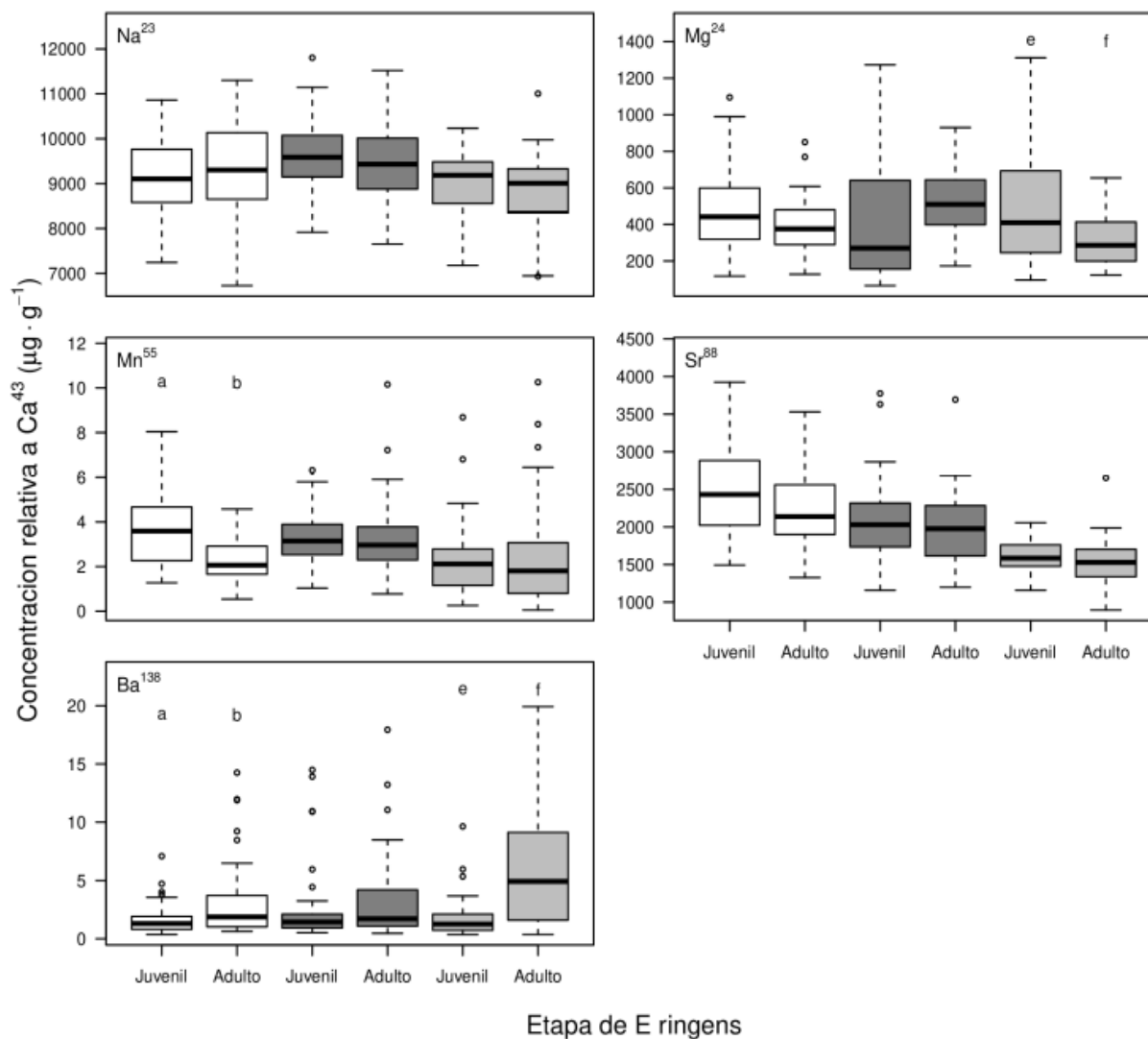


Figura 8: Concentraciones de ²³Na, ²⁵Mg, ⁵⁵Mn, ⁸⁸Sr y ¹³⁸Ba relativas al ⁴³Ca (µg·g⁻¹) de secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* dentro de zonas, para el periodo 2015-2016. Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos). Letras distintas indican diferencias significativas entre etapas, dentro de zonas.

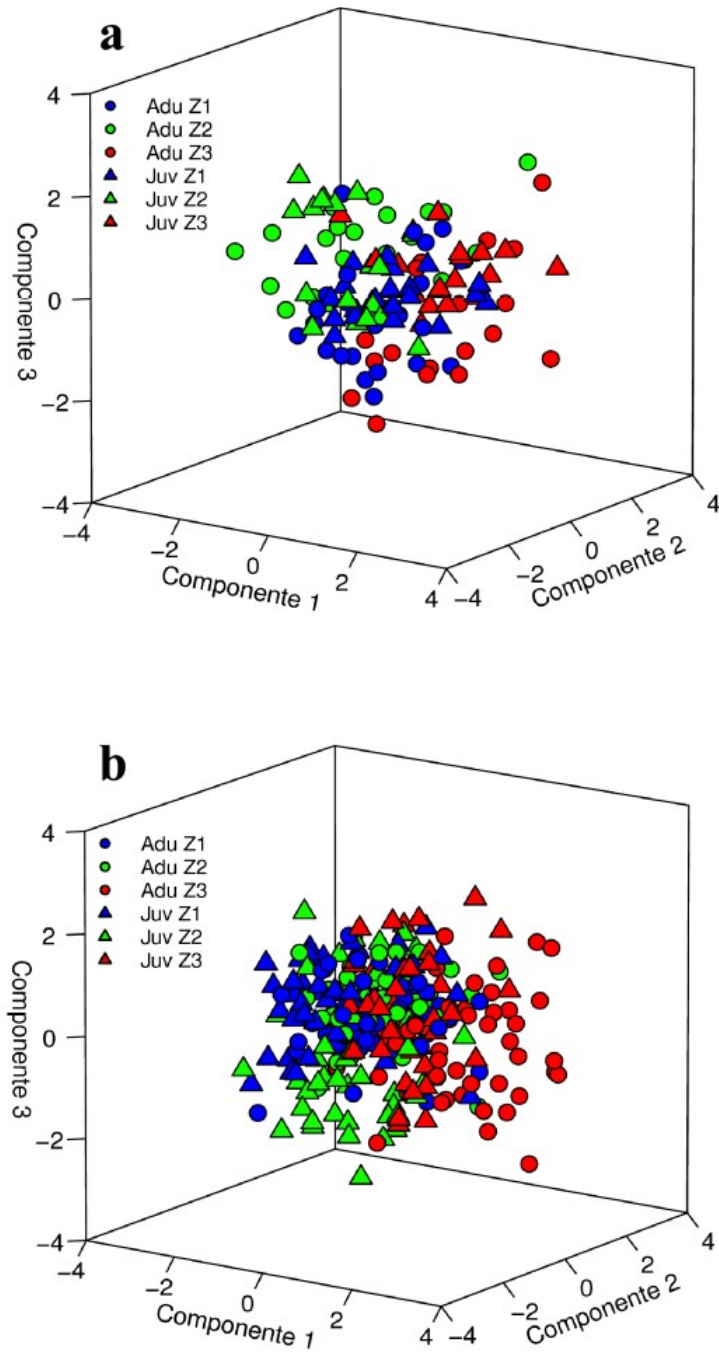


Figura 9: Diagrama de los tres primeros componentes principales de concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca en zonas nucleares de otolitos de peces juveniles (Juv) y adultos (Adu) de anchoveta *Engraulis ringens* muestreados en el periodo 2012-13 (a; 73 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 68 % de la varianza explicada). ZI=Arica-Antofagasta, ZII=Atacama-Coquimbo; ZIII=Valparaíso-Los Lagos.

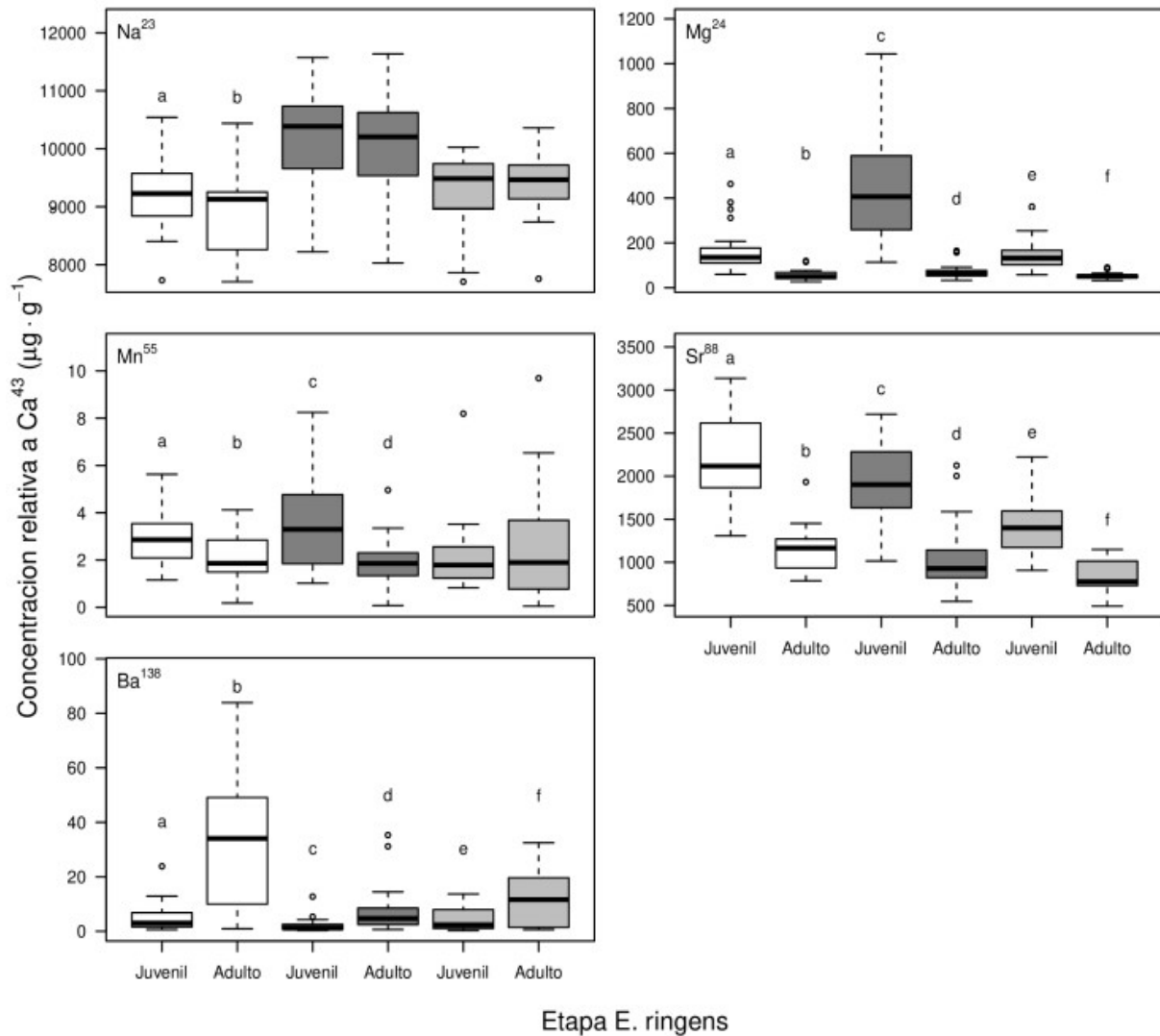


Figura 10: Concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu g \cdot g^{-1}$) en secciones nucleares (etapa juvenil) y bordes (etapa adulta) de otolitos de peces adultos de anchoveta *Engraulis ringens* en el periodo 2012-2013. Zona I=Arica-Antofagasta (blanco), Zona II=Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III=Valparaíso-Los Lagos (gris claro). Diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro de zonas se indican con letras diferentes.

Tabla 7: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la variabilidad en las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en la sección nuclear de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodo 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas combinaciones de variables explicativas. La variable zona corresponde a la zona de captura y divide el área de estudio en Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. La variable etapa discrimina individuos juveniles y adultos. DIC= Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Hipótesis (variables explicativas)	DIC 2012-2013	DIC 2015-2016
Zona	1562.8	3484.9
Zona×Etapa	1563.7	3484.5
Zona+Etapa	1563.1	3484.5

Tabla 8: Medias observadas y ajustadas de las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas al ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares y marginales de otolitos de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodos 2012-2013 y 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Elemento	Zona	Sección otolito	Media observada \pm DS		Media ajustada \pm EE	
			2012-2013	2105-2016	2012-2013	2105-2016
Na^{23}	I	Nuclear	8785 \pm 910	8785 \pm 910	8756 \pm 184	8755 \pm 183
Na^{23}	I	Marginal	9310 \pm 870	9310 \pm 870	9316 \pm 172	9319 \pm 175
Na^{23}	II	Nuclear	9505 \pm 923	9505 \pm 923	9595 \pm 162	9594 \pm 160
Na^{23}	II	Marginal	9696 \pm 864	9696 \pm 864	9805 \pm 159	9801 \pm 157
Na^{23}	III	Nuclear	9016 \pm 868	9016 \pm 868	9106 \pm 171	9108 \pm 169
Na^{23}	III	Marginal	8971 \pm 788	8971 \pm 788	9077 \pm 167	9080 \pm 165
Mg^{24}	I	Nuclear	69 \pm 72	69 \pm 72	50 \pm 5	50 \pm 5
Mg^{24}	I	Marginal	317 \pm 165	317 \pm 165	242 \pm 27	242 \pm 27
Mg^{24}	II	Nuclear	73 \pm 69	73 \pm 69	60 \pm 5	59 \pm 5
Mg^{24}	II	Marginal	506 \pm 221	506 \pm 221	448 \pm 50	449 \pm 49
Mg^{24}	III	Nuclear	45 \pm 18	45 \pm 18	41 \pm 4	41 \pm 4
Mg^{24}	III	Marginal	284 \pm 184	284 \pm 184	232 \pm 24	233 \pm 25
Mn^{55}	I	Nuclear	1.5 \pm 0.85	1.5 \pm 0.85	1.4 \pm 0.18	1.4 \pm 0.18
Mn^{55}	I	Marginal	2.5 \pm 1.09	2.5 \pm 1.09	2.5 \pm 0.24	2.5 \pm 0.24
Mn^{55}	II	Nuclear	1.5 \pm 1.01	1.5 \pm 1.01	1.3 \pm 0.16	1.3 \pm 0.16
Mn^{55}	II	Marginal	3.3 \pm 1.75	3.3 \pm 1.75	3.2 \pm 0.27	3.2 \pm 0.27
Mn^{55}	III	Nuclear	2.2 \pm 1.74	2.2 \pm 1.74	1.9 \pm 0.20	1.9 \pm 0.20
Mn^{55}	III	Marginal	2.4 \pm 2.05	2.4 \pm 2.05	1.9 \pm 0.21	1.9 \pm 0.20
Sr^{88}	I	Nuclear	1184 \pm 326	1184 \pm 326	1141 \pm 40	1142 \pm 40
Sr^{88}	I	Marginal	2242 \pm 533	2242 \pm 533	2173 \pm 81	2169 \pm 82
Sr^{88}	II	Nuclear	1045 \pm 315	1045 \pm 315	989 \pm 32	988 \pm 32
Sr^{88}	II	Marginal	1990 \pm 492	1990 \pm 492	1901 \pm 68	1901 \pm 68
Sr^{88}	III	Nuclear	815 \pm 163	815 \pm 163	799 \pm 26	798 \pm 25
Sr^{88}	III	Marginal	1505 \pm 322	1505 \pm 323	1465 \pm 51	1465 \pm 51
Ba^{138}	I	Nuclear	21 \pm 24	21 \pm 24	12.4 \pm 3	12 \pm 3
Ba^{138}	I	Marginal	4 \pm 5	4 \pm 4	3 \pm 1	3 \pm 1
Ba^{138}	II	Nuclear	14 \pm 13	14 \pm 13	8 \pm 2	8 \pm 2
Ba^{138}	II	Marginal	3 \pm 4	3 \pm 4	2 \pm 0.5	2 \pm 0.5
Ba^{138}	III	Nuclear	27 \pm 20	27 \pm 20	14 \pm 4	14 \pm 4
Ba^{138}	III	Marginal	112 \pm 16	12 \pm 16	4 \pm 1	4 \pm 1

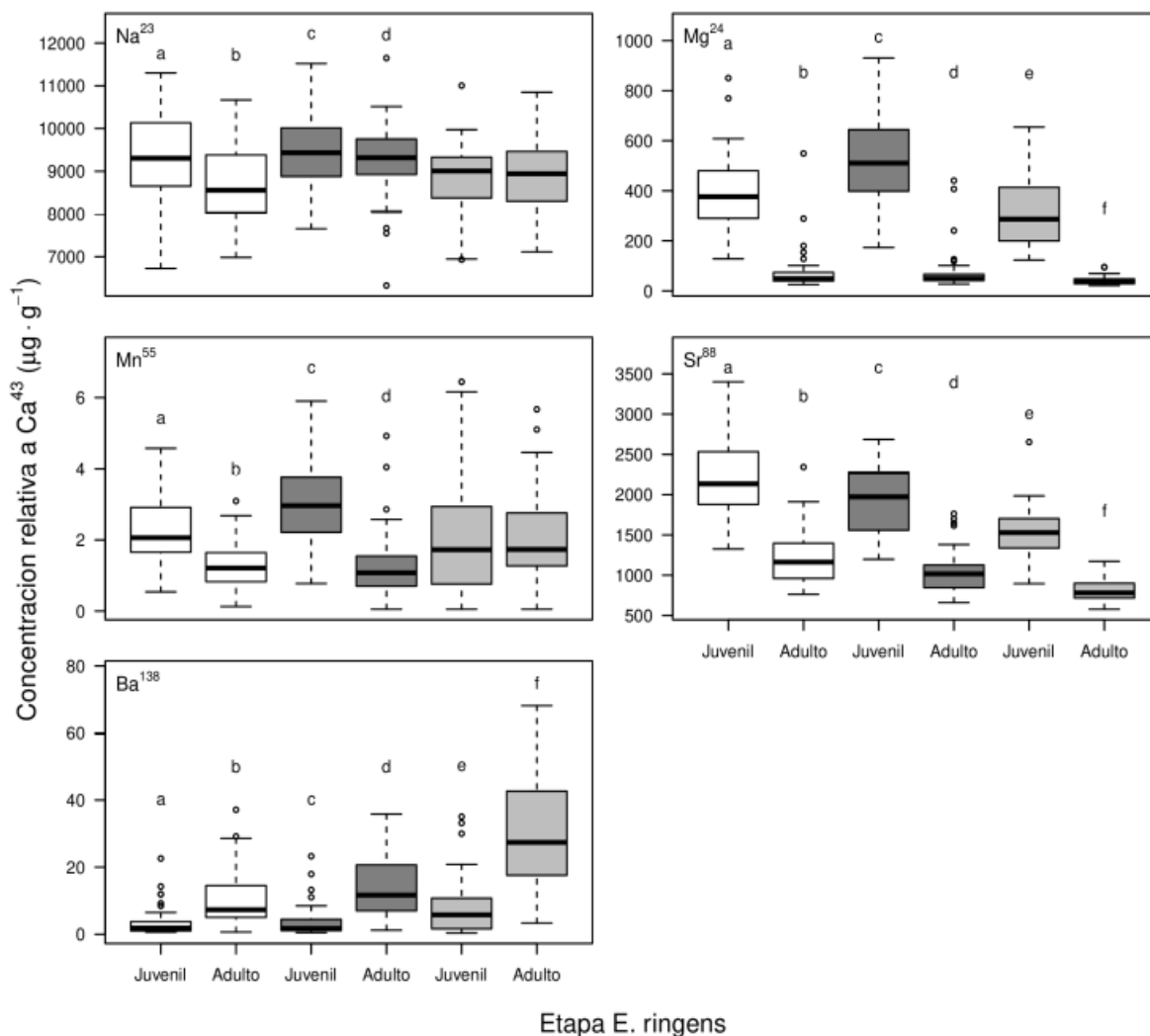


Figura 11: Concentraciones de ²³Na, ²⁵Mg, ⁵⁵Mn, ⁸⁸Sr y ¹³⁸Ba relativas al ⁴³Ca (µg·g⁻¹) en secciones nucleares y marginales de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodo 2015-2016). Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro). Diferencias significativas (p<0.05) dentro de zonas se indican con letras diferentes.

Tabla 9: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la variabilidad en las concentraciones de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba relativas a ^{43}Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en secciones nucleares y marginales de otolitos de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodos 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas combinaciones de variables explicativas. Variable zona divide el área de estudio en Zona I=Arica-Antofagasta; Zona II=Atacama-Coquimbo y Zona III=Valparaíso-Los Lagos. Variable sección discrimina secciones nuclear y marginal del otolito. DIC= Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Hipótesis (variables explicativas)	DIC 2012-2013	DIC 2015-2016
Zona	1507	3388
Zona×Sección	1570	3536
Zona+Sección	1515	3423
Hipótesis (variables explicativas)	1517	3421

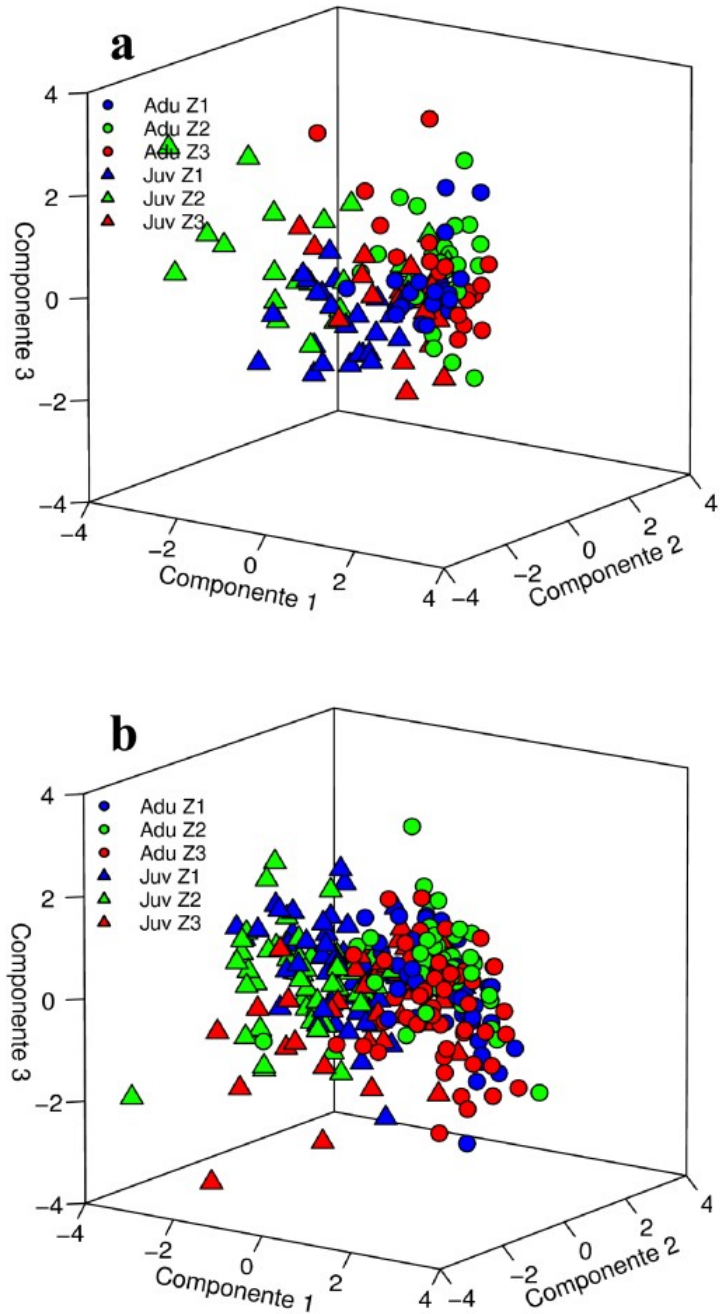


Figura 12: Diagrama de los tres primeros componentes principales de la concentración relativa de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba en zona nuclear (Juv) y borde (Adu) de otolitos de peces adultos muestreados en el periodo 2012-13 (a; 76 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 81 % de la varianza explicada). Z1=Arica-Antofagasta, Z2=Atacama-Coquimbo; Z3=Valparaíso-Los Lagos.

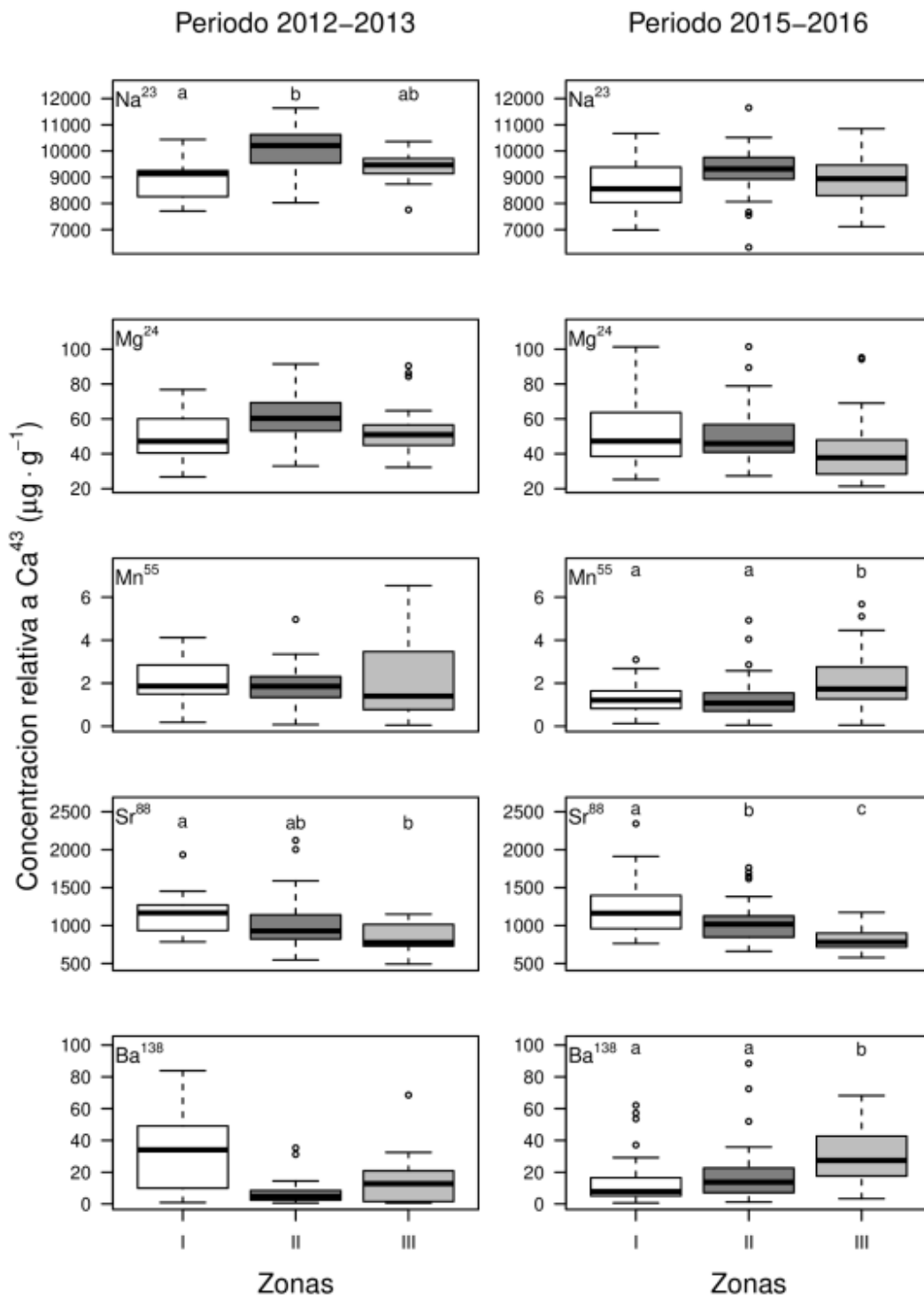


Figura 13: Concentración relativa de Na²³, Mg²⁵, Mn⁵⁵, Sr⁸⁸ y Ba¹³⁸ en borde de otolitos de peces adultos. Panel izquierdo corresponde al periodo 2012-2013 y panel derecho corresponde al periodo 2015-2016 (Zona I: Arica-Antofagasta Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos). Diferencias significativas entre zonas ($p < 0.05$) se indican con letras diferentes.

Tabla 10: Media observada y ajustada (\bar{X}) de la concentración de cada elemento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2012-2013). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	$\bar{X}\pm\text{DS}$ observada	$\bar{X}\pm\text{EE}$ ajustada	Elemento
I	8974 \pm 778	8998 \pm 208	Na ²³
II	9970 \pm 939	9983 \pm 176	Na ²³
III	9434 \pm 615	9437 \pm 205	Na ²³
I	49 \pm 15	46 \pm 4	Mg ²⁴
II	62 \pm 15	58 \pm 6	Mg ²⁴
III	54 \pm 17	50 \pm 4	Mg ²⁴
I	2.1 \pm 1.09	1.9 \pm 0.30	Mn ⁵⁵
II	2.0 \pm 0.99	1.8 \pm 0.28	Mn ⁵⁵
III	2.3 \pm 1.95	1.8 \pm 0.31	Mn ⁵⁵
I	1151 \pm 258	1121 \pm 102	Sr ⁸⁸
II	1040 \pm 405	926 \pm 69	Sr ⁸⁸
III	827 \pm 186	803 \pm 58	Sr ⁸⁸
I	32 \pm 25	22 \pm 10	Ba ¹³⁸
II	8 \pm 9	5 \pm 2	Ba ¹³⁸
III	15 \pm 17	7 \pm 3	Ba ¹³⁸

Tabla 11: Media observada y ajustada (\bar{X}) de la concentración de cada elemento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	$\bar{X}\pm\text{DS}$ observada	$\bar{X}\pm\text{EE}$ ajustada	Elemento
I	8710 \pm 963	8629 \pm 243	Na ²³
II	9265 \pm 835	9271 \pm 212	Na ²³
III	8864 \pm 902	8934 \pm 216	Na ²³
I	52 \pm 19	46 \pm 5.1	Mg ²⁴
II	50 \pm 17	47 \pm 4.8	Mg ²⁴
III	41 \pm 17	37 \pm 3.1	Mg ²⁴
I	1.3 \pm 0.63	1.1 \pm 0.13	Mn ⁵⁵
II	1.2 \pm 0.94	1.1 \pm 0.12	Mn ⁵⁵
III	2.1 \pm 1.29	1.8 \pm 0.17	Mn ⁵⁵
I	1201 \pm 331	1137 \pm 44	Sr ⁸⁸
II	1036 \pm 254	992 \pm 34	Sr ⁸⁸
III	814 \pm 154	794 \pm 23	Sr ⁸⁸
I	14 \pm 14.4	9 \pm 1.4	Ba ¹³⁸
II	18 \pm 16.8	13 \pm 1.8	Ba ¹³⁸
III	30 \pm 16.9	25 \pm 3.3	Ba ¹³⁸

Tabla 12: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones de Na^{23} , Mg^{25} , Mn^{55} , Sr^{88} y Ba^{138} en borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (periodo 2012-2013 y 2015-2016) es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos; DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Hipótesis	DIC 2012-2013	DIC 2015-2016
Modelo nulo (zona común I+II+III)	983.8	1830.7
Tres Zonas (I, II y III)	947.3	1842.4
Dos Zonas (I+II y III)	974.2	1829.9
Dos Zonas (I y II+III)	961.4	1845.2

ii. Isótopos estables

Comparación de secciones nucleares de otolitos de peces juveniles entre zonas, dentro de períodos

Se encontró evidencia de diferencias univariadas significativas de $\delta^{18}\text{O}$ entre las secciones nucleares de otolitos de peces juveniles entre zonas de muestreo, con valores medios de $\delta^{18}\text{O}$ significativamente mayores en la zona III (0.8 ± 0.05 EE) que en las zonas I (0.2 ± 0.04 EE) y II (0.3 ± 0.04 EE). Los valores medios de $\delta^{13}\text{C}$ en la zona III (-3.4 ± 0.27 EE) fueron mayores que la zona I (-3.8 ± 0.19 EE) y II (-4.1 ± 0.18 EE), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 13 y Figura 15). El análisis multivariado de otolitos de peces juveniles, mostró que el modelo más informativo fue aquel que consideró tres fuentes separadas de origen, representadas por las tres zonas de estudio (DIC= 515.5). El modelo nulo que consideró sólo una fuente de origen (zona I+II+II) fue el modelo menos informativo (DIC= 229; Tabla 14 y Figura 16).

Comparación de la composición isotópica de secciones nucleares de otolitos entre juveniles y adultos, dentro de zonas y períodos

La comparación univariada de la concentración relativa de ambos isótopos (^{18}O y ^{13}C) en secciones nucleares de otolitos entre peces juveniles y adultos, evidenció ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos de edad (Tabla 15 y Figura 17). El análisis multivariado de estos mismos datos reveló, sin embargo, diferencias entre etapas de vida, dentro de zonas de muestreo, seleccionado, como más informativo, el modelo (GLMM) que

consideró tanto los efectos principales, como la interacción entre zonas de muestreo y etapa de vida (Tabla 16).

Comparación de la composición elemental de otolitos entre secciones nucleares y marginales de adultos, dentro de zonas y períodos

El análisis univariado tanto de la composición relativa de ^{13}C , como de ^{18}O mostró diferencias significativas entre el núcleo y el borde de otolitos de peces adultos, dentro de las tres zonas de muestreo (Figura 19). La sección nuclear de los otolitos (fase juvenil) presentó valores menores que la sección marginal (fase adulta) en las tres zonas de muestreo, tanto en $\delta^{18}\text{O}$ como en $\delta^{13}\text{C}$ (Tabla 17 y Figura 19). El modelo multivariado más informativo fue aquél que consideró la etapa de vida (representada por la correspondiente sección del otolito) como única variable explicativa (Tabla 18 y Figura 20).

Comparación de la composición isotópica de secciones marginales de otolitos de peces adultos entre zonas, dentro de períodos

La composición isotópica en el borde de otolitos de peces adultos, presentó diferencias univariadas significativas entre zonas. Los valores de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en la zona III (1.3 ± 0.04 y -1.5 ± 0.11 , respectivamente) fueron significativamente mayores que los observados en las zonas I ($\delta^{18}\text{O}$: 0.9 ± 0.04 y $\delta^{13}\text{C}$: -2.0 ± 0.10) y II ($\delta^{18}\text{O}$: 0.8 ± 0.04 y $\delta^{13}\text{C}$: -2.2 ± 0.09), mientras que estas dos últimas zonas, no fueron significativamente diferentes entre ellas (Tabla 19 y Figura 21). El modelo multivariado más informativo para la composición isotópica de las secciones marginales de otolitos de peces adultos, fue aquél que consideró dos zonas, una representada por la combinación de las zonas I y II y la otra por la zona III (Tabla 20 y Figura 22).

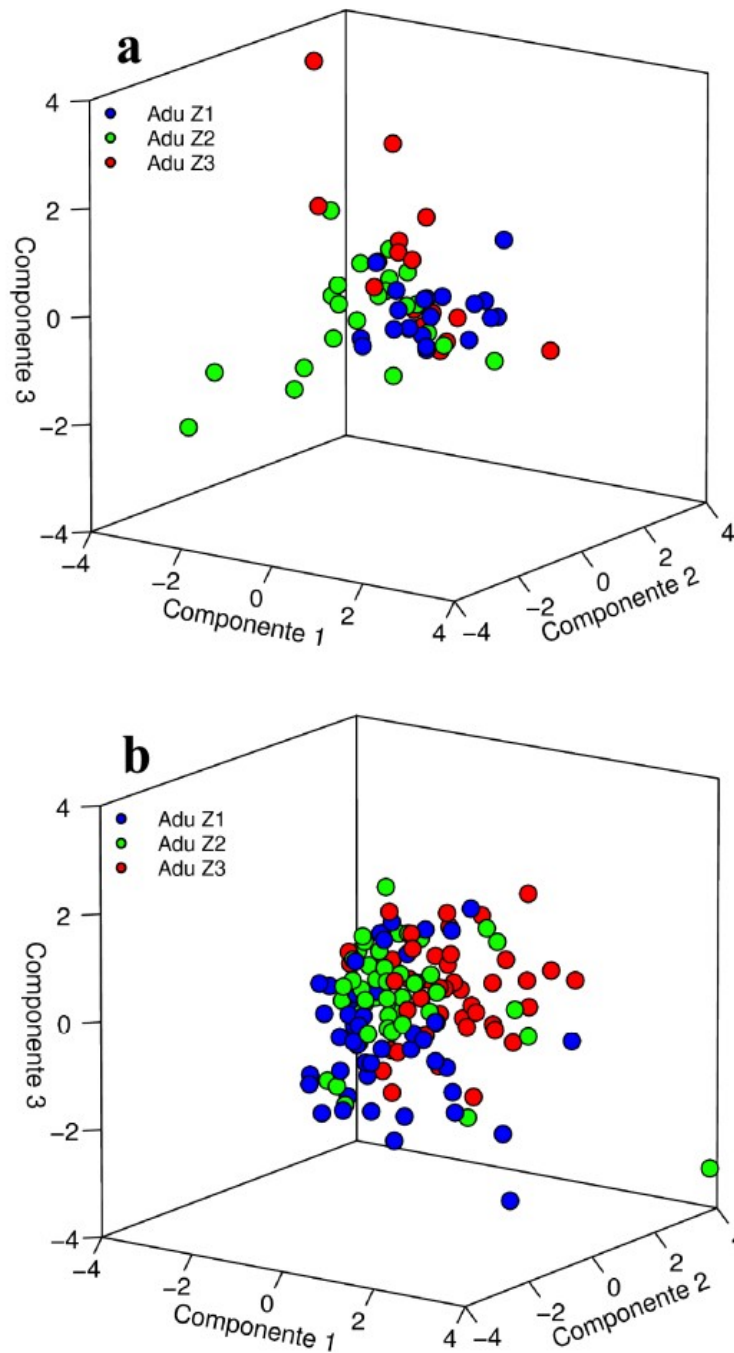


Figura 14: Diagrama de los tres primeros componentes principales de la concentración relativa de ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , y ^{138}Ba en borde de otolitos de peces adultos muestreados en el periodo 2012-2013 (a; 71 % de la varianza explicada) y 2015-2016 (b; 71 % de la varianza explicada). ZI=Arica-Antofagasta, ZII=Atacama-Coquimbo; ZIII=Valparaíso-Los Lagos.

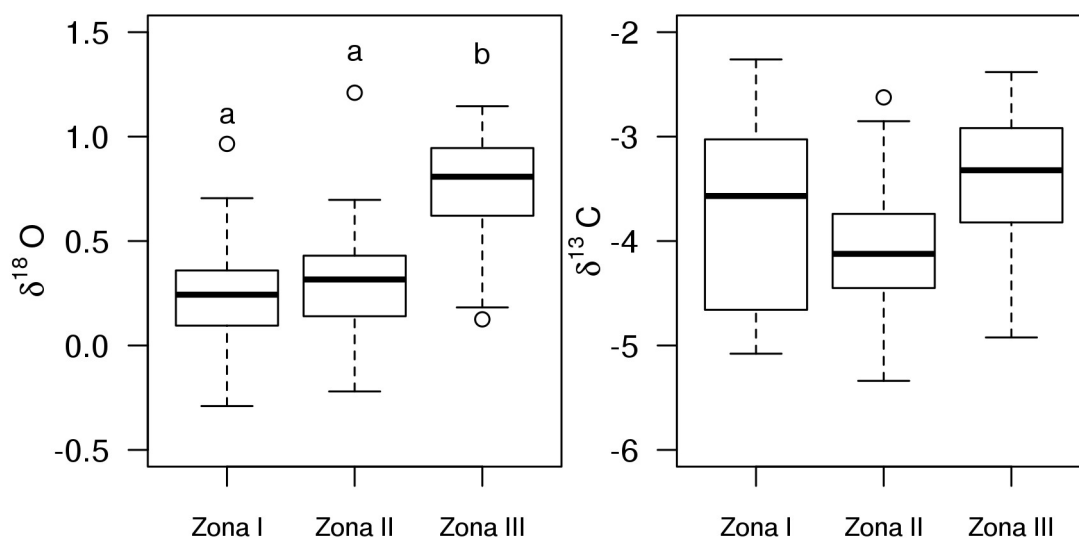


Figura 15: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles. Letras diferentes, indican diferencias significativas entre zonas.

Tabla 13: Media observada y ajustada (\bar{X}) $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en núcleo de otolitos de peces juveniles en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	$\bar{X} \pm \text{DS}$ observada	$\bar{X} \pm \text{EE}$ ajustada	Isótopo
I	0.2 ± 0.25	0.2 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
II	0.3 ± 0.23	0.3 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
III	0.8 ± 0.29	0.8 ± 0.05	$\delta^{18}\text{O}$
I	-3.7 ± 0.85	-3.8 ± 0.19	$\delta^{13}\text{C}$
II	-4.1 ± 0.55	-4.1 ± 0.18	$\delta^{13}\text{C}$
III	-3.4 ± 0.63	-3.4 ± 0.27	$\delta^{13}\text{C}$

Tabla 14: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{18}O) en otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* son explicadas por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos. DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Fuentes	DIC
Modelo nulo (zona común I+II+III)	534.1
Tres Zonas (I, II y III)	515.5
Dos Zonas (I+II y III)	518.6
Dos Zonas (I y II+III)	517.3

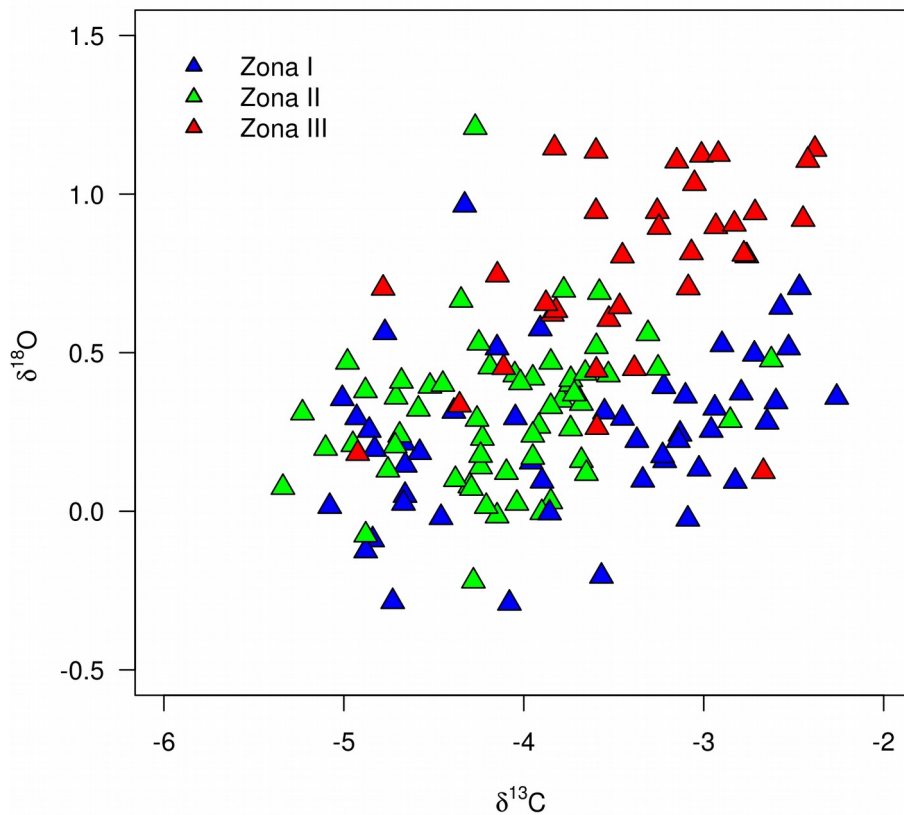


Figura 16: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles de anchoveta *Engraulis ringens*. Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).

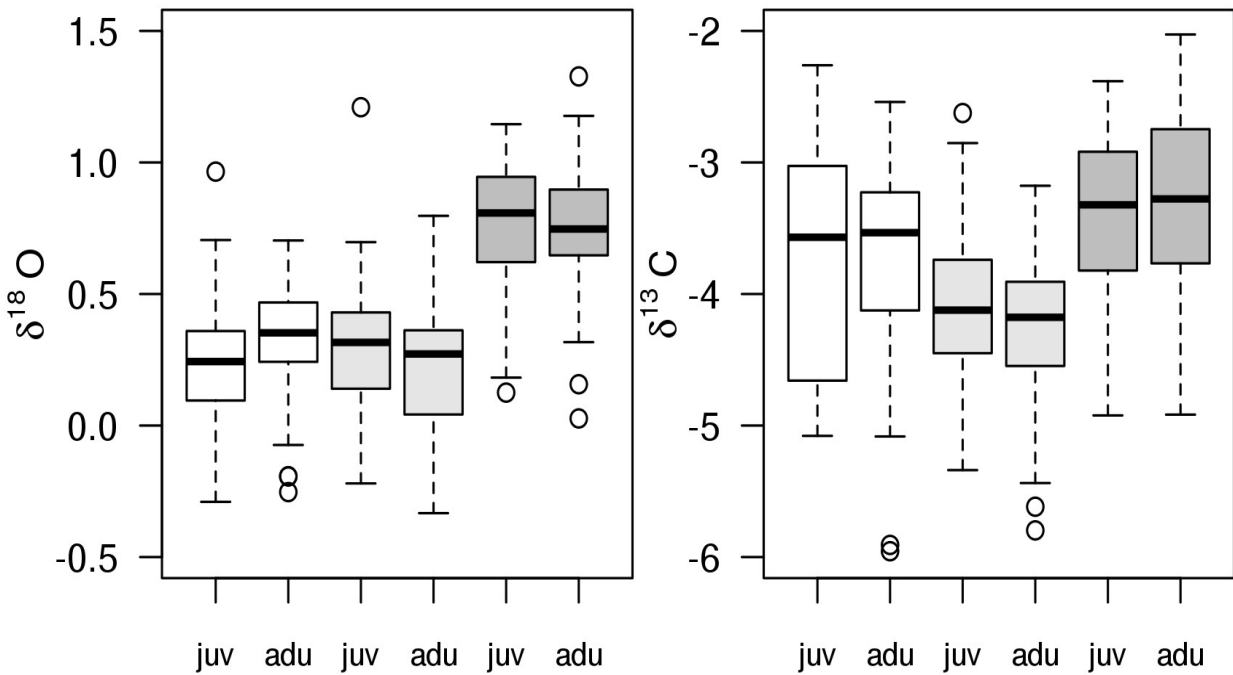


Figura 17: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles (juv) y adultos (adu). Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro)

Tabla 15: Media observada y ajustada (\bar{X}) $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en núcleo de otolitos de peces juveniles y adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	Núcleo otolito	$\bar{X} \pm \text{DS}$ observada	$\bar{X} \pm \text{EE}$ ajustada	Isótopo
I	adulto	0.3±0.20	0.3±0.04	$\delta^{18}\text{O}$
I	juvenil	0.2±0.25	0.3±0.04	$\delta^{18}\text{O}$
II	adulto	0.2±0.24	0.3±0.04	$\delta^{18}\text{O}$
II	juvenil	0.3±0.23	0.3±0.03	$\delta^{18}\text{O}$
III	adulto	0.8±0.26	0.8±0.04	$\delta^{18}\text{O}$
III	juvenil	0.8±0.29	0.8±0.04	$\delta^{18}\text{O}$
I	adulto	-3.7±0.72	-3.8±0.17	$\delta^{13}\text{C}$
I	juvenil	-3.7±0.85	-3.8±0.15	$\delta^{13}\text{C}$
II	adulto	-4.2±0.59	-4.2±0.16	$\delta^{13}\text{C}$
II	juvenil	-4.1±0.55	-4.2±0.14	$\delta^{13}\text{C}$
III	adulto	-3.3±0.72	-3.4±0.17	$\delta^{13}\text{C}$
III	juvenil	-3.4±0.63	-3.4±0.18	$\delta^{13}\text{C}$

Tabla 16: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde la composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$) en la sección nuclear de otolitos de ejemplares juveniles y adultos de anchoveta *Engraulis ringens* (2015-2016) es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras y la etapa de los individuos. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos DIC= Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Hipótesis	DIC
Tres Zonas (I, II, III) y Etapa única (nucleo otolito juvenil + nucleo otolito adulto)	-346.3
Tres Zona separadas (I, II, III) * Etapas separadas (nucleo otolito juvenil y nucleo otolito adulto)	-345.1
Tres Zonas separadas (I, II, III) + Etapas separadas (nucleo otolito juvenil y nucleo otolito adulto)	-345.8

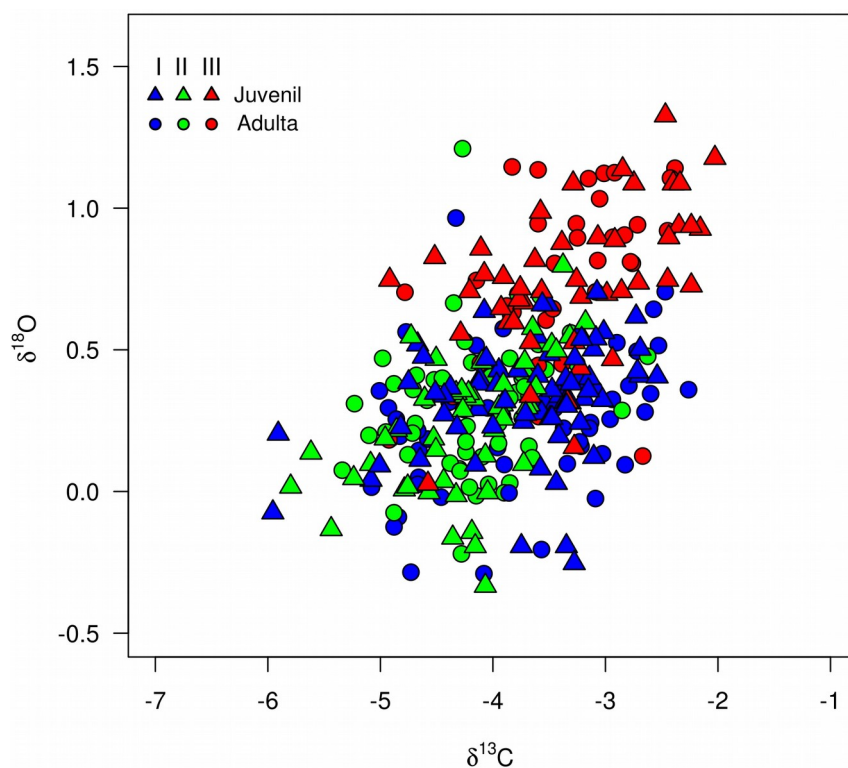


Figura 18: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nucleares de otolitos de ejemplares juveniles (triángulos) y adultos (círculos) de anchoveta *Engraulis ringens*. Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).

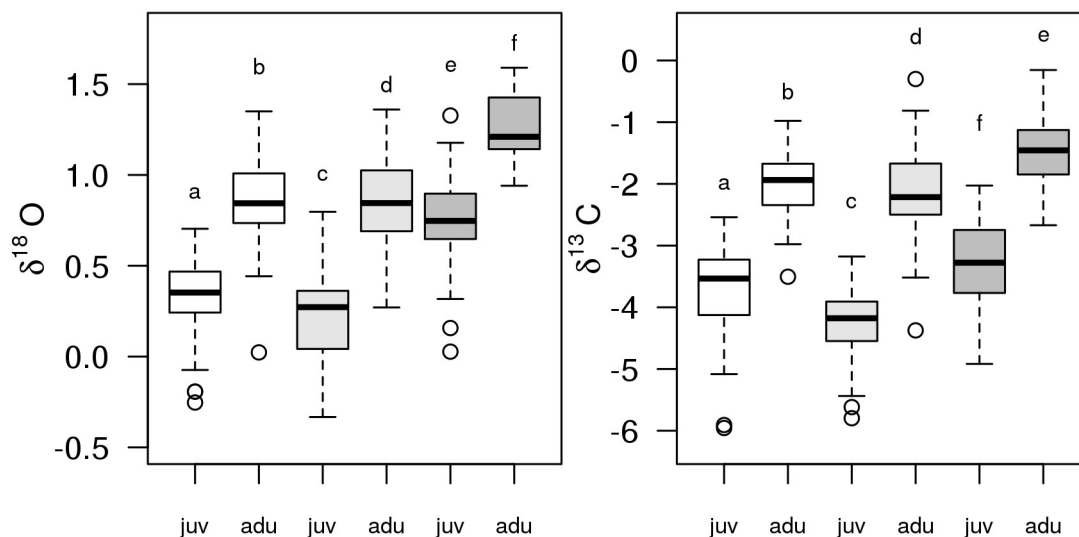


Figura 19: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) por cada zona en el núcleo (juv) y borde (adu) de otolitos de ejemplares adultos. Zona I: Arica-Antofagasta (blanco), Zona II: Atacama-Coquimbo (gris oscuro) y Zona III: Valparaíso-Los Lagos (gris claro)

Tabla 17: Media observada y ajustada (\bar{X}) $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en núcleo (juvenil) y borde (adulto) de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio (período 2015-2016). DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	Fase otolito	$\bar{X}\pm\text{DS}$ observada	$\bar{X}\pm\text{EE}$ ajustada	Isótopo
I	adulto	0.8 ± 0.24	0.8 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
I	juvenil	0.3 ± 0.20	0.3 ± 0.03	$\delta^{18}\text{O}$
II	adulto	0.8 ± 0.24	0.8 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
II	juvenil	0.2 ± 0.24	0.2 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
III	adulto	1.3 ± 0.19	1.3 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
III	juvenil	0.8 ± 0.26	0.7 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
I	adulto	-2.0 ± 0.52	-2.0 ± 0.15	$\delta^{13}\text{C}$
I	juvenil	-3.7 ± 0.72	-3.7 ± 0.14	$\delta^{13}\text{C}$
II	adulto	-2.2 ± 0.73	-2.2 ± 0.13	$\delta^{13}\text{C}$
II	juvenil	-4.2 ± 0.59	-4.3 ± 0.14	$\delta^{13}\text{C}$
III	adulto	-1.5 ± 0.57	-1.6 ± 0.15	$\delta^{13}\text{C}$
III	juvenil	-3.3 ± 0.72	-3.3 ± 0.14	$\delta^{13}\text{C}$

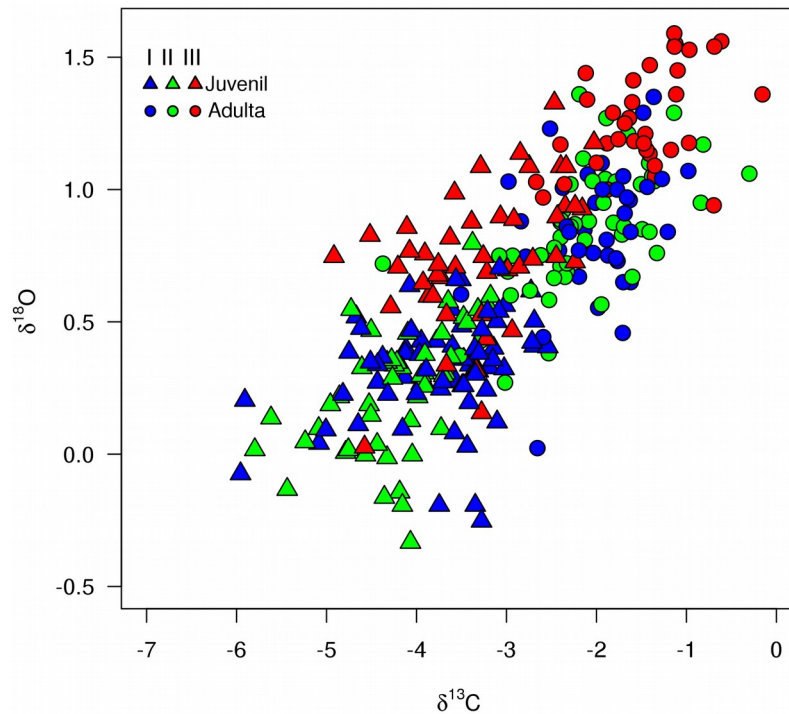


Figura 20: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en secciones nuclear y borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens*, que representan su fase juvenil (triángulos) y adulta (círculos). Colores indican zonas de origen de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).

Tabla 18: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{18}O) en la sección nuclear y borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens* es explicada por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras y/o etapa de vida representada (juvenil y adulta). Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Hipótesis	DIC
Etapas (núcleo de otolito y borde otolito)	716
Zonas (I, II y III)	842
Zonas (I, II y III) * Etapas (núcleo y borde otolito)	732
Zonas (I, I y III) + Etapas (núcleo y borde otolito)	729

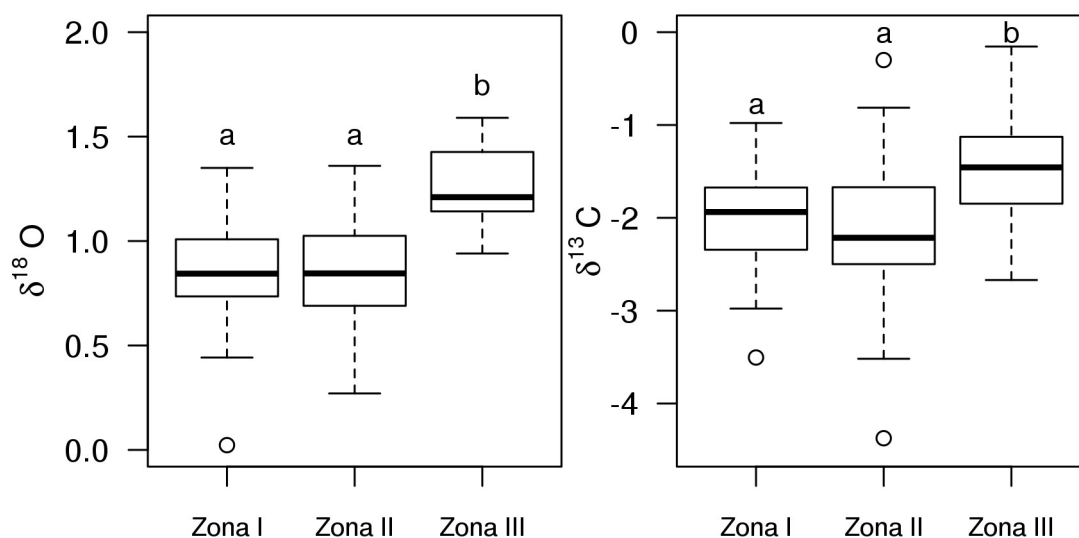


Figura 21: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y ^{13}C (panel derecho) en el borde de otolitos de ejemplares adultos en cada zona de estudio. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos

Tabla 19: Media observada y ajustada (\bar{X}) $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en el borde de otolitos de peces adultos en cada zona de estudio. DS=desviación estándar; EE=error estándar

Zona	$\bar{X} \pm \text{DS}$ observada	$\bar{X} \pm \text{EE}$ ajustada	Isótopo
I	0.8 ± 0.24	0.9 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
II	0.8 ± 0.24	0.8 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
III	1.3 ± 0.19	1.3 ± 0.04	$\delta^{18}\text{O}$
I	-2.0 ± 0.52	-2.0 ± 0.10	$\delta^{13}\text{C}$
II	-2.2 ± 0.73	-2.2 ± 0.09	$\delta^{13}\text{C}$
III	-1.5 ± 0.57	-1.5 ± 0.11	$\delta^{13}\text{C}$

Tabla 20: Comparación de modelos multivariados (GLMM) donde las concentraciones relativas de isótopos estables (^{13}C y ^{18}O) en el borde de otolitos de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* son explicadas por distintas hipótesis sobre la segregación de las zonas de origen de las muestras. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos. DIC=Criterio de Información de Devianza (Hadfield, 2010).

Fuentes	DIC
Modelo nulo (zona común I+II+III)	142.8
Tres Zonas (I, II y III)	138.0
Dos Zonas (I+II y III)	137.6
Dos Zonas (I y II+III)	139.9

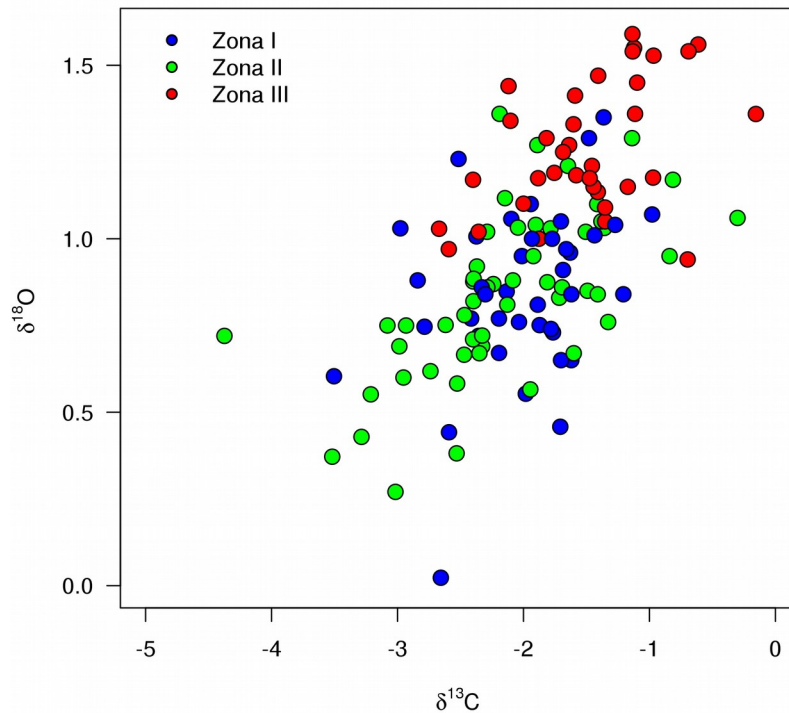


Figura 22: Diagrama bivariado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en borde de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta *Engraulis ringens*. Colores indican zonas de captura de las muestras (Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo y Zona III: Valparaíso-Los Lagos).

1.4. Análisis y discusión de resultados

Los resultados obtenidos permitieron validar la utilización de modelos discriminantes basados en la composición relativa de ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr y ^{138}Ba , para la identificación de origen de individuos de *E. ringens* que hubieron utilizado alguna de las tres zonas de crianza analizadas en el presente proyecto. Los datos obtenidos permitieron definir los vectores de medias y las matrices de varianza-covarianza que definen cada una de estas zonas de crianza y que se utilizaron para la estimación de la contribución (proporciones de mezcla) de cada una de ellas al stock adulto presente en cada una de las zonas de interés (Niklitschek and Darnaude, 2016).

Tanto el análisis de la composición elemental como de la composición isotópica de otolitos de juveniles de *E. ringens* mostraron claras diferencias latitudinales entre las zonas ubicadas hacia el norte (zonas I) y hacia el sur del área de estudio (zona III), las que fueron consistentes entre los dos períodos de tiempo analizados. Se observó también una importante consistencia entre las composiciones elementales y, principalmente, isotópicas en las secciones nucleares de los otolitos de juveniles y adultos, evidenciando cierto grado de movilidad o mezcla entre zonas a lo largo del primer año de vida.

Diferencias significativas en composición elemental e isotópica fueron encontradas entre las secciones nucleares y los bordes de los otolitos de adultos, indicando la existencia de cambios de hábitat dentro de zonas. La disminución de las concentraciones de ^{88}Sr y ^{24}Mg y el aumento de $\delta^{18}\text{O}$ en los bordes de los otolitos de adultos, dentro de cada zona, sugieren el desplazamiento a hábitats más fríos, ya sea por su mayor proximidad a zonas de surgencia y/o a su mayor profundidad que las zonas de crianza.

La composición elemental analizada en el borde de otolitos de peces adultos, entregó evidencia, de cierto grado de mezcla entre zonas en la etapa adulta de *E. ringens*.

En general, el análisis de la composición isotópica y elemental en otolitos (período 2015-2016), entregaron resultados consistentes entre si y las diferencias observadas entre estas, se pueden atribuir a la diferente resolución entregada por cada metodología. Por otro lado, se observaron diferencias entre periodos en la composición elemental en otolitos. Esto puede ser relacionado a la existencia de variación inter-anual de las condiciones ambientales y/o al comportamiento migratorio de la especie.

1.5. Conclusiones

- Se identificaron al menos dos zonas de crianza de anchoveta, dependiendo de la aproximación metodológica y el período de tiempo analizado. Sin perjuicio de lo anterior, ambas aproximaciones mostraron existencia de segregación entre la Zona I y III.
- Se encontró evidencia de migraciones de individuos adultos desde su zona de crianza. El análisis de la sección nuclear entre peces juveniles y adultos, y el análisis del borde de los otolitos de peces adultos, mostró cierto grado de movilidad o mezcla entre zonas. En términos generales, esto fue consistente entre las dos aproximaciones metodológicas y periodos de tiempo analizados.
- Anchoveta, presentaría un cambio de hábitats entre su fase juvenil y adulta. El aumento de la concentración relativa de ^{18}O y Sr^{88} , en la fase adulta, sugiere que en esta etapa, los peces habitarían en aguas mas frías que en su fase juvenil. Esto estaría relacionado a una migración batimétrica en la columna de agua, o a migraciones tróficas a zonas de surgencia.

2. Composición de la fauna parasitaria de *E. ringens*

Marcelo E. Oliva, Juan Espíndola

Instituto de Ciencias Naturales Alexander von Humboldt, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta.

2.1. Antecedentes

Desde el trabajo pionero de Herrington et al (1939), los parásitos han sido exitosamente utilizados como marcas biológicas en estudios poblacionales, no sólo de peces marinos sino también en moluscos, crustáceos e incluso cetáceos, ver referencias en Oliva & Sánchez, (2005). Bajo una perspectiva eminentemente pesquera, los parásitos han demostrado su utilidad como marcas biológicas que han permitido entender no sólo movimientos migratorios y estructura poblacional, sino también discriminar el hábitat ocupado por peces (Oliva et al. 2004).

Como ha sido indicado por MacKenzie & Abaunza (2005), los principios básicos que gobiernan el uso de parásitos (tanto metazoos como protistas) como marcas biológicas indican que un pez se infecta con una especie particular de parásito sólo cuando el pez (huésped) está en el área endémica de tal especie de parásito. La asociación huésped-parásito implica la existencia de dos tipos de parásitos, aquellos altamente específicos que a su vez representan un sistema que ha co-evolucionado y parásitos generalistas, los que están fuertemente asociados con procesos ecológicos más que evolutivos. En el primer caso tenemos una asociación en un escenario evolutivo que dará importantes pistas acerca de la estructura poblacional; en el segundo caso se obtendrá información referida a movimientos migratorios. Otra aproximación implica que si peces infectados se encuentran fuera del área endémica del parásito, podremos inferir que ese pez ha estado en algún momento de su historia de vida en tal área endémica (MacKenzie & Abaunza 2005). Esta aproximación exige conocer la extensión exacta de esa especie de parásito, un problema no fácil de resolver. En todo caso, dos postulados zoogeográficos refuerzan el uso de parásitos como marcas biológicas: las primeras reglas biológicas de Ihering (1891) que indican que los animales acarrean a sus parásitos durante sus migraciones, y los postulados de Noble & Noble (1982) que indican que cuando una población se separa en dos o más grupos, entonces la fauna de parásitos de cada nuevo grupo tenderá a una divergencia .

El uso de parásitos como marcas biológicas requiere que se cumplan ciertos criterios bien descritos por Mackenzie y Abanzua (2005), que son aceptados en su totalidad, pero no es necesario que se cumplan simultáneamente:

- a) El parásito debe ser común en una población y raro o estar ausente en otra.

- b)** Debe tener, preferentemente, un ciclo de vida directo, infectando un solo huésped en su ciclo vital.
- c)** La infección debe ser de relativamente larga duración y cubrir al menos la escala de tiempo del estudio.
- d)** La incidencia (prevalencia) de infección debe permanecer relativamente constante.
- e)** Las condiciones ambientales a través de toda el área de estudio deben corresponder con los límites de tolerancia del parásito.
- f)** No se deben considerar ectoparásitos que sean fácilmente desprendible o que no dejen evidencias de su presencia, ya que pueden perderse en la captura o durante la manipulación.
- g)** El método de examen debe considerar un mínimo de disección y preferiblemente un alto nivel de especificidad por un hábitat definido.
- h)** El parásito debe ser fácilmente detectable e identificable.
- i)** El parásito no debe tener marcados efectos patológicos, ya que de lo contrario originará mortalidades selectivas o cambios conductuales en el huésped, afectando su valor como marcador.

Los parásitos han sido exitosamente utilizados en la identificación de la estructura poblacional en peces de importancia comercial de Chile, como merluza *Merluccius gayi* (George-Nascimento 1996, Oliva & Ballón 2002), *Merluccius australis* (González & Carvajal 1994), cascajo o cabrilla española *Sebastes capensis* (Oliva & González 2004), anchoveta *Engraulis ringens* (Valdivia et al. 2007, George-Nascimento & Moscoso 2013), merluza de cola *Macruronus magellanicus* (Oliva 2001), reineta *Brama australis* (Oliva et al. 2016) y jurel *Trachurus murphyi* (George-Nascimento 2000), entre otros. George-Nascimento & Oliva (2015) revisan el uso de parásitos en estudios poblacionales en peces del Pacífico sur-este.

Desde un punto de vista administrativo, el recurso anchoveta en Chile se considera conformado por tres unidades de pesquería: una entre las regiones XV-II, otra entre las regiones III-IV y entre las regiones V-X. Sin embargo, la independencia funcional de estas tres unidades de pesquería no ha sido comprobada, pese a que Valdivia et al. (2007) basándose en muestras de *E. ringens* obtenidas desde 7 localidades en las costas de Chile (Arica a Talcahuano) concluyen, por medio de evidencia parasitológica, la existencia de dos stocks, un stock norte (Arica a Coquimbo) asociado a la presencia de dos ectoparásitos: el copépodo *Caligus* sp. y el monogeneo *Pseudanthocotyloides* sp., parásitos ausentes en las localidades más australes (Valparaíso - Talcahuano). Posteriormente, George-

Nascimento y Moscoso (2013) analizan muestras de *E. ringens* provenientes de Caldera, Talcahuano y Valdivia, ampliando la cobertura geográfica de Valdivia et al (2007) y llegando a la misma conclusión en términos de la existencia de dos stocks. Las conclusiones de George-Nascimento & Moscoso (2013) se basan en la presencia de los mismos dos ectoparásitos tipificados por Valdivia et al. (2007) sólo en la zona norte. Adicionalmente detectan digeneos (adultos y metacercarias) en las muestras australes (Talcahuano y Valdivia) y ausentes en Caldera, siendo esta una evidencia adicional de la existencia de dos stocks de *E. ringens* en las costas de Chile. Si bien ambos autores concluyen la existencia de dos stocks, no presentan evidencia de algún grado de mezcla entre el norte y el sur, en la potencial zona de mezcla (III-IV regiones).

Los parásitos, además de ser utilizados como marcas biológicas en estudios poblacionales, han sido tentativamente usados para evaluar grados de mezcla entre poblaciones (stocks) de atunes, al menos en el “Atlantic bluefin tuna” *Thunnus thynnus* (Brunenmeister 1980, Walters 1980) quienes sugieren grados de mezcla, basados en ectoparásitos, cercanos al 15%. La existencia de parásitos propios de *E. ringens* tanto del norte como del sur de su distribución, permiten evaluar un potencial grado de mezcla en la zona intermedia de distribución (III - IV Regiones).

2.2. Metodología de trabajo

En el análisis parasitológico de anchoveta se asumió independencia de las observaciones, sin considerar la correlación existente entre muestras provenientes de un mismo lance. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo indicado por Valdivia et al. (2007). Cada ejemplar fue fijado en etanol 95% en bolsas individuales y se trasladaron al laboratorio para análisis de parásitos metazoos (ecto y endoparásitos). En total se analizaron 1109 muestras de *E. ringens*, 444 ejemplares juveniles (202, 184 y 58 de las Zonas I, II y III, respectivamente) y 665 ejemplares adultos (148, 192 y 325 de las Zonas I, II y III, respectivamente). Los parásitos fueron registrados por especie y número de especímenes en cada pez.

Las muestras de juveniles fueron contrastadas con ejemplares adultos (> 12.0 cm de LT), para identificar parásitos propios de adultos. Es de esperar que juveniles no presenten parásitos propios de adultos, los que se adquieren sólo cuando los juveniles reclutan al stock reproductivo y en consecuencia quedan expuestos a ser parasitados, particularmente por ectoparásitos de ciclo de vida directo. El tamaño muestral definido fue superior a lo recomendado por Poulin & Kamiya (2015, n mínimo =50), lo que aseguró, con una confianza superior al 95%, que se obtuvieron parásitos con prevalencia igual o superior al 5%. Para cada especie de parásito, se determinó prevalencia e intensidad de infección de acuerdo a Bush et al. (1997)

Prevalencia de Infección (PI), se define como el número de peces infectados con una especie particular de parásito dividido por el número total de peces examinados, expresado como porcentaje.

Intensidad Media de Infección (IM), se define como el número total de parásitos de un taxón en particular, dividido por el número de *peces infectados* con ese taxón en particular. Otro parámetro de uso común es la *Abundancia (A)*, que es el número de individuos parásitos de un taxón particular, dividido por el número total de peces estudiados (Bush et al. 1997). En todo caso, estos tres parámetros están relacionados según:

$$A = IM * PI \text{ (expresada como proporción)}$$

Entonces, conociendo PI y otro de los restantes parámetros, es posible estimar el tercero.

El análisis estadísticos siguen a Zar (1999) usando el utilitario SYSTAT (Wilkinson 1990) como herramientas estadísticas. Los resultados de peces adultos analizados, se presentan en función de muestras comprometidas (80 por cada zona), y muestras adicionales analizadas (Zona I: 68 , Zona II: 112 y Zona III: 245)

2.3. Resultados

i. Muestra de Peces

Se analizó un total de 1109 especímenes de anchoveta, provenientes de las tres zonas definidas en el marco de este Proyecto. De ellos 665 correspondieron a ejemplares adultos y 444 a juveniles (menores a 12.5 cm. según Canales & Leal (2009). La Tabla 21 indica las características de la muestra de adultos analizadas.

Tabla 21: Características de la muestra total analizada. DE = Desviación Estándar, n= tamaño muestral.

Zona	Promedio	Rango	DE	n
Zona I	12.99	11.5 - 14.8	0.676	148
Zona II	13.87	11.5 - 15.7	0.796	192
Zona III	14.41	9.80 - 18.4	1.899	325

El análisis de varianza mostró que la talla media fue significativamente diferente entre zonas ($F_{2,662}=58,83$, $p < 0.001$), mientras que el análisis *a posteriori* (Tukey) diferencias paradas significativas ($p < 0.001$) entre todas ellas.

La fauna de parásitos fue cualitativamente y cuantitativamente pobre, e incluyó cinco especies en la totalidad de las muestras (n= 1109). La muestra de ejemplares juveniles resultó negativa para parásitos. Los parásitos encontrados en ejemplares adultos corresponden a los ectoparásitos *Livoneca* sp. (Isopoda), y *Pseudanthocotyloides heterocotyle* (Monogenea) y los endoparásitos *Anisakis* sp. (Nematoda), un Acantocephala no identificado y un ejemplar del cestodo *Clestobothrium crassiceps* en una anchoveta proveniente de la Zona II (Tabla 22).

Para la muestra de adultos, la prueba “G” de bondad de ajuste logarítmico indicó que la prevalencia de infección para *Anisakis* sp. (Tabla 22) es significativamente mayor en la Zona III que en las Zonas I y II ($G = 196,6$, $gl = 2$, $p < 0.001$). La prueba H de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en intensidad entre las zonas en que se encontró *Anisakis* sp. ($H_c = 4,41$, $p > 0.1$, $gl = 2$).

Tabla 22: Prevalencia de infección (Prev) e Intensidad media de infección (IM) para los parásitos encontrados en las tres zonas analizadas.

Taxon	Zona I		Zona II		Zona III	
	Prev	IM	Prev	IM	Prev	IM
<i>Livoneca</i> sp	0,0	0,0	28,6	1,1	0,3	1,0
<i>P. heterocotyle</i>	0,7	1,0	0,0	0,0	0,3	1,0
<i>C. crassiceps</i>	0,0	0,0	0,5	1,0	0,0	0,0
<i>Acanthocephala</i> gen. sp.	0,0	0,0	0,5	1,0	0,9	1,0
<i>Anisakis</i> sp.	1,4	1,0	2,6	1,4	44,0	2,0

El análisis multivariado de discriminación múltiple para las muestras comprometidas, indicó una alta proporción de asignación correcta para la Zona I (98%) y Zona III (44.0%) (Tabla 23), siendo significativa (Aproximación $F_{6,47} = 351,57$; $p < 0.001$). Sin embargo, el valor del estadístico Wilk’s Lambda fue alto (0.675) y si bien el estadístico indica significancia en la asignación de grupos, Wilk’s Lambda tiende a 1 cuando la asignación correcta tiende a cero. Por otro lado, mientras que de acuerdo a Poulin y Kamiya (2015) se esperan niveles de asignación correcta sobre el 70%, este nivel llegó sólo al 51.7% dada la muy baja asignación correcta a la Zona II (29.2%). En todo caso, la probabilidad de asignación correcta dada por el azar alcanza a 37.2%, valor inferior a los niveles de asignación correcta dados por el análisis para la Zona I y Zona III (Tabla 23).

Tabla 23: Matriz de asignación correcta, basada en Intensidad de Infección para las tres zonas consideradas

Zona	Zona I	Zona II	Zona III	Porcentaje asignación correcta
Zona I	145	1	2	98 %
Zona II	130	56	6	29.2 %
Zona III	180	2	1430	44 %
Total				51.7 %

2.4. Análisis y discusión de resultados

La fauna de parásitos metazoos encontrada fue cualitativa y cuantitativamente pobre, con valores menores a los registrados previamente para esta especie. Así Valdivia et al. (2007), en una muestra total de 359 ejemplares obtenidos desde seis localidades, indicó un total de seis especies de parásitos, con una prevalencia global de 25.7% y una intensidad media de 0.33 parásitos por pez. Siendo similar, a los encontrado en este estudio, donde se observó una prevalencia global de 25.4% y una media de 0.46 parásitos por pez para una muestra total de 665 especímenes (excluido juveniles). George-Nascimento y Moscoso (2013) indicaron una prevalencia global de 68.7% para una muestra de 221 ejemplares obtenidos en tres localidades, con una abundancia promedio global de 4.34 parásitos por pez (reconstruido desde Tablas 1 y 2 de George-Nascimento & Moscoso 2013). Los valores observados para *Engraulis ringens* contrastan fuertemente con aquellos observados para *Engraulis anchoita* en Argentina, donde la prevalencia de infección llega al 98.9% y la abundancia global supera los 45 individuos por pez (Timi 2003).

Una potencial explicación para la pobre fauna de parásitos de anchoveta, puede estar dada por los niveles de explotación de este recurso. De acuerdo con el informe de estado de las principales pesquerías en Chile (Subpesca 2016), *E. ringens* se encuentra en estado de sobreexplotación. Al respecto, Wood et al. (2010) indican que debido a la remoción de peces por pesca, se reduce la densidad de las poblaciones, implicando una reducción de la eficiencia de transmisión de parásitos con ciclo de vida directo. Por otro lado, la pesca reduce la complejidad de las tramas tróficas, con un impacto directo en parásitos tróficamente transmitidos.

Las bajas prevalencias y abundancias ahora encontradas, generan matrices con exceso de valores cero, lo que dificulta la interpretación de los resultados. La matriz de asignación

correcta indica un 98% de asignación correcta para peces de la Zona I. De existir algún grado de mezcla (evaluado por asignación cruzada) esta debe evaluarse en función de la prevalencia de *Anisakis* sp., especie presente en las tres zonas y con un claro gradiente latitudinal, con altos valores en la Zona III disminuyendo fuertemente a las Zonas II y III. Al respecto, *Anisakis* sp. ha sido considerado un buen indicador, ya que al ser un parásito que se enquistaba en el hospedador intermediario, no hay posibilidades de pérdida. Una vez que infecta un pez, la expectativa de vida de esta larva es igual a la expectativa de vida del hospedador (Oliva 2013). Al respecto, la presencia de este parásito en muestras de *Strangomera bentincki* obtenidos desde la zona central y sur de Chile, sugiere la existencia de dos stocks para ese recurso (Oliva 2013), con ausencia de movimiento de peces del sur hacia el norte, pero sin descartar la migración de peces del norte hacia el sur. El potencial aporte de la Zona III a la Zona II puede estimarse en base a las fuertes diferencias en prevalencia de infección; considerando que la abundancia de *Anisakis* sp. entre la Zona III y Zona II no difiere significativamente, se puede inferir que, de haber aporte del sur al centro, la carga parasitaria por pez no incrementa y mantiene su valor de origen. En consecuencia se podría esperar un aporte o grado de mezcla del $1.14\% \pm 0.013$, estimado como la proporción de prevalencia de infección en la Zona II (2.6%) en función de la prevalencia de infección en la Zona III (44.0%). Por otro lado, y aceptando que *Anisakis* sp. es un parásito propio de la Zona III, su presencia en la Zona I puede ser consecuencia de un aporte desde la Zona II y siguiendo el mismo análisis se puede estimar ese aporte en un $0.036\% \pm 0.011$. Al respecto, la información aportada por George-Nascimento y Moscoso (2013) indican también prevalencias de infección para este parásito, mayor en la zona sur (Valdivia) que en las localidades más al norte (Talcahuano y Caldera).

2.5. Conclusiones

Debido a las características cualitativas y cuantitativas de las muestras analizadas, se aconseja considerar con la debida prudencia los resultados del componente parasitológico.

- La fauna de parásitos ahora analizada, resulta pobre en términos cualitativos y cuantitativos.
- El efecto de la pesca (sobreexplotación) ha sido considerado como una fuerza importante que puede alterar la estructura de las comunidades parasitarias, disminuyendo sus atributos poblacionales.

- Se sugiere la existencia de dos stock de anchovetas: un stock sur caracterizado por una alta prevalencia de *Anisakis sp.* y un stock norte con bajos valores de prevalencia de este parásito, lo que es concordante con lo indicado por Valdivia et al. (2007).
- Especies consideradas como buenos indicadores de stock en trabajos previos, como el monogeneo *P. heterocotyle* presentó una baja abundancia (un sólo espécimen en la Zona I) o como en el caso del copépodo *Caligus sp.* que no estuvo presente en las muestras analizadas.

3. Análisis de la microestructura de otolitos (AMO)

Guido Plaza, Alejandra Hernández, Jorge Contreras, Camilo Rodríguez

Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

3.1. Antecedentes

Los anillos de crecimiento diario o micro-incrementos (Pannella 1971), son generalmente visibles a través de un microscopio durante el primer año de vida del pez, debido a que su crecimiento es mayor durante dicho período. Los incrementos diarios (Figura 23.1) son formados por la sucesiva deposición de una capa rica en carbonato de calcio y de una capa rica en proteína pero de baja concentración en carbonato de calcio. Ambas capas son denominadas zonas L y D (Figura 23.2), apareciendo como una zona clara y oscura bajo luz transmitida, respectivamente. Panella (1971) fue quien descubrió estas estructuras y fue el primero en sugerir que su frecuencia de producción era diaria. El grosor de los incrementos primarios puede fluctuar desde menos de 1 μm hasta acerca de 15 μm o más. El grosor de la zona "L" es de alrededor de 1 μm , mientras que el grosor de la zona "D" puede ser más variable. Sin embargo, debido a que el crecimiento del otolito no es uniforme, el grosor de los incrementos primarios dependerá del radio a través del cual el incremento es medido. Los otolitos se desarrollan de una o más estructuras parcialmente calcificadas denominada "primordium" (Figura 23.3; P), formado en el oído interno (Mann et al. 1983). Este centro de crecimiento puede ser circular, elongado o múltiple, dependiendo de la especie. En el caso de primordium múltiples éstos se fusionan para formar el centro del otolito. La MO no sólo registra edad y crecimiento, sino también patrones de movimientos, y/o interacción de hábitat (e.g., patrones de asentamiento) que son registrados a diferentes escalas temporales (Victor 1982, Sponaugle & Cowen 1994, Hamer & Jenkins 1997).

Este potencial también se puede extender a la identificación de unidades demográficas discretas, asociadas a la fidelidad de los individuos por zonas de desove y/o crianza características. Parte de esta información vinculada al origen es registrada en la micro-estructura de sus otolitos durante su desarrollo larval o juvenil temprano. El principio de esta aproximación es simple: El crecimiento somático durante los estadios tempranos de peces teleósteos es principalmente afectado por dos controladores, la temperatura y la productividad. Si uno de estos factores y/o ambos varían entre una zona y otra, es razonable esperar variaciones sustantivas en las tasas de crecimiento diarias de los individuos que en dichas zonas ocurren. Es importante destacar que hasta la fecha varios estudios han considerado la MO con propósitos de identificación de stock (Neilson et al. 1985, Stenevik et al.

1996, Husebø et al. 2005, Brophy et al. 2006, Volkoff & Titus 2007). Más aun, recientemente un estudio ha demostrado la utilidad de la micro-estructura para identificar stock en una escala estacional para separar arenques del atlántico (*Clupea harengus*) que desovan en diferentes estaciones del año (Clausen et al. 2007)). Resultados similares han sido reportados para el arenque *Etrumeus teres* (Plaza et al. 2006).

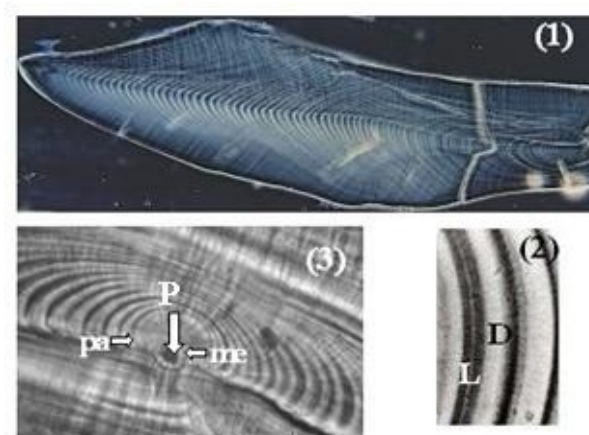


Figura 23: Ilustración de micro-incrementos en otolitos de peces teleósteos. (1) Vista general de otolito pulido; (2) Incrementos diarios; (3) zona del primordio (P).

Es importante destacar que para el caso particular de *E. ringens* la MO puede tornarse en un marcador natural de poblaciones demográficas discretas que pueden mantenerse por fidelidad a sus sitios de desove. En este sentido es importante destacar los resultados obtenidos en crecimiento diario para esta especie en los proyectos FIP 2009-16 y FIP 2013-19, donde se han reportado diferencias notables tanto en las tasas de crecimiento como el perfil de grosor de los micro-incrementos en ejemplares de la zona norte y centro sur de Chile. Para el caso de la zona centro sur, se reportó una tasa de crecimiento global (TCG) de $0,72 \pm 0,18 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ para la cohorte de invierno; $0,52 \pm 0,06 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ para la cohorte de verano y $0,59 \pm 0,15 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ para ambas cohortes combinadas para el año 2013. Estas tasas de crecimiento fueron más bajas, alrededor de la mitad, que las reportadas para este mismo recurso en la zona norte donde los valores de TCG fluctuaron entre $0,84$ y $1,2 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ (Cerna et al. 2011). Esto se confirma al comparar los ajustes de crecimiento talla-edad actual, como también el patrón de resolución y grosor de los micro-incrementos, estimados por los mismos autores, para la zona norte (Figura 24A). En esta zona para un rango de edad entre 1 y 60 días el grosor medio fue de $14 \mu\text{m}$ llegando a presentar un valor máximo de $21 \mu\text{m}$, entre los 30 y 50 días que es el periodo de máximo crecimiento,. Estos resultados contrastan con estimaciones realizadas para la zona centro-sur, donde el grosor medio fue $8,0$ y $5,5 \mu\text{m}$ para la cohorte de

invierno y verano, respectivamente, con un máximo, en ambas cohortes combinadas, que no superó los 9 μm , para un periodo de máximo crecimiento entre los 90 y 130 días (Figura 24B).

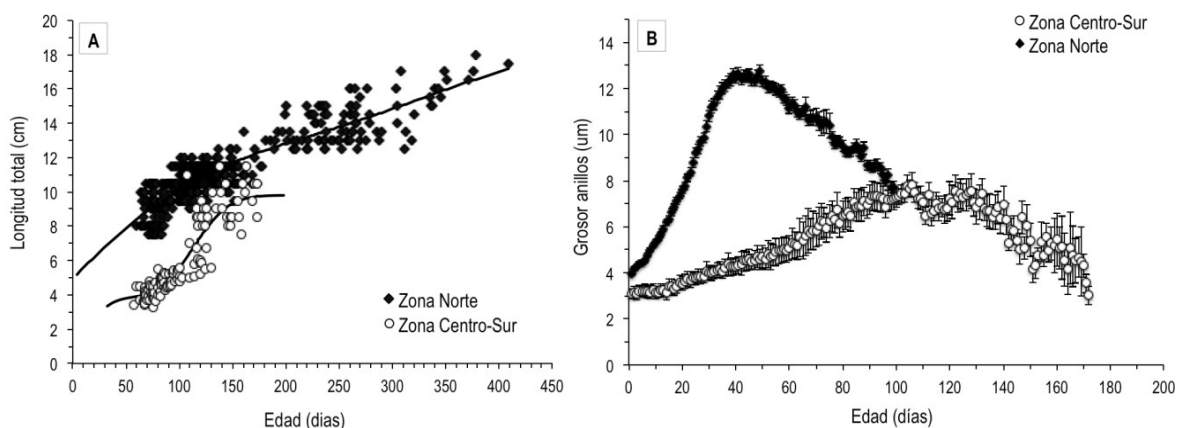


Figura 24: Comparación del crecimiento de *E. ringens* entre la zona centro-sur y la zona norte a través del ajuste del crecimiento estacional (A) y el perfil de grosor de los micro-incrementos diarios (B).

Las diferencias encontrada en las tasas de crecimiento y patrón de la micro-estructura de los otolitos de *E. ringens* de la zona norte y centro-sur de Chile, son promisorias para su uso como marcadores naturales de unidades demográficas discretas adaptadas a condiciones ambientales propias, una vez que se comparen en un mismo periodo de estudio, para descartar alguna potencial influencia interanual. Esta inferencia se sustenta en el hecho de que las principales variables que controlan el crecimiento en los estadios tempranos de peces son la temperatura (Miller et al. 1988, Houde & Zastrow 1993) y disponibilidad de alimento (Shepherd & Cushing 1980, Jenkins 1987), ambas presentan una marcada diferencia a lo largo de la costa de Chile, donde se distribuye este recurso.

3.2. Metodología de trabajo

El otolito izquierdo fue cuidadosamente limpiado de tejido residual y fotografiado para análisis morfométrico en el Laboratorio de Edad y Crecimiento del Instituto de Fomento Pesquero (ver sección correspondiente). Posteriormente cada otolito fue derivado al Laboratorio de Esclerocronología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, donde se prepararon para análisis micro-estructural.

Los otolitos sagitales izquierdo de ejemplares < 5 cm de LT fueron embebidos con la cara proximal hacia abajo en portaobjetos, utilizando una pequeña porción de Crystalbond transparente. Posteriormente la cara distal fue pulida ligeramente con lijas de 3 μm de tamaño de grano, hasta visualizar con claridad el primordio. Los ejemplares de entre 6 y 13 cm fueron procesados siguiendo

el método SGEM descrito por Plaza *et al.* (2005). Los otolitos fueron montados en resina epóxica en portaobjetos y pulidos por ambas caras hasta lograr una resolución adecuada del primordio utilizando lijas entre 800-1000 μm de tamaño de grano. Este procedimiento ya ha sido adecuadamente desarrollado para la especie *E. ringens* en el proyecto FIP 2009-16, donde se determinó que un doble pulido sagital es el más adecuado para la identificación de los micro-incrementos en juveniles menores a 12 cm en esta especie (Figura 25).

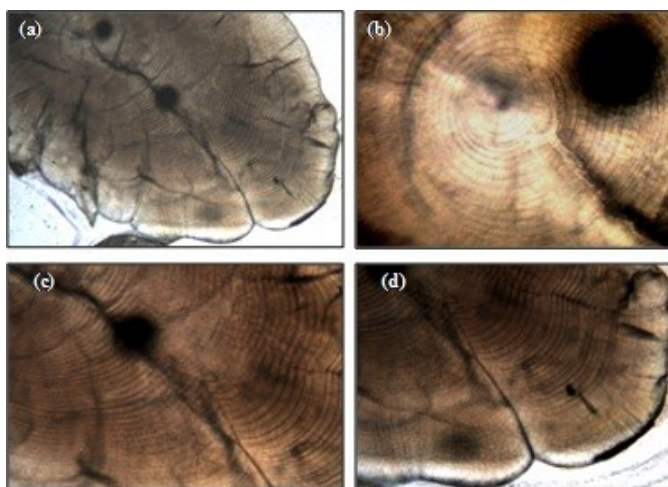


Figura 25: Fotografías bajo luz transmitida de otolitos pulidos en posición sagital de un juvenil de *E. ringens* de 10 cm de LT. (a) A:10X; (b) Zona del primordio A:400X; (c) Zona media A:200X; (d) Borde del otolito A:200X.

Los otolitos preparados fueron digitalizados utilizando dos sistemas de análisis de imágenes, uno compuesto por un microscopio LEICA DM 1000 LED, una cámara digital CMO de 3.2 megapíxeles (MP) y el programa computacional de captura LAS 3.2 (Leica Application Suite). El otro sistema estuvo compuesto por un microscopio DG LAB, cámara digital TCA 5 MP. Ambos sistemas fueron debidamente calibrados para efectuar mediciones a 0,01 μm de precisión.

En primera instancia se digitalizaron los otolitos a magnificaciones menores (4-10X) para obtener una imagen completa que permitiese obtener mediciones precisas del largo total del otolito (LT: antero-posterior), radio caudal (RC), radio rostral (RR), radio dorsal (RD) y radio ventral (RV). Posteriormente los otolitos fueron digitalizados a magnificaciones de 400X para la medición de los grosores y radios a cada edad. En la mayoría de los casos varias imágenes fueron necesarias para lograr una secuencia completa de micro-incrementos desde el primordio hasta el borde del otolito, por lo que previo a la lectura las imágenes de las distintas áreas del otolito, obtenidas a 400X de magnificación, fueron debidamente ensambladas. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando la herramienta "Caliper" del programa IMAGE-pro-plus. Esta misma herramienta fue también

utilizada para la obtención de medidas morfométricas de tamaño del otolito a nivel micro-estructural.

La preparación de los otolitos de peces adultos para análisis micro-estructural siguió los mismos procedimientos de montaje y pulido descritos para juveniles de mayor tamaño, donde un doble pulido en posición sagital fue suficiente para revelar los micro-incrementos diarios con confiabilidad. La medición de grosores de los micro-incrementos se realizó utilizando el Análisis de Imágenes “Otolith Reading System (RATOC Ltd), que permitió medirlos en imágenes en vivo. Para ellos se dibujó una transecta desde el primordio hasta el borde de la cauda utilizando el objetivo 4X, a través de la cual se midieron los micro-incrementos (Figura 26). La medición de los micro-incrementos se realizó a mayor magnificación registrándose la mayor cantidad posible de anillos visibles. Posteriormente se marcó el borde del cauda para conseguir el radio máximo hacia esa dirección del otolito. Cuando los micro-incrementos fueron difíciles de identificar en la transecta principal, se generaron subtransectas, donde los registros de micro-incrementos fueron traspasados automáticamente a la transecta mayor (Figura 26). En total se analizaron 514 otolitos, de los cuales 202 provinieron de ejemplares juveniles y 117 adultos del periodo 2015-2016. Del periodo 2012-2013 se analizaron 195 otolitos de ejemplares juveniles.

3.2.1. Variables discriminantes

Se debe subrayar que el análisis de la MO de los juveniles en las zonas analizadas permite obtener información con propósitos de clasificación. Esta información cuantificable como variables discriminatorias independientes para cada individuo juvenil, es la que debe estar registrada también en la micro-estructura de otolitos de ejemplares adultos. A continuación se describen aspectos metodológicos asociados a las variables discriminantes, consideradas en el presente informe.

i. Grosor y radio a cada día

Se debe destacar que durante el periodo larval y juvenil temprano, los ejemplares permanezcan retenidos en la zona de desove y/o crianza y por consiguiente se presume que el grosor y el radio registrado a cada edad proveniente de estos ejemplares, posean un elevado potencial discriminatorio. Tanto el grosor como el radio fueron utilizados como indicadores de la tasa de crecimiento somático y tamaño del ejemplar respectivamente. Para verificar si existieron diferencias significativas en el radio y grosor medio se llevó a cabo un análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) con un diseño balanceado, donde los ejemplares de cada zona se distribuyeron en filas y las repeticiones de las variables de interés (transformadas a

logaritmo natural) fueron distribuidas en columnas. Para reducir la cantidad de repeticiones se efectuó la comparación cada 5 días, para dos set de datos balanceados. Posteriormente los radios y grosores fueron usados como variables independientes en un Análisis Discriminante Lineal (ADL). Para reducir el número de variables y evitar sobre-parametrización se utilizaron los radios registrados cada 5 y/o 10 días y los grosores promedios, medidos en el mismo intervalo y estandarizados a la magnitud del radio caudal.

ii. Diámetro a la marca de eclosión (DME)

La zona difusa que rodea al primordio en otolitos sagitales es muy distintiva en peces teleósteos, debido a que se encuentra envuelta por una marca prominente que en algunos casos coincide con la marca de eclosión y en otros con la primera alimentación (Figura 27). Por lo tanto se infirió que el diámetro de esta zona puede ser un marcador de unidad demográfica, donde zonas primordiales de mayor diámetro pueden estar asociadas a larvas de mayor tamaño a la eclosión, debido a que se han descritos diferencias latitudinales en el tamaño de embriones para *E. ringens* en la zona norte de Chile, presumiblemente vinculadas a la influencia de la temperatura en las tasas de incubación (Llanos-Rivera & Castro 2004, Tarifeño et al. 2008). En el presente estudio se registró el DME en aquellas muestras que presentaron la mayor resolución micro-estructural. El DME para cada ejemplar correspondió a un promedio de dos mediciones efectuadas de forma horizontal y vertical, obtenidas a 40X de magnificación.

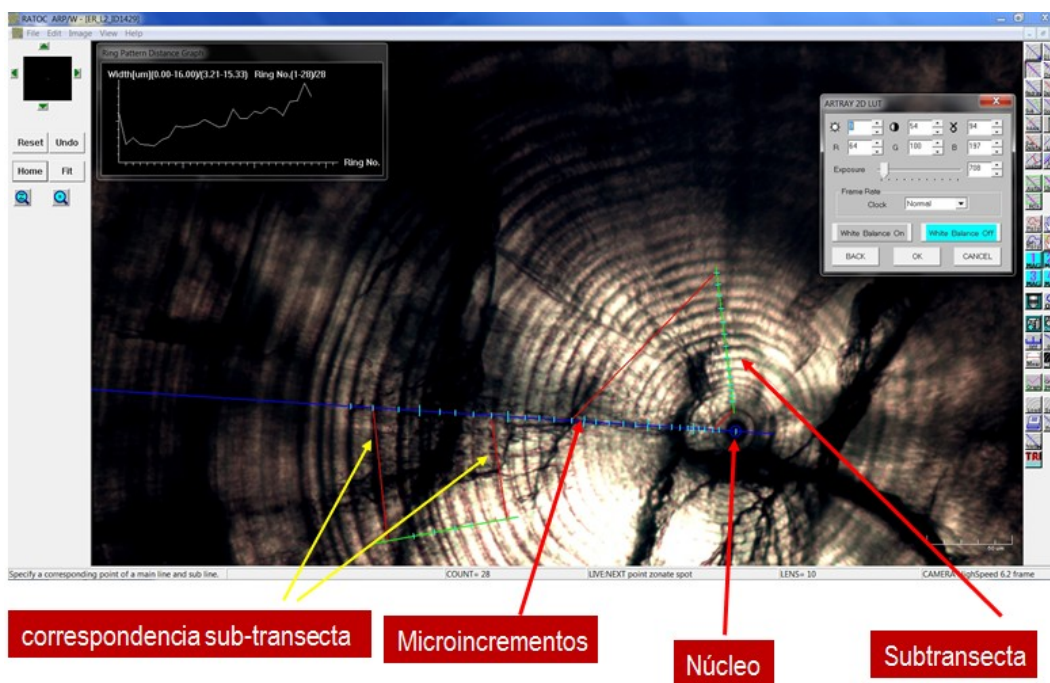


Figura 26: Ilustración del proceso de medición de micro-incrementos diarios de ejemplares adultos de anchoveta, utilizando el análisis de imágenes “Otolith Reading System (RATOC Ltd).

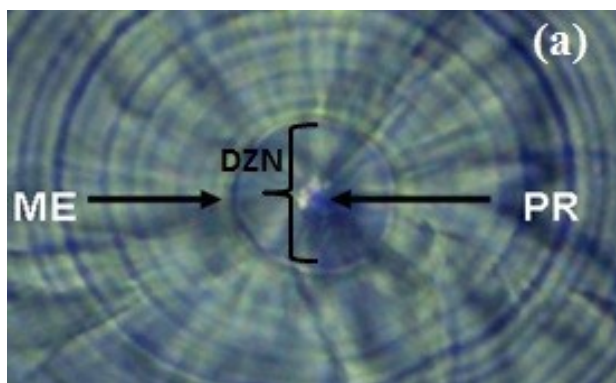


Figura 27: Ilustración de variables discriminatorias asociadas al diámetro de la marca de eclosión en una muestra de otolito pulido de *Engraulis ringens*.

3.3. Resultados

Los resultados de la micro-estructura de otolitos asociados al segundo objetivo específico del proyecto se resumen en cinco aproximaciones: (i) obtención de información micro-estructural derivada de los juveniles de origen conocido; (ii) evaluación de la capacidad discriminatoria de las variable micro-estructurales de juveniles; (iii) análisis de la micro-estructura de los otolitos en adultos de origen desconocido; (iv) determinación de niveles de mezcla en adultos con algoritmos de clasificación derivados de juveniles; y (v) análisis micro-estructural y evaluación de su capacidad discriminatoria en un año de muestreo alternativo. En adelante se describirán los resultados asociados a estas cinco aproximaciones en orden secuencial.

3.3.1. Obtención de información micro-estructural derivada de los juveniles de origen conocido

i. Variables de tamaño del otolito derivadas del análisis micro-estructural

Todas las relaciones entre las medidas morfométricas de tamaño del otolito sagital y las medidas de radio derivadas del análisis micro-estructural, analizadas para las tres zonas de estudio, fueron significativamente lineales ($P < 0,001$). Aunque los rangos del tamaño de los ejemplares analizados no fue enteramente comparable, se pudo constatar una elevada proporcionalidad, particularmente, entre la longitud antero-posterior (LO) y los radios rostrales y caudales de los otolitos (Figura 28a-d; Tabla 24). La excepción al patrón fue la relación entre

la LO y el radio ventral donde una fracción de los ejemplares mostraron tasas de proporcionalidad distintas en la Zona II, que correspondió a ejemplares mayoritariamente entre 9,5 y 12 cm de LT.

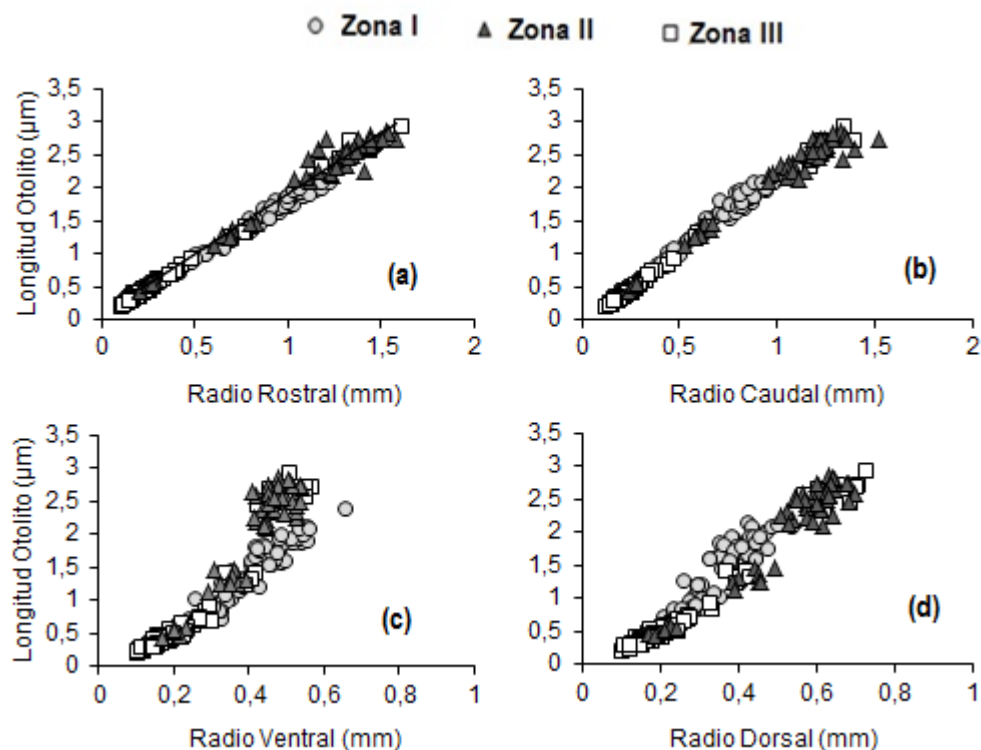


Figura 28: Relación entre dimensiones del tamaño del otolito extraídas de análisis micro-estructural en pre-reclutas y reclutas de *Engraulis ringens*, colectados en las zonas estudiadas. (a) Longitud otolito-radio rostral; (b) longitud otolito-radio caudal; (c) longitud otolito-radio ventral; (d) longitud otolito-radio dorsal.

Tabla 24: Coeficientes de regresión de modelos entre la dimensiones del tamaños del otolito derivadas de análisis micro-estructural en pre-reclutas y reclutas de anchoveta *E. ringens* colectados en la zona norte (Zona I), Atacama-Coquimbo (Zona II) y centro-sur (Zona III) de Chile, respectivamente. LO=longitud antero-posterior del otolito; RR: radio rostral; RC: radio caudal; RV. Radio ventral; RD: radio dorsal; EE: error estándar.

Zona	Modelo	$\alpha \pm EE$	$\beta \pm EE$	F	r^2	n
I	LO vs RR	0,08 \pm 0,03	1,7 \pm 0,03	3239,1	0,98	72
	LO vs RC	0,02 \pm 0,04	2,2 \pm 0,06	1295,6	0,97	72
	LO vs RV	-0,35 \pm 0,09	4,4 \pm 0,21	455,6	0,87	72
	LO vs RD	-0,33 \pm 0,12	4,9 \pm 0,32	237,3	0,88	72
II	LO vs RR	0,16 \pm 0,12	1,8 \pm 0,09	375,7	0,93	54
	LO vs RC	0,35 \pm 0,10	1,8 \pm 0,09	418,5	0,94	54
	LO vs RV	-0,11 \pm 0,40	5,4 \pm 0,84	40,9	0,66	54
	LO vs RD	-0,16 \pm 0,21	4,3 \pm 0,35	157,0	0,75	54
III	LO vs RR	0,07 \pm 0,00	1,8 \pm 0,01	16654,3	0,99	110
	LO vs RC	-0,08 \pm 0,01	2,3 \pm 0,02	9600,2	0,99	110
	LO vs RV	-0,24 \pm 0,03	4,0 \pm 0,14	781,5	0,93	110
	LO vs RD	-0,11 \pm 0,01	3,2 \pm 0,06	2929,1	0,98	110

ii. Caracterización de la micro-estructura por zona.

En general los otolitos sagitales, tanto de pre-reclutas (<5 cm LT) como de reclutas (6-12 cm LT), recolectados en la Zona I en el crucero de diciembre 2015, mostraron un patrón micro-estructural bastante difuso, donde los micro-incrementos primarios fueron difícil de interpretar debido a la presencia de discontinuidades y gran cantidad de anillos sub-diarios (Figura 29). Esta característica no estuvo relacionada con el proceso de preparación debido a que pudo ser evidente incluso en otolitos embebidos en resina epóxica pero sin pulir. Para la identificación de los micro-incrementos primarios se aplicaron las recomendaciones descritas en la disciplina, que consistió en dejar levemente fuera de foco el plano de observación (Figura 29). En contraposición la micro-estructura de los otolitos sagitales de pre-reclutas de la Zona III apareció bien definida, lo que permitió identificar los micro-incrementos primarios con mucha mayor facilidad desde el primordio hasta el borde de los mismos (Figura 30).

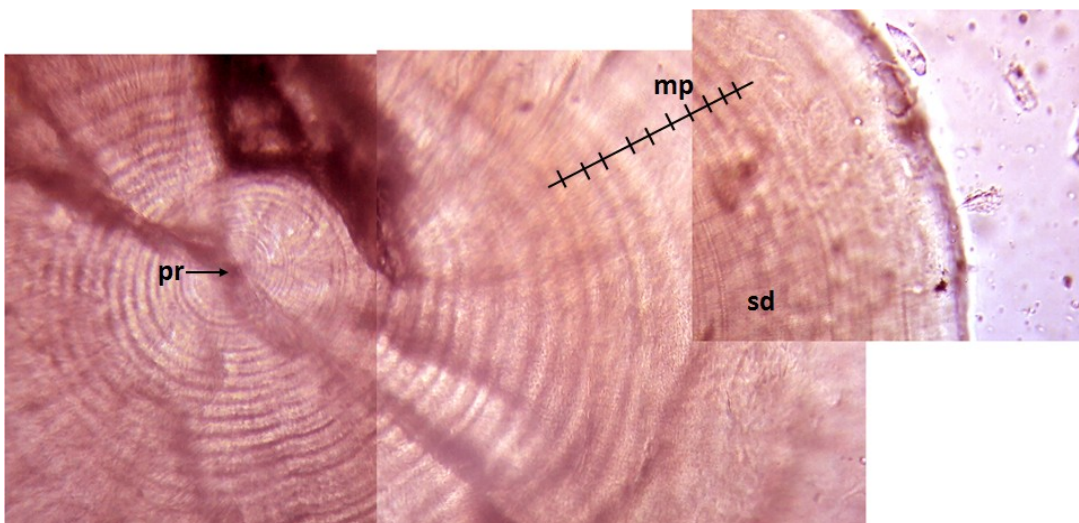


Figura 29: Imágenes combinadas de un otolito sagital derecho de un ejemplar pre-recluta de 4,6 cm de LT de anchoveta *Engraulis ringens* recolectados en la zona norte de Chile (Zona I), en diciembre de 2015. pr: primordio; mp: micro-incrementos primarios (diarios); sd: micro-incrementos subdiarios.

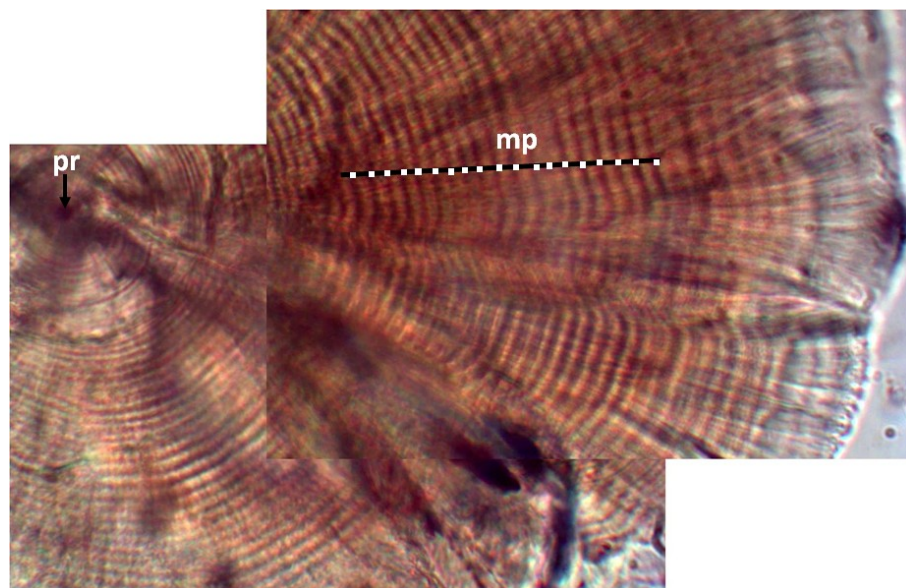


Figura 30: Imagen combinada de un otolito sagital derecho de un ejemplar pre-recluta de 4,5 cm de LT de *E. ringens* colectados en la Zona III, en enero 2016. pr: primordio; mp: micro-incrementos primarios (diarios). La línea segmentada ilustra la secuencia de mp.

iii. Radio y grosor de los micro-incrementos primarios a cada edad

Los perfiles de grosores medios en los ejemplares analizados para cada zona se ilustran en la Figura 31. Tanto el radio como el grosor medio a cada edad mostraron diferencias aparentes entre las tres zonas con valores medios incrementando en un gradiente norte sur. Para verificar si estas diferencias aparentes fueron significativas se llevó a cabo un análisis de medidas repetidas (RM-ANOVA) para dos set de datos balanceados, hasta los 40 y 50 días respectivamente. En ambos casos se demostró que existieron diferencias significativas en el radio y grosor medio a cada edad (RM ANOVA; $p < 0,001$; Tabla 25).

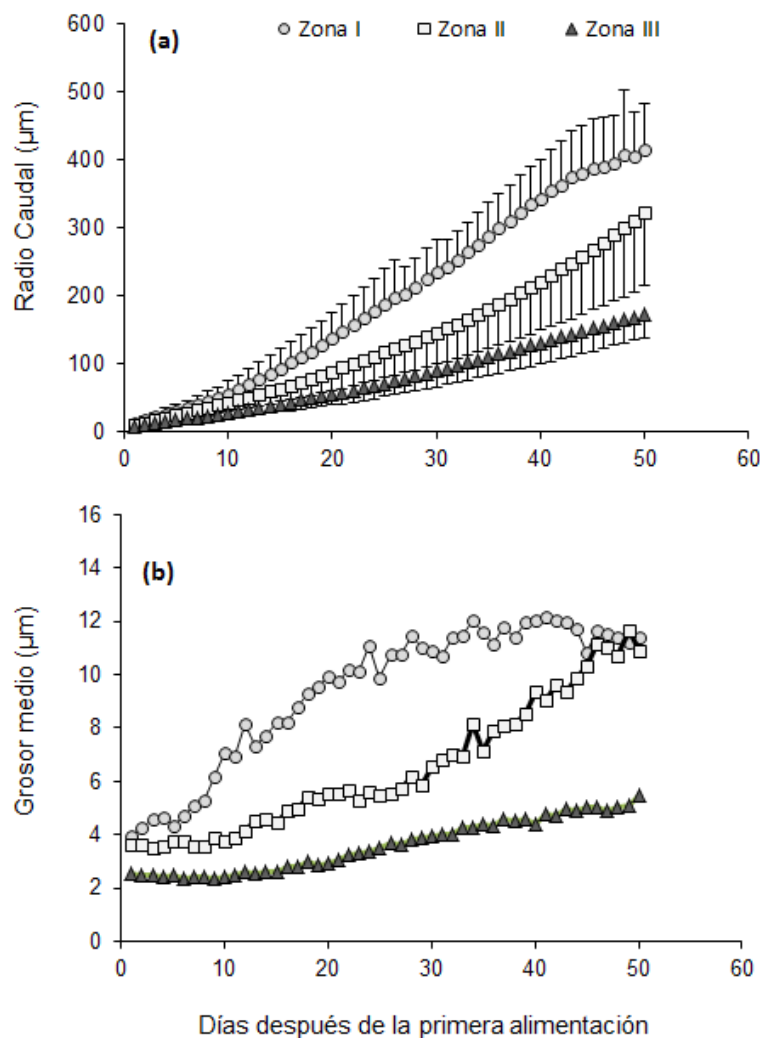


Figura 31: Perfiles de radio caudal y grosores medios para los primeros 50 días de vida de ejemplares pre-reclutas de anchoveta *E. ringens* recolectados en las tres zonas de muestreo.

Tabla 25: Estadísticas derivadas de análisis de medidas repetidas multivariado para datos balanceados hasta los primeros 40 y 50 días de vida *E ringens*, para poner a prueba la hipótesis de ausencia de diferencias significativas en el radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos entre las Zonas I, II y III. GLh y GLe: Grados de libertad asociados al contraste de factor área-repeticiones y error, respectivamente. F: aproximación a un estimado del estadístico F-Fisher.

Aproximación	Variable	Wilks's Lambda	GLd	GLe	F	P
40	Radio	0,492	14	324	9,857	<0,001
	Grosor	0,703	14	324	4,465	<0,001
50	Radio	0,408	18	252	7,922	<0,001
	Grosor	0,623	18	252	3,733	<0,001

iv. Fechas de nacimiento

La fecha de nacimiento para cada ejemplar y zona de estudio pudo ser determinada substrayendo la edad total de la fecha de captura. Los ejemplares analizados provinieron del desove mayoritariamente de primavera del año 2015 (Figura 32). Un análisis comparativo de las distribuciones de frecuencia a través de la prueba Kolgomorov-Smirnov sólo evidenció diferencias significativas entre los ejemplares de la zona Centro-Sur (III) y el resto de las zonas ($D=0,323$; $P<0,001$).

v. Diámetro a la marca de eclosión (DME)

El DME de los ejemplares analizados fluctuaron entre 8,9 y 22,8 μm , 9,3 y 19,4 μm y entre 10,2 y 23,9 μm , para la Zona I, Zona II y Zona III, respectivamente, con una media global de $15,1 \pm 3,5 \mu\text{m}$ y con coeficientes de variación que fluctuaron alrededor del 20% en cada zona de estudio. Un análisis de varianza de un factor demostró que no existieron diferencias significativas en el DME entre la zonas geográficas contrastadas (ANOVA $F_{(2, 112)} = 1,65$; $p = 0,188$; Figura 33).

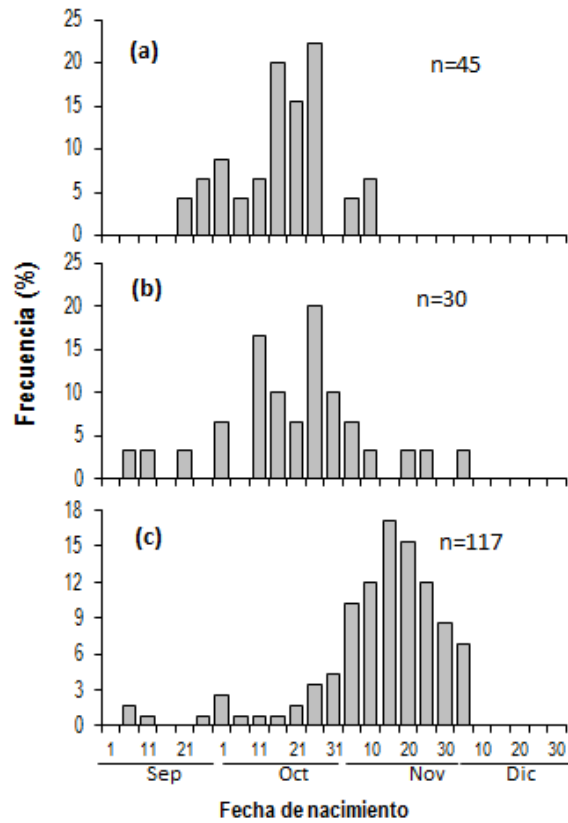


Figura 32: Distribuciones de frecuencia de fechas de nacimiento de ejemplares pre-reclutas y reclutas de anchoveta *Engraulis ringens* recolectados. (a) Zona I (norte); (b) Zona II (Atacama-Coquimbo) y (c) Zona III (Centro-Sur) de Chile. Los meses en el eje “X” corresponden al año 2015.

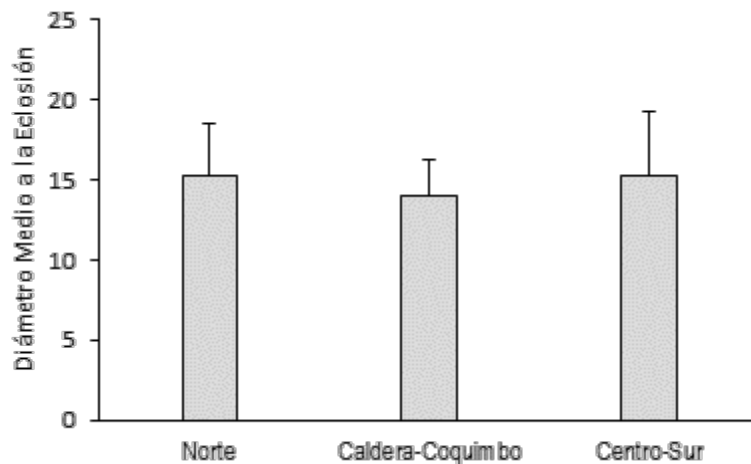


Figura 33: Valores medios del diámetro a la marca de eclósión (DME) en otolitos sagitales de juveniles de anchoveta recolectados en las tres zonas de estudio. El DME se registró a la primera marca prominente a partir de la cual se observaron micro-incrementos distintivos.

3.3.2. Evaluación de la capacidad discriminatoria de las variables micro-estructurales de juveniles

i. Análisis discriminante

Un análisis discriminante lineal fue llevado a cabo utilizando las mismas bases de datos utilizadas para RM-ANOVA. Para el set de datos balanceados hasta los 40 días las variables transformadas del radio 30, radio 40 y grosor medio 30-40 lograron discriminar de forma significativa las tres zonas analizadas (Wilks's Lambda: 0,276; $F_{6,322}= 49,9$; $P<0,001$). La evaluación a través de las funciones de clasificación (Tabla 26) demostró que el modelo discriminó correctamente en el 80% de los casos, donde las Zonas I y II aparecieron completamente separadas (Tabla 27a; Figura 34). De forma similar cuando se utilizó el set de datos balanceados a 50 días se discriminaron significativamente las tres zonas de estudio (Wilks's Lambda: 0,256; $F_{8,262}= 31,9$; $P<0,001$). Cuando se incorporó la variable Radio 50 y grosor medio 41-50 la potencia discriminatoria se incrementó a porcentajes 87% de clasificaciones correctas (Tabla 27b; Figura 34).

Tabla 26: Funciones de clasificación derivadas de un Análisis Discriminante Lineal (ADL), utilizando variables provenientes del análisis del micro-estructura de otolitos de juveniles de anchoveta *Engraulis ringens* recolectados en las tres zonas de muestreo.

Rango (días)	Parámetro	Zona I	Zona II	Zona III
40	Constante	-15.798	-15.809	-15.681
	LRAD_30	-14.257	-14.284	-14.240
	LRAD_40	21.687	21.719	21.647
	LG_M_30_40	-7.259	-7.271	-7.252
50	Constante	-13.089	-13.044	-13.045
	LRAD_30	-174	-178	-190
	LRAD_40	-14.732	-14.735	-14.741
	LRAD_50	20.802	20.798	20.819
	LG_M_40_50	-5.911	-5.905	-5.921

Tabla 27: Porcentajes de clasificación derivados de las funciones de clasificación descritas en la Tabla 26. Se destaca que las muestras utilizadas fueron de origen conocido, utilizando dos set de datos, *i.e.* hasta los primeros 40 y 50 días, respectivamente. Los porcentajes de clasificación fueron corregidos utilizando una aproximación *jackknife*.

(a)	Zona I	Zona II	Zona II	% correcto
Zona I	30	2	0	94
Zona II	7	16	5	57
Zona III	0	15	96	86
Total	37	33	101	83
(b)	Zona I	Zona II	Zona III	% correcto
Zona I	14	3	0	82
Zona II	4	18	6	64
Zona III	0	5	87	95
Total	18	26	93	87

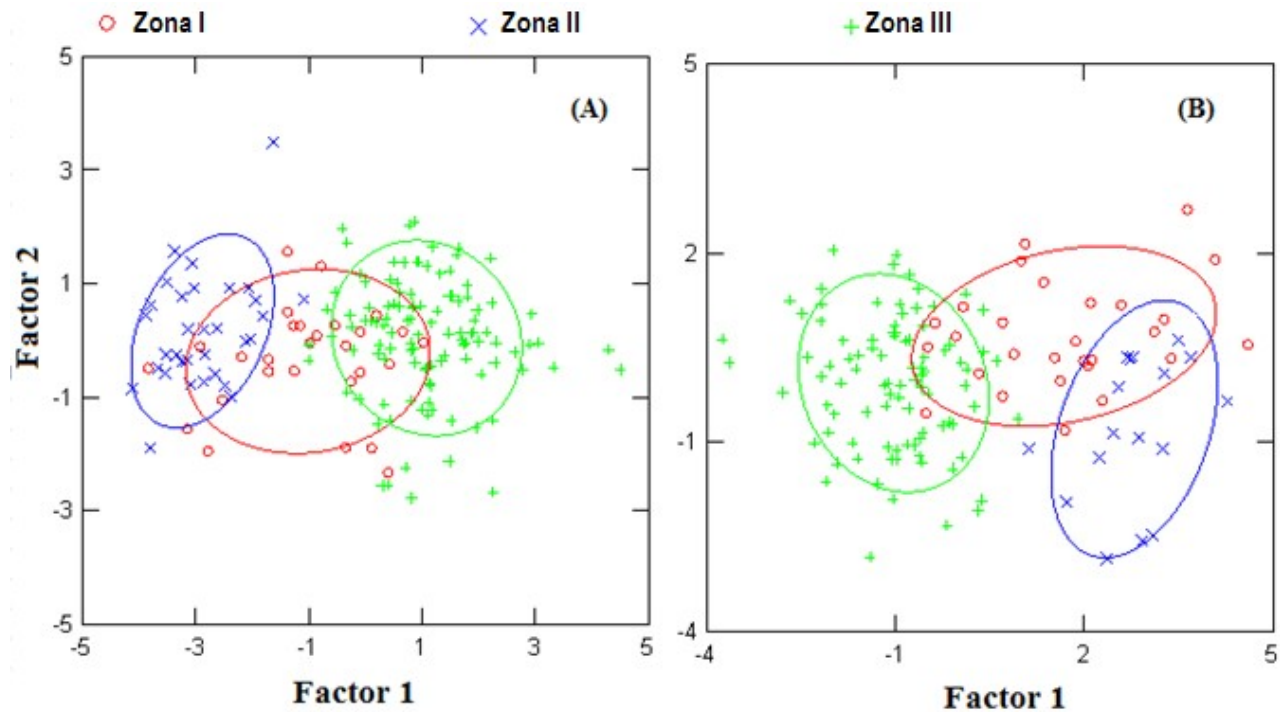


Figura 34: Valores canónicos derivados de una ADL, donde variables derivadas del radio y grosor de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes.

3.3.3. Análisis de la micro-estructura de otolitos en adultos de origen desconocido

Para esta aproximación se analizaron un total de 115 ejemplares adultos de anchovetas recolectados en las tres zonas de estudio entre invierno y primavera del año 2016, los cuales fluctuaron entre 11,6 y 18 cm LT ($14,08 \pm 1,53$; CV=10,92%). Para estos ejemplares fue posible revelar los rasgos micro-estructurales de su vida temprana, utilizando los procedimientos metodológicos descritos previamente. Para mantener consistencia con las variables discriminantes y evitar reducir el tamaño de muestra para obtener un diseño balanceado, se restringió el análisis a los primeros 50 días de vida, que fue el periodo donde la micro-estructura pudo ser revelada con mayor confiabilidad.

i. Radio y grosor de los micro-incrementos primarios reconstruidos a partir de adultos

Los perfiles de grosores medios, estandarizados a la dimensión del radio caudal, en los ejemplares adultos analizados para cada zona se ilustran en la Figura 35. Tanto el radio como el grosor medio a cada edad hasta los primeros 50 días fluctuaron entre 1,88 y 35,83 μm siguiendo un patrón similar al descrito por juveniles, incrementando a medida que transcurrió la edad y en un gradiente norte sur. Un análisis de medidas repetidas (RM-ANOVA) para los mismos dos set de datos balanceados que se analizaron en juveniles, i.e. hasta 40 y 50 días respectivamente, demostró que existieron diferencias significativas en el radio y grosor medio a cada edad (RM ANOVA; $p < 0,001$; Tabla 28) en las mismas variables discriminantes (convertidas con logaritmo natural) reveladas a partir de ejemplares adultos.

Tabla 28: Estadísticas derivadas de análisis de medias repetidas para datos balanceados hasta los primeros 40 y 50 días de vida de peces adultos de *E. ringens*, para poner a prueba la hipótesis de ausencia de diferencias significativas en el radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos entre la Zona I, Zona II y Zona III. GLh y GLe: Grados de libertadas asociadas al contraste de factor área-repeticiones y error, respectivamente. F: aproximación a un estimado del estadístico F-Fisher.

Aproximación	Variable	Wilks's Lambda	GLd	GLe	F	P
40	Radio	0,488	14	206	34,374	<0,001
	Grosor	0,506	14	206	7,105	<0,001
50	Radio	0,408	18	182	7,922	<0,001
	Grosor	0,551	18	182	6,71	<0,001

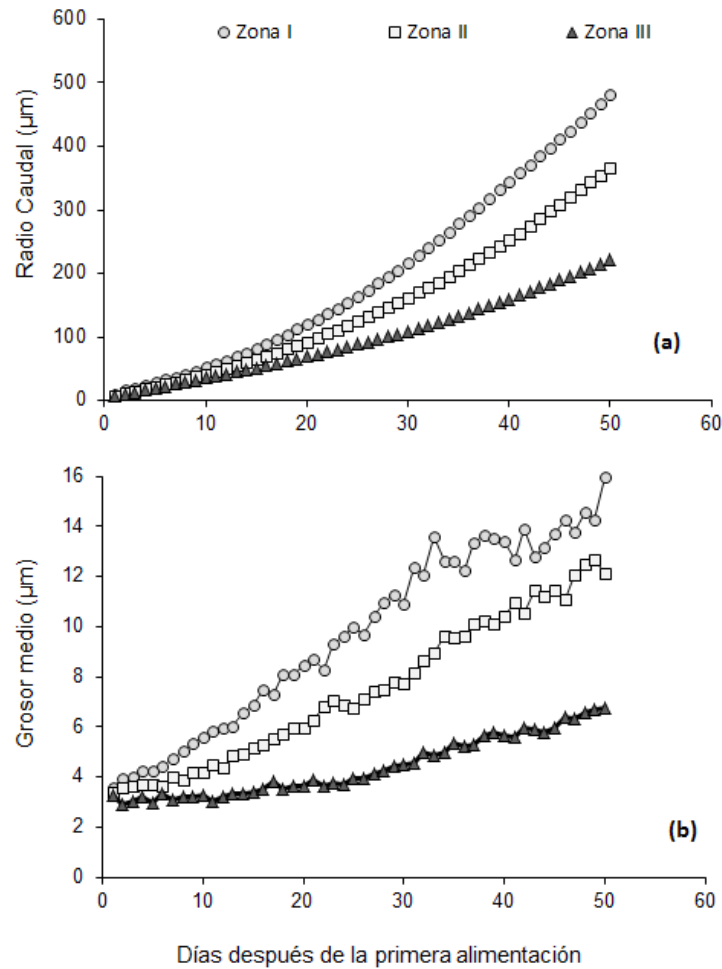


Figura 35: Perfiles de radio caudal y grosores medios para los primeros 50 días de vida de ejemplares adultos de anchoveta *E. ringens* recolectados en las tres zonas de estudio.

ii. Análisis discriminante

Un análisis discriminante lineal fue llevado a cabo utilizando las mismas variables discriminantes utilizadas en los ejemplares juveniles, con las base de datos balanceadas. No obstante, se debe subrayar que el propósito de este análisis sólo tiene un carácter descriptivo, porque los algoritmos de clasificación que se utilizaron para determinar los niveles de mezcla son aquellas derivadas del ADL de ejemplares juveniles con origen conocido. Para el set de datos balanceados hasta los 40 días las variables transformadas (a logaritmo natural) del radio 30, radio 40, y grosor medio 30-40 lograron discriminar de forma significativa las tres zonas analizadas (Wilks's Lambda $_{(6,109)}=0,2323$; $F_{(6,214)}=27,06$; $P<0,001$). La evaluación demostró que el modelo discriminó correctamente en el 77% de los casos, donde las zonas norte (I) y centro sur (III) aparecieron mayoritariamente separadas, con un 82 y 95% de clasificaciones correctas, respectivamente (Tabla 29a; Figura 36). Similarmente cuando se utilizó el set de datos

balanceados hasta 50 días se discriminaron significativamente las tres zonas de estudio (Wilks's Lambda_(4,99)=0,22; F_(8,192)=26,54; P<0,001) y cuando se incorporó la variable Radio 50 y grosor medio 41-50 (ambas variables transformadas a su logaritmo natural) la potencia discriminatoria total se incrementó levemente. (Tabla 29b; Figura 36).

Tabla 29: Porcentajes de clasificación derivados de las funciones de clasificación del radio y grosor del micro-incrementos de otolitos de ejemplares adultos de anchoveta, para las mismas variables utilizadas en juveniles, donde se utilizaron dos tipos de datos balanceados hasta los primeros 40 (a) y 50 (b) días, respectivamente.

(a)	Zona I	Zona II	Zona III	% correcto
Zona I	24	2	0	92
Zona II	11	29	7	62
Zona III	0	6	33	85
Total	35	37	40	77
(b)	Zona I	Zona II	Zona III	% correcto
Zona I	21	5	0	81
Zona II	21	23	5	62
Zona III	1	2	36	92
Total	31	30	41	78

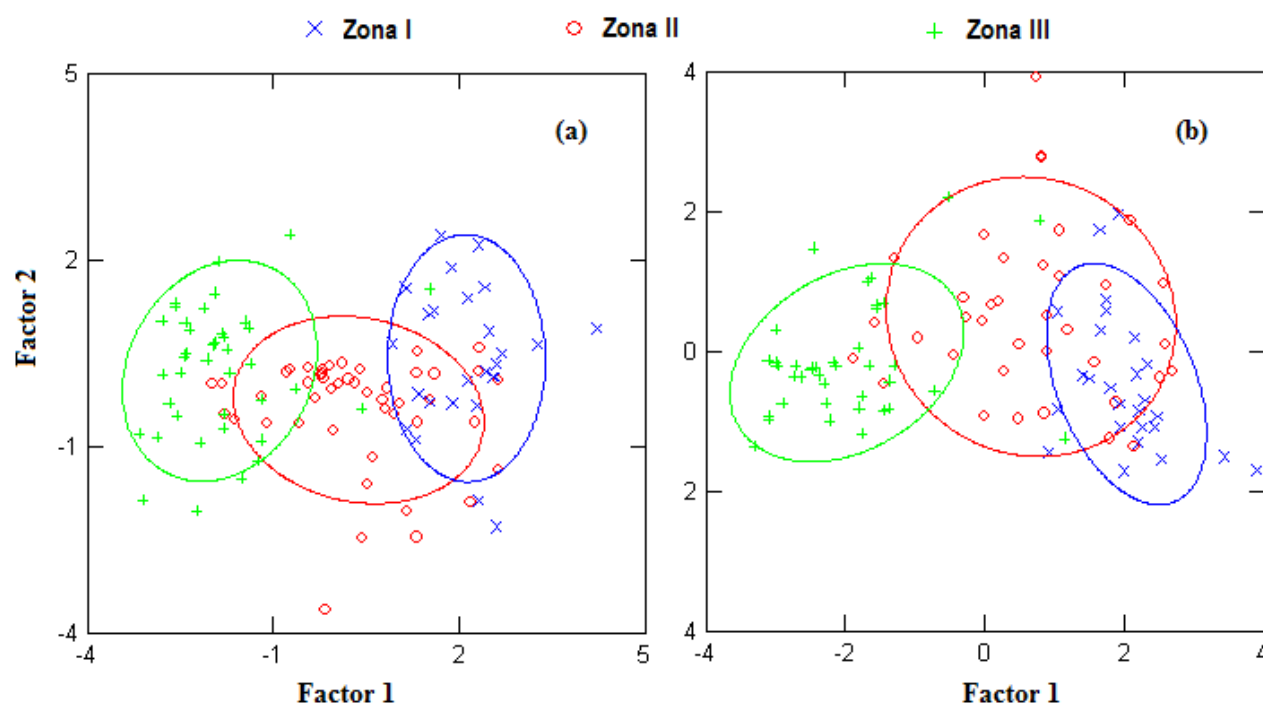


Figura 36: Valores canónicos derivados de una ADL para adultos de *E. ringens*, donde variables derivadas del radio medio y grosor medio de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes, en datos balanceados a los primeros 40 (a) y 50 (b) días de vida.

3.3.4. Determinación de niveles de mezcla en adultos con algoritmos de clasificación derivados de juveniles.

La determinación de los niveles de mezcla pudo ser obtenida utilizando los algoritmos de clasificación obtenida del ADL de juveniles de origen conocido, utilizando las variables discriminatorias identificadas en la Tabla 26, para los dos tipos de datos balanceados. La información ingresada a los algoritmos de clasificación, correspondieron a las mismas variables, obtenidas en otolitos de 115 adultos que fueron recolectados en las tres zonas de estudio. El hallazgo más distintivo fue la confirmación que las zonas extremas (I y III) prácticamente no evidenciaron mezcla, independiente de la aproximación analítica utilizada (Tabla 30;Figura 37). Contrariamente, la zona de Atacama-Coquimbo (II), evidenció una presencia de ejemplares de otras zonas de que no fue consistente entre el tipo de set de datos, pero que en ningún caso superó un 40% de ocurrencia (Tabla 30;Figura 37).

Tabla 30: Identificación de la ocurrencia y porcentaje de mezcla (entre paréntesis) de ejemplares adultos de anchoveta recolectados en tres zonas de estudio, que se originaron en las zonas de crianza aledañas a los sitios de muestreo. La mezcla fue determinada usando algoritmos de clasificación en muestras balanceadas del grosor y radio para los primeros 40 (a) y 50 de vida (b), de acuerdo a las funciones de clasificación descritos en la Tabla 24, que fueron obtenidos de juveniles de origen conocido.

(a) 40	Zona I	Zona II	Zona III	Total (Zona)
Zona I	26 (100)	0 (0)	0 (0)	26 (100)
Zona II	14 (29)	30 (63)	4 (8)	48 (100)
Zona III	1 (3)	7 (18)	31 (79)	39 (100)
Total (origen)	41 (36)	37 (33)	35 (31)	113 (100)
(b) 50	Zona I	Zona II	Zona III	Total
Zona I	19 (73)	7 (27)	0 (0)	26 (100)
Zona II	10 (21)	27 (56)	0 (0)	48 (100)
Zona III	1 (3)	14 (42)	24 (73)	33 (100)
Total (origen)	30 (28)	48 (45)	24 (22)	107 (100)

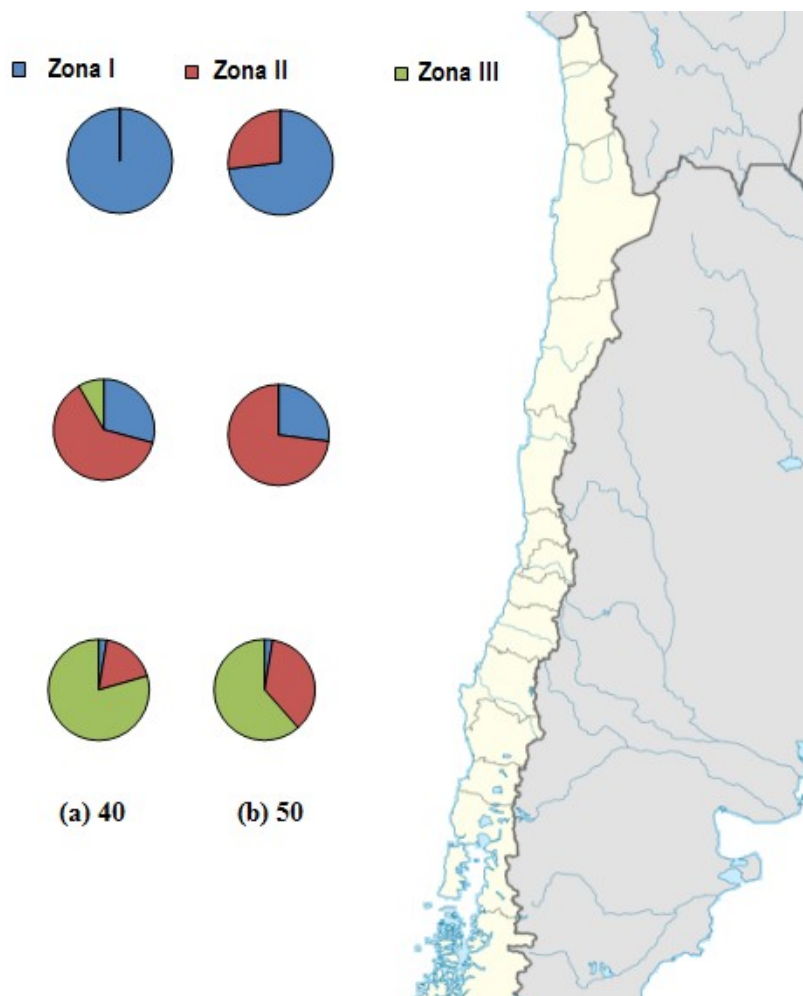


Figura 37: Ilustración de los niveles de mezcla de adultos de anchoveta recolectados entre zonas de muestreo, determinados utilizando algoritmos de clasificación derivados del análisis de la micro-estructura de juveniles de origen conocido.

3.3.5. Análisis micro-estructural y evaluación de su capacidad discriminadora en un año de muestreo alternativo (2012-2013)

Un aspecto clave en el proceso de identificación de unidades demográficas en un recurso, es verificar la estabilidad interanual en la capacidad discriminadora de las herramientas utilizadas, a fin de determinar la utilidad de los algoritmos de clasificación para efectuar procesos de monitoreo de los niveles de mezcla, con propósitos de manejo pesquero. En el caso del presente proyecto, se propuso evaluar la capacidad discriminadora de la micro-estructura de los otolitos para un año distinto del periodo 2015-2016. Para este propósito se contó con muestras de otolitos de ejemplares juveniles de las zonas I (Norte) y II (Atacama-Coquimbo), los cuales fueron recolectados en los cruceros de evaluación hidroacústicos, llevados a cabo por el Instituto de Fomento Pesquero, entre diciembre de 2012 y enero de 2013. Las muestras de otolitos sagitales, procesadas para análisis

micro-estructural, fueron complementadas con muestras de otolitos que ya habían sido preparadas, en el marco del desarrollo del proyecto FIP 2013-16 para la Zona III.

i. Variables de tamaño del otolito derivadas del análisis micro-estructural

En una primera aproximación se pudo efectuar también un análisis de la relación entre las medidas morfométricas de tamaño del otolito sagital y las medidas de radio derivadas del análisis micro-estructural, en juveniles recolectados entre 2012 y el verano 2013, de forma similar a los ejemplares de menor talla (pre-reclutas) recolectados entre 2015 y 2016. En general se observó un patrón similar con relaciones altamente proporcionales (significativas; $P < 0.01$), particularmente para las relaciones entre la longitud del otolito y los radios caudales y rostrales, a pesar que el rango de tamaño de los ejemplares analizados no fue enteramente comparable (Figura 38).

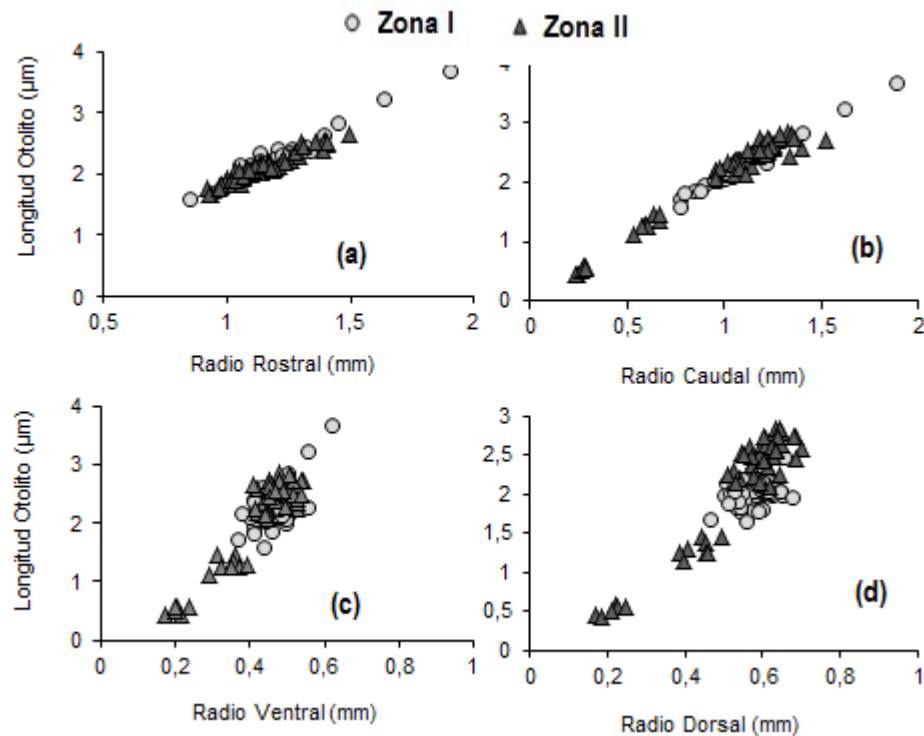


Figura 38: Relación entre dimensiones del tamaño del otolito extraídas de análisis micro-estructural en reclutas *E. ringens*, recolectados en la zona estudiadas para el periodo 2012-2013. Longitud otolito-radio rostral (a); longitud otolito-radio caudal (b); longitud otolito-radio ventral (c); longitud otolito-radio dorsal (d).

ii. Fechas de nacimiento de los ejemplares procesados

Un total de 189 otolitos sagitales de ejemplares de juveniles (reclutas) estuvieron disponible para este análisis, los cuales mostraron una elevada resolución de los micro-incrementos diarios, desde el primordio hasta el borde, particularmente en la Zona I. Los ejemplares analizados fluctuaron entre 8,3 y 11,2 cm de LT ($9,65 \pm 0,57$) y entre 86 y 142 días de vida (118 ± 12) para la Zona I; entre 8,1 y 9,6 cm de LT ($9,14 \pm 0,42$) y entre 42 y 127 días (97 ± 22) para la Zona II; y entre 3,3 y 11,5 cm de LT ($5,77 \pm 2,02$) y entre 59 y 178 días (105 ± 31) para la Zona III. Los ejemplares analizados provinieron de eventos de desove distintos en cada zona geográfica, aunque con pulsos consistentes en invierno al menos para la zona norte (Figura 39a) y zona centro-sur (Figura 39c), donde se apreció una cohorte de verano (Figura 39c).

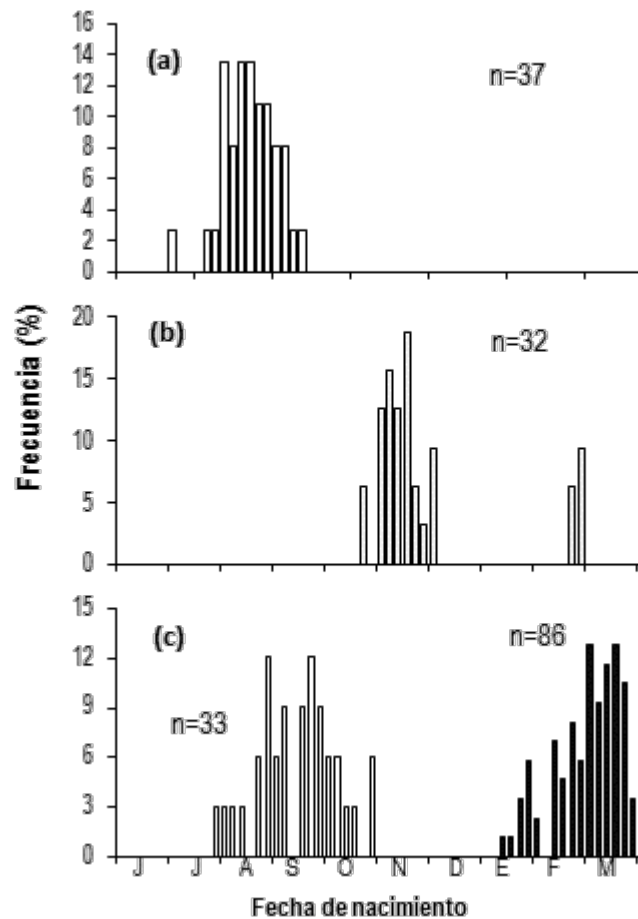


Figura 39: Distribuciones de frecuencia de fechas de nacimiento de ejemplares reclutas de anchoveta *Engraulis ringens* recolectados en la zona Norte (a), Atacama-Coquimbo (b) y Centro-Sur (c) de Chile. Los meses en el eje “X” corresponden al año 2012 y verano de 2013.

iii. Radio y grosor de los micro-incrementos primarios de reclutas

Aunque las fechas de nacimiento no fueron estrictamente consistentes entre las tres zonas geográficas, se analizaron los perfiles de grosores y radios medios estandarizados, separando la cohorte de verano de la Zona III (centro-sur) (Figura 39). Tal como ocurrió en los perfiles de radio y grosor de pre-reclutas y adultos en análisis anteriores, se evidenció un gradiente norte-sur, tanto en el grosor como en el radio (Figura 40ab). Este gradiente varió significativamente entre las zonas extremas durante los primeros 80 días de vida, cuando se contrastaron cada 5 días en un diseño balanceado (Ln radio: RM ANOVA Wilks's Lambda (15,117)=0,03; $F_{(45,1965)}=89,044$; $P<0,001$; Ln Grosor: RM ANOVA Wilks's Lambda_(15,117)=0,057; $F_{(45,1965)}=26,79$; $P<0,001$) y estas diferencias se mantuvieron entre la Zona I y la cohorte de verano de 2012 para la Zona III, particularmente entre los 50 y 80 días de vida. Un aspecto que resaltó fue la ausencia de diferencias significativas en los perfiles de grosores entre la Zona I (Norte) y Zona II (Atacama-Coquimbo), cuando se usó la información sin transformar (radio: RM ANOVA Wilks's Lambda_(15,43)=0,517; $F_{(15,855)}=8,22$; $P<0,001$; Grosor: RM ANOVA Wilks's Lambda_(45,43)=0,634; $F_{(15,825)}=1,722$; $P=0,099$; Figura 40).

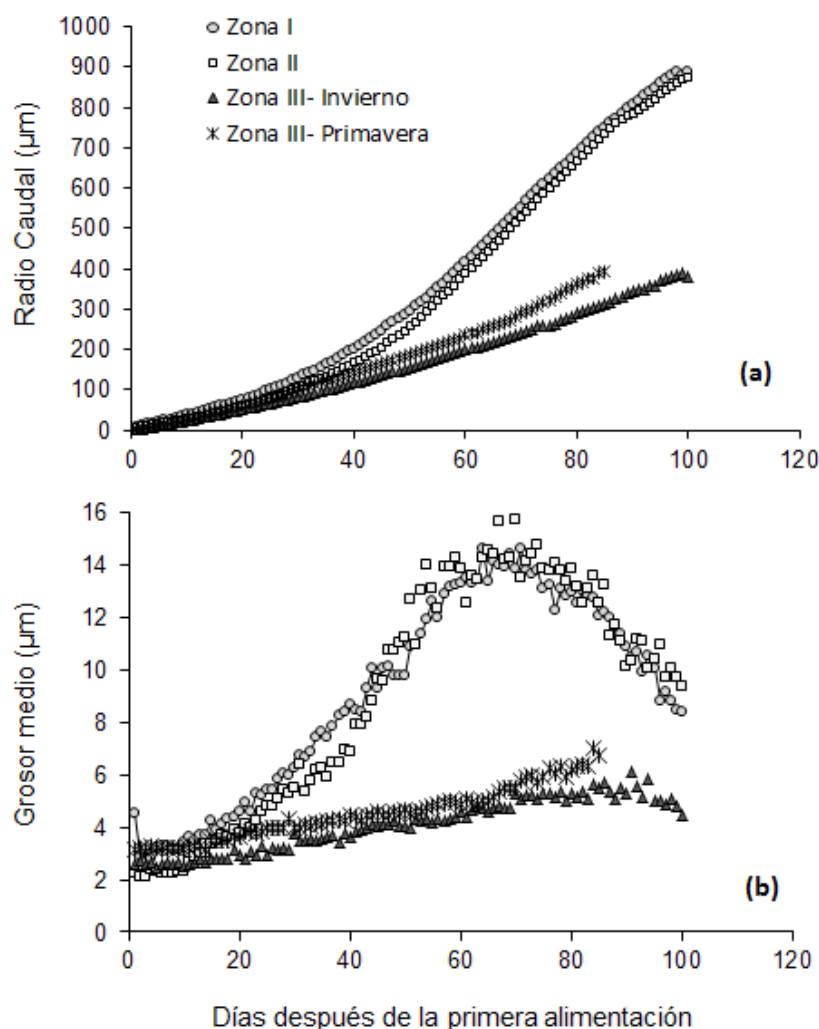


Figura 40: Perfiles de radio caudal (a) y grosores (b) medios para los primeros 100 días de vida de ejemplares juveniles (reclutas) de entre 9 y 12 cm LT de anchoveta *Engraulis ringens*, recolectados durante el otoño de 2012 y verano de 2013 en las tres zonas de estudio.

iv. Análisis discriminante de reclutas de los años 2012 y 2013

Un análisis discriminante lineal pudo ser desarrollado usando la misma información generada para RM-ANOVA, usando un set de datos balanceados hasta los primeros 80 días, debido a que en la etapa juvenil tardía es donde se observó una aparente mayor variabilidad en el crecimiento del otolito para juveniles (reclutas) de esta especie en las zonas de estudio. Las variables transformadas del radio y grosor a los primeros 40, 50, 60, 70 y 80 días y el grosor promedio entre los días 41-50, 51-60, 61-70 y 71-60, lograron discriminar de forma significativa las tres zonas analizadas (Wilks's Lambda: 0,093; $F_{(21,353)} = 22,109$; $P < 0,001$). La evaluación a través de las funciones de clasificación demostró que el mejor modelo discriminó correctamente en el 73% de los casos, donde las Zonas I (norte) y Zona II (Atacama-

Coquimbo), siempre aparecieron completamente separadas de la zona centro sur, incluso con presencia de estacionalidad en este último caso (Tabla 7; Figura 41).

Tabla 31: Porcentajes de clasificación derivados de un análisis discriminante lineal (ADL), donde las variables independientes correspondieron a radios caudales estandarizados y grosor medios de otolitos de juveniles de anchoveta, recolectados en las tres zonas de estudio entre primavera 2012 a verano 2013. Las variables fueron transformadas con logaritmo natural previo al análisis.

Zonas	Zona I	Zona II	Zona III Invierno	Zona III Verano	% correcto
Zona I	29	8	0	0	78
Zona II	10	17	0	0	63
Zona III Invierno	1	0	19	12	59
Zona III Verano	0	0	6	33	85
Total	40	25	25	45	73

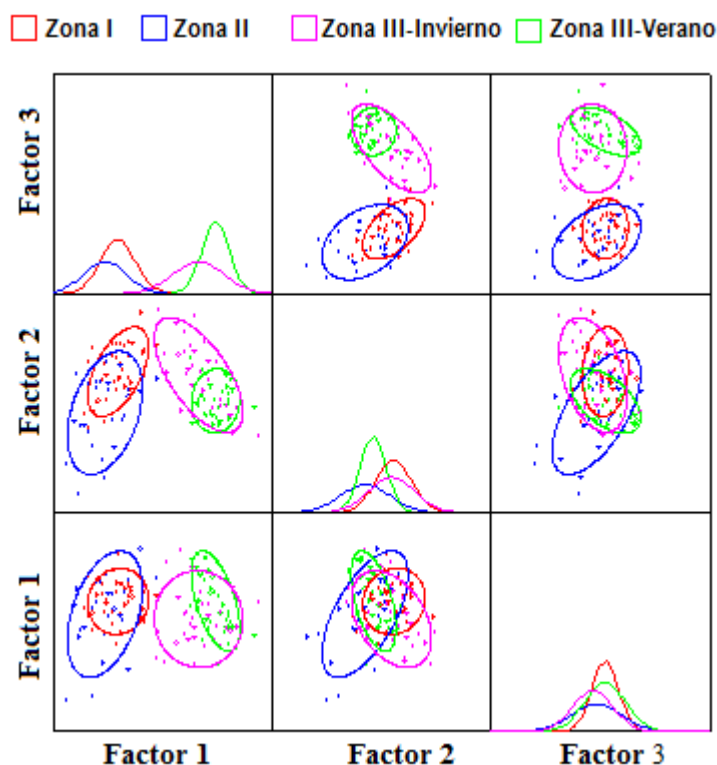


Figura 41: Valores canónicos derivados de una ADL para juveniles (reclutas) de *Engraulis ringens*, recolectados durante el periodo 2012-2013 en las tres zonas de estudio y donde variables derivadas del radio y grosor o de los micro-incrementos de otolitos a nivel diario fueron usadas como variables independientes, en datos balanceados a los primeros 40, 50, 60, 70 y 80 días de vida.

3.4. Análisis y discusión de resultados

En el análisis de la microestructura de otolitos de anchoveta se asumió independencia de las observaciones, sin considerar la correlación existente entre muestras provenientes de un mismo lance. Considerando lo anterior, se obtuvieron cinco hallazgos distintivos en el presente estudio, asociados a la identificación de unidades demográficas de anchoveta en la costa chilena, usando la micro-estructura de otolitos, a saber: (i) una baja resolución de los micro-incrementos y mayor presencia de anillos sub-diarios en la micro-estructura de otolitos en Zona I para el periodo 2015-2016; (ii) una elevada proporcionalidad encontrada entre las dimensiones del tamaño del otolito provenientes del análisis micro-estructural; (iii) una elevada capacidad discriminatoria del radio y grosor de los micro-incrementos en la vida temprana; (iv) evidencia de ausencia de niveles de mezcla entre las zonas norte y centro-sur, incluso en una escala inter-anual; y (v) ausencia de capacidad discriminatoria del diámetro a la marca de eclosión.

Los otolitos sagitales, particularmente en la zona norte recolectado en el periodo 2015-2016, mostraron una resolución reducida de los micro-incrementos primarios, lo que contrasta con los estudios previos que habían reportado elevada resolución de los micro-incrementos primarios en otolitos sagitales de reclutas de esta especie (Cerna et al. 2011; Cerna y Plaza 2016), incluso cuando varios años de análisis fueron contrastados. En el caso del periodo 2015-2016 (Zona I) el rasgo característico fue la elevada presencia de micro-incrementos muy finos que dificultaron la identificación de los micro-incrementos diarios verdaderos. Es importante destacar que la evidencia en la literatura demuestra que la mayor presencia de anillos subdiarios ocurren durante la fase de transición y juvenil temprana, particularmente en especies de crecimiento acelerado (Campana & Jones 1993, Panfili et al. 2002). Por lo tanto, es razonable inferir que este rasgo micro-estructural esté asociado a las condiciones ambientales particulares de un evento El Niño, y que pudiese estar incrementando la capacidad discriminatoria de las variables de radio y grosor. Sin embargo, es importante subrayar que a la capacidad discriminatoria se extendió también a las muestras de otolitos del periodo 2015-2016. Por consiguiente, es razonable inferir que estas diferencias micro-estructurales no alteran sustantivamente las conclusiones del presente estudio.

La proporcionalidad en la relación entre el tamaño antero-posterior y los radios micro-estructurales, es una primera evidencia de simetría antero-posterior y dorso ventral, las cuales se mantuvieron constantes incluso entre zonas de muestreo y entre juveniles jóvenes (pre-reclutas) y tardíos (reclutas). Es importante subrayar que las mediciones micro-estructurales radiales tienen un grado de incertidumbre asociada a la identificación del punto máximo debido a que se efectúa de forma manual (Begg et al. 2001). Esto puede explicar la mayor proporcionalidad en las medidas de la

longitud antero-posterior y los radios medidos hacia esas direcciones; aun así las relaciones fueron altamente proporcionales hacia otras direcciones. Estos resultados son una primera evidencia de que los cambios de grosor y radio a nivel diario no parecen estar relacionadas a una diferencia estructural del otolito, sino más bien parecen ser el producto de la variabilidad de los controladores potenciales del crecimiento, que se traduce en cambios en las tasa de crecimiento del otolito. La excepción fue el radio ventral que no pareció incrementar en la misma proporción en ejemplares mayores de 9,5 cm en la Zona II, rasgo que no se observó en ejemplares de tamaño similar en juveniles de talla similar del periodo 2012-2013, que puede ser producto de la dificultad en identificar de forma manual el punto máximo hacia esa dirección, debido al mayor número de irregularidades que surgen en la forma a medida que el otolito crece. Alternativamente se infiere que la menor proporcionalidad micro-estructural hacia la región ventral encontrada se alinea bien con el modelo propuesto por Gauldie & Nelson (1990), quienes sugieren que el contacto físico de otolito con la porción ventral del cráneo restringe el crecimiento del otolito hacia su borde ventral.

Un hallazgo distintivo fue que las variables de radio y grosor derivados del análisis de la micro-estructura de los otolitos sagitales discriminaron significativamente a los ejemplares nacidos en las tres zonas estudiadas, particularmente entre las zonas extremas donde las funciones de clasificación separaron en un 100% los ejemplares de la Zona I de aquellos de la Zona III. Estos resultados confirman la capacidad del otolito de actuar como marcador natural, capturando en su micro-estructura los cambios producidos por los controladores ambientales del crecimiento, que para los estadios tempranos de peces teleósteos corresponde a la productividad (Shepherd & Cushing 1980, Jenkins 1987) y a la temperatura (Miller et al. 1988, Houde & Zastrow 1993). Para el caso del sistema de corriente de Humboldt (HCS) a lo largo de la costa de Chile, los mayores centros de productividad primaria se encuentran precisamente en las dos zonas extremas analizadas. En la zona norte existe surgencia permanente a lo largo de todo el año (Montecino & Quiroz 2000, Iriarte & González 2004, Thiel et al. 2007), mientras que en la zona Centro-Sur la surgencia se encuentra restringida principalmente a primavera verano (Strub et al. 1998, Thiel et al. 2007). En el presente estudio las fechas de nacimiento estuvieron concentradas en primavera y verano para ambas zonas, coincidiendo con los periodos de mayor productividad. Por otra parte entre el norte y centro-sur las diferencias latitudinales en temperatura del océano se hacen más evidentes a medida que se acerca la estación estival.

Algunas preguntas surgen a partir de estos hallazgos, *i.e.*, ¿hasta qué punto los cambios marcados en el crecimiento temprano observados entre las zonas contrastadas ocurre en otras estaciones de nacimiento? ¿Son consistentes las variaciones en el crecimiento temprano del otolito en una escala

inter-anual? Los resultados derivados del análisis de la micro-estructura de juveniles del periodo 2012-2013 permitieron abordar estas interrogantes. Estos ejemplares nacieron en estaciones distintas, algunos en invierno otros en primavera y una cohorte surgió incluso de un desove de verano. Aún así fue posible distinguir significativamente a los ejemplares de las zonas extremas, donde la estación de verano pareció mitigar sólo parcialmente las diferencias entre el norte (Zona I) y centro-sur (Zona III). Adicionalmente, es razonable inferir que la capacidad discriminatoria de la micro-estructura sería incluso mucho más robusta si hipotéticamente los algoritmos de clasificación se hubiesen generado con ejemplares nacidos en una misma cohorte mensual, debido a que es bien conocido que hay una variabilidad estacional sustantiva en el crecimiento en los estadios tempranos, particularmente de peces pelágicos (Plaza et al. 2005, Clausen et al. 2007, Schismenou et al. 2013, 2016, Watanabe et al. 2014). Por consiguiente, se puede concluir con confiabilidad que los ejemplares, tanto pre-reclutas como reclutas, de esta especie mantienen una elevada fidelidad a la Zona I y Zona III.

La elevada fidelidad de los juveniles de anchoveta a la Zona I y Zona III fue adicionalmente respaldada por los hallazgos derivados del análisis de la micro-estructura de otolitos de peces adultos, donde se demostró ausencia absoluta de mezcla entra estas zonas extremas. Los algoritmos de clasificación con juveniles de origen conocido demostraron también que la zona de Atacama-Coquimbo (Zona II), tiene un componente mayoritariamente, propio pero con niveles de mezcla de alrededor de 35%, con un gradiente norte sur, ya sea como reservorio de ejemplares que provienen del norte, y/o como de vaciamiento de ejemplares que pueden migrar desde el centro a la Zona III. Se podría argumentar que los resultados podrían estar parcialmente influenciados por la ausencia de ejemplares pre-reclutas de la Zona II, donde se utilizaron juveniles de mayor talla para construir los algoritmos de clasificación. No obstante, es importante destacar que se observaron diferencias significativas en los radios y grosores medios para la fase temprana entre zonas geográficas, tanto en juveniles tardíos (reclutas) para el periodo 2012-2013, como en ejemplares adultos en el periodo 2015-2016; por consiguiente, la falta de pre-reclutas en los algoritmos no pareciera estar alterando las conclusiones. En este mismo sentido se puede inferir que el hecho de que los porcentajes de clasificaciones correctas disminuyeran para esta zona, cuando se usaron juveniles tardíos para el periodo 2012-2013, parece ser una primera evidencia que los niveles de mezcla de anchoveta en la zona de Atacama-Coquimbo (Zona II) podrían variar en una escala interanual. Esta hipótesis puede ser abordada analizando varios años, estudio que puede ser abordado debido a que los otolitos de juveniles de esta especie, derivados del monitoreo de la pesquería, permanecen almacenados y estarían disponible para análisis.

En un marco más general, los resultados demuestran la existencia unidades demográficas discretas en la zona norte (Zona I) y centro-sur de Chile (Zona III), hallazgo que sincroniza bien con los paradigmas recientes de filopatría en peces marinos (Bonanomi et al. 2016). Es importante subrayar que aunque estudios recientes han reportado evidencias empíricas de fidelidad a los sitios de desove en algunas especies, particularmente aquellas de gran tamaño (Rooker et al. 2008, Engstedt et al. 2014, Duponchelle et al. 2016), aún existe controversia entre los ecólogos marinos sobre los fundamentos teóricos detrás de hallazgos de filopatría en especies pelágicas con desove por expulsión y con progenie de tamaño pequeño al nacer (Bradbury & Laurel 2007, Svedäng et al. 2007, Bentzen & Bradbury 2016). Algunos estudios han propuesto que la fidelidad de los sitios de desove puede ser un mecanismo clave para explicar la extensa distribución latitudinal que se observa no sólo en la distribución de huevos y larvas sino también en la intensidad de desove en algunas especies pelágicas pequeñas (Brochier et al. 2009). Por ejemplo se ha sugerido que la filopatría ambientalmente-mediada pudiese ser más trascendental en especies donde los forzantes tienen cierta consistencia temporal y espacial, que es precisamente el caso de los ecosistemas que poseen eventos de surgencia, como es el caso del Sistema de Corriente de Humbolt. Más aún varios estudios han demostrado que en el SCH del Pacífico Sur las áreas principales de desove de anchoveta se concentran entre los 18-22 °S (Perú-Chile) y entre los 33-40 °S en el centro-sur (Castro & Hernandez 2000, Cubillos et al. 2007). Por consiguiente, es razonable inferir que es altamente ventajoso para esta especie adaptar su ciclo vida completo a las condiciones de un ecosistema único, el cual parece garantizar su sobrevivencia y sustentabilidad. Por otra parte, un hallazgo distintivo fue que las diferencias en el crecimiento de los otolitos tendieron a incrementarse con la edad, hasta aproximadamente los primeros 50 días de vida, que fue el último punto utilizado para realizar las comparaciones para el periodo 2015-2016. Este hallazgo resultó ser consistente con los resultados reportados para esta especie, donde se ha demostrado que entre los 30 y 50 días es donde se concentra el crecimiento máximo, pero a su vez donde se concentra la mayor variabilidad en una escala estacional (Cerna & Plaza 2016). Esto puede explicar también el aumento en la capacidad discriminatoria de las variables radio y grosor en el set de datos de hasta 50 días. En este mismo contexto, el análisis de la micro-estructura de otolitos de juveniles tardíos para el periodo 2012-2013, dejó en evidencia también, que las diferencias en el crecimiento, potencialmente modeladas por los forzantes ambientales se extienden incluso hasta fines del tercer mes de vida.

Las dimensiones de la sección nuclear no variaron significativamente entre las tres zonas analizadas, rechazando la hipótesis original de que el diámetro del otolito a la eclosión puede ser un marcador natural en un gradiente norte-sur para esta especie. Esto parece controversial debido a que se ha

demostrado que el diámetro del otolito a la eclosión en un proxy lineal del tamaño larval al nacer en una especie emparentada (Garrido et al. 2015) y que en teleósteos hay una relación directa entre el tamaño del huevo y el tamaño larval. Más aún se ha demostrado en esta especie que los embriones tienden a ser mayor en la zona norte presumiblemente debido a la influencia de la temperatura en las tasas de incubación (Llanos-Rivera & Castro 2004, 2006, Tarifeño et al. 2008). Adicionalmente se ha demostrado también en esta especie que existe un gradiente latitudinal incremental en el tamaño del huevo (Llanos-Rivera & Castro 2004, 2006). Por lo tanto, algunas explicaciones plausibles pueden ser esgrimidas para explicar la ausencia de capacidad discriminatoria de esta variable. Por una parte podría ser producto de problemas metodológicos asociados a la identificación de la marca de eclosión en secciones pulidas de otolitos sagitales de juveniles, en donde una segunda marca prominente que rodea la región del primordio es muy nítida. Alternativamente se debe tener en cuenta que los juveniles son aquellos ejemplares que sobrevivieron al periodo larval independiente de las condiciones geográficas, aspecto que puede explicar que las diferencias de tamaño al nacer pudiesen ser menos marcadas entre zonas.

3.5. Conclusiones

- Existió una elevada proporcionalidad entre el tamaño del otolito y las mediciones radiales derivadas de la micro-estructura, las cuales fueron independiente de la zona analizada, evidenciando que el crecimiento antero-posterior del otolito tiende a mantenerse constante.
- Un análisis de varianza de medidas repetidas evidenció que existieron diferencias significativas en los radios y grosores medios entre el primer y segundo mes de vida entre las tres zonas I, II y III, independiente del estado ontogenético (pre-recluta, recluta y adulto) y periodo analizado (2015-2016 vs 2012-2013).
- Se evidenció que las tres zonas estudiadas pudieron ser distinguidas significativamente mediante un análisis discriminante lineal, utilizando el radio y grosor como variables independientes, en el periodo de mayor crecimiento entre los primeros 20 y 50 días de vida para el periodo 2015-2016.
- Las funciones de clasificación derivadas del análisis de la MO de ejemplares juveniles de anchoveta recolectados en las zonas I, II y III permitieron re-clasificar correctamente un 80% de las muestras del periodo 2015-2016 y alrededor de un 73% de las muestras del periodo 2012-2013.

- El diámetro medio a la eclosión no varió significativamente entre zonas, descartándose como un variable discriminante potencial para evaluar estructura poblacional de esta especie.
- Utilizando los algoritmos de clasificación derivados del registro del radio y grosor de juveniles tempranos de origen conocido, fue posible clasificar adultos recolectados cercanos a las áreas de crianza de las tres zonas estudiada para el periodo 2015-2016, estimándose una completa separación entre los ejemplares de las Zona I y III.
- Se estimó que la zona de Atacama-Coquimbo (Zona II) contiene un porcentaje de alrededor de 35% de mezcla, de ejemplares provenientes mayoritariamente de la Zona I, mientras que una pequeña fracción de los ejemplares adultos que ocurren en esta misma zona provendrían de la Zona III.

4. Morfometría de otolitos

Francisco Cerna, Juan Carlos Saavedra, Cecilia Machuca, y Lizandro Muñoz.

División de Investigación Pesquera, Instituto de Fomento Pesquero.

4.1. Antecedentes

La morfometría y forma de los otolitos es específico de una especie (Hecht & Appelbaum 1982, Gaemers 1983) y también específico de una población en algunos casos (Neilson et al. 1985) La variación en la forma de los otolitos puede revelar la presencia de diferentes poblaciones en términos de su distribución geográfica (Bird et al. 1986, Campana & Casselman 1993, Begg & Brown 2000, Turan et al. 2006, Turan 2000). Las diferencias en las características morfológicas de los otolitos indican que las poblaciones pueden ocupar, por algunos periodos de su vida, diferentes ambientes (Begg et al. 1999, Cadrin 2000, Bergenius et al. 2005) y por lo tanto, tienden potencialmente a desarrollar diferentes características de historia de vida.

Las características morfométricas usadas como indicadores para identificar distintas poblaciones se resumen en tres categorías: 1) Las tradicionales medidas lineales de una dimensión, atributos relativos al tamaño, como longitud y ancho del otolito (Begg & Brown 2000, Bolles & Begg 2000) y distancias entre puntos específicos del otolito (Turan 2000, Turan et al. 2006). Así también, se incluyen medidas internas del otolito como la longitud del núcleo y ancho de las bandas hialinas e incrementos. 2) Comprende las medidas de tamaño en dos dimensiones como el área y perímetro (Campana & Casselman 1993, Begg & Brown 2000, Bolles & Begg 2000) y diferentes índices de forma que incluyen la circularidad, rectangularidad, elipticidad, excentricidad, redondez y factores de forma (Pothin et al. 2006). 3) Análisis del contorno del otolito en dos dimensiones usando análisis de frecuencia, por medio de transformadas de Fourier o Wavelets (Bird et al. 1986, Smith 1992, Campana & Casselman 1993, Begg & Brown 2000, Bergenius et al. 2005, Parisi-Baradad et al. 2005, Pothin et al. 2006, Turan et al. 2006). De todas las técnicas, el análisis o aplicaciones con variables geométricas para reconstruir el contorno de los otolitos, series de Fourier, ha entregado los mejores resultados, facilitado por el desarrollo de herramientas de análisis de imágenes (Cañas et al. 2012).

Los estudios de análisis morfométricos y de forma del otolito, como método de determinación de unidades poblacionales en peces, se sustentan en la naturaleza de formación de los otolitos que tiene una componente ontogenética y otra ambiental que influyen en una manera interactiva la forma del otolito potencialmente mediado por la tasa de crecimiento (Vignon, 2012). Es decir, aunque estas estructuras son especie-específica, las condiciones ambientales (bióticas y abióticas)

determinan diferencias intraespecíficas entre distintas regiones geográficas, que pueden expresarse desde temprana edad. En este sentido, nuestros análisis abarcaron peces juveniles y adultos, en el entendido que el estudio de la dinámica de cambio de la forma del otolito puede ser una manera interesante de abordar los estudios de unidades poblacionales, sin dejar a un lado la importancia del análisis de adultos, que corresponden al estado ontogenético más apropiado en este tipo de estudios, al corresponder a peces maduros.

4.2. Metodología de trabajo

4.2.1. Muestreo y preparación de otolitos

Se colectaron muestras de peces juveniles y adultos de anchoveta entre diciembre del 2015 y octubre del 2016 en las tres zonas de estudio. Los peces juveniles comprendieron a los ejemplares longitud total (LT) <12 cm. Se consideró adultos a todos los peces de talla $LT \geq 12$ cm. La Zona I incluyó las aguas costeras de las regiones de Arica y Parinacota, de Tarapacá y de Antofagasta, la Zona II las aguas costeras de las regiones de Atacama y Coquimbo; y la Zona III correspondió a las aguas costeras ubicadas entre las regiones de Valparaíso y Los Ríos. Como plataforma de muestreo de peces juveniles se utilizaron los cruceros hidroacústicos de reclutamiento que operaron entre diciembre del 2015 y febrero del 2016. Los adultos fueron colectados entre agosto y octubre del 2016 a bordo de embarcaciones artesanales usadas por IFOP en el monitoreo de condiciones reproductivas. Los otolitos colectados en el muestreo biológico fueron almacenados en compartimentos debidamente rotulados con un número de registro que permite asociar la estructura a los datos biológicos y de procedencia de cada pez. El medio de almacenamiento asegura que la estructura no se quiebre durante el transporte, de ocurrir esto en el momento del muestreo, este par de otolitos se elimina.

En el laboratorio los pares de otolitos de distintas áreas fueron seleccionados, lavados con agua destilada y revisados bajo microscopio estereoscópico, dejando para los análisis solo aquellas estructuras que no estuvieran dañadas. Los otolitos seleccionados fueron separados en envases distintos, destinando el otolito izquierdo para análisis morfométrico y microestructura; y el otolito derecho para química. El detalle de las muestras de otolitos que se analizaron mediante esta técnica, incluye una muestra complementaria de adultos del 2013 se presenta en la Tabla 32.

Tabla 32: Número de otolitos utilizados en el análisis de morfometría, clasificados por estado ontogenético, zona y localidad de procedencia, para los años 2016 y 2013. Se incluye en rango de longitudes de pez por cada estrato.

Estado Ontogenético	Zona	Localidad	2016			2013		
			n	Longitud pez (cm)		n	Longitud pez (cm)	
				min	-		max	min
Juveniles	I	Arica-Iquique	50	6,5	-	11,5		
		Antofagasta	92	4,0	-	9,5		
	II	Caldera	103	9,0	-	11,5		
		Coquimbo	69	6,5	-	11,5		
	III	Talcahuano	126	2,0	-	9,5		
		Valdivia	49	2,0	-	6,0		
Adultos	I	Arica-Iquique	51	12,0	-	14,0	32	14,0 - 14,5
		Antofagasta	46	12,0	-	14,0	18	14,0 - 14,5
	II	Caldera	53	12,0	-	14,0	20	14,0 - 14,5
		Coquimbo	55	12,0	-	14,0	30	14,0 - 14,5
	III	Talcahuano	45	12,0	-	14,0	21	14,0 - 14,5
		Valdivia	50	12,0	-	14,0	29	14,0 - 14,5

4.2.2. Análisis morfométrico de los otolitos

El otolito izquierdo fue fotografiado bajo microscopio estereoscópico con aumento 20X y luz reflejada. Para estandarizar la orientación de la estructura en el análisis, el otolito fue dispuesto con la cara externa hacia arriba y el rostro hacia adelante (Figura 42A). El otolito digitalizado fue posteriormente binarizado utilizando herramientas de procesamiento de imágenes (Figura 42B). La binarización del otolito se hace utilizando el software Image-Pro Plus (MediaCybernetics). Este proceso consiste en aplicar a cada imagen digitalizada un filtro para detectar la discontinuidad en la tonalidad de píxeles que componen el borde de la imagen del otolito. Posterior a esto, se convierte la imagen a escala de grises y se aplica una máscara del programa con el propósito de binarizar los píxeles de la imagen, es decir, transformar la imagen del otolito en color negro sobre el fondo blanco.

Una vez binarizados se procedió a efectuar la caracterización de la morfometría básica utilizando el módulo “count/size” del menú “Measure” del software Image-Pro Plus, para obtener medidas automáticas. Las medidas fueron tomadas en milímetros previa calibración

del “software” de acuerdo al aumento del microscopio estereoscópico. Estas medidas básicas fueron: largo máximo, ancho máximo, perímetro, área, largo de Feret, ancho de Feret.

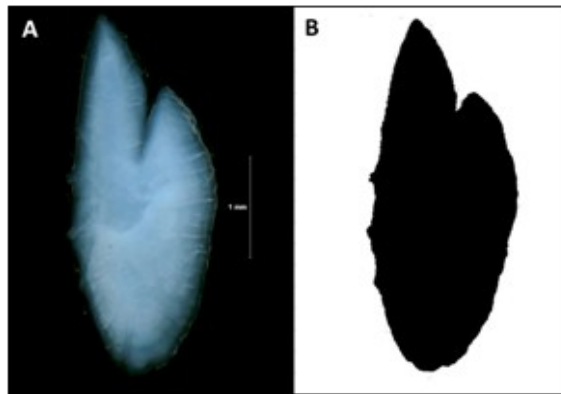


Figura 42 . Ilustración del proceso de digitalización de un otolito derecho de 3 mm de longitud, de un ejemplar de anchoveta de 13 cm de LT con el Programa Image-Pro Plus. (A) Otolito digitalizado en fondo oscuro; (B) imagen binarizada del otolitos convertido a “gray scale 8”.

Las seis variables morfométricas básicas fueron corregidas para evitar el efecto del tamaño del pez y el alométrico que ocurre durante el crecimiento del otolito (Lombarte & Lleonart 1993). Se estimó la relación potencial entre cada una de las variables y la longitud del pez, transformadas a logaritmo para homogenizar los residuos. Cada una de las medidas originales Y fue transformada en un Z de acuerdo con la siguiente ecuación (Lleonart et al. 2000):

$$Z_i = Y_i \left(\frac{X_0}{X_i} \right)^b$$

donde X_i es la longitud del otolito del espécimen i en la muestra; X_0 es la longitud total de pez que se usa como referencia. La longitud usada como referencia fue 11 cm LT, que corresponde a la talla media de la muestra.

Finalmente, los píxeles que conforman el contorno del otolito son exportados a un archivo de texto (*.txt) bajo una escala de coordenadas cartesianas, para ser leído por un programa de análisis numérico. En el proceso de obtención de coordenadas cartesianas (x,y) se emplea la macro “getaoipoints” del Software Image-Pro Plus que permite obtener de forma automática entre 1000 y 2000 coordenadas cartesianas que constituyen el contorno del otolito (Figura 43).

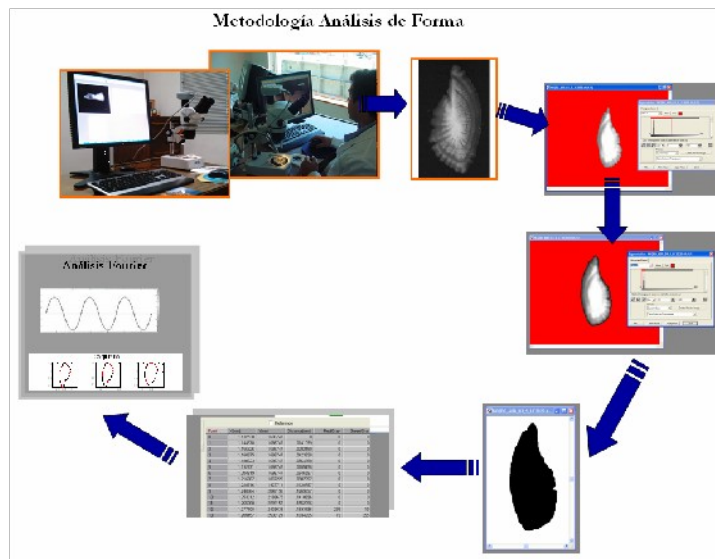
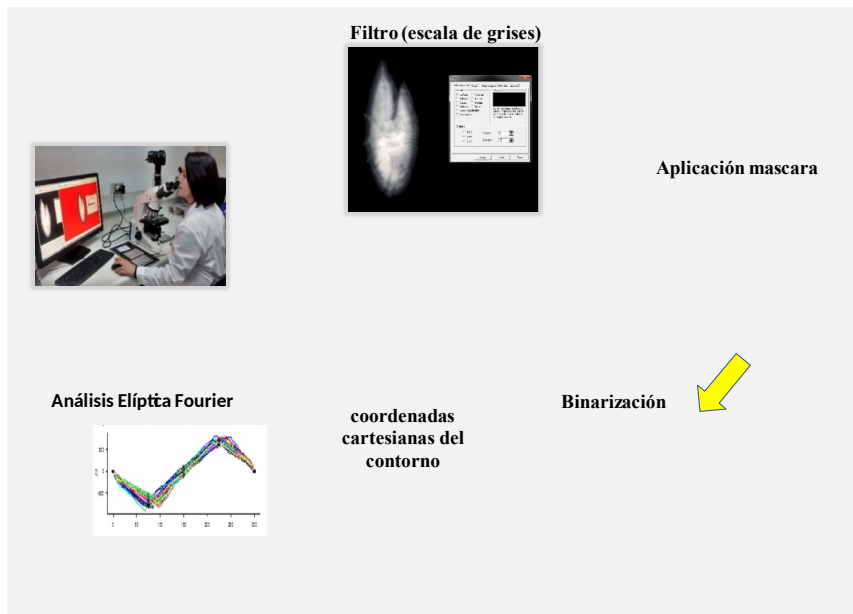


Figura 43: Diagrama que muestra en forma resumida la secuencia de pasos para preparar una imagen y obtener las medidas morfométricas básicas y las coordenadas cartesianas utilizadas en el análisis de forma del otolito empleando descomposición elíptica de Fourier.

i. Índice de Forma

Los cálculos de las medidas básicas permitieron estimar cinco índices de forma, a saber: Factor de forma, Redondez, Circularidad, Elipticidad, Rectangularidad, cuyas ecuaciones se resumen en la Tabla 33. La relación entre cada uno de los índices de forma y la longitud del pez fue descrita aplicando un Modelo aditivo generalizado (GAM) utilizando el paquete mgcv (Wood 2006), del software estadístico R. El modelo con distribución gamma y función identidad que

incluye la zona de procedencia como un factor, con el propósito de evaluar la existencia de diferencias significativas entre estas. La ecuación general del modelo es la siguiente:

$$\Theta(IF_{ij}) = \beta_0 + s(\text{long}_{ij}) + \text{Zona}_{ij}$$

donde Θ representa la función que permite enlazar la media y el modelo (función de enlace); IF corresponde al índice de forma; β_0 es el intercepto del modelo; s es una función suavizadora; $Zona$ representa la procedencia de la muestra con $j=1,2$ e i el i -ésimo individuo.

Este análisis fue realizado solo para las muestras colectadas en 2016 que incluye un amplio rango de distribución de tallas, desde 2,0 a 14,5 cm de longitud total. Esta distribución mostró la existencia de diferencias significativas entre distintas localidades ($F=231,1$; $P<0,00$) (Figura 44). El amplio rango de tallas de la muestra permitió analizar la dinámica de la forma del otolito a través de todos los estados ontogenéticos de anchoveta para cada una de las zonas de muestreo.

ii. Análisis de forma con elíptica de Fourier

El análisis elíptico de Fourier consiste en la descripción de una curva cerrada, en este caso el contorno del otolito caracterizado por coordenadas (x,y) equidistantes, por medio de la sumatoria infinita de elipses con diferentes amplitudes y ángulos. El objetivo del análisis es la descripción del contorno del otolito utilizando el mínimo número de elipses. Cada elipse del análisis de Fourier es llamado Descriptor elíptico de Fourier (DF) o simplemente armónico, ya que su forma funcional es por medio de funciones senos y cosenos. Debido a que la forma descrita por los DF es sensible a la orientación, tamaño y punto de partida de los pares ordenados (x,y) , se realizó un proceso de normalización siguiendo las recomendaciones de Kuhl & Giardina (1982). El proceso de normalización soslaya el sesgo en los DF debido a la correlación con otras variables morfológicas como la longitud del pez.

Para la descripción de los contornos se estimaron inicialmente un total de 200 DF, los que fueron calculados para cada otolito de acuerdo al algoritmo descrito por Claude (2008) en el software R (R Developed Team 2010), de forma de reproducir un alto porcentaje de la varianza de los DF. Como se indicó en la sección anterior, una descripción no sesgada del contorno, es alcanzado cuando el número de DF tiende a infinito. Por lo que, para estimar el número de DF suficientes para los análisis estadísticos, se realizó un análisis de poder, a partir del cual se pudo estimar que 20 DF o armónicos son suficientes para explicar el 95% de la varianza asociada al contorno del otolito (Figura 45). Posterior a la reconstrucción, 20 DF fueron utilizados para

clasificar y discriminar los diferentes contornos de otolitos por localidad y zona, para juveniles y adultos de anchoveta. Este análisis consistió en el ajuste de una función discriminante que permitieron predecir la clasificación de las variables categóricas o coeficientes de Fourier. Altos porcentajes de clasificación permitirán apoyar la separación de la forma de los contornos de los otolitos entre localidades y/o zonas.

Tabla 33: Variables morfométricas e índices descriptores de forma del otolito. Se incluyen las ecuaciones de cada índice. (Fuente: Modificada de Pothin *et al.*, 2006).

Variables morfométricas	Índices de Forma
Área (A)	Circularidad = P^2/A
Perímetro (P)	Rectangularidad = $A / (Fl*Fw)$
Feret length (Fl)	Factor de forma = $(4\pi*A)/P^2$
Feret width (Fw)	Redondez = $(4A)/(\pi*Fl^2)$
	Elípticidad = $(Fl-Fw)/(Fl+Fw)$

Para evitar el efecto de la talla sobre los contornos de los otolitos, el análisis discriminante de los descriptores de Fourier fue aplicado en juveniles en peces entre 6,5 a 9,5 cm LT, tallas presentes en todas las zonas de muestreo. En el caso de los adultos el intervalo de tallas usado en la muestra del 2016 fue 13,5 a 14,0 cm LT, en la muestra alternativa (control) del 2013 fue de 14,0 a 14,5 cm LT. La diferencia del intervalo de tallas de adultos se debe a la disponibilidad de muestras existentes el 2013, lo cual no debiera afectar el resultado, ya que ambos intervalos están por sobre la talla media de madurez sexual, en que la forma del otolito debiera ser más estable y contener el efecto modulador del crecimiento post-reproducción, como también del ambiente propio de cada localidad y/o zona.

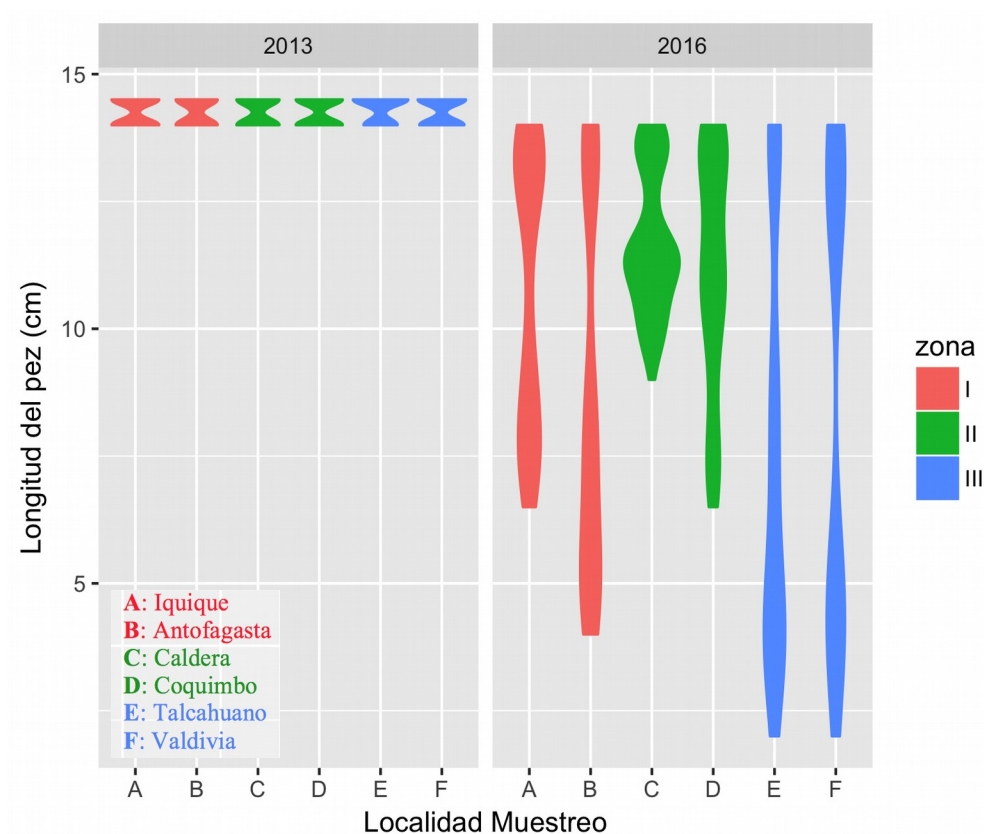


Figura 44: Distribución de la longitud total de los peces juveniles y adultos por localidad y zona, colectados el 2013 y 2016, utilizados en el análisis morfométrico de otolitos.

Los descriptores de Fourier permitieron también, utilizando la plataforma de R Project, reconstruir el contorno promedio de los otolitos para cinco estados ontogenéticos, a saber: Pre-Reclutas I (4,0-5,5 cm LT), Pre-Reclutas II (6,5-7,5 cm LT), Reclutas I (8,0-9,5 cm LT), Reclutas II (8,0-9,5 cm LT) y Adultos (13,5-14,0 cm) lo cual permite comparar en términos gráficos la deriva ontogenética de la forma del otolito entre las distintas zonas de estudio.

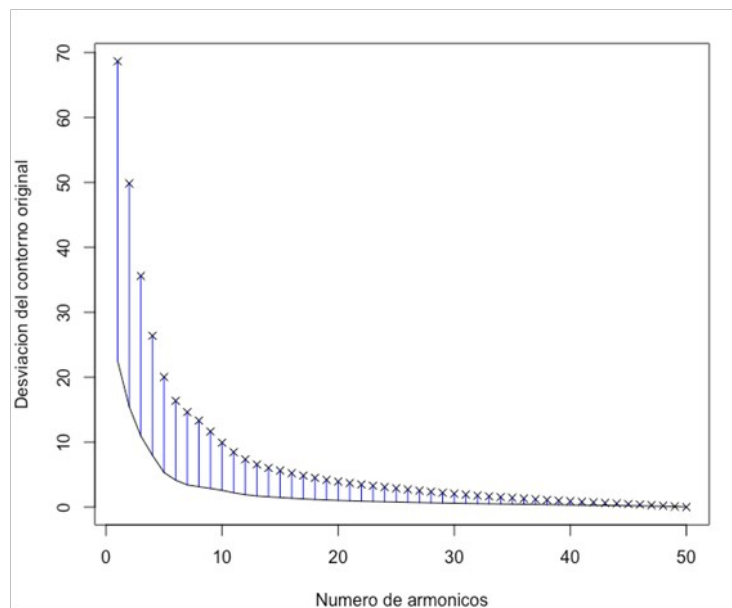


Figura 45: Porcentaje de desviación del contorno del otolito de anchoveta *Engraulis ringens* reconstituido con distinto número de armónicos (DF) respecto del contorno original. Sobre 20 armónicos la varianza explicada es mayor al 95%.

4.3. Análisis y discusión de resultados

En el análisis de morfometría de otolitos de anchoveta se asumió independencia de las observaciones, sin considerar la correlación existente entre muestras provenientes de un mismo lance.

4.3.1. Índices de Forma

El análisis de los índices de forma, consideró la agrupación de la muestra en cinco grupos arbitrarios asociados a los estados ontogenéticos, dos Pre-reclutas: 4,0-5,5 cm LT y 6,0-7,5; dos Reclutas: 8,0-9,5 y 10,0-11,0 y un adulto: 13,5-14,0 cm, correspondientes a muestras colectadas en 2016. A este grupo se agrega una muestra de adultos de 2013 (14,0-14,5 cm LT). El área, perímetro, largo y ancho del otolito varían entre estados ontogenéticos, aunque originalmente los valores promedio son directamente proporcionales al tamaño de los peces, al ser ponderados por una talla media, los valores son más próximos entre estados ontogenéticos o incluso tienden a ser más altos los observados en peces juveniles. En el caso de los índices de forma, debido a la estandarización de los indicadores básicos se eliminó el efecto del tamaño del pez sobre estos, siendo comparables entre zonas y estados ontogenéticos. En este sentido se puede observar, en pre-reclutas y reclutas, que los índices de forma presentan un gradiente latitudinal en el sentido norte-sur (Zona I a la III). Un gradiente de aumento del valor medio en el caso de la rectangularidad, circularidad, factor de forma y redondez, y por el contrario, un gradiente descendente en el valor medio de la elipticidad,

tendencia que para este índice se observa también en ejemplares adultos, aunque la diferencia se aprecia entre la Zona III respecto a la I y II que presentan la misma media. Los valores medios del resto de los índices, en los adultos, quiebra el patrón observado en juveniles, mostrando valores muy similares entre zonas, a excepción del factor de forma que en los adultos el gradiente se invierte, disminuyendo su valor medio desde la Zona I a la III. A modo de resumen de este análisis descriptivo, se puede sugerir que los otolitos de la Zona I y II son más elípticos y por tanto menos circulares que aquellos presentes en la Zona III, en un gradiente norte sur que es más acentuado en juveniles. Por otra parte, en adultos, los valores medios de los índices de forma son muy similares, no mostrando diferencias aparentes entre el 2013 y 2016 (Tabla 34).

Tabla 34: Variables morfométricas básicas e índices de forma de los otolitos de pre-reclutas y reclutas y adultos de anchoveta por zona de muestreo. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

Estado		Area		Perímetro		Largo		Ancho		Elipticidad		Rectangularidad		Circularidad		Factor de Forma		Redondez	
		Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.
PRE-RECLUTAS (4,0 - 5,5)	Zona I	0.41 ± 0.10		2.49 ± 0.35		0.94 ± 0.14		0.61 ± 0.06		0.22 ± 0.03		0.71 ± 0.01		15.39 ± 0.72		0.82 ± 0.04		0.58 ± 0.04	
	Zona II																		
	Zona III	0.18 ± 0.09		1.50 ± 0.35		0.54 ± 0.14		0.42 ± 0.08		0.12 ± 0.03		0.75 ± 0.02		13.30 ± 0.46		0.95 ± 0.03		0.75 ± 0.06	
PRE-RECLUTAS (6,0 - 7,5)	Zona I	0.97 ± 0.16		4.16 ± 0.44		1.59 ± 0.17		0.88 ± 0.07		0.30 ± 0.02		0.70 ± 0.01		17.95 ± 1.00		0.70 ± 0.04		0.48 ± 0.03	
	Zona II	1.00 ± 0.22		4.16 ± 0.53		1.60 ± 0.22		0.90 ± 0.08		0.28 ± 0.03		0.70 ± 0.02		17.50 ± 0.91		0.72 ± 0.04		0.50 ± 0.03	
	Zona III	0.71 ± 0.22		3.31 ± 0.66		1.26 ± 0.26		0.77 ± 0.12		0.25 ± 0.04		0.73 ± 0.01		15.68 ± 1.07		0.80 ± 0.06		0.56 ± 0.06	
RECLUTAS (8,0 - 9,5)	Zona I	1.30 ± 0.18		4.99 ± 0.44		1.91 ± 0.17		0.98 ± 0.07		0.33 ± 0.02		0.70 ± 0.01		19.24 ± 0.98		0.65 ± 0.03		0.45 ± 0.03	
	Zona II	1.66 ± 0.30		5.60 ± 0.59		2.20 ± 0.26		1.08 ± 0.08		0.35 ± 0.03		0.70 ± 0.02		19.01 ± 1.15		0.66 ± 0.04		0.43 ± 0.03	
	Zona III	1.22 ± 0.14		4.66 ± 0.36		1.81 ± 0.15		0.96 ± 0.05		0.32 ± 0.03		0.72 ± 0.01		17.82 ± 0.90		0.71 ± 0.03		0.48 ± 0.03	
RECLUTAS (10,0 - 11,0)	Zona I	2.53 ± 1.01		6.93 ± 1.35		2.80 ± 0.66		1.28 ± 0.22		0.38 ± 0.04		0.70 ± 0.01		19.65 ± 0.58		0.64 ± 0.02		0.40 ± 0.03	
	Zona II	2.12 ± 0.25		6.45 ± 0.49		2.59 ± 0.20		1.18 ± 0.07		0.38 ± 0.02		0.71 ± 0.02		19.66 ± 1.30		0.64 ± 0.04		0.40 ± 0.02	
	Zona III																		
ADULTOS 2016 (13,5 - 14,0)	Zona I	3.72 ± 0.25		8.73 ± 0.41		3.59 ± 0.15		1.49 ± 0.06		0.41 ± 0.02		0.69 ± 0.02		20.54 ± 1.46		0.61 ± 0.04		0.37 ± 0.02	
	Zona II	3.48 ± 0.32		8.61 ± 0.44		3.50 ± 0.20		1.46 ± 0.07		0.41 ± 0.02		0.68 ± 0.02		21.36 ± 1.28		0.59 ± 0.03		0.36 ± 0.02	
	Zona III	3.53 ± 0.38		8.69 ± 0.54		3.47 ± 0.21		1.48 ± 0.09		0.40 ± 0.02		0.69 ± 0.02		21.48 ± 1.33		0.59 ± 0.04		0.37 ± 0.02	
ADULTOS 2013 (14,0 - 14,5)	Zona I	3.66 ± 0.26		8.66 ± 0.39		3.59 ± 0.15		1.48 ± 0.06		0.42 ± 0.02		0.69 ± 0.02		20.50 ± 1.42		0.62 ± 0.04		0.36 ± 0.02	
	Zona II	3.44 ± 0.26		8.53 ± 0.52		3.48 ± 0.16		1.44 ± 0.07		0.42 ± 0.02		0.69 ± 0.02		21.17 ± 1.73		0.60 ± 0.05		0.36 ± 0.02	
	Zona III	3.48 ± 0.24		8.61 ± 0.57		3.44 ± 0.15		1.47 ± 0.07		0.40 ± 0.02		0.69 ± 0.02		21.33 ± 2.22		0.59 ± 0.05		0.38 ± 0.02	

Los índices de redondez y factor de forma descienden a medida que aumenta la longitud del pez, la circularidad y elipticidad lo hacen en sentido inverso. El análisis GAM de los índices de forma de 2016 para todas las zonas agrupadas, muestra sólo una leve estabilización de la forma del otolito o asintoticidad de los índices respecto al tamaño de los peces, entre 8 a 10 cm LT. Aunque el cambio es más pronunciado entre los 4 y 8 cm de LT, la tendencia general es hacia un cambio continuo de

los índices de forma al menos hasta los 14 cm (Figura 46). Los análisis de devianza del GAM de los índices de forma con respecto a la longitud del pez muestran diferencias significativas entre la Zona III con la Zona I. Por el contrario, entre la Zona I y II sólo se registraron diferencias significativas para el factor de forma, elipticidad y redondez del otolito. Los análisis presentaron buenos ajustes para la mayoría de los índices de forma con más del 88% de la devianza explicada, a excepción de la rectangularidad cuya devianza explicada fue del 62,8% (Tabla 35; Figura 46).

Tabla 35: Resumen del análisis de devianza de los modelos aditivos generalizados (GAM) de cada índice de forma en su relación con la longitud del pez entre zonas de muestreo. La Zona I corresponde a las localidades de Arica-Antofagasta; Zona II a Atacama-Coquimbo y Zona III a Valparaíso-Valdivia.

Índice	Factor	Estimación	E.E	t _{valor}	P _{valor}
Factor de Forma	Intercepto	0,684	0,003	245	<2e-16
	Zona II	0,009	0,004	2	0,043
	Zona III	0,039	0,004	9	<2e-16
	Log Like	1427,9			
	Devianza %	91,1			
Circularidad	Intercepto	1,892	0,076	248892	<2e-16
	Zona II	-0,205	0,120	-1714	0,087
	Zona III	-0,961	0,101	-9531	<2e-16
	Log Like	-1165,2			
	Devianza %	88,8			
Rectangularidad	Intercepto	0,705	0,001	567309	< 2e-16
	Zona II	-0,002	0,002	-1051	0,293
	Zona III	0,013	0,002	7558	1,2E-13
	Log Like	2058,3			
	Devianza %	62,8			
Redondez	Intercepto	0,458	0,002	196	< 2e-16
	Zona II	0,012	0,004	3	0,001
	Zona III	0,049	0,003	15	< 2e-16
	Log Like	1574,9			
	Devianza %	94,9			
Elipticidad	Intercepto	0,334	0,002	198	< 2e-16
	Zona II	-0,009	0,003	-3	0,001
	Zona III	-0,032	0,002	-13	< 2e-16
	Log Like	1824,9			
	Devianza %	95,2			

El análisis descriptivo de los promedios de variables morfométricas básicas (área, perímetro, largo, ancho) y los índices de forma (factor de forma, circularidad, rectangularidad, redondez y elipticidad) del otolito entre distintos estados ontogenéticos permitió evidenciar las variaciones que se explican, en la existencia de características propias de los otolitos en cada zona. Un ejemplo de esto se observa en que los otolitos de la Zona III, de pre-reclutas y reclutas hasta los 9,5 cm, presentan índices como factor de forma, redondez y circularidad que los caracteriza como otolitos más circulares que aquellos correspondientes a peces de la Zona I y II. Incluso podríamos afirmar que existe un gradiente latitudinal de esta característica, ya que los otolitos de la Zona II son más circulares que los de la Zona I. Coherente con esto los otolitos de pre-reclutas y reclutas de la Zona I son más elípticos, debido a que presentan valores más altos en el índice de elipticidad, que los peces correspondientes a la Zona III.

Con el análisis del perfil de cambio de los índices de forma con respecto a la longitud del pez, a través de un modelo GAM, se buscó identificar la longitud a la cual la forma del otolito de anchoveta se estabiliza (Tuset et al. 2003, Curin-Osorio et al. 2012). Los resultados mostraron una leve estabilización o disminución de la velocidad del cambio en la forma del otolito, justo antes de la talla media de madurez, sin embargo, la forma del otolito del individuo adulto de anchoveta continúa cambiando después de alcanzar la talla media de madurez, al menos hasta los 14 cm LT. Aunque la forma del otolito de anchoveta no es totalmente estable en la etapa adulta, esta situación fue sobrellevada en nuestro análisis de forma (elíptica de Fourier) utilizando ejemplares que hubieran superado la talla media de madurez y de un rango de longitudes muy estrecho, no superior a 0,5 cm, que permitiera evitar el efecto del tamaño del pez sobre la forma del otolito. Estos criterios son suficientes, ya que en la mayoría de los estudios son utilizados y forman parte de las condiciones necesarias de la muestra de otolitos usada en estudios de morfometría para estimar unidades poblacionales (Cadrin 2000). Aun así, en el caso particular de *Engraulidos* hay excepciones como por ejemplo los estudios de Zengin *et al.* (2015) y Jemaa *et al.* (2015), quienes para determinar unidades poblacionales de *Engraulis encrasicolus* utilizaron ejemplares de 11 a 12 cm LT, que aún no habían superado la talla media de madurez y de igual forma obtuvieron resultados satisfactorios en la discriminación de poblaciones en el Mar Negro y Mediterráneo.

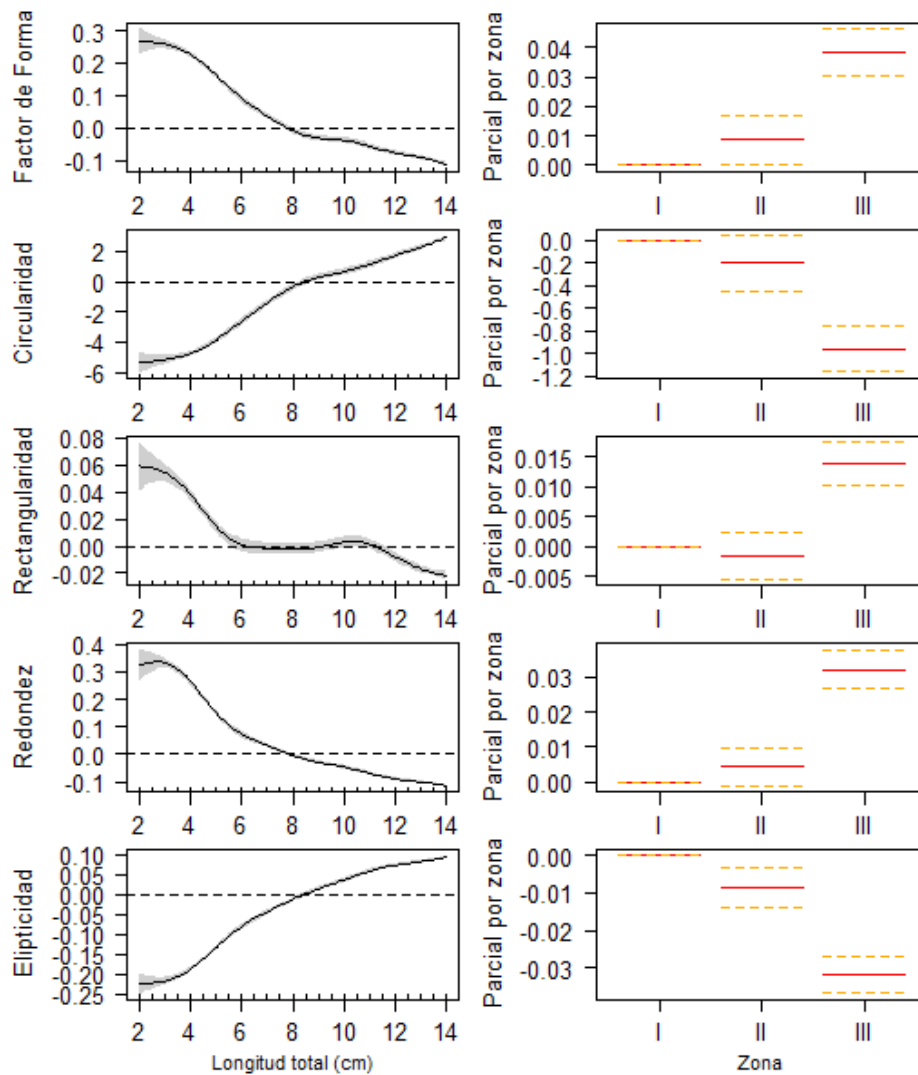


Figura 46: Gráficas de la izquierda ilustran el modelado GAM para el factor de forma, redondez, elipticidad, circularidad y rectangularidad como una función no-lineal de la longitud total de anchoveta de la Zona I (Arica-Antofagasta), Zona II (Atacama-Coquimbo) y Zona III (Valparaíso-Valdivia).

El factor de forma y redondez están asociados a la forma circular perfecta del otolito cuando su valor es cercano a uno, los valores medios de estos índices muestran una media más cercana a uno en otolitos de peces pre-reclutas y adultos de la Zona III. La circularidad está asociada también al círculo perfecto, aunque en otra magnitud cercana a 8π , la que también es propia de pre-reclutas y adultos de la Zona III. La elipticidad muestra diferencias significativas entre la Zona III y Zona II con respecto a la Zona I, confirmando lo observado en el análisis descriptivo de la media índices, que muestra que otolitos de la Zona I son más elípticos que aquellos provenientes de la Zona II y III. En el caso de la rectangularidad existen solo diferencias entre la Zona III con la Zona I, siendo más rectangulares los otolitos de esta última zona.

El GAM usando como factor la zona, aísla del modelo el efecto debido a la talla del pez sobre los índices permitiendo que la zona actué como predictor de éstos. En este análisis el ANDEVA que incluyó la zona como factor predictor de los índices de forma, evidenció la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas para dos índices, a saber: factor de forma y elipticidad. La circularidad redondez y rectangularidad solo mostró diferencias entre la zona III con respecto a la zona I, entre la zona I y II no existieron diferencias significativas. Este resultado es un buen indicador preliminar de las diferencias entre zonas, que muestra el factor de forma, redondez y la elipticidad como un carácter distintivo entre las tres zonas de estudio.

4.3.2. Análisis de elíptica de Fourier

El resultado del análisis discriminante de los DF correspondiente a los otolitos de anchoveta juvenil del 2016, para el rango de tallas (6,5 a 9,5 cm LT) en que existieron muestras de las tres zonas estudiadas, permitió clasificar la forma de otolitos por zona con dos funciones que explicaron el 79 y 21% de la varianza con una correlación canónica de 0,88 y 0,69 respectivamente. La primera función discriminante fue significativa con un Lambda de Wilks de 0,117 ($P < 0,000$), la segunda función presentó un Lambda de Wilks moderadamente alto de 0,521 ($P = 0,241$), lo cual significa que existe un nivel de sobreposición entre los grupos en el promedio de las variables en esta función. Estas funciones permitieron clasificar correctamente el 89% de los casos agrupados originalmente, donde en la Zona III fue clasificada correctamente en 95% de los casos (Tabla 36; Figura 47).

Tabla 36: Matriz de clasificación de otolitos de anchoveta juvenil de 2016 (longitud 6,5 a 9,5 cm LT) para las zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

	Zona	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
		I	II	III	
Recuento Original	I	74	10		84
	II	5	35	1	41
	III	1	1	41	43
Porcentaje	I	88,1	11,9		100
	II	12,2	85,4	2,4	100
	III	2,3	2,3	95,3	100

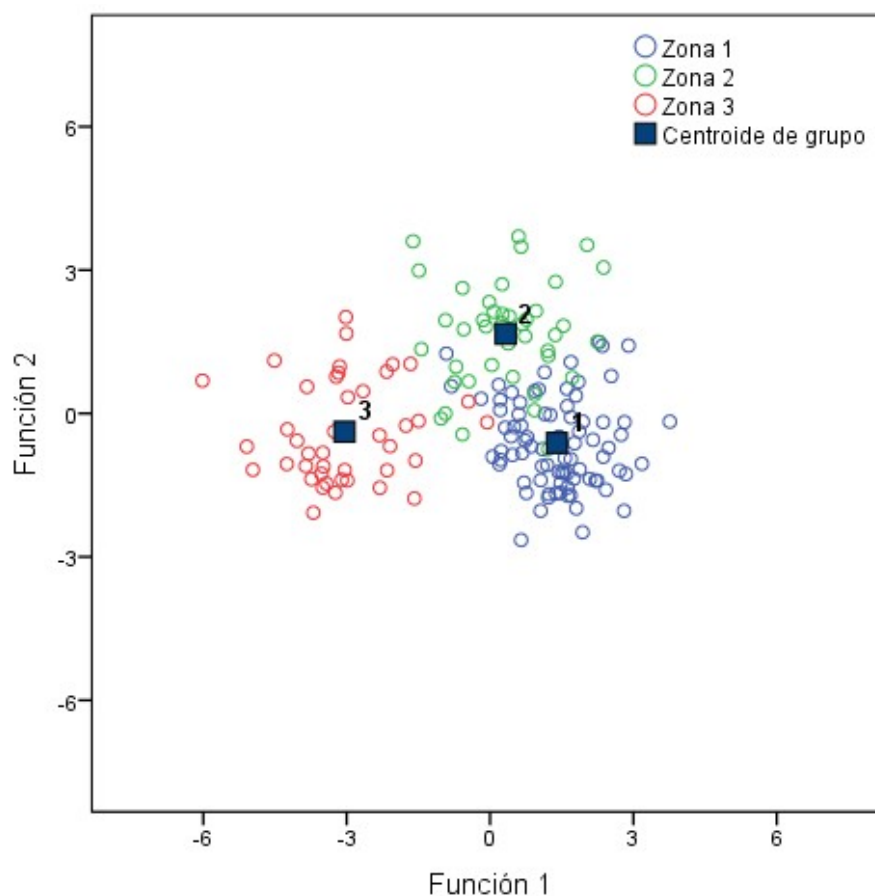


Figura 47: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta juvenil de 2016 para las tres zonas de muestreo analizadas; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

El análisis discriminante de los DF de los otolitos de anchoveta adulta del 2016 para el rango de tallas entre 13,5 y 14,0 cm LT, permitió clasificar la forma de otolitos por zona con dos funciones que explicaron el 67 y 33% de la varianza con una correlación canónica de 0,78 y 0,57, respectivamente. La primera función discriminante fue significativa con un Lambda de Wilks de 0,222 ($P < 0,000$), la segunda función presentó un Lambda de Wilks de 0,568, en el límite de error que estamos dispuestos a aceptar ($P = 0,053$). Estas funciones permitieron clasificar correctamente el 85% de los casos agrupados originalmente, donde las zonas alcanzaron valores de clasificación sobre el 81% de los casos (Tabla 37; Figura 48).

Tabla 37: Matriz de clasificación de los otolitos de anchoveta adultas de 2016, para las tres zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

	Zona	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
		I	II	III	
Recuento Original	I	59	8	3	70
	II	5	61	9	75
	III	4	3	58	65
Porcentaje	I	84,3	11,4	4,3	100
	II	6,7	81,3	12,0	100
	III	6,2	4,6	89,2	100

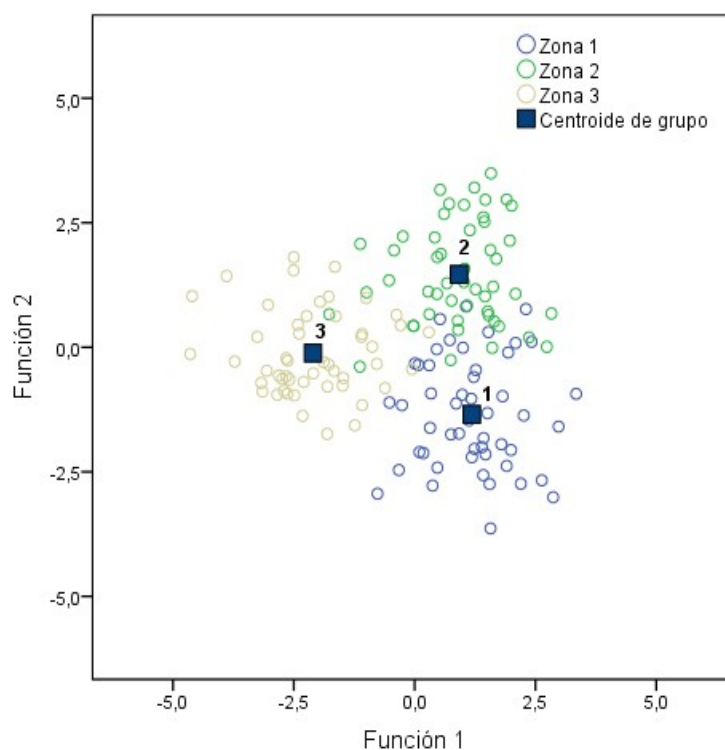


Figura 48: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta adulta de 2016 para las tres zonas de muestreo: Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

El resultado del análisis discriminante de los DF correspondiente a los otolitos de anchoveta adulta del 2013, permitió clasificar la forma de otolitos por zona con dos funciones canónicas de las cuales la primera explicó el 63% de la varianza con una correlación canónica sobre 0,83 la segunda función explicó el 37% restante con una correlación canónica de 0,76. El contraste entre la función 1 y 2 con el test Lambda de Wilks muestra que la primera función fue altamente significativa ($P < 0,0001$), lo que indica que la capacidad explicativa de esta función es adecuada. La segunda función presentó

un error mayor que 0,05 con un $P=0,072$, lo que confiere una menor confianza a la predicción, que se puede apreciar gráficamente en un nivel de mayor sobreposición entre los grupos de las variables en esta función. Estas funciones permitieron clasificar correctamente el 90% de los casos agrupados originalmente, donde las localidades tuvieron porcentajes de clasificación sobre el 87% de los casos (Tabla 38, Figura 49).

Tabla 38: Matriz de clasificación de otolitos de anchoveta adultas de 2013, para las tres zonas de muestreo; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

		Grupo de pertenencia pronosticado			Total
		Zona I	Zona II	Zona III	
Recuento Original	I	45	5		50
	II	3	44	3	50
	III	1	3	46	50
Porcentaje	I	90,0	10,0	0,0	100
	II	6,0	88,0	6,0	100
	III	2,0	6,0	92,0	100

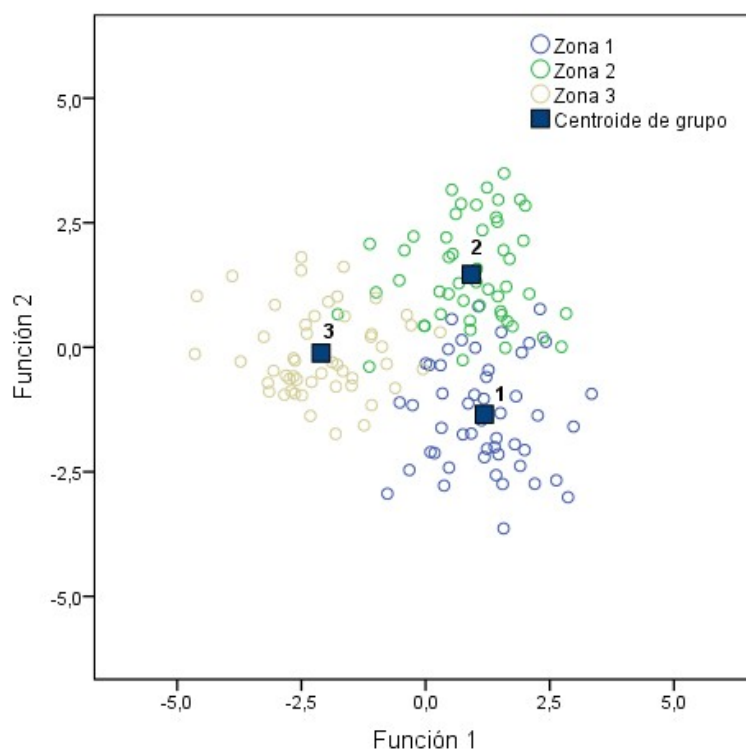


Figura 49: Ploteo de los puntajes de la primera y segunda función discriminante obtenidos desde las variables de forma del otolito (descriptores de Fourier) de anchoveta para las tres zonas de muestreo en 2013; Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Talcahuano-Valdivia.

Las diferencias en la forma del otolito entre las distintas zonas de muestreo está influida por el impacto del crecimiento, como variable modulada por el efecto del ambiente. Esto se aprecia con más claridad en los otolitos de la Zona III (Talcahuano-Valdivia) que a una misma longitud del pez presentan un menor tamaño que los otolitos de las Zonas I y II, al menos en la etapa de pre-recluta, es decir antes de los 8 cm LT, lo cual se puede apreciar en forma gráfica en la reconstrucción de la forma promedio del otolito a partir de los descriptores de Fourier (Figura 50).

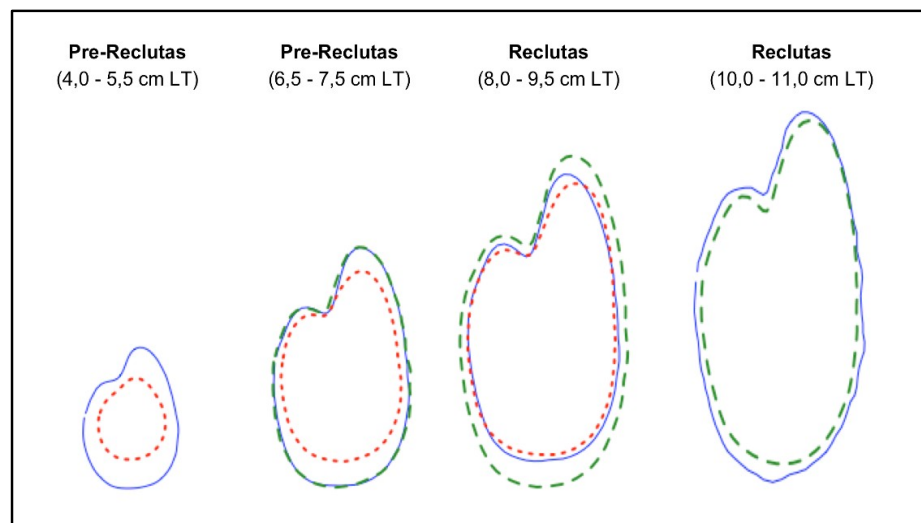


Figura 50: Reconstrucción de la forma del otolito promedio de anchoveta para cuatro rangos de longitudes que representan dos estados ontogenéticos de anchoveta para cada zona de muestreo, estimados a partir de los descriptores de Fourier. La línea azul sólida corresponde a la Zona I, la verde cortada a la Zona II y la roja punteada a la Zona III

La reconstrucción gráfica del otolito promedio para cada zona y estados ontogenéticos, pre-reclutas y reclutas, desde los 4 a 11 cm LT, es coincidente con los resultados de los índices de forma promedio, el análisis de GAM y funciones discriminantes en juveniles, evidenciando las diferencias existentes en el contorno del otolito entre las distintas zonas de estudio, con otolitos más pequeños y circulares en la Zona III y más elíptico en las Zonas I y II. La descripción de los cambios en su ontogenia varía desde una forma más circular en la etapa pre-recluta, propio de su proximidad con el estado larval, a formas más irregulares en la etapa recluta, características de una forma adulta de anchoveta, a su vez las diferencias en el contorno entre zonas son mayores en los estadios pre-reclutas que en los reclutas y adultos.

El análisis de elíptica de Fourier fue realizado para el rango completo de peces, juveniles y adultos, correspondientes a seis localidades que pueden ser agrupadas de acuerdo a su proximidad geográfica en tres zonas de interés, que actualmente corresponden a tres principales stocks pesqueros de anchoveta en la costa de Chile. El análisis discriminante de los DF en peces juveniles, mostró una alta clasificación de los casos a su grupo zona de origen, con valores sobre el 85%. Este resultado es similar al obtenido con el análisis GAM, lo que sugiere que la forma del otolito de anchoveta juvenil no solo varía con el tamaño del pez, sino que también entre zonas geográficas al menos entre los 6,5 y 9,5 cm LT.

El análisis discriminante de los DF de otolitos de peces adultos del 2016 para las tres zonas estudiadas, mostró la existencia de un alto poder de clasificación de los otolitos a su zona de origen con dos funciones. Este resultado fue similar al obtenido desde el análisis discriminante de los DF de adultos de 2013, que se aplicó para tener un control respecto del análisis de 2016 que fue un año sujeto al efecto del fenómeno ENSO (El Niño), con una clasificación de los peces a su zona de origen superior al 81%.

Este último resultado muestra a su vez que el efecto del evento “El Niño” 2014-2016, no muestra un impacto en la clasificación de los peces a su zona de origen, usando la forma del otolito como variable clasificatoria. Lo cual sugiere la ausencia de un movimiento generalizado de cardúmenes en sentido norte-sur durante los años en que, por efecto del evento ENSO “El Niño”, ingresan masas de aguas cálidas procedentes del norte. Esto parece coherente con los hallazgos reportados en los cruceros acústicos de reclutamiento, que ha observado un cambio en la distribución batimétrica del recurso, que en condiciones aguas cálidas por efecto del evento “El Niño”, permanecen en zonas más profundas de la columna de agua (Castillo et al. 1998, Leiva et al. 2016).

Los resultados logrados en el análisis de DF de adultos de 2016 como de 2013, muestran un alto poder discriminante del contorno de los otolitos para separar unidades poblacionales de anchoveta (*E. ringers*), entre zonas de la costa de Chile desde Arica a Valdivia. En *E. encrasicolus* porcentajes de clasificación de 81 al 85%, han sido suficientes para diferenciar cuatro poblaciones, dos al norte y dos al sur en el Mar Mediterráneo (Jemaa et al. 2015). Esto verifica que las características de la forma y/o contorno de los otolitos del género *Engraulis* tienen un efecto importante del ambiente de su hábitat preferente, que permite diferenciar unidades demográficas independientes.

El análisis de la forma de los otolitos de anchoveta de Chile, sugiere la existencia de diferencias fenotípicas entre las tres zonas estudiadas, que pueden ser consideradas como unidades demográficas independientes. Sin embargo, hay que tener en consideración que la alta clasificación

de los peces a su lugar de origen, no quiere decir que estos estén totalmente aislados y no sean objeto de migraciones entre localidades, que aunque limitados, podrían conferir cierto nivel de mezcla en periodos específicos o etapas de su historia de vida. Aunque diferencias fenotípicas no proveen evidencia directa de aislamiento genético entre stocks, ellos pueden indicar una prolongada separación de estos peces en diferentes hábitats (Reiss et al. 2009).

La forma del otolito, entre otras características fenotípicas, son el reflejo de un efecto combinado de variación genética y factores ambientales locales (Tudela 1999, Torres et al. 2000, Vignon & Morat 2010). Muchos estudios muestran que el ambiente del hábitat induce importantes cambios en la forma del otolito (Lombarte & Lleonart 1993, Cardinale et al. 2004, Vignon 2012). En nuestro estudio, las tres unidades demográficas observadas, a partir del análisis de forma de los otolitos, podrían estar asentadas en diferencias ambientales propias de cada zona, con distinto nivel de productividad originadas por fenómenos de surgencia, temperaturas, niveles de clorofila *a* y/o factores físicos y topográficos con características propias, como la zona de transición costera (ZTC) entre los 34 y 39°LS (Morales et al. 2010) o la existencia de una latitud crítica (~22,8°S) de transición que opera como una barrera, donde las bahías de Mejillones y Moreno, al sur de esta latitud muestran altas concentraciones de clorofila durante todo el año con retención de aguas surgentes debido al efecto topográfico e independientes del transporte de Ekman característico de aguas adyacentes (Letelier et al. 2012), que podrían conferir incluso una característica propia a la zona de Antofagasta distinta a Atacama-Coquimbo, e incluso a Arica-Iquique, elementos que habría que estudiar en mayor profundidad.

4.4. Conclusiones

- El ANDEVA del GAM que incluyó la zona como factor predictor de los índices de forma, evidenció para el factor de forma, redondez y elipticidad la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas. Este resultado es consistente con el análisis descriptivo, que sugiere la existencia de un gradiente latitudinal de norte a sur en la elipticidad de los otolitos, siendo los otolitos de peces de la Zona I más elípticos que aquellos provenientes de la Zona II y III. En forma inversa los otolitos de la Zona III son más próximos a la forma circular que aquellos provenientes de la Zona II y I.
- El análisis discriminante de los DF en peces juveniles de 2016 como adultos de 2016 y 2013 mostró la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas, con altos porcentajes de clasificación a su zona de origen, mayores al 81%, lo cual

sugiere que la Zona I (Arica-Antofagasta), II (Atacama-Coquimbo) y III (Talcahuano-Valdivia) corresponde a unidades demográficas independientes.

- El resultado similar entre el 2016 (año con ENSO “El Niño”) y el 2013 (año neutro, sin fenómeno ENSO), sugiere la ausencia de un movimiento generalizado de cardúmenes en sentido norte-sur durante los años en que, por efecto del evento ENSO “El Niño”, ingresan masas de aguas cálidas procedentes del norte.

5. Marcadores moleculares

Sandra Ferrada Fuentes¹, Victoria Herrera¹, Rocio Barrios Figueroa¹, Cristian Canales-Aguirre², Ricardo Galleguillos^{1*}

¹Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción

²Centro i~mar, Universidad de Los Lagos

*Jefe de Proyecto

5.1. Introducción

Un aspecto fundamental para la evaluación y manejo de las poblaciones explotadas es la identificación y evaluación de la conectividad entre unidades evolutivas afectadas por extracción pesquera. La unidad evolutiva es la unidad básica sobre la cual se reconocen otras unidades ecológicamente relevantes, sobre las cuales se aplicarán las evaluaciones y las medidas de ordenamiento. El concepto de unidades evolutivas se refiere a poblaciones con dinámicas evolutivas independientes que conforman un pool génico particular (Luck et al. 2003). Este concepto es muy similar al de stock genético, el cual indica que un stock genético se refiere a una población que evolucionó independientemente de otras y que, por lo tanto, acumuló diferencias genéticas con respecto a ellas (Spanakis et al. 1989). La estimación del grado de conectividad a través del rango de distribución de especies comercialmente importantes o que se encuentran amenazadas, ha tenido gran interés, pues para un manejo efectivo de estos recursos es requisito el conocimiento de los patrones de estructuración temporal y espacial, así como la identificación de unidades evolutivamente significativas (ESU del inglés Evolutionary Significant Units, ver Ryder (1986). Desde una perspectiva genética, una alternativa para evaluar las diferencias poblacionales es examinar el grado de divergencia entre poblaciones, lo que refleja el balance entre los procesos potencialmente diversificadores de la deriva génica y la selección, versus, el efecto homogenizador del flujo génico.

Más allá de las variadas acepciones teóricas de las ESUs, de Guia & Saitoh (2007) y Casacci et al. (2014) presentan una amplia revisión y discusión sobre las diferentes definiciones de ESU que se han adoptado a través del tiempo, haciendo comparaciones entre ellas, para mostrar las fortalezas y debilidades de cada una. Es en estas revisiones que se demuestra que la definición enunciada por Moritz (1994) es la más utilizada por los investigadores, aludiendo que sería la definición más objetiva desde un punto de vista teórico y operacional en donde unidad evolutiva correspondería a “aquellas poblaciones que muestran patrones de monofilia recíproca en linajes del ADN mitocondrial y diferencias significativas en las frecuencias alélicas de loci nucleares”

Para identificar y caracterizar unidades evolutivas, se han utilizado diversas fuentes de evidencia genética a través de la historia. En general, podemos indicar marcadores de origen mitocondrial y nuclear, y el uso de uno u otro, u ambos va a depender de la problemática biológica que se plantee. Generalmente genes de origen mitocondrial han sido utilizados principalmente en responder preguntas en un contexto de filogeografía (Wang 2010) y por otro lado marcadores nucleares altamente repetitivos como los microsátélites han sido utilizados para responder preguntas en un contexto histórico reciente, recapitulando información estimada de 10-100 generaciones (Selkoe & Toonen 2006).

Los microsátélites son uno de los marcadores genéticos más utilizados en la evaluación de unidades poblacionales y determinación de variabilidad genética (Jarne & Lagoda. 1996). Los marcadores moleculares tipo microsátélites (SSRs: Simple Sequence Repeats; STRs: Short Tandem Repeats) corresponden a regiones no codificantes, de origen y función aún desconocida, salvo algunas excepciones. Estas regiones están compuestas por motivos básicos de repetición de 1-6 nucleótidos de largo, organizados en bloques con 5-50 repeticiones en serie. Se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma de organismos eucariontes y procariontes (Zane et al. 2002), donde es posible observar una región microsátélite cada 10 kilobases. Estos marcadores moleculares responderían a un modelo de herencia mendeliana codominante (De Woody & Avise 2000), con un elevado polimorfismo, lo que explica su frecuente utilización en estudios poblacionales (Selkoe & Toonen 2006). A pesar de la gran importancia y utilidad de los microsátélites como marcadores moleculares para estudios de estructuración genética poblacional, entre otros (Jarne & Lagoda. 1996) el uso de dichos marcadores moleculares en teleósteos es escaso en comparación con otras categorías taxonómicas, no existiendo reporte de aislamiento y caracterización de loci microsátélites específicos para *E. ringens*. Por esta razón, se propone desarrollar y aplicar microsátélites especie específicos para *E. ringens*. Esto a pesar de la disponibilidad de microsátélites heterólogos, pues se considera que la utilización de estos, podría afectar las estimaciones de diversidad y divergencia genética, evidenciándose un mayor número de loci polimórficos, mayor riqueza alélica, e incrementando los estimados de la heterocigosidad observada (Meneses et al. 2010).

Habida cuenta de la escasa evidencia de diferenciación genética encontrada para esta especie, en la costa chilena (Galleguillos et al. 1996, Ferrada et al. 2002) y peruana (Rojas 2010), y la necesidad de racionalizar los recursos disponibles para el proyecto, nuestro análisis molecular se concentrará en la comparación de las dos zonas de estudio más extremas: Zonas I y III (Figura 1), que es donde se esperaría encontrar mayores diferencias moleculares entre grupos. De esta manera, buscaremos desafiar la hipótesis vigente de panmixia (unidad evolutiva única), utilizando muestras de estas dos

zonas contrastantes y marcadores moleculares de tipo microsatélites, desarrollados específicamente para *E. ringens*.

5.2. Metodología

5.2.1. Número de muestras

Considerar en el diseño de muestreo la cantidad de individuos necesarios para una correcta identificación y delimitación de unidades evolutivas y demográficas es un aspecto importante para evitar sesgos en las posteriores estimaciones. En términos, genéticos, para marcadores moleculares tipo microsatélites del ADN nuclear, consideraciones teóricas (Pamilo & Nei 1988) establecen que la resolución y calidad de los datos mejora si se examina un gran número de loci; esto es particularmente cierto si los loci examinados exhiben moderados niveles de diversidad alélica. Así, el número de individuos a ser muestreados dependen principalmente del número de alelos presentes en cada locus examinado. Cuando la diversidad alélica es baja, pocos individuos son necesarios en el análisis. Sin embargo, en el caso de loci hipervariables, un gran tamaño muestral es necesario para determinar frecuencias alélicas con confianza estadística. La relación empírica (Kornfield & Parker 1997) derivada de simulaciones establece que el tamaño muestral para análisis de microsatélites en poblaciones es:

$$\text{Tamaño muestral} = 1.5 (\text{Número de alelos})^{1.35}$$

La búsqueda de marcadores moleculares tipo microsatélites en el género *Engraulis* indica que existen microsatélites heterólogos que se podrían utilizar, de esta manera se cuenta con información a priori sobre el número aproximado de alelos por locus para el género. Se utilizará como valor de referencia el número promedio de alelos para microsatélites de *E. encrasicolus* y *E. japonicus*, y que fueron ensayados en *E. ringens*, valor que corresponde a 23 alelos. Bajo este número de alelos y la relación empírica presentada por Kornfield & Parker, (1997), se deben analizar aproximadamente 100 ejemplares por población putativa para alcanzar alto poder estadístico en el análisis genético.

5.2.2. Sitios de muestreo y recolección de muestras

Para contrastar la hipótesis que define una única unidad evolutiva (panmixia) en la costa chilena, con una hipótesis alternativa que define al menos dos unidades evolutivas en las Zonas de estudio I y III, se analizaron 100 ejemplares por cada Zona de estudio (I y III) colectadas durante el periodo 2015-2016. Para evaluar la estabilidad temporal de las eventuales diferencias genéticas, utilizamos ejemplares adultos colectados durante el año 2008, en la costa de Chile (Tabla 39).

Tabla 39: Muestras de *Engraulis ringens* colectadas en 2008 para comparaciones de parámetros genéticos durante 2015-2016.

Localidad	Código	Latitud	Longitud	Tamaño de muestra
Callao-Perú, 2008	A	12°46'	77°27'	50
Iquique, 2008	E	18° 31'	70° 29'	50
V Región, 2008	F	33° 32'	71° 40'	50
Golfo de Arauco, 2008	B	36° 25'	72° 53'	50
XIV Región, 2008	D	39°29'	73°22'	50
X Región sur, 2008	C	42° 18'	73° 19'	50
Zona I, 2015	Zona I			100
Zona III, 2016	Zona II			100

5.2.3. Extracción de ADN, visualización y cuantificación

Los individuos recolectados en 2015-2016 fueron medidos y pesados en el laboratorio húmedo, perteneciente a la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Posteriormente, se les extrajo a cada uno de los individuos un trozo de musculatura esquelética proveniente principalmente desde la zona del pedúnculo caudal, depositándose en etanol absoluto dentro de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Posteriormente se llevaron al laboratorio de Genética y Acuicultura de la Universidad de Concepción para realizar la extracción de ADN.

El ADN genómico total se obtuvo mediante el kit comercial de purificación de ADN “*Nucleo Spin*®” (Macherey-Nagel) siguiendo los pasos descritos por el distribuidor e incorporando algunas modificaciones. Específicamente se siguieron los siguientes pasos:

- Preparar la muestra:** 25mg. de tejido en un tubo de micro centrifuga 1,5 ml
- Pre-lisis de muestras:** Agregar 180 µl Buffer T1 y 25 µl Proteinasa K, agitar para mezclar.
 - Incubar a 56°C por toda la noche.
- Lisis de la muestra:** Agitar las muestras antes de añadir 200 µl de buffer B3, agitar vigorosamente. Incubar a 70° C por 10 minutos, agitar brevemente.
 - Centrifugar por 5 minutos a 11.000 rpm
 - Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5ml.

- **Ajustes de ADN, condiciones de unión:** Añadir 210 μ l de etanol (96-100%) a la muestra y agitar vigorosamente.
- **Enlazar ADN:** Para cada muestra colocar una columna NucleoSpin Tissue en un tubo de recogida, aplique la muestra en la columna. Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 rcf (*g). Descartar el flujo a través de la columna y colocar un nuevo tubo de colección.
 - Si la muestra no se extrae completamente a través de la matriz, repetir el paso de centrifugación a 11.000 rcf (*g). Deseche el flujo.
- **Lavar la membrana de sílice:**
 - Primer lavado: Añadir 500 μ l Buffer BW, Centrifugar por 1 minuto a 11.000 rcf (*g). Deseche el flujo y coloque un nuevo tubo de colección.
 - Segundo lavado: Añadir 600 μ l de Buffer B5 a la columna y centrifugar por 1 minuto a 11.000 rcf (*g). Deseche el flujo a través de la columna y coloque un nuevo tubo de colección.
- **Secar la membrana de sílice:** Centrifugar la columna por 1 minuto a 11.000 rcf (*g).
 - En esta etapa es removido el etanol residual.
- **Eluir el ADN de alta pureza:** coloque la columna NucleoSpin Tissue en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. y añada 100 μ l de Buffer BE precalentado (70° C), incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 rcf (*g).

El extracto de ADN genómico total fue visualizado mediante una matriz de agarosa al 3% y teñido con bromuro de etidio para determinar el éxito de la extracción, esto es, determinar si presenta ADN de alto peso molecular (> 10000 pb) o fragmentado. Se determinó la calidad y cantidad de ADN extraído utilizando un Biofotómetro, el cual registra absorbancias a 230 nm (hidratos de carbono, péptidos, fenoles y combinaciones aromáticas), 260 nm (ADN), 280 nm (proteínas y fenol) y 320 nm (turbidez) de cada muestra. Además, nos entrega la razón de absorbancias A260/280 y A260/230, para determinar la calidad de nuestro ADN. Posterior a conocer la calidad y cantidad del ADN de cada una de las muestras se procedió a generar una dilución de trabajo a una concentración final de 100 ng/ μ l. La utilización de una concentración menor a la extraída se fundamenta en que para los posteriores análisis (amplificación por PCR) el exceso de ADN puede inhibir la reacción y por lo tanto no amplificar los loci de interés.

5.2.4. Desarrollo de librería microsatélites mediante NGS

Para *E. ringens* es escaso el conocimiento genético poblacional que hay descrito, así como marcadores moleculares especie específicos utilizados en ella. Por este motivo, y dentro de los objetivos del proyecto se consideró desarrollar una librería de loci microsatélites (e.g. (Castoe et al. 2012), los cuales son polimórficos y han sido utilizados en muchos estudios poblacionales de recursos marinos (Canales-Aguirre et al. 2010, Galleguillos, Ferrada, et al. 2012).

Una librería para identificar loci microsatélites en *E. ringens* fue desarrollada mediante una plataforma de Secuenciación de Última Generación (NGS: *Next Generation Sequencing* en inglés) por los servicios de OMIC solutions (<http://omics-solutions.cl>) del centro nacional de genómica y bioinformática de Chile. Para este fin se utilizó un pool de ADN genómico, que fue analizado en un secuenciador 454 GS Jr de Roche. De esta partida de secuenciación se obtuvo un total de 136.537 lecturas con un largo promedio de secuencias de 387 pb. Del total de lecturas 125.753 son lecturas redundantes, y 27.352 son secuencias de ADN que presentaron regiones microsatélites. La búsqueda de regiones microsatélite con motivos di, tri, tetra, penta y hexa nucleótidos fue realizada en el programa MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>). Se tomó como parámetro de búsqueda que la lectura que tenga una región micro debía contener al menos cinco motivos repetidos. Para las lecturas en donde se identificó regiones microsatélites se desarrollaron partidores específicos. Se utilizó el programa PRIMER3 (Untergrasser et al. 2012) para identificar regiones y diseñar partidores para cada locus elegido. Para 13.211 lecturas se diseñaron partidores, de los cuales se sintetizaron 80 parejas.

Las condiciones de amplificación fueron igual para todos los loci microsatélites y fue la siguiente: Tampon PCR 1X, MgCl₂ 3mM, primer F (0.4 μ M), primer R (0.4 μ M), dNTPs (0.8 mM), Taq polimerasa (0.1 U/ μ L). El programa utilizado en el termociclador correspondió a un protocolo *touchdown*, el cual aumenta la especificidad del *annealing* (hibridación de los partidores en la región flanqueante del locus objetivo) incorporando en los primeros ciclos temperaturas altas, comenzando a disminuir 0.5°C por cada ciclo transcurrido hasta alcanzar una temperatura de *annealing* final de 55°C. Específicamente el programa de termociclado fue: denaturación inicial a 95°C por 300s, seguido de 20 ciclos con los siguientes pasos: denaturación a 95°C por 30s, *annealing* a 65-55°C (*touchdown*) por 30s, extensión a 72°C por 30s. En cada ciclo la temperatura disminuyó 0.5°C. Posteriormente, siguieron 20 ciclos con los siguientes pasos: denaturación a 95°C por 30s, *annealing* a 55°C por 30s, y extensión a 72°C por 30s. Finalmente una ciclo final de extensión a 72°C por 300s.

5.2.5. Prueba de polimorfismo en microsátelites obtenidos

Utilizando las condiciones antes mencionadas se probó el polimorfismo de los partidores diseñados en un total de 50 individuos muestreados en la Zona I en el año 2015 como parte de este estudio . El éxito de cada amplificación fue verificado mediante electroforesis en un gel de agarosa UltraPure™ Agarose 1000 (Invitrogen™) al 4 % y visualizado mediante tinción con bromuro de etidio. Para determinar el tamaño del amplicón utilizamos marcadores de peso molecular de 50 y 100 pares de bases (pb).

Para las parejas de partidores que mostraron una amplificación exitosa, su partidador forward fue marcado con los fluoróforos NED, PET, 6-FAM y VIC de AppliedBiosystems. Posteriormente se amplificaron los 50 individuos y se realizó un análisis de fragmentos en un secuenciador ABI 3730xl (AppliedBiosystems) con un estándar de peso molecular LIZ500. Para la determinación de los genotipos obtenidos se utilizó el programa Peak Scanner v1.0 (AppliedBiosystems) (Tabla 41).

5.2.6. Bases de datos genéticos para los análisis estadísticos

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados, la totalidad de datos genotípicos fueron organizados en cuatro bases de datos multilocus. En la primera base de datos se organizaron y compararon de adultos muestras correspondientes a 2008: zona A, B, C, D, E y F. En la segunda base de datos se organizaron las muestras de juveniles correspondientes a 2015-2016: Zona I y Zona III. En la tercera base de datos se agruparon las muestras para hacer una comparación entre el año 2008 y año 2015-2016. Con la finalidad de explorar diferencias genéticas entre generaciones, considerando la alta mortalidad natural de la especie, se construyó una cuarta base de datos correspondiente a las muestras de juveniles 2015-2016, donde se agruparon los ejemplares por grupo etario, según la cantidad de meses de vida estimadas para los individuos, identificándose tres grupos principales de edad, 2 meses, 3 meses y 4 meses de vida. Para determinar el rango de talla correspondiente a cada grupo etario se utilizó el método desarrollado por Guido Plaza y colaboradores en el capítulo “Análisis de la microestructura de otolitos sagitales” en este mismo estudio.

El análisis de diferencias genética por sexo, no fue posible de realizar, dada la inmadurez de los ejemplares trabajados en el 2015-2016.

5.2.7. Determinación de calidad de base de datos de loci microsátelites

Con la finalidad de evitar un sesgo en el análisis poblacional, debido a la asignación incorrecta de genotipos producto de ADN degradado, bajas concentraciones de ADN o mutaciones en la región que flanquea el microsátelite objetivo (alelos nulos), se comprobó la calidad de la base de datos.

Para esto se identificó errores de genotipado debido a presencia de alelos nulos (alelos no amplificados) con el algoritmo de Brookfield (Brookfield 1996), dominancia de alelos cortos, anotaciones de bandas tartamudas (repetidas) y errores tipográficos, mediante el programa Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004).

5.2.8. Parámetros de diversidad genética para loci microsatélites

Para los microsatélites utilizados se determinó las frecuencias alélicas de cada uno de los quince loci analizados, así como, el número de alelos. Además se determinó mediante conteo directo de homocigotos - heterocigotos la heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) que fueron obtenidos en el programa GENALEX v6.5 (Peakall & Smouse 2012). Se realizó un test de equilibrio de Hardy & Weinberg (H&W) en el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Estos parámetros de diversidad genética fueron realizados para cada una de las cuatro bases de datos bajo estudio.

5.2.9. Análisis de poder estadístico para loci microsatélites

El programa Powsim v4.0 (Ryman & Jorde 2001, Ryman & Palm 2006) fue utilizado para evaluar el poder estadístico o error tipo II en los análisis realizados (aceptar H_0 cuando esta es falsa, siendo esta H_0 homogeneidad genética) (*ver* (Laikre et al. 2005, Ryman et al. 2006, Larsson et al. 2007, Canales-Aguirre et al. 2010), y el error tipo I (α). El poder estadístico fue estimado para los 15 loci microsatélites en conjunto, y así detectar diferenciación genética para varios niveles de F_{st} simulados. El análisis se realizó entre las ocho zonas de muestreo: para 2008 las zonas A, B, C, D, E y F con 30, 34, 30, 31, 31 y 33 individuos respectivamente, y para 2015-2016 las Zonas I y III, con 93 y 97 individuos, respectivamente. En las simulaciones se utilizó un tamaño efectivo poblacional de $N_e=70.000$, y diferentes valores de deriva generacional ($t=0$, $t=10$, $t=15$, $t=20$, $t=40$) para obtener los valores F_{st} hipotéticos, donde sólo la simulación $t=0$ supone ausencia de deriva génica. Cada simulación fue corrida 10.000 veces y el poder estadístico fue determinado como la proporción de simulaciones que tanto el test exacto de Fisher como el test chi-cuadrado detectaban como significativas con un nivel de $p<0,05$.

5.2.10. Estructuración poblacional para loci microsatélites

Para estimar el grado de divergencia genética entre las agrupaciones bajo estudio se utilizó el índice F_{st} de (Weir & Cockerham 1984), y su análogo R_{st} (Slatkin 1995) por pares de zonas, para las 4 bases de datos, por zonas de muestreo para 2008, por zonas de muestreo para 2015-2016, base de datos comparando 2008 vs 2015-2016, y base de datos por grupos etarios.

El índice F_{st} estima el grado de estructuración genética presente en la distribución geográfica de la especie en estudio. Valores F_{st} cercanos a 1 sugieren una fuerte estructuración genética y aislamiento reproductivo, mientras que índices F_{st} cercanos a 0 indicarían una débil estructuración genética y alto flujo génico, siempre y cuando este índice sea estadísticamente significativo, $p \leq 0,01$. La hipótesis nula que se evalúa en este análisis es si el índice F_{st} estimado es significativamente distinto de cero.

5.2.11. Detección de estructura genética poblacional sin información a priori

Para identificar la presencia de estructuración poblacional en *Engraulis ringens* se utilizó una aproximación Bayesiana en el programa GENELAND v. 4.0.2 (Guillot, Estoup, et al. 2005, Guillot, Mortier, et al. 2005, Guillot 2008) implementado como paquete en R (<http://cran.r-project.org/>). Este programa utiliza la información genética y la localización geográfica (coordenadas geográficas) de los individuos muestreados (coordenadas de los lances), y permite distinguir el número más probable de poblaciones (i.e. *conglomerado* genéticos), sus límites geográficos, y la incertidumbre de la asignación de individuos a las poblaciones identificadas (Guillot, Estoup, et al. 2005). Un *conglomerado* genético correspondería a un grupo de individuos que comparten variantes genéticas (genotipos más similares) entre sí (Mank & Avise 2004). Para identificar el número más probable de poblaciones (K), se testeó un rango de K entre 1 a 10 ($K=1-10$), donde $K=1$ significa que los datos genéticos dan cuenta de una sola población (no hay estructuración) y $K=n$ que los datos dan cuenta de “ n ” poblaciones en el set de datos analizados. Los datos genéticos utilizados correspondieron al genotipo multilocus de cada individuo. Dado que GENELAND es un análisis Bayesiano, la inclusión de valores *a priori* son importantes para obtención de resultados precisos, por lo tanto, se testeó diferentes modelos de frecuencias alélicas (i.e. modelo correlacionado y modelo no correlacionado).

Los parámetros de los análisis previos fueron: $K=1-10$, usando un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas, y luego uno de frecuencias alélicas no correlacionadas durante un millón de generaciones muestreando cada 1000 parámetros. Luego, comparamos el ajuste de ambos modelos por medio de la prueba Factor de Bayes (FB; Drummond & Rambaut 2007, Gelman et al. 2014) usando el método descrito en el programa Tracerv1.5 (Rambaut et al. 2014). El FB está definido por las Verosimilitudes Marginales de los modelos ($\text{pr}(D/M)$) contrastados. En donde B_{10} define el logaritmo base 10 de FB que nos permite evaluar qué modelo (M) da cuenta de una mayor proporción de la probabilidad total de los datos. Para interpretar los valores de B_{10} se usó la clasificación de Raftery (1996: 165), según la cual valores entre 3 y 20 muestran evidencia positiva para el modelo 1, y mayores de 20 una fuerte evidencia. Posteriormente, se volvió a ejecutar el análisis usando el modelo seleccionado y el número de K con el valor de convergencia de este

modelo. El modelo identificado que presentó mayor evidencia de ajuste a los datos fue el modelo de frecuencias alélicas correlacionado (Tabla 40). La corrida final del programa se realizó por 5 millones de generaciones muestreando cada 1000 parámetros, para estimar *a posteriori* la probabilidad de asignación de individuos a grupos geográficos basados en su geo-referenciación y el genotipo de los individuos. Finalmente, se realizó un post-proceso de los parámetros (valor de *k*; contornos poblacionales; pertenencia del *i*-ésimo individuo a la *k*-ésima población) en un espacio de 400 x 400 píxeles los cuales representan un soporte gráfico que nos indica: 1) quiebres poblacionales en la zona de estudio; y 2) isolíneas de probabilidad de pertenencia a la *k*-ésimas población del *i*-ésimo individuo. Este análisis fue llevado a cabo sobre la base de datos de genotipos combinada (genotipos 2008 + 2015), base de datos adultos 2008, y base de datos juveniles 2015.

Tabla 40: Comparación de modelos de frecuencias alélicas correlacionadas y no correlacionadas obtenido en GENELAND mediante el Factor de Bayes para *Engraulis ringens*. Valores en negrita corresponden a los modelos que muestran mayor evidencia de ajuste a los datos en la base de datos base de datos adultos 2008, base de datos juveniles 2015, y la base de datos combinada genotipos 2008 y genotipos 2015.

Datos	Modelo	ln P (data modelo)	S.E.	Correlacionado	No- Correlacionado
Adultos	Correlacionado	-7542,883	0,062	-	45,458
	No-Correlacionado	-7588,341	0,047	-45,458	-
Juveniles	Correlacionado	-10170,148	0,052	-	32,291
	No-Correlacionado	-10202,439	0,050	-32,291	-
Adultos y juveniles combinado	Correlacionado	-17500,375	0,369	-	-4,131
	No-Correlacionado	-17504,507	0,115	-4,131	-

De manera complementaria a GENELAND se estimó la estructura genética poblacional mediante inferencia bayesiana utilizando STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) . Este programa es utilizado para inferir estructura poblacional usando datos genotípicos sin información a priori respecto al origen de las muestras, el algoritmo utilizado identifica agrupaciones genéticas asignando individuos al grupo de poblaciones más probable. El programa asume un modelo en el cual hay K poblaciones (K es desconocido) caracterizadas por un set de datos de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son asignados (probabilísticamente) a poblaciones (K) o conjuntamente a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que están mezclados. En este análisis en particular finalmente se realizaron 10 corridas para cada valor de K entre 1 y 8. Cada corrida fue configurada bajo un modelo de mezcla y se utilizó un periodo de burning de 50.000 iteraciones, seguido de 250.000 iteraciones de MCMC. Se infirió el número de poblaciones más probables utilizando el

criterio del ΔK (Evanno et al. 2005) implementado en STRUCTUREHARVESTER (Earl & vonHoldt 2012).

5.2.12. Análisis de aislamiento por distancia

Se realizó un análisis de aislamiento genético mediado por la distancia espacial tomando cada base de datos de genotipos, adultos 2008 y juveniles 2015 por separado, utilizando los registros por lances como ubicación geográfica, esto con la finalidad de evaluar diferenciación intra anual. Para evaluar la presencia de aislamiento por distancia se procedió a generar matrices de distancia genética y distancia geográfica entre grupos de muestras (lances de pesca) para cada base de datos. Las matrices de distancia genética fueron realizadas en Genepop versión 4.6 (Rousset 2008) y posteriormente linealizadas mediante la ecuación $F_{st} \text{ linealizado} = F_{st} / (1 - F_{st})$. Las matrices de distancia geográfica fueron calculadas en el Genalex versión 4.6 (Peakall & Smouse 2006). Se realizaron test de mantel para evaluar el grado de correlación entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica utilizando el paquete de R vegan utilizando la función “mantel” con 10.000 permutaciones (Oksanen et al. 2011, R Core Team 2016).

5.2.13. Análisis de componentes principales

Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando datos genéticos correspondientes a la base de datos de anchovetas juveniles del año 2015, para corroborar patrones evidenciados. Para este análisis se estimó la distancia genética entre pares de individuos, utilizando la matriz de distancia se realizó el gráfico PCoA para presentar los patrones de agrupación de las distancias genéticas en las muestras en un plano de dos dimensiones.

5.3. Resultados

5.3.1. Extracción de ADN, visualización y cuantificación

Las extracciones de ADN genómico de los 330 individuos fueron satisfactorias, tanto en cantidad, como calidad, siendo útiles para el ensayo de cualquier marcador molecular.

5.3.2. Desarrollo de marcadores microsatélites mediante NGS

Se marcaron con fluoróforos un total de 35 parejas de partidores, los cuales fueron ensayados para testear tanto las condiciones de PCR como su polimorfismo, los resultados obtenidos fueron adecuados para análisis poblacionales. Eligiendo un total de 15 parejas de partidores para el análisis a nivel poblacional. En la Tabla 41 se detallan los loci microsatélites aplicados a nivel poblacional para *Engraulis ringens*. Se informa el motivo de repetición de los loci ensayados, el rango de

tamaño alélico que se detectó en la descripción inicial de los loci microsatélites, el número de alelos observados por microsatélite, la heterocigosidad observada y esperada al equilibrio de Hardy Weinberg, así como la significancia de las desviaciones a este equilibrio.

En este contexto, seis de los 15 loci microsatélites analizados muestran desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg. Todos ellos con marcado déficit de heterocigotos, existiendo múltiples causas para su origen. Rico et al. (1997) revisa posibles causas del exceso de homocigotos, evaluando varias hipótesis relacionadas con error de genotipado, presencia de alelos nulos, efecto Wahlund (Wahlund 1928), endogamia, apareamiento selectivo, y /o selección. Al evaluar la hipótesis de alelos nulos en la base de datos de *Engraulis ringens*, sólo dos de 15 microsatélites analizados muestran la presencia de alelos nulos (loci E50 y E69). Dakin & Avise (2004), establecen que los alelos nulos están presentes en la mayoría de la taxa, particularmente en aquellas poblaciones con altos tamaños efectivos poblacionales (Chapuis & Estoup 2007), como es el caso de peces pelágicos como *Engraulis ringens*. La presencia de alelos nulos podría contribuir al significativo desequilibrio de Hardy-Weinberg, teniendo presente las potenciales consecuencias de este desequilibrio en el análisis de diferenciación poblacional. Los alelos nulos crean falsos homocigotos, lo cual es problemático para las estimaciones de diferenciación poblacional, y análisis de parentesco. Sin embargo, si las frecuencias alélicas son corregidas para esta situación, las bases de datos si pueden ser utilizadas para evaluar diferenciación poblacional (ver Van Oosterhout et al. 2004). Considerando además que Carlsson (2008) realiza un análisis basado en simulaciones, sin corregir la base de datos, demostrando que loci microsatélites afectados por alelos nulos, no alterarían el resultado de análisis de parentesco, y por lo tanto pueden ser incluidos en este tipo de análisis. Esta información nos permite establecer que los 15 microsatélites desarrollados generan información útil para la identificación y delimitación de unidades genéticas poblacionales.

La variabilidad genética para las agrupaciones según las zonas de 2008 indican valores de número de alelos entre dos (E50) a 28 alelos (E28), con heterocigosidades observadas que varían entre 0,250 (E35) a 1.000 (E50). Las heterocigosidades esperadas varían entre 0,226 (E35) a 1,000 (E50) (Tabla 42). Para la variabilidad genética según las zonas de 2015-2016 (Zona I y Zona III), se observó un N_a promedio entre 12 a 15 alelos por localidad, un H_o entre 0,653-0,698 y una H_e entre 0,653 y 0,734 (Tabla 43). Los parámetros de variabilidad genética para la comparación entre 2008 y 2015-2016 indican valores de N_a promedio entre 16-17 alelos por localidad, un H_o entre 0,660-0,684 y una H_e entre 0,750-0,752 (Tabla 44). Cuando se analizan los parámetros de variabilidad genética por grupo etario, el número de alelos detectados varía entre 2 (E27) y 37 (E53) con

heterocigosidades observadas que varían entre 0,269 (E35) a 1,000 (E50). Las heterocigosidades esperadas varían entre 0,362 (E35) a 0,959 (E53) (Tabla 45).

Previo al análisis poblacional, se realizó estimaciones de los niveles de poder estadístico para el set de 15 loci microsatélites (Tabla 46), las simulaciones indican que el conjunto de microsatélites, en combinación con el tamaño de la muestra utilizada, confiere suficiente poder estadístico, capaz de detectar divergencias genéticas a un nivel de F_{st} tan bajo como 0,0022, con una probabilidad de 0,99. Destacando que a pesar de los desequilibrios de Hardy-Weinberg, presentado en la mayoría de los microsatélites analizados, estos poseen el suficiente poder estadístico como para detectar niveles de diferenciación genética tan bajos como 0,0022, y delimitar con certeza unidades genéticas poblacionales. En ausencia de deriva génica (setting de $t=0$), el error tipo I o α , correspondiente a la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (H_0 ; homogeneidad genética; $F_{st}=0$) cuando esta es verdadera, varía desde 0,045 con el test χ^2 , a 0,066 con el test de Fisher, bordeando el 5% de la significancia estadística. Una vez evaluado y confirmado el poder estadístico del set de microsatélites, se procedió a estimar los niveles de divergencia genética existentes entre variados niveles de agrupación de las muestras.

Las estimaciones de los índices de estructuración genética poblacional arrojaron valores estadísticamente no significativos al comparar las muestras de 2008 con las del período 2015-2016 para la anchoveta en Chile. Estos estimados, $F_{st}=0,00048$ y $R_{st}=0,00002$, no dieron soporte a hipótesis relacionadas con variaciones genéticas temporales significativas (Tabla 47).

En el caso de las comparaciones pareadas entre las seis zonas muestreadas en el 2008, los valores del índice de estructuración poblacional R_{st} no fueron significativos, dado $\alpha=0,05$ (Tabla 49). Sin embargo, el índice F_{st} (Tabla 48) mostró valores significativos al comparar las zonas de muestreo ubicadas al sur de la Zona III (X, XIV, y Golfo de Arauco) con la V región e Iquique. Las mayores diferencias se dan entre la X y la V región con un F_{st} de 0,019, y entre la XIV región e Iquique, con un F_{st} de 0,013.

Al estimar los índices de divergencia genética entre las zonas de muestreo del año 2015-2016 (Tabla 50), ninguna de las comparaciones arroja valores significativos para estructuración genética poblacional. Destacando que el estimado del índice F_{st} de 0,002 se encuentra al límite de la significancia con un valor de probabilidad de 0,056 (a un nivel de significancia del 0,05).

En la Tabla 51, se informan los índices de estructuración genética F_{st} y R_{st} para las comparaciones entre grupos etarios, inferidos a partir de las tallas registradas. Ninguno de los estimados resultó estadísticamente significativo. Destacando que los estimados del índice R_{st} entre el grupo etario de

4 meses y las comparaciones con el grupo etario 2 meses (R_{st} de 0,0180) y 3 (R_{st} de 0,0237), se encuentran al límite de la significancia con un valor de probabilidad de 0,0592 y 0,0592 respectivamente (a un nivel de significancia del 0,05).

El análisis de estructuración poblacional sin información *a priori* no mostró estructuración espacial ni temporal cuando se analiza la base de datos de adultos del 2008 y juveniles del 2015 en conjunto. El análisis identificó solo un *conglomerado* genético ($K=1$) en la distribución geográfica analizada (Figura 51). Este patrón no estuvo relacionado con los modelos de frecuencias alélicas testeados (Figura 51A y B), i.e. correlacionado y no correlacionado.

Cuando analizamos las bases de datos de 2008 y 2015 por separado, el análisis de estructuración poblacional sin información *a priori* mostró resultados contrastantes según el modelo de frecuencias alélicas testado (i.e. correlacionado y no correlacionado). Específicamente, el modelo no correlacionado estimó un $K=1$ en ambos sets de datos, adultos y juveniles (Figura 52B, D). Por otro lado, utilizando un modelo correlacionado se estimó un $K=3$ para adultos y un $K=2$ para juveniles (Figura 52A, C).

Para el set de datos de individuos adultos del 2008, los tres *conglomerados* identificados no mostraron un patrón espacial latitudinal (Figura 53), sino parchoso. Los valores de *isolíneas* de probabilidad estimados para cada *conglomerado* mostraron valores menores a 0.4 de probabilidad (Figura 53). Para el set de datos de individuos juveniles del 2015, los dos *conglomerados* identificados mostraron un claro patrón espacial latitudinal (Figura 54), diferenciando en un *conglomerado* al norte de los $\sim 25^{\circ}\text{S}$ (zona norte de Chile), y al sur de los $\sim 34^{\circ}\text{S}$ (zona centro-sur de Chile). Los valores de *isolíneas* de probabilidad estimados para cada *conglomerado* mostraron altos, fueron superiores a 0.9 de probabilidad (Figura 54).

El análisis de inferencia de estructura genética poblacional realizados en STRUCTURE generaron como resultado patrones de ancestrías típico de ausencia de estructura genética para ambas bases de datos analizadas juntas y por separado (Figura 57, 58 y 59). Los análisis de aislamiento por distancia (IBD) evidencian patrones diferentes para las muestras del año 2008 y 2015 (Figura 55 y 56). Para las muestras de anchovetas adultas del año 2008 no presentaron un patrón de IBD significativo (p -val: 0.517, r : -0.041). Por el contrario, las muestras de anchovetas juveniles del año 2015 presentaron un patrón de IBD positivo y significativo (p -val: 0.04, r : 0.427).

El Análisis de Coordenadas Principales presenta en un plano de dos dimensiones la variabilidad en las distancias genéticas entre las muestras de juveniles del año 2005, evidenciando un patrón que muestra sobreposición entre puntos pertenecientes a la Zona I y Zona III (Figura 60).

Tabla 41: Detalles de 15 loci microsatélites polimórficos desarrollados para *E. ringens* (N_i : número de individuos analizados; N_A : número de alelos observado; H_e y H_o : heterocigosidades esperada y observada respectivamente; P_i : probabilidad de identidad para cada locus; P_{HW} : probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. † indican los loci que muestran desviaciones al equilibrio de H&W y en negrita se destacan los loci con posible presencia de alelos nulos).

Locus	Primer (5'-3')	Motivo	Rango (bp)	N_i	N_A	H_o	H_e	P_i	p-value (HWE)
E27	F: GCTTTCTGGATGTTTTAGAT	(TGTC)6	149-257	44	4	0.455	0.513	0.347	0.833
	R: AACACTATCTGACAACTGACA								
E39	F: GTTGTCAGAAGCTTTAGTCA	(TTTCC)5	143-193	44	10	0.636	0.829	0.048	0.032
	R: GATAAGAAATACACAGGAAAG								
E6	F: TGGGTTGATAAATAGACTAGA	(ATGA)5	175-218	35	6	0.771	0.677	0.150	0.913
	R: AGTATTAACACTTGTAGGTGC								
E28	F: CATGGTTTTAAATCTGTGAC	(TTTA)6	239-297	41	12	0.854	0.857	0.036	0.972
	R: TACAAATGAGAGCAAATACA								
E22	F: GTGTGTATGTTTCTTTTCAA	(CAGA)6	273-296	43	6	0.674	0.659	0.166	0.003
	R: TCTCTATGGACTTTAACATA								
E45	F: ATAAAAAGTTGAGGCTGTTT	(ATTC)7	162-203	44	9	0.795	0.765	0.088	0.460
	R: GACTTTGAAGACAGCTGTAC								
E48	F: CCAATAGTTCAGTAGTACCAG	(GCT)10	136-175	43	12	0.860	0.832	0.048	0.995
	R: ACAGTAAGCTAGAGTATCCAG								
E49	F: ATCATTATGCTAATGTCTGC	(ACAGC)6	126-171	44	10	0.773	0.830	0.050	0.427
	R: GGACTTTTTAGCATCAGTAT								
E50	F: GTCTAGGGGTGTAAATAATAA	(ATCGT)6	157-163	42	2	0.976	0.500	0.375	0.000†
	R: TCCACTTCTATTATGTTATGG								
E72	F: TTTTCTTTACATTAGCACAG	(ACACAT)5	187-308	45	11	0.444	0.660	0.174	0.001
	R: AATTTGTAGTACAGCTGTGTC								
E73	F: ACTTTGAGTCTGGAATAAAGT	(TGA)17	106-185	44	20	0.932	0.915	0.014	0.678
	R: CCATAGATTAGAGGACAATAA								
E69	F: GGCCTACATTAATAACATACT	(TAA)15	122-174	45	18	0.756	0.915	0.013	0.000†
	R: CTAATGTGGGAATATAGTGAG								
E53	F: TGTAGAAGAAAGTGACAGAGA	(GA)17	136-235	45	33	0.822	0.943	0.006	0.033
	R: GTTATTGGTGTGAGTCATT								
E61	F: GAGATTTAGCAGACAGATGT	(AG)20	190-226	45	11	0.756	0.880	0.027	0.258
	R: TAGTATTCTCAACACGTAGCT								
E35	F: CTCAGTGGAACAAGTCACT	(GCAAG)5	147-174	40	4	0.425	0.457	0.332	0.060
	R: TAAATACATGCTTAAGAGTCC								

Tabla 42: Parámetros de variabilidad genética de *E. ringens* para muestras de 2008. (N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)

Localidad	Parámetro	Locus														
		E27	E39	E6	E28	E49	E48	E45	E22	E73	E69	E50	E72	E53	E35	E61
ZONA A	N	29	29	28	29	28	27	28	28	28	25	27	29	29	30	28
	Na	3	9	9	14	7	11	5	6	14	14	3	7	22	6	12
	Ho	0.379	0.552	0.679	0.759	0.679	0.741	0.500	0.393	0.893	0.720	0.815	0.552	0.793	0.600	0.536
	He	0.530	0.769	0.822	0.863	0.755	0.813	0.743	0.652	0.881	0.900	0.504	0.687	0.937	0.561	0.837
	H&W	0.153	0.004	0.001	0.078	0.321	0.420	0.012	0.000	0.518	0.006	0.000	0.054	0.001	0.680	0.000
ZONA B	N	33	32	32	34	31	30	30	29	28	32	31	32	32	32	31
	Na	5	11	11	14	8	14	8	4	15	16	2	5	28	3	10
	Ho	0.394	0.563	0.781	0.882	0.774	0.933	0.633	0.310	0.893	0.656	1.000	0.688	0.781	0.250	0.645
	He	0.447	0.817	0.756	0.866	0.763	0.839	0.762	0.466	0.891	0.910	0.500	0.670	0.943	0.322	0.833
	H&W	0.395	0.000	0.511	0.129	0.138	0.082	0.046	0.008	0.719	0.000	0.000	0.599	0.005	0.132	0.003
ZONA C	N	29	28	29	29	29	28	26	26	27	24	24	28	26	30	29
	Na	4	7	10	11	6	9	6	4	17	14	3	7	20	3	12
	Ho	0.621	0.714	0.690	0.828	0.586	0.714	0.577	0.615	0.963	0.750	0.917	0.500	0.769	0.300	0.759
	He	0.495	0.810	0.671	0.834	0.750	0.794	0.708	0.638	0.905	0.893	0.515	0.679	0.929	0.384	0.878
	H&W	0.361	0.452	0.103	0.902	0.102	0.003	0.140	0.435	0.208	0.007	0.000	0.061	0.005	0.150	0.177
ZONA D	N	31	31	31	31	30	30	30	24	31	28	31	28	30	28	28
	Na	5	7	8	13	12	13	6	4	14	14	2	6	24	4	10
	Ho	0.516	0.484	0.774	0.677	0.500	0.833	0.667	0.375	0.968	0.821	0.935	0.464	0.800	0.250	0.750
	He	0.509	0.820	0.750	0.853	0.784	0.866	0.733	0.519	0.893	0.895	0.498	0.668	0.937	0.524	0.872
	H&W	0.223	0.000	0.182	0.004	0.000	0.404	0.357	0.109	0.693	0.084	0.000	0.010	0.021	0.000	0.202
ZONA E	N	31	31	30	31	31	30	29	24	31	31	30	28	31	31	30
	Na	3	8	9	11	8	10	6	5	13	14	3	8	22	5	10
	Ho	0.548	0.806	0.633	0.581	0.581	0.767	0.690	0.333	0.935	0.806	1.000	0.607	0.774	0.226	0.700
	He	0.548	0.806	0.633	0.581	0.581	0.767	0.690	0.333	0.935	0.806	1.000	0.607	0.774	0.226	0.700
	H&W	0.605	0.452	0.028	0.003	0.003	0.017	0.311	0.006	0.316	0.007	0.000	0.118	0.018	0.011	0.059
ZONA F	N	31	29	31	30	25	33	31	30	33	30	30	33	31	30	29
	Na	3	8	10	10	8	13	7	6	13	16	2	6	25	4	10
	Ho	0.387	0.621	0.645	0.633	0.640	0.697	0.581	0.533	0.970	0.733	0.967	0.394	0.774	0.333	0.552
	He	0.556	0.750	0.770	0.829	0.781	0.831	0.772	0.601	0.891	0.891	0.499	0.681	0.939	0.427	0.821
	H&W	0.090	0.094	0.023	0.002	0.114	0.010	0.053	0.266	0.540	0.030	0.000	0.000	0.001	0.057	0.000

Tabla 43: Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2015-2016: Zona I vs Zona III. Estimadores para los 15 loci microsatélites para las Zonas I y Zona III de las muestras correspondientes a 2015-2016. (N: número de individuos analizados; Na: número de alelos observado; He y Ho: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; H&W: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.)

Locus	Parámetro									
	Zona I					Zona III				
	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W
E27	89	4	0.494	0.513	0.123	48	5	0.542	0.566	0.202
E39	86	14	0.651	0.819	0.000	46	10	0.848	0.754	0.140
E6	81	13	0.716	0.741	0.098	47	9	0.574	0.790	0.003
E28	87	14	0.759	0.860	0.053	37	15	0.649	0.863	0.000
E49	91	11	0.714	0.803	0.144	39	10	0.667	0.788	0.052
E48	91	17	0.813	0.839	0.167	45	11	0.711	0.823	0.009
E45	91	19	0.758	0.794	0.022	45	9	0.644	0.816	0.035
E22	91	12	0.549	0.656	0.000	40	7	0.250	0.494	0.000
E73	87	22	0.920	0.908	0.986	45	15	0.933	0.898	0.082
E69	90	18	0.689	0.912	0.000	39	13	0.615	0.864	0.001
E50	87	4	0.977	0.517	0.000	41	4	0.976	0.546	0.000
E72	90	15	0.500	0.669	0.000	38	9	0.605	0.681	0.887
E53	92	42	0.870	0.952	0.006	48	36	0.854	0.947	0.041
E35	87	5	0.368	0.406	0.029	48	5	0.292	0.297	0.132
E61	92	17	0.696	0.886	0.000	47	17	0.638	0.888	0.000

Tabla 44: Parámetros de variabilidad genética utilizando muestras de 2008 y muestras de 2015-2016. (*N*: número de individuos analizados; *Na*: número de alelos observado; *He* y *Ho*: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; *H&W*: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia).

Locus	Parámetro									
	2008					2015				
	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W
E27	184	5	0.473	0.512	0.666	137	5	0.511	0.534	0.020
E39	180	15	0.622	0.811	0.000	132	16	0.720	0.814	0.003
E6	181	15	0.702	0.806	0.000	128	13	0.664	0.776	0.007
E28	184	27	0.728	0.863	0.000	124	18	0.726	0.864	0.000
E49	174	13	0.626	0.793	0.000	130	13	0.700	0.805	0.003
E48	178	20	0.781	0.843	0.001	136	17	0.779	0.837	0.045
E45	174	9	0.609	0.776	0.000	136	20	0.721	0.805	0.002
E22	161	8	0.429	0.581	0.000	131	13	0.458	0.615	0.000
E73	178	21	0.938	0.902	0.008	132	22	0.924	0.909	0.699
E69	170	22	0.747	0.913	0.000	129	18	0.667	0.903	0.000
E50	173	5	0.942	0.507	0.000	128	4	0.977	0.526	0.000
E72	178	10	0.534	0.683	0.000	128	16	0.531	0.676	0.000
E53	179	48	0.782	0.951	0.001	140	47	0.864	0.956	0.007
E35	181	7	0.326	0.434	0.000	135	6	0.341	0.370	0.003
E61	175	16	0.657	0.875	0.000	139	22	0.676	0.892	0.000

Tabla 45: Parámetros de variabilidad genética utilizando criterio de grupos edad. Parámetros de variabilidad genética de *E. ringens* para 15 loci microsatélites, bajo el criterio de grupos de edad (Mes 2 entre 31 a 60 días; Mes 3 entre 61 a 90 días; Mes 4 entre 91 a 120 días. *N*: número de individuos analizados; *Na*: número de alelos observado; *He* y *Ho*: heterocigosidades esperada y observada respectivamente; *H&W*: probabilidad del test exacto para equilibrio de Hardy & Weinberg. Valores en negrita significativos al $p < 0,05$ de significancia.

Locus	Parámetro														
	MES 2					MES 3					MES 4				
	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W	N	Na	Ho	He	H&W
E27	61	4	0.557	0.532	0.103	53	5	0.415	0.549	0.019	23	2	0.609	0.485	0.281
E39	57	14	0.789	0.810	0.195	53	8	0.660	0.815	0.007	22	7	0.682	0.685	0.278
E6	61	10	0.639	0.794	0.105	46	11	0.652	0.747	0.046	21	8	0.762	0.731	0.106
E28	53	14	0.660	0.878	0.001	48	14	0.750	0.852	0.236	23	7	0.826	0.809	0.836
E49	56	11	0.661	0.777	0.085	51	10	0.725	0.797	0.131	23	10	0.739	0.814	0.061
E48	61	15	0.787	0.840	0.126	53	14	0.774	0.813	0.377	22	12	0.773	0.860	0.018
E45	61	15	0.770	0.824	0.324	53	9	0.679	0.756	0.252	22	12	0.682	0.807	0.002
E22	59	11	0.407	0.610	0.002	49	6	0.531	0.604	0.164	23	7	0.435	0.641	0.026
E73	54	18	0.889	0.897	0.514	55	19	0.945	0.917	0.857	23	14	0.957	0.882	0.615
E69	56	14	0.661	0.891	0.000	51	16	0.667	0.896	0.000	22	15	0.682	0.905	0.000
E50	52	4	0.962	0.527	0.000	53	4	0.981	0.527	0.000	23	3	1.000	0.521	0.000
E72	54	9	0.537	0.688	0.028	51	14	0.549	0.682	0.012	23	5	0.478	0.603	0.140
E53	63	37	0.857	0.949	0.000	54	40	0.870	0.959	0.023	23	20	0.870	0.925	0.489
E35	61	4	0.393	0.362	0.879	52	5	0.269	0.362	0.001	22	4	0.364	0.402	0.234
E61	63	16	0.587	0.882	0.000	54	14	0.759	0.888	0.119	22	12	0.727	0.866	0.028

Tabla 46: Estimados del poder estadístico de 15 loci microsatélites. Valores de probabilidad χ^2 y Test de Fisher para detectar niveles de diferenciación poblacional (*Fst*) por promedio de test exacto de Fisher's y χ^2 , algoritmo implementado en POWSIM (Ryman & Palm, 2006).

Fst esperado	X² Test	Fisher's Test	Ne	Generaciones t	Runs
0	0,045	0,066	70.000	0	10.000
0.0011	0.742	0.635	70.000	10	10.000
0.0017	0.952	0.886	70.000	15	10.000
0.0022	0.996	0.982	70.000	20	10.000
0.045	1.000	1.000	70.000	40	10.000

Tabla 47: Índice de estructuración poblacional *Fst* y *Rst* por pares muestras de 2008 vs muestras de 2015-2016. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.

Localidad	Fst		Rst	
	2008	2015-2016	2008	2015-2016
2008	-	0.2970	-	05729
2015-2016	0.00048	-	0.00002	-

Tabla 48: Índice de estructuración poblacional Fst por pares de zonas para muestras del año 2008. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados. En negrita valores significativos.

Localidad	ZONA A Perú- Callao	ZONA E Iquique	ZONA F V Región	ZONA B Golfo Arauco	ZONA D XIV Región	ZONA C X Región
ZONA A Perú- Callao	-	0.130	0.118	0.074	0.283	0.085
ZONA E Iquique	0.005	-	0.623	0.025	0.000	0.019
ZONA F V Región	0.005	-0.000	-	0.007	0.080	0.000
ZONA B Golfo Arauco	0.006	0.007	0.010	-	0.324	0.280
ZONA D XIV Región	0.003	0.013	0.006	0.001	-	0.362
ZONA C X Región	0.006	0.008	0.019	0.001	0.001	-

Tabla 49: Índice de estructuración poblacional Rst por pares de zonas para muestras del año 2008. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.

Localidad	ZONA A Perú- Callao	ZONA E Iquique	ZONA F V Región	ZONA B Golfo Arauco	ZONA D XIV Región	ZONA C X Región
ZONA A Perú- Callao	-	0.207	0.497	0.374	0.735	0.815
ZONA E Iquique	0.008	-	0.921	0.766	0.441	0.763
ZONA F V Región	0.000	-0.010	-	0.868	0.971	0.584
ZONA B Golfo Arauco	0.003	-0.005	-0.000	-	0.656	0.885
ZONA D XIV Región	-0.003	0.005	-0.021	-0.001	-	0.763
ZONA C X Región	-0.008	-0.001	0.000	-0.012	-0.004	-

Tabla 50: Índices de estructuración poblacional Fst y Rst por pares de zonas para muestras del año 2015-2016. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados.

Localidad	Fst		Rst	
	Zona I	Zona III	Zona I	Zona III
Zona I	-	0.056	-	0.352
Zona III	0.002	-	0.003	-

Tabla 51: Índice de estructuración poblacional F_{st} / R_{st} por pares utilizando criterio de grupos edad. Sobre la diagonal valor-p asociado a los valores estimados. Columna MES indica mes de vida de los individuos.

Edad	Fst			Rst		
	MES 2	MES 3	MES 4	MES 2	MES 3	MES 4
MES 2	-	0.3995	0.4194	-	0.1026	0.0592
MES 3	0.0006	-	0.3995	-0.0080	-	0.0592
MES 4	0.0050	0.0009	-	0.0180	0.0237	-

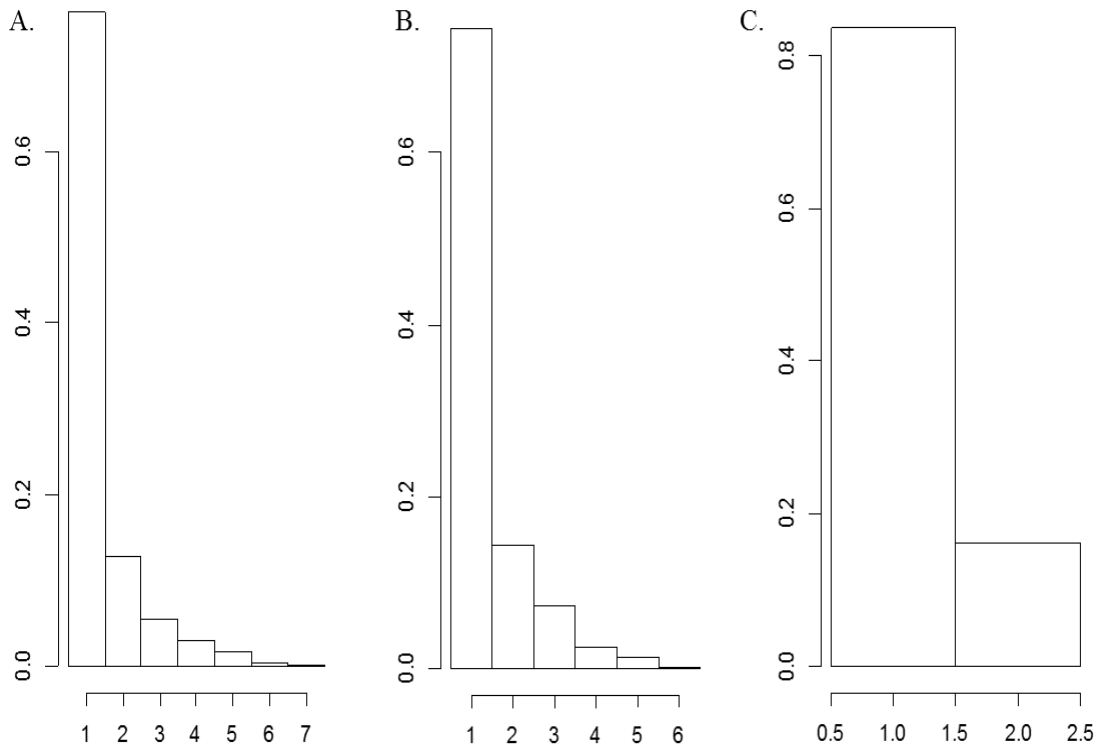


Figura 51: Densidad de frecuencias para cada número de *conglomerado* genéticos testeados. (A) resultados para el modelo no correlacionado, (B) resultados para el modelo correlacionado, y (C) resultados para el modelo que mejor ajuste según el Factor de Bayes para un K igual a 2, para la base de datos de genotipos combinada 2008-2015.

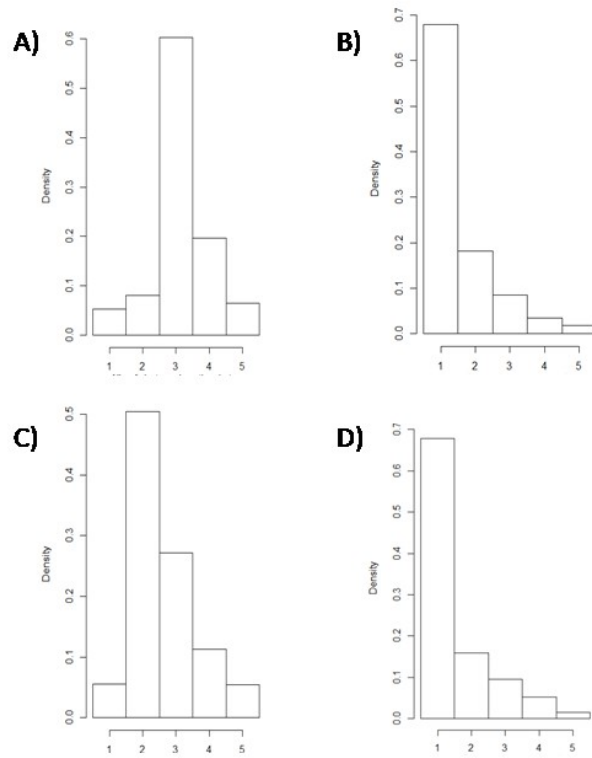


Figura 52: Densidad de frecuencias para cada número de *conglomerado* genéticos testeado. (A) modelo correlacionado y (B) modelo no-correlacionado, ambos para la base de datos de individuos adultos (2008). (C) modelo correlacionado y (D) modelo no-correlacionado, ambos para la base de datos de individuos juveniles (2015).

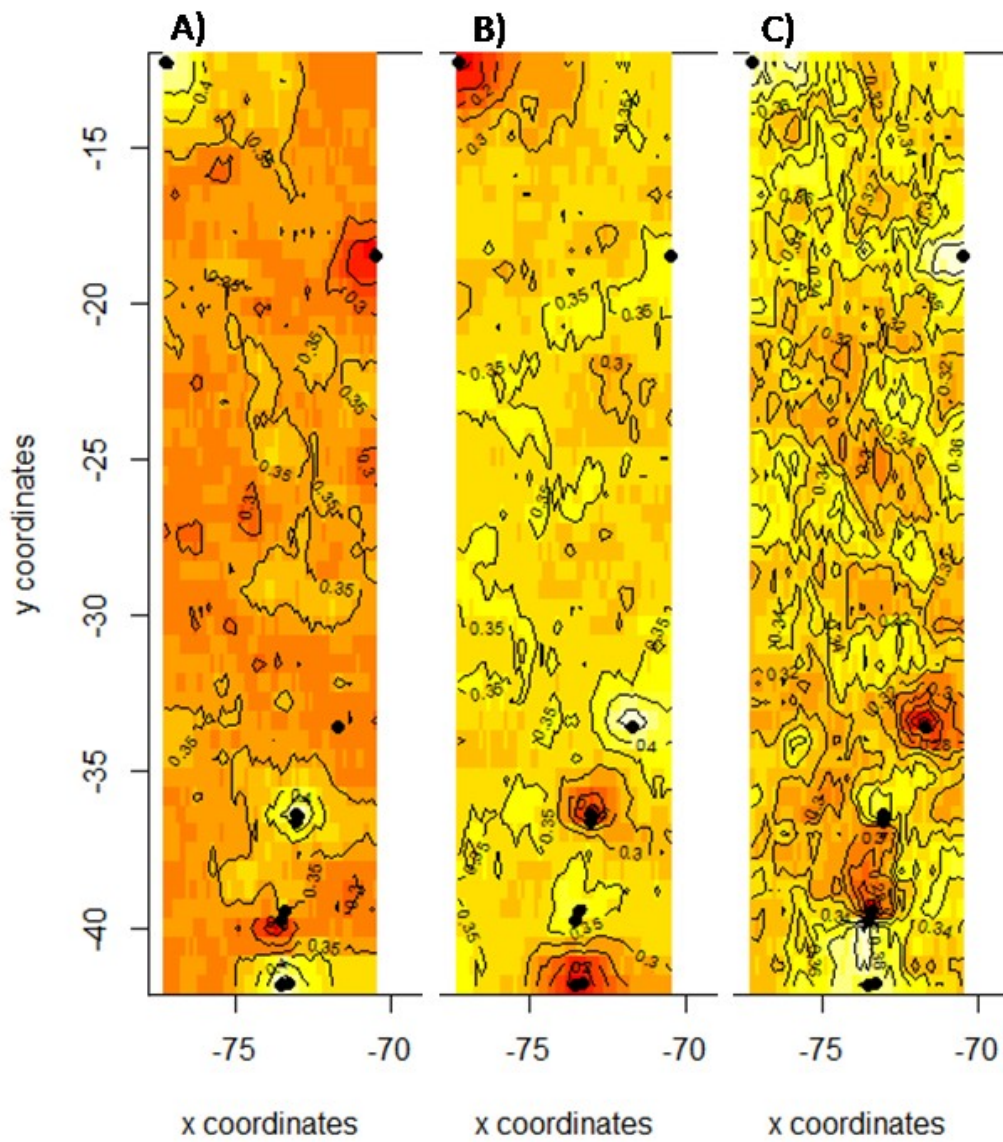


Figura 53: Mapa de *isolíneas* de probabilidades para los tres *conglomerado* genéticos (A-C) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos adultos (año 2008).

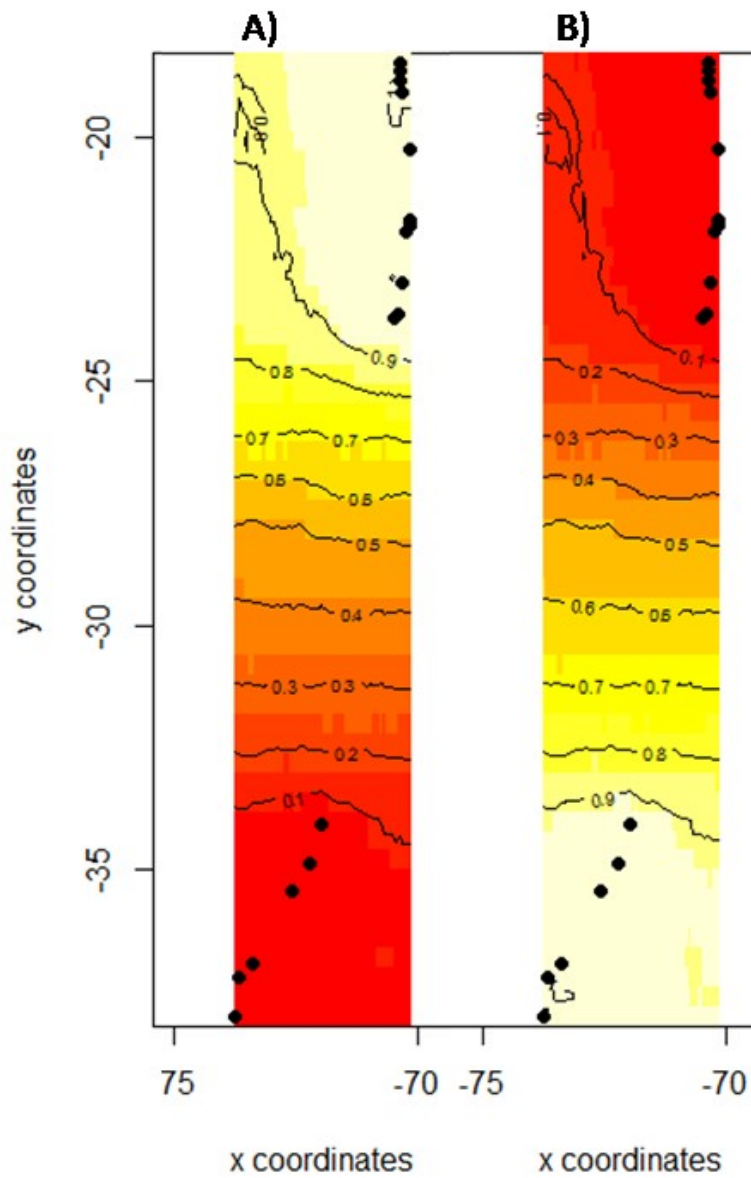


Figura 54: Mapa de *isolíneas* de probabilidades para los dos *conglomerado* genéticos (A-B) obtenidos mediante el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas en la base de datos de individuos juveniles (año 2015).

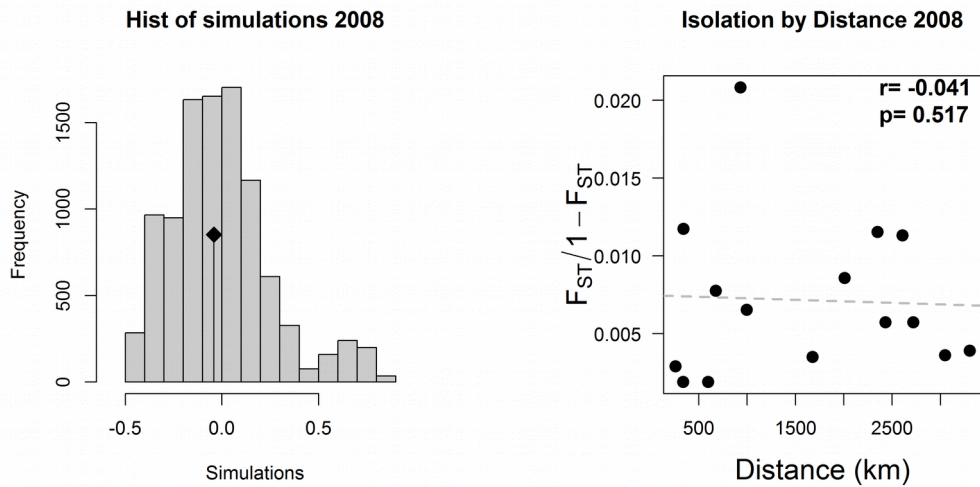


Figura 55: Análisis de aislamiento por distancia para la base de datos de anchovetas adultas del 2008. Izquierda: Gráfico del análisis de permutaciones (test de mantel) mostrando resultados no significativos. Derecha: Gráfico de la correlación entre distancia geográfica y distancia genética.

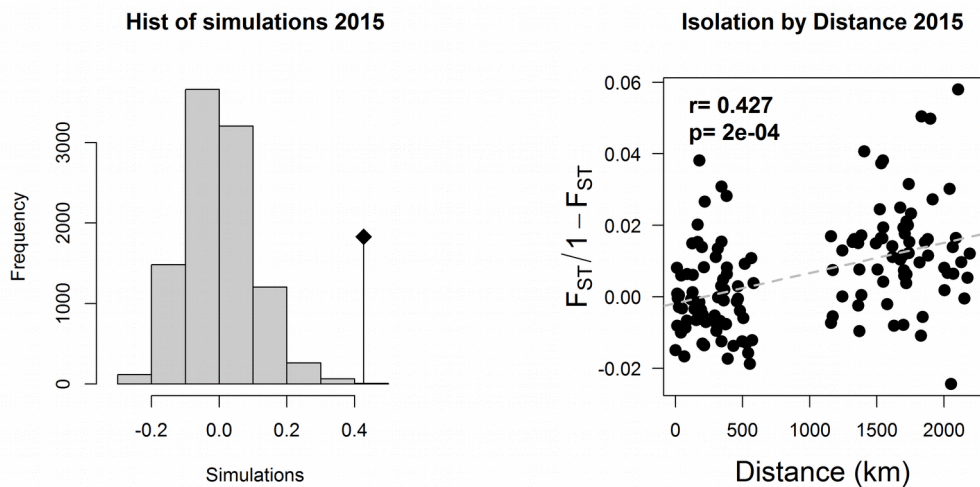


Figura 56: Análisis de aislamiento por distancia para la base de dato anchovetas juveniles del 2015. Izquierda: Gráfico del análisis de permutaciones (test de mantel) mostrando resultados significativos. Derecha: Gráfico de la correlación entre distancia geográfica y distancia genética.

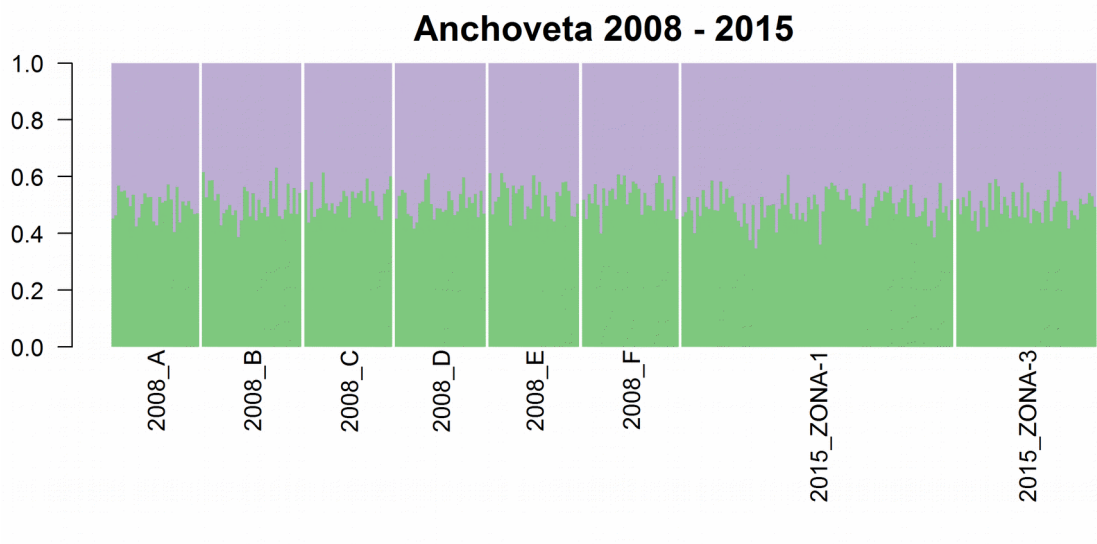


Figura 57: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para ambas bases de datos 2008-2018 combinadas para $K = 2$.

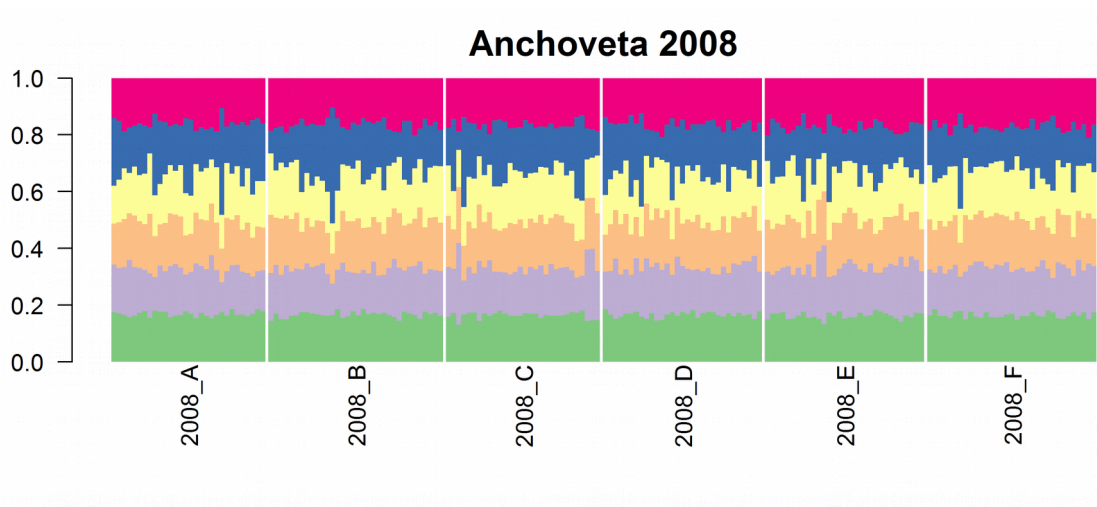


Figura 58: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para la base de datos de anchovetas adultas del año 2008 para $K = 6$.

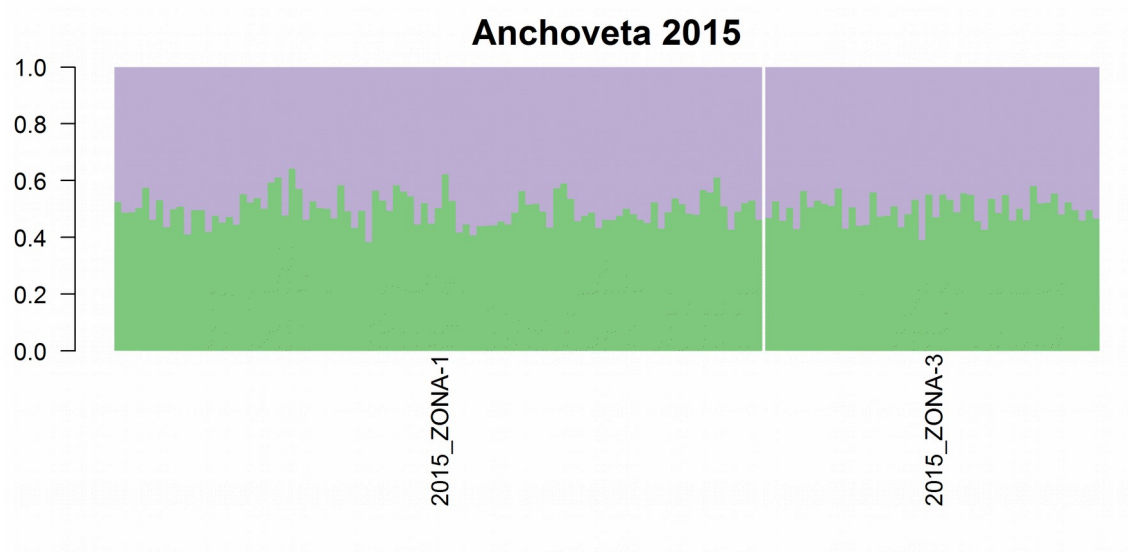


Figura 59: Gráfico de coeficientes de ancestría individual obtenidos en el software STRUCTURE para la base de datos de anchovetas juveniles del año 2015 para K = 2.

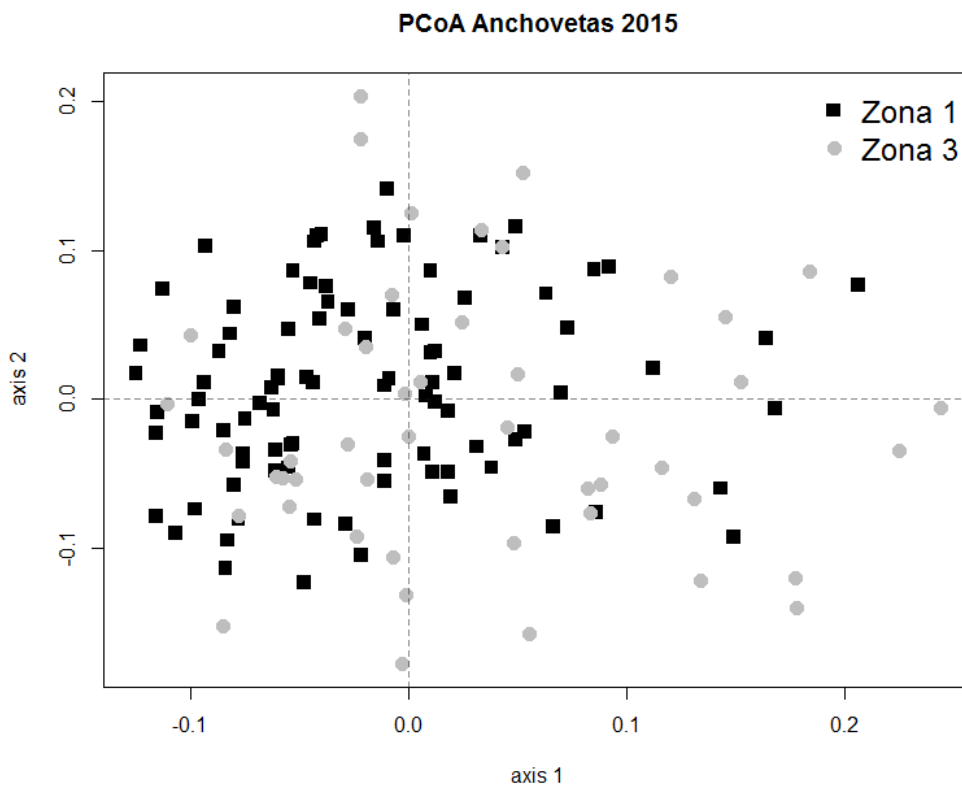


Figura 60: Análisis de Coordenadas Principales para la base de datos de anchovetas juveniles del 2015 basado en distancias genéticas.

6. Análisis y discusión de resultados

Los resultados obtenidos trabajando con ambos sets de datos, adultos y juveniles de manera individual dan cuenta de patrones diferenciados y modelo dependiente. Aplicando el modelo de frecuencias alélicas no correlacionado se obtuvo un *conglomerado* genético más probable de $K = 1$ (Figura 52), no detectando diferencias genéticas significativas entre las temporadas y localidades bajo estudio. Estos resultados son consistentes con los resultados basados en el análisis de la bases de datos combinada, incluido ambos modelos (frecuencias alélicas correlacionadas, y no correlacionadas) (Figura 51). Adicionalmente, estos resultados coinciden con previos estudios en *Engraulis ringens* (Ferrada et al. 2002), y peces pelágicos como *Strangomera bentincki* (Galleguillos et al. 1997) y *Trachurus murphyi* (Galleguillos, Canales-Aguirre, et al. 2012).

Por otro lado, los resultados utilizando un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas (i.e. las frecuencias de los alelos tienden a ser similares en diferentes poblaciones) mostró que para individuos adultos del 2008 se obtuvo un $K = 3$ y para individuos juveniles del 2015-2015 un $K = 2$ (Figura 52).

Para adultos, los tres *conglomerados* genéticos identificados no mostraron un patrón geográfico definido (e.g. latitudinal), sino más bien parchoso, con valores de probabilidad asociadas a las *isolíneas* menores a $pp < 0.4$ (Figura 53). La presencia de *conglomerados* genéticos con bajo sustento probabilístico puede ser resultado de la baja diferenciación genética estimada con el modelo de frecuencias alélicas no correlacionada. Esta escasa diferenciación se ve corroborada por el análisis de aislamiento por distancia (Figura 55) para los adultos del año 2008 que presentan ausencia del patrón de aislamiento por distancia, obteniéndose una pendiente negativa, de baja magnitud y no significativamente diferente de cero, lo que indicaría que no existe un incremento en la distancia genética producto de la distancia geográfica y ausencia de flujo génico.

Por el contrario, para los juveniles se observó un patrón de estructura genética geográfica definido, separando individuos de la zona norte (Zona I) de la zona centro-sur de Chile (Zona III) (Figura 54). Destacando que las *isolíneas* de cada *conglomerado* genético identificado mostró valores de probabilidad mayores a > 0.9 , dando robustez al patrón genético evidenciado, y que se ve corroborado por el análisis de aislamiento por distancia de las muestras de juveniles del 2015-2016 que muestra la Figura 56, con un coeficiente de correlación del 40%.

Este patrón de aislamiento genético por distancia estaría relacionado con segregación de la especie en el área de estudio durante fases tempranas de crecimiento, con individuos juveniles cercanos a las áreas de desove, que se van disgregando a medida que van creciendo. Esta segregación en estadios juveniles se dispararía llegando a la adultez, producto de la mezcla evidenciada con las herramientas complementarias utilizadas en este estudio, el análisis de la microestructura de otolitos evidencia un

porcentaje de mezcla entre adultos de anchoveta del 3% entre la Zona I y Zona III (Tabla 30). Este porcentaje de mezcla sería suficiente para evitar la diferenciación genética significativa de generación en generación, llevando a patrones de homogeneidad genética entre muestras temporales de adultos y juveniles (Figura 57). Esto se puede establecer debido a que si el patrón de aislamiento por distancia evidenciado en juveniles del 2015-2016 fuera estable en el tiempo, debiera mostrar diferencias con los genotipos de adultos del 2008, y esto no ocurre (Figura 51 y 57). Para corroborar este resultado resulta importante genotipar los adultos del 2015-2015, y realizar los análisis correspondientes.

7. Conclusiones

Ante los resultados descritos se concluye que:

- No se observan diferencias genéticas significativas entre muestras de adultos del 2008 y muestras de juveniles del 2015-2016.
- No se observan diferencias significativas entre localidades muestreadas para ejemplares adultos del 2008.
- No se observan diferencias genéticas significativas entre grupos de edad de juveniles muestreadas en el 2015-2016.
- Se observan diferencias genética significativas entre los extremos de la distribución de la especie en Chile, para ejemplares juveniles del 2015-2016.
- Bajo una visión más conservativa se genera mayor evidencia de la presencia de una sola gran población en la especie *E. ringens* en su distribución en Chile, no observándose diferencias genéticas temporales, y destacando que las diferencias genéticas espaciales evidenciadas en los juveniles del 2015-2016 deben ser corroboradas con: análisis de muestras de juveniles en la zona central, para identificar la zona de quiebre genético y poder completar el patrón descrito, así como analizar la genética de los adultos del 2015-2016, y comparar con la información ya generada.
- Futuros estudios deben ser realizados enfocados en incluir un mayor número de localidades de estudio, implementar marcadores mitocondriales y marcadores de único nucleótido, estos últimos con mayor cobertura en el genoma y parte de ellos sensibles a procesos adaptativos.

OBJETIVO 3: DESARROLLAR UN MODELO CONCEPTUAL RESPECTO A LAS MIGRACIONES ONTOGÉNICAS DE LOS INDIVIDUOS, LOS POSIBLES PROCESOS DE CONECTIVIDAD, Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES AMBIENTALES.

1. Introducción

El actual modelo conceptual que sustenta, de manera más o menos explícita, el manejo de anchoveta en Chile concibe dos unidades demográficas en las Zonas I y III, las que, probablemente, se mezclan en la Zona II, desconociéndose la existencia de una unidad demográfica local en esta última. Para sustentar la existencia de dos unidades evolutivas y/o demográficas separadas se requiere niveles importantes de fidelidad a la zona natal, es decir, del retorno predominante de adultos a desovar en sus propias zonas de origen. En el caso de las unidades evolutivas esta fidelidad deberá ser muy cercana al 100%, mientras que en el caso de las unidades demográficas, podrá ser menor, pero suficiente como para conducir a dinámicas poblacionales independientes en cada unidad (Taylor & Dizon 1999).

Estimar el grado de mezcla entre unidades durante la época de alimentación y/o la existencia de dinámicas de fuente-sumidero poseen poco interés directo para caracterizar las unidades demográficas, para lo que, como ya hemos dicho, es fundamental concentrarse en el grado de aislamiento reproductivo y la proporción de desovantes que posee un origen local. Sin embargo, desde el punto de vista del estudio de la dinámica de una unidad demográfica particular, resulta de gran importancia conocer la manera en que esta unidad contribuye a la pesquería en cada área y período de explotación. Sólo de esta manera se podrá obtener tasas de mortalidad por pesca realistas para cada unidad.

El estudio de los procesos de migración ontogenética, conectividad y fidelidad al sitio natal es complejo e intenso en términos del tiempo y de los recursos humanos, físicos y financieros requeridos para el efecto. Es por este motivo que, aún cuando los métodos directos, basados en marcaje y seguimiento o en marcaje y recaptura han logrado gran desarrollo, han tendido a ceder un importante espacio a métodos indirectos basados en marcadores naturales (Cadrin et al. 2005, Secor 2015). Es necesario clarificar que las ventajas de los métodos indirectos son, en general, solo de orden económico y práctico, permitiendo el desarrollo de estudios que, de otro modo, serían inviables.

2. Metodología

El desarrollo del presente objetivo fue de carácter más bien cualitativo y exploratorio, y estuvo orientado a revisar y/o formular hipótesis y modelos conceptuales acerca de la distribución espacial y de los patrones migratorios de esta especie en el área de estudio. Este desarrollo de hipótesis

alternativas se basó, principalmente, en los resultados del análisis de marcadores moleculares, química y microestructura (crecimiento temprano) de otolitos.

Según lo comprometido en la oferta técnica, se evaluaron tres modelos conceptuales (hipótesis) acerca de la estructura poblacional de *E. ringens* en el área de estudio:

- H1; unidad demográfica única: ausencia de diferencias significativas en la composición isotópica de la sección central de otolitos de adultos y de otolitos de juveniles capturados en las distintas zonas de estudio.
- H2; múltiples unidades demográficas sustentadas en la residencia de los peces durante su ciclo de vida: ausencia de perfiles elementales o composición isotópica de bordes que denoten migración a zonas distantes de alimentación
- H3: múltiples unidades demográficas sustentadas en fidelidad a sitio natal: evidencia de migración a zonas distantes de alimentación en perfiles elementales o composición isotópica de bordes, pero captura predominante de los adultos en sus correspondientes zonas natales.

2.1. Geo-localización de áreas de crianza de anchoveta

Con el fin de obtener una fuente adicional de información sobre la distribución más probable de los reclutas y adultos de anchoveta, se procedió a aplicar un método de geo-localización basado en la comparación de la composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$) observada en otolitos de anchoveta de distintas procedencias y la composición esperada (en el agua) a lo largo de la costa chilena, derivada de la variabilidad espacial de sus condiciones de salinidad y temperatura.

i. Valores observados de $\delta^{18}\text{O}$

Se utilizaron valores de $\delta^{18}\text{O}$ determinados en secciones nucleares y marginales de otolitos sagitales de juveniles y adultos anchoveta del mismo cohorte (año 2015), determinados como parte del proyecto FIPA 2015-22 (ver sección correspondiente a microquímica de otolitos en Objetivo 2). Las secciones nucleares se diseñaron para representar los primeros 4 meses de vida en anchovetas juveniles y adultas. Mientras que la sección marginal de cada otolito se diseñó para representar los últimos 5-7 meses de vida de individuos adultos (>11.5 cm LT). Por ende, es posible asumir que el valor de $\delta^{18}\text{O}$ observado en sus otolitos es representativo del hábitat utilizado durante estos mismos períodos.

ii. Valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$

Los otolitos incorporan ^{18}O en proporción directa a la concentración relativa de este mismo isótopo en el agua de mar (Campana 1999), y las concentraciones relativas de ^{18}O en agua de mar

y otolitos varían inversa y significativamente con la temperatura (Kim & O’Neil 1997, Thorrold et al. 1997, Campana 1999). Mientras que existe una relación casi lineal entre la concentración relativa de $\delta^{18}\text{O}$ en el agua y la salinidad (LeGrande & Schmidt 2006, Xu et al. 2012) De esta manera, conociendo los valores de salinidad y temperatura del hábitat, es posible estimar el valor esperado de $\delta^{18}\text{O}$ en la matriz calcárea del otolito formada durante su permanencia en ese mismo hábitat. Siguiendo esta lógica, aplicamos los modelo de Kim et al (2007) para estimar la función de distribución de probabilidad (FDP) de las concentraciones de $\delta^{18}\text{O}$ esperables en la secciones nucleares y marginales de otolitos de anchoveta, para cada celda geográfica. Esto siguiendo la relación,

$$(1) 1000 \ln \alpha = 17.88 \pm 0.13 \left(\frac{10}{T} \right) - 31.14 \pm 0.46$$

donde α es $(\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonita}} + 1000)/(\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}} + 1000)$ y T es la temperatura del agua ($^{\circ}\text{K}$).

iii. Concentración relativa de ^{18}O en el agua

Para estimar los parámetros de la FDP de los valores de $\delta^{18}\text{O}_{(\text{agua})}$ en cada celda geográfica, se utilizó información de la base de datos mundial de $\delta^{18}\text{O}$ en agua, reportados desde 1950 (Schmidt et al. 1999, LeGrande & Schmidt 2006) y de otros nueve cruceros realizados en el océano costero frente a Chile (37-46 $^{\circ}\text{S}$) entre 2009 y 2014. Con esta información se ajustaron modelos que permitieran predecir $\delta^{18}\text{O}$ en agua a partir de las variables físicas de la columna de agua (LeGrande & Schmidt 2006). El mejor modelo, fue aquel que sólo considero la salinidad como predictor de $\delta^{18}\text{O}$:

$$(2) \delta^{18}\text{O}_{(\text{agua})} = -13.46 (1.748) + 0.40(0.051) \times S$$

De esta manera, para predecir $\delta^{18}\text{O}_{(\text{agua})}$ en cada celda geográfica del área de estudio, se utilizó valores de salinidad (media y devianza) obtenidos de información procedente de seis cruceros de investigación realizados entre julio de 2015 y diciembre de 2016 (18-42 $^{\circ}\text{S}$). Además se utilizó la información disponible en software Ocean Data View para la misma zona y periodo. Se seleccionó los datos reportados entre los 0 y 60 m de profundidad, ya que representa el rango batimétrico de distribución de anchoveta (Castillo et al. 2012, Saavedra et al. 2014). Se interpolaron los valores de salinidad de seis estratos batimétricos, de diez metros cada uno (i.e., 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 y 50-60 m). Esto se realizó mediante modelos latentes Gaussianos, usando la aproximación anidada integrada de Laplace, con la librería “INLA” de R (Rue et al. 2009, Lindgren & Rue 2015) El área de estudio fue definida como una grilla espacial de 12495 celdas de 5 km^2 , cuyos límites latitudinales norte y sur fueron -18.4 y -41.7 $^{\circ}\text{S}$, respectivamente.

iv. Probabilidad de procedencia y valor relativo de hábitats de ocurrencia

Para comparar los valores de $\delta^{18}\text{O}$ observados en las secciones de otolitos con la FDP de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ predichos en cada celda geográfica, se calculó la (densidad de) probabilidad de que cada uno de los individuos juveniles y adultos hubiera habitado cada una de las celdas definidas en el área de estudio. Finalmente, indexamos el valor de cada celda como hábitat de ocurrencia, sumando las probabilidades individuales antes calculadas dentro de cada celda analizada.

3. Resultados y discusión

3.1.1. Patrones de estructuración genética poblacional

La escasa estructuración genética observada en muestras de las zonas más distantes (I y III) sustenta la hipótesis de que ciertos niveles de conectividad existirían en toda el área de estudio, al menos en escalas de tiempo evolutivo. Esta información es coherente con los resultados de los análisis de mezcla basados en análisis microestructurales y químicos de otolitos, los cuales sugieren niveles de mezcla de 1-24% entre zonas de estudio, dentro de un mismo año. De esta manera, es posible postular que *E. ringens* en la costa chilena, y probablemente a lo largo de toda la Corriente de Humboldt conforma una única unidad evolutiva. Esta unidad evolutiva estaría conformada por múltiples unidades demográficas que tenderían a permanecer en la proximidad de sus zonas de crianza y responderían localmente a los cambios ambientales y a la presión extractiva.

3.1.2. Composición elemental de otolitos

Los principales cambios ontogenéticos en la composición elemental de los otolitos fueron observados en ^{24}Mg , ^{88}Sr y ^{138}Ba , donde la concentración relativa de ^{24}Mg y ^{88}Sr tendió a disminuir con la edad, mientras que lo contrario tendió a suceder con el ^{138}Ba . Dada la limitada variabilidad en salinidad a lo largo de la costa chilena, es posible relacionar la disminución en ^{88}Sr con una disminución en la temperatura del agua (Elsdon et al. 2008), lo que podría estar asociado con un acercamiento a zonas de surgencia y/o a una profundización dentro de la columna de agua. La proporcionalidad esperada entre magnesio y tasa metabólica y el aumento en la concentración relativa $\delta^{18}\text{O}$ tienden a confirmar el uso de aguas más frías por parte de los adultos. La escasa contribución de las zonas de crianza I y II a la Zona III, llevan a sostener que este desplazamiento ontogenético sería, principalmente, de carácter vertical y/o longitudinal y no latitudinal.

3.1.3. Composición isotópica de otolitos

Dadas condiciones relativamente constantes de salinidad, existe una proporcionalidad inversa entre la concentración relativa $\delta^{18}\text{O}$ en el agua de mar (y en el otolito) y la temperatura del mar (Kim & O'Neil 1997). Dado este marco teórico, nuestros resultados muestran un claro patrón de segregación térmica entre las distintas zonas de crianza, donde el $\delta^{18}\text{O}$ en juveniles se incrementa hacia el sur. Esta diferencia es mucho más fuerte al comparar la Zona III con las Zonas I y II, lo que parece responder a sus distintos niveles de segregación latitudinal. El aumento ontogenético de $\delta^{18}\text{O}$ en adultos, por su parte, es consistente con las hipótesis de un desplazamiento hacia zonas de surgencia y/o a una profundización en la columna de agua.

La interpretación de la variabilidad observada en la concentración relativa $\delta^{13}\text{C}$ es un poco más compleja toda vez que la concentración $\delta^{13}\text{C}$ en el agua de mar, representa el resultado final de procesos de asimilación (fotosíntesis), transporte (hundimiento, surgencias, aportes fluviales) y liberación (respiración) que ocurren en el ecosistema y son, por lo tanto, independientes del individuo analizado (Quay et al. 2003). Para mayor dificultad, los niveles de $\delta^{13}\text{C}$ en otolitos no sólo reflejan la concentración $\delta^{13}\text{C}$ en el agua de mar, sino que el nivel de $\delta^{13}\text{C}$ en sus presas (reflejando el largo relativo de las cadenas tróficas locales) y la tasa metabólica de los propios peces (función de la temperatura). Aún dadas estas limitaciones en cuanto a su interpretación mecanística, la comparación de este isótopo entre zonas y etapas de vida, nos permite deducir la existencia de diferencias ecosistémicas entre hábitats de crianza y/o alimentación.

En general, un otolito enriquecido en $\delta^{13}\text{C}$ puede ser el resultado de permanecer en ecosistemas más productivos (fraccionamiento por fotosíntesis) y/o de ocupar un nivel trófico superior al del grupo utilizado como referencia. De manera tentativa, podríamos relacionar los mayores niveles de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados en los juveniles de la Zona III con mayores niveles de productividad en esa zona durante los meses primaverales, posteriores al desove. El aumento ontogenético de $\delta^{13}\text{C}$ con la edad, observado en el borde de los otolitos de adultos, podría por su parte, estar asociado con el incremento de nivel trófico de los adultos y/o con la depleción del ^{12}C asociada al final del periodo de mayor productividad fitoplanctónica (primavera-verano).

3.1.4. Geolocalización

Los dos estratos más superficiales (0-10 y 10-20 m) presentaron las mayores probabilidades de ocurrencia ($\Sigma P = 0.22$ y 0.20 , respectivamente) de juveniles de anchoveta provenientes de la zona norte y centro. Mientras que en los estratos más profundos (> 30 m), la probabilidad de ocurrencia en el área de estudio fueron menores ($\Sigma P: 0.15-0.11$) y los valores entre celdas fueron más homogéneos. En

general, los patrones de ocurrencia en el área de estudio fueron similares para los individuos de provenientes de la zona norte y centro. En ambos casos se observa que las probabilidades son mayores al norte de los 29° S (Figura 61 y Figura 62).

En individuos juveniles provenientes de la zona norte, las celdas espaciales con las mayores probabilidades (percentil 0.975) se concentraron en tres extensas zonas (18.25°-22.8° S, 23.9-24.8° S y 25.9°-28.0° S) en el estrato más superficial. En el estrato de 10-20 m se observó una zona costera ubicada entre los 25.5° y 26.9° S. Para los individuos juveniles provenientes de la zona centro, la mayores probabilidades (percentil 0.975) se concentraron en una extensa zona entre el Norte de Arica y los 24.5° S y otra entre los 26.7° y 28.0° S, en el estrato superficial de 0-10 m (Figura 62). En el estrato de 10-20 se observaron otras dos zonas ubicadas los 19 y 20.3° S y entre 25.1 y 28.8° S (Figura 62).

Los juveniles provenientes de la zona sur, mostraron la mayor probabilidad de ocurrencia en el estrato de 20-30 m (ΣP : 0.18). Sin embargo, la variación de la probabilidad entre estratos fue baja, siendo 0.16 en la mayoría de los estratos (0-10, 40-50 y 50-60 m). Los patrones espaciales de probabilidad de las celdas fue diferente entre estratos (Figura 63). En el estrato más superficial (0-10 m), las celdas con mayor probabilidad se observaron al sur de los 27.8° S, concentrándose entre los 28° y 32.5° S (Figura 63). Los siguientes dos estratos de profundidad (entre los 10 y 30 m), presentaron los mayores valores de ΣP (0.17-0.18) y la distribución de probabilidades entre celdas fue más homogénea. En general, las celdas con probabilidades más altas se observaron al norte de los 32° S (Figura 63). Las mayores probabilidades de ocurrencia (percentil 0.975) en el estrato de 10-20 m se concentraron entre los 28° y 32° S. Mientras que en el estrato de 20-30 m se observaron tres zonas, ubicadas entre los 20.5° y 27.8° S. En los tres estratos restantes (entre los 30 y 60 m) las probabilidades de las celdas disminuyeron a medida que aumento la profundidad del estrato, y las probabilidades más bajas se concentraron en la zona sur del área de estudio ($> 28.5^\circ$ S). En el estrato de 30-40 m, se observaron dos zonas que presentaron celdas con mayores probabilidades de ocurrencia (percentil 0.975), la primera ubicada entre los 18.25° y 22.8° S y segunda entre los 24.6° y 27° S (Figura 63).

La fase adulta de individuos provenientes de la zona norte y centro mostraron los mismos patrones de distribución de probabilidades y no se observaron diferencias notorias entre los distintos estratos (Figura 67 y 68). Las celdas con las mayores probabilidades (percentil 0.975) se concentraron en el estrato de 30-40 m, entre los 18.25° y 28.8° S. En individuos provenientes de la zona sur, los estratos más profundos, presentaron las probabilidades de ocurrencia mas altas (ΣP : 0.19 en 40-50 y 50-60 m). Mientras que el estrato más superficial presentó las menores probabilidades (ΣP : 0.12). En general se observó que las probabilidades de ocurrencia aumentan en el sentido norte-sur, siendo más notorio este

patrón en los estratos más superficiales (Figura 69). Las celdas que concentraron las mayores probabilidades de ocurrencia (percentil 0.975) se observaron en los estratos más profundos. En los 40-50 se ubicaron en tres áreas costeras al norte de Constitución (28.9°-30.2°, 31.1°-32.8 y entre 33.8°-35.3° S) y alrededor de Isla Mocha. Mientras que en el estrato de 50-60 m, se concentraron en dos extensas zonas: 28 y 34.9° S y entre Isla Mocha y los 40° S.

En general, no se observaron diferencias en los patrones de distribución de la fase recluta de individuos juveniles y adultos en el área de estudio. Esto se debe principalmente, a que la concentración relativa de $\delta^{18}\text{O}$ no presentó diferencias significativas entre estos individuos de diferentes etapas. La zonas con mayor probabilidad de ocurrencia de individuos provenientes de la zona norte y centro (estratos < 30 m), son consistentes con los patrones de distribución de huevos y reclutas (al norte de 29° S). Si bien, la abundancia y distribución de huevos puede presentar importantes variaciones inter-anales, los focos de distribución más importantes se concentran entre Arica y Antofagasta, siendo una zona recurrente de abundancia la que se ubica entre Iquique y Tocopilla (Valenzuela et al. 2014) De igual forma, en esta zona (Arica - Antofagasta) se encuentran una importante fracción de reclutas, los cuales se ubican preferentemente en los primeros 25 m de profundidad (Córdova & Legua 2015, Leiva et al. 2016). Otra zona que concentró las celdas con las mayores probabilidades de ocurrencia para individuos de la zona norte y centro, fue el área ubicada entre los entre los 25° y 28° S en los dos estratos más superficiales. Dentro de esta zona, en la primera milla costera, se ha reportado importantes concentraciones de huevos (> 100 huevos/100m³), entre los 25° y 26.5° S (Mujica et al. 2016)(25° S-27° S) de ocurrencia de individuos juveniles (Leiva et al., 2015, 2014).

Los individuos juveniles provenientes de la zona sur, presentaron la probabilidad más baja en el sur de la zona de estudio, incluyendo las área próximas al origen de las muestras. Todas las celdas con mayor probabilidad de ocurrencia se encontraron al norte de los 26° S. Zonas importantes en términos de abundancia de huevos (Cubillos & Castro 2016) y de juveniles (Canales-Aguirre et al. 2017), ubicadas entre Punta Nugurme-Golfo de Arauco (36°-37° 10' S) e Isla Mocha-Corral (38° 30'-39° 50' S) no fueron representados con celdas espaciales de alta probabilidad de ocurrencia. Esta inconsistencia en los resultados, puede relacionarse a la deficiencia del modelo para predecir $\delta^{18}\text{O}$ en el agua de mar en la zona sur del área de estudio. Una estacionalidad significativa puede producir un sesgo en las estimaciones de $\delta^{18}\text{O}$ en el agua de mar en ciertas regiones usando solo la salinidad como predictor (LeGrande & Schmidt 2006)

Las mayores probabilidades de ocurrencia de adultos provenientes de la zona norte y centro se observaron al norte de los 28° S, esto coincide en general con la distribución de anchoveta entre Arica y Caleta Totalillo (32.03° S). (Córdova and Legua, 2015; Leiva et al., 2015, 2016). Para individuos

provenientes de la zona sur, las celdas de mayores probabilidad se ubicaron al sur de los 28° S, la mayoría en el estrato más profundo. Sin embargo, la única zona que se corresponde con abundancias altas de anchoveta, es la que se encuentra entre Isla Mocha y Corral (Canales-Aguirre et al. 2017). No se observaron diferencias notorias entre estratos de profundidad para individuos adultos de la (zona norte y centro), lo que podría relacionarse con el carácter migratorio (circadiano) de anchoveta en la columna de agua. Si bien, anchoveta se encuentra preferentemente en los primeros 30 m de profundidad, se ha observado grandes variaciones en la profundidad media de las agregaciones, con registro importantes bajo los 30 m (40-100 m), durante episodios fuertes de “el Niño” (ej 1998-2016) (Leiva et al. 2016)

La sección marginal de los otolitos se diseñó para representar los últimos 5-7 meses de vida de peces adultos. Durante este tiempo, además de las migraciones circadianas, anchoveta realizaría migraciones tróficas y/o reproductivas, experimentando variaciones físico-químicas en la columna de agua, que podrían relacionarse con la distribución homogénea de probabilidades de ocurrencia en el área de estudio.

En general, nuestros resultados fueron concordadores con la distribución espacial reportada para individuos juvenil y adultos de anchoveta (zona norte y centro). Si bien, no se logró localizar áreas específicas de ocurrencia (mayor resolución espacial), fue posible geo-localizar áreas de ocurrencia de esta especie, a partir de características físicas del agua (salinidad, temperatura) y químicas de otolitos ($\delta^{18}\text{O}$). Las principales limitaciones identificadas, se relacionan con :

- Extenso periodo de tiempo representados por la estructura de los otolitos (núcleo: 4 meses, borde: 5-7 meses), periodo en el cual, anchoveta puede realizar migraciones de carácter circadiano, trófico y/o reproductivo.
- Limitada resolución espacial y temporal de salinidad y temperatura en la columna de agua
- La necesidad de un modelo específico de $\delta^{18}\text{O}$ (en el agua) para el área de estudio.

4. Conclusiones

- Zonas con mayor probabilidades de ocurrencia, coinciden con distribución espacial de anchoveta en la zona norte y centro.
- Mayores probabilidades de ocurrencia de individuos provenientes de la zona sur, no representó la distribución espacial de anchoveta observada en la zona sur.
- Es posible geo-localizar hábitats de peces a partir $\delta^{18}\text{O}$ observados en otolitos y características físico-químicas del agua.

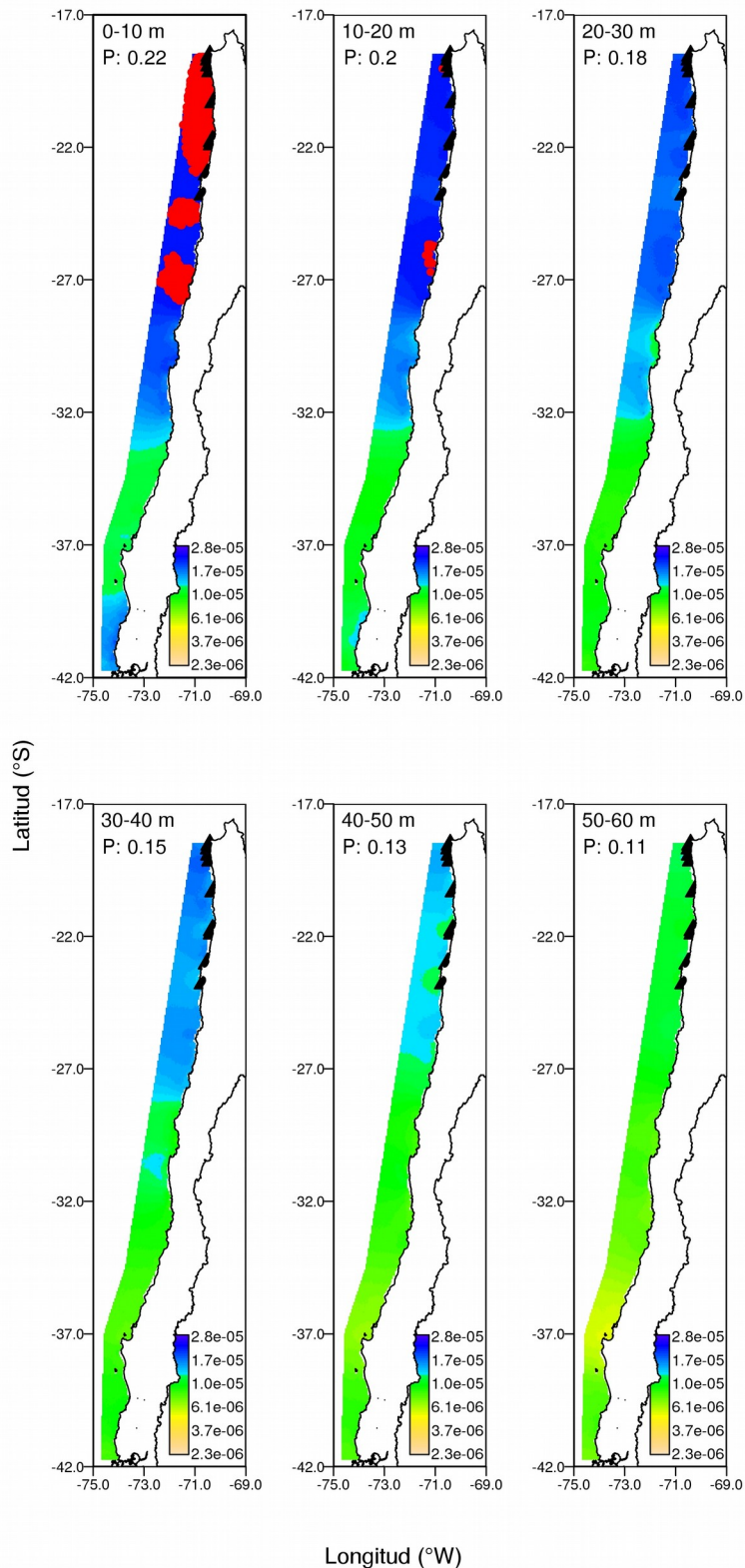


Figura 61: Geo-localización de las áreas de crianza utilizadas por juveniles capturados dentro de la Zona I. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda (2×2 km²). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.

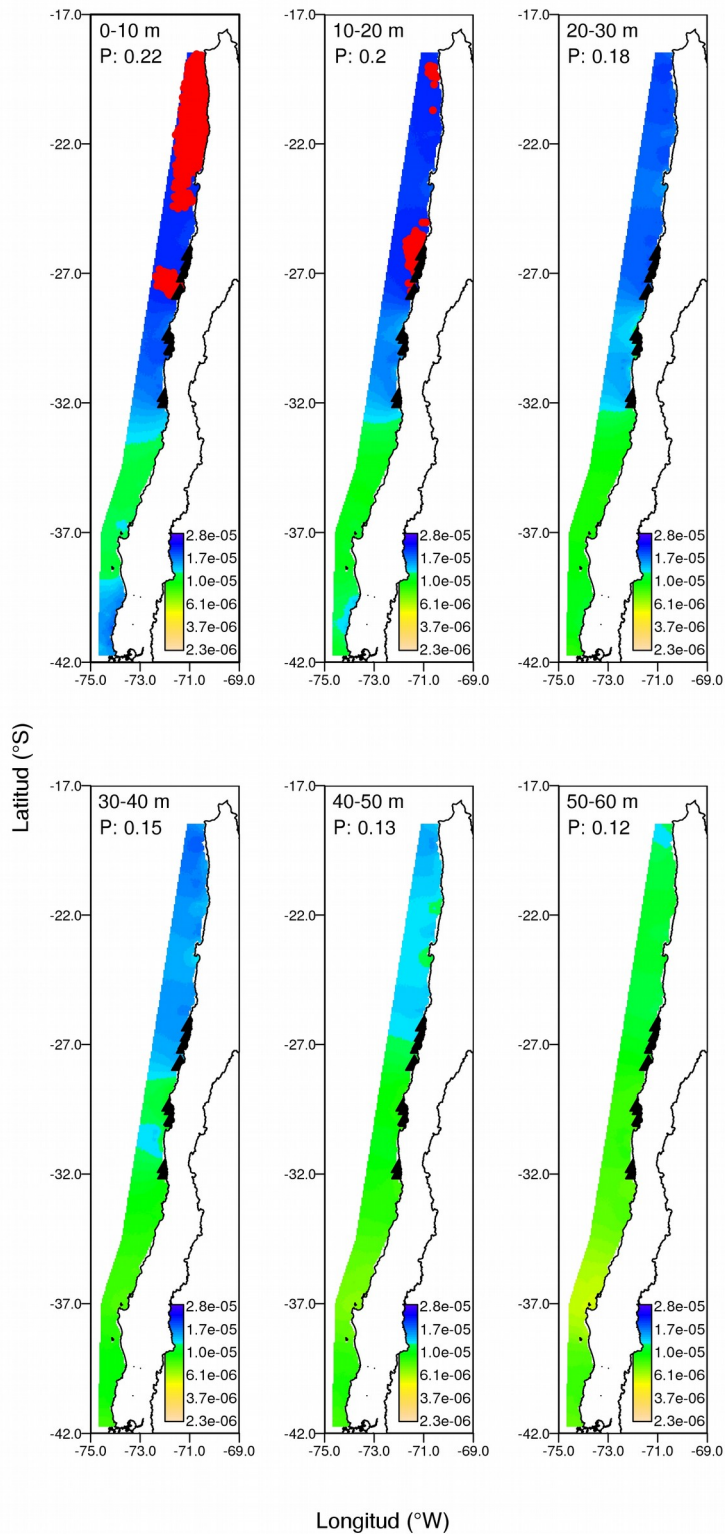


Figura 62: Geo-localización de las áreas de crianza de juveniles capturados dentro de la Zona II. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda ($2 \times 2 \text{ km}^2$). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.

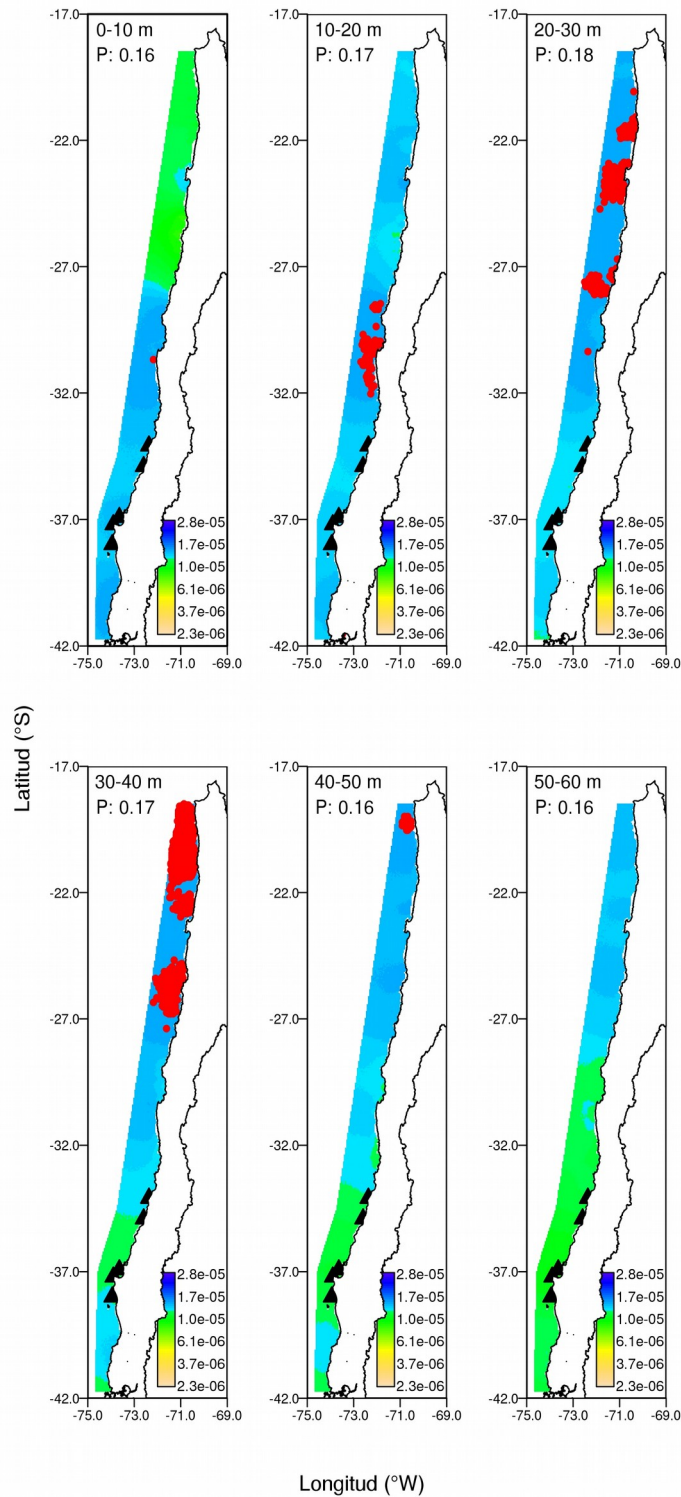


Figura 63: Geo-localización de las áreas de crianza de juveniles capturados dentro de la Zona III. Triángulos negros identifican sitios de captura. La escala de colores representa probabilidad de uso de cada celda ($2 \times 2 \text{ km}^2$). Cada panel representa un estrato de profundidad. El valor P corresponde a la suma de las probabilidades de todas las celdas dentro de cada estrato. Las celdas en rojo representan probabilidades de ocurrencia superiores al percentil 0,975 del conjunto de celdas y estratos.

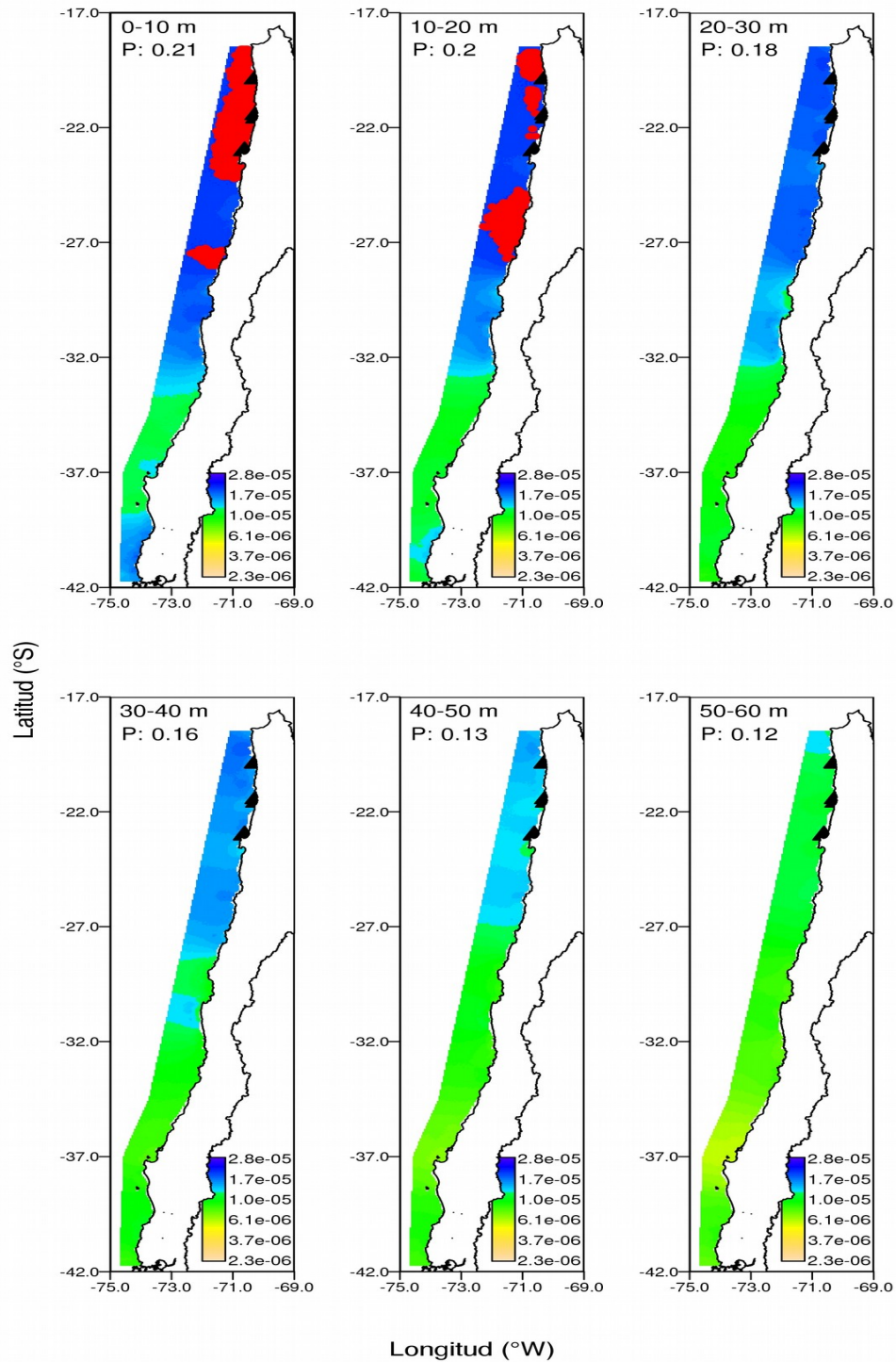


Figura 64: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona norte (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}O$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}O$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

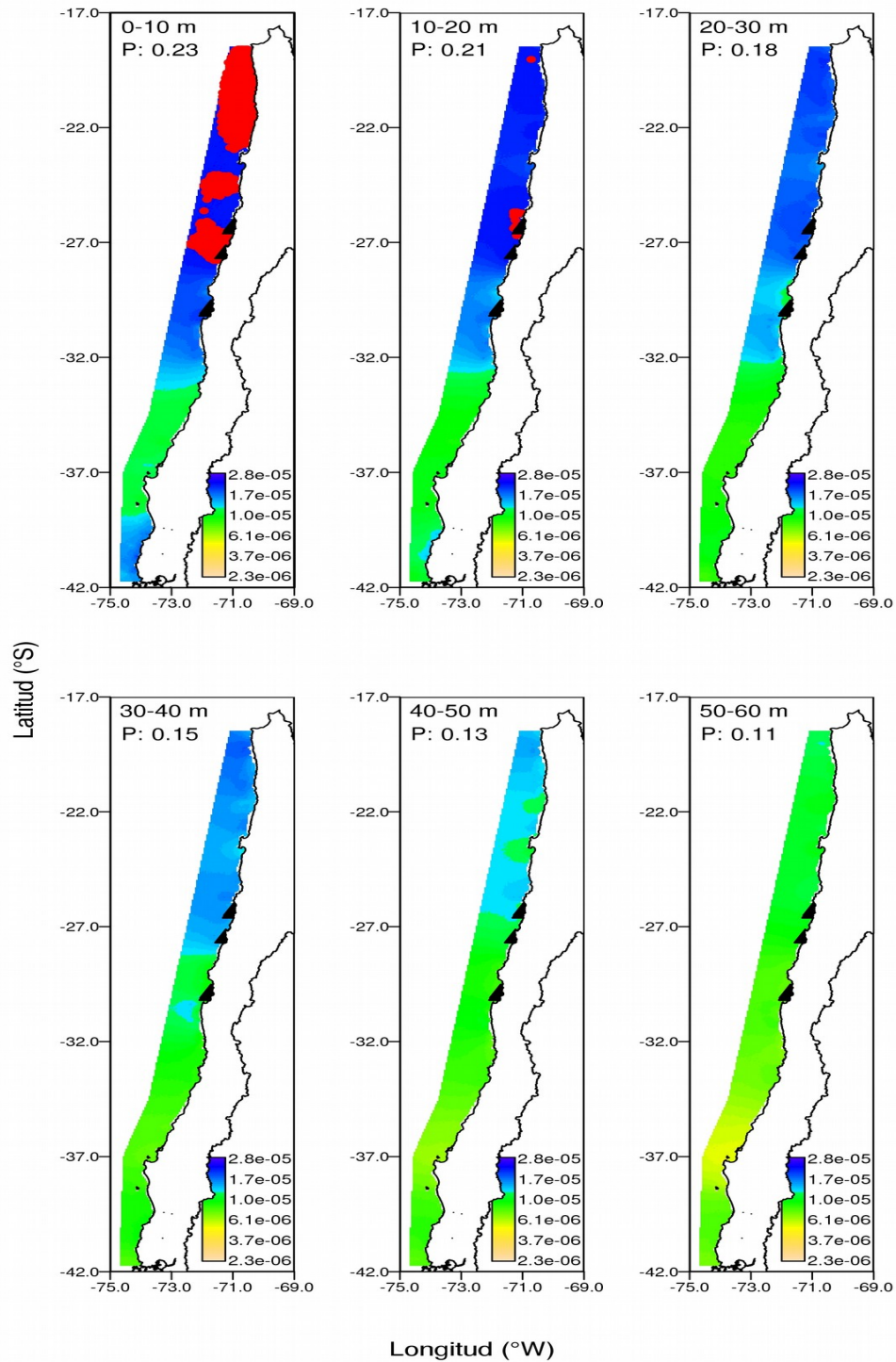


Figura 65: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona centro (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}\text{O}$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

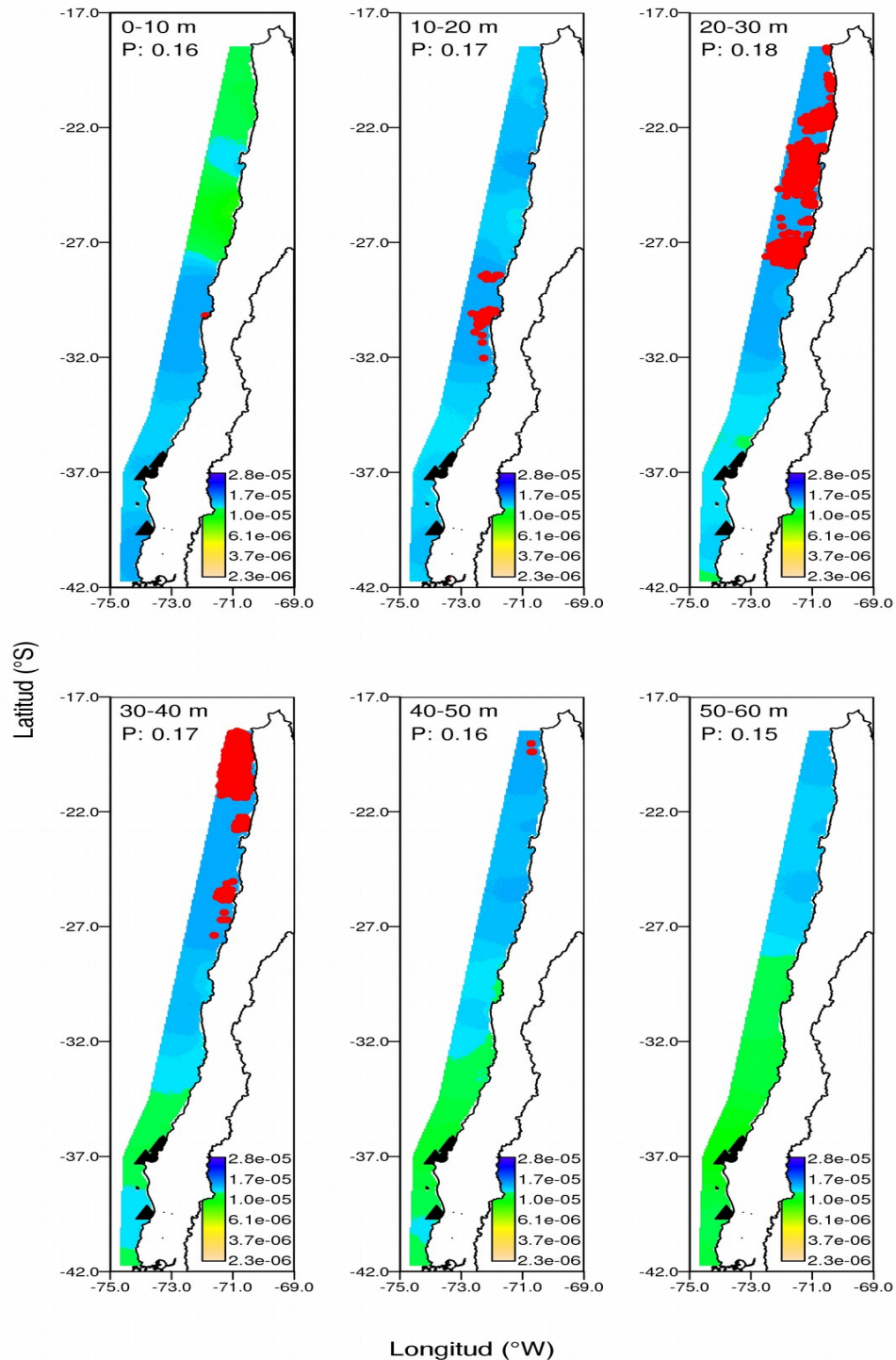


Figura 66: Probabilidad de ocurrencia de la etapa pre-reclutas de anchovetas adultas provenientes de la zona sur (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}\text{O}$ en el núcleo de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

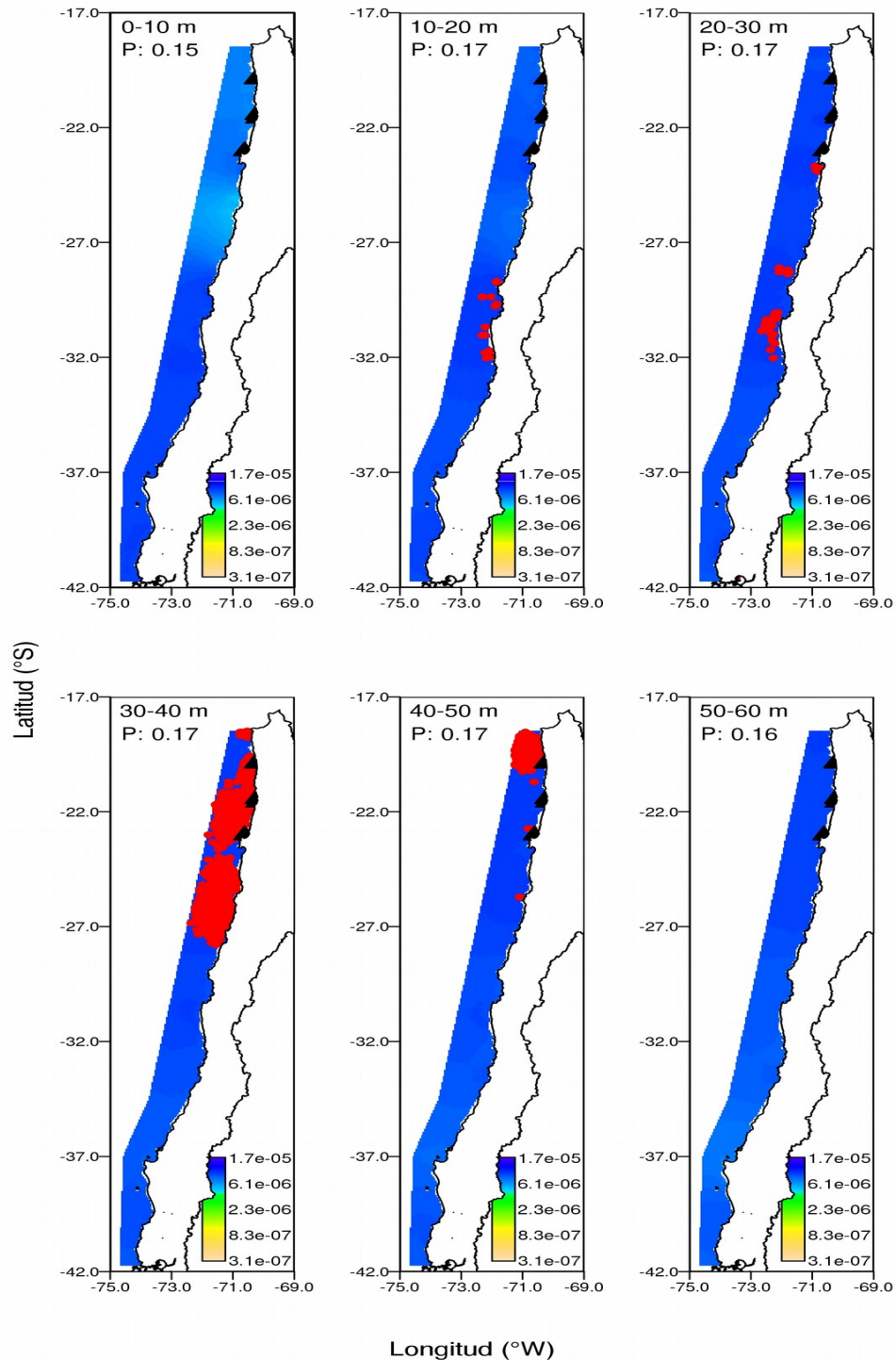


Figura 67: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona norte (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}\text{O}$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

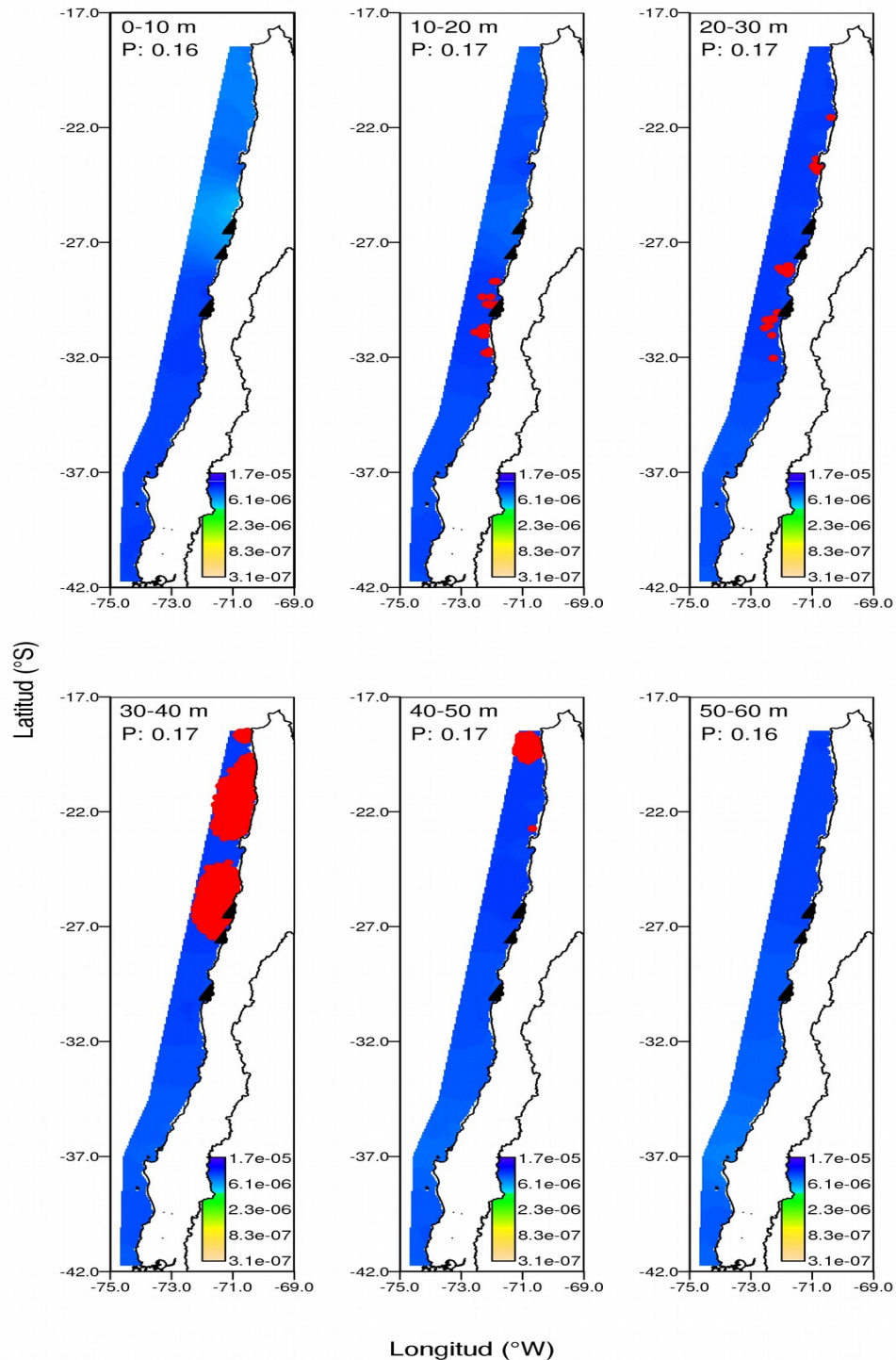


Figura 68: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona centro (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}\text{O}$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

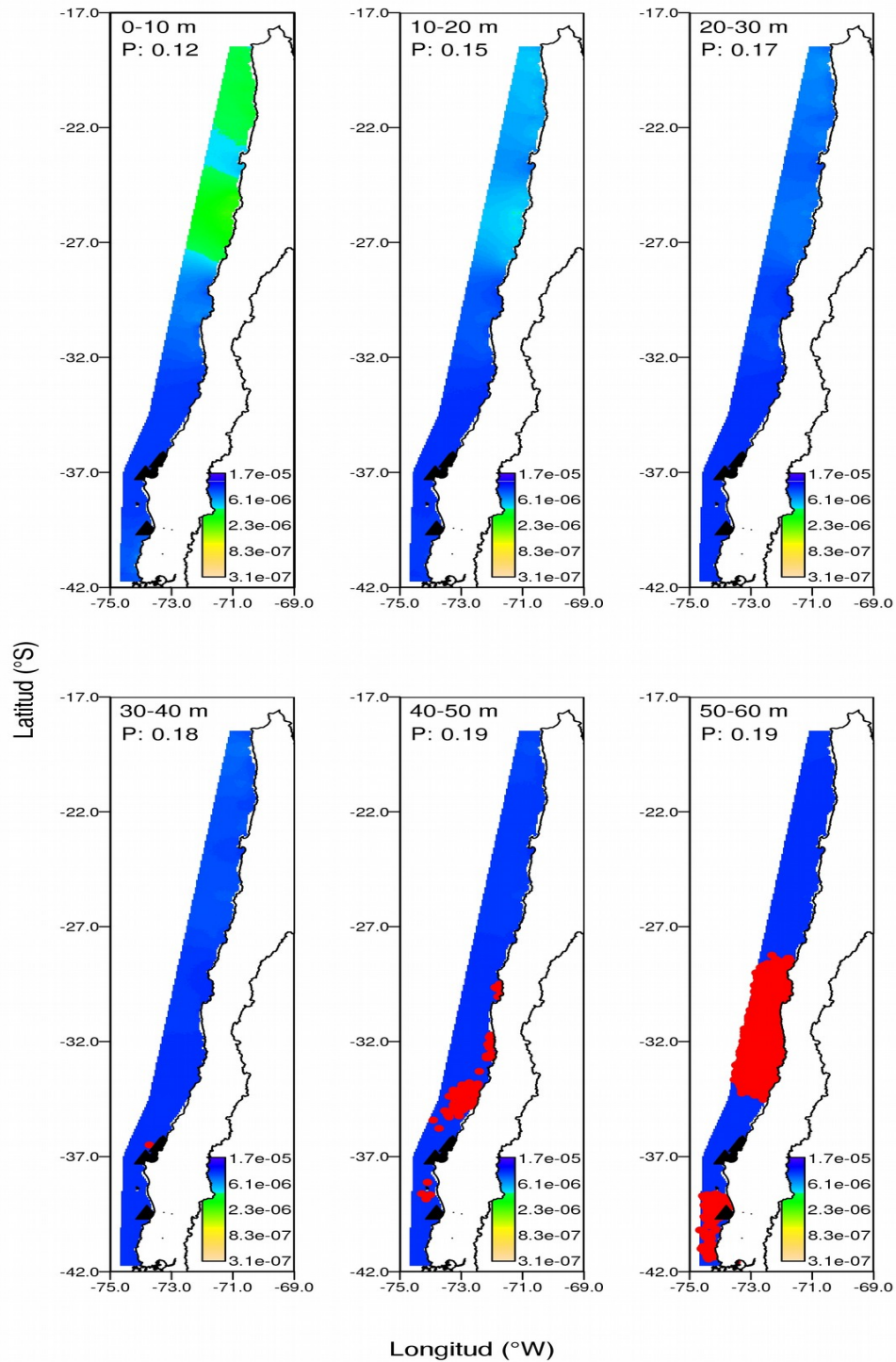


Figura 69: Probabilidad de ocurrencia de la etapa adulta de anchovetas adultas provenientes de la zona sur (triángulos negros) calculada a partir de la comparación de valores observados de $\delta^{18}\text{O}$ en el borde de otolitos con la función de probabilidad de valores esperados de $\delta^{18}\text{O}$ en cada celda geográfica. Cada panel representa un estrato de profundidad diferente, donde P es la suma de probabilidades de cada celda en el área de estudio en cada estrato. Celdas en rojo, representan aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia (percentil 0.975).

4.1.1. Patrones de crecimiento temprano

Las marcadas diferencias en las tasas de crecimiento de los juveniles de *E. ringens* encontradas entre las tres zonas estudiadas superaron los niveles de heterogeneidad ambiental reflejados en el análisis químico de los otolitos, y sugieren la existencia de marcadas diferencias tróficas entre zonas de crianza. Estas diferencias podrían guardar relación con efectos ecofisiológicos de la temperatura, abundancia y calidad de presas, presencia de competidores y/o depredadores, entre otros controladores del crecimiento durante las etapas tempranas de desarrollo de esta especie. La gran precisión de esta técnica permitió identificar el origen de los adultos con altos niveles de certidumbre y mostró que estos tienden a permanecer en la proximidad de sus respectivas zonas de crianza, llevándonos a postular que las migraciones latitudinales en la etapa adulta tendrían una importancia más bien limitada.

4.1.2. Morfometría de otolitos y composición parasitaria

La existencia de diferencias morfométricas significativas entre zonas, tanto en peces juveniles, como en adultos confirma la existencia de diferencias ambientales importantes entre zonas de crianza y alimentación y niveles importantes de fidelidad a las mismas. Esto, dado que la existencia de tales diferencias sería incompatible con procesos relevantes de mezcla causados ya sea por movimientos aleatorios o direccionales (migraciones). La existencia de diferencias Norte-Sur en cargas parasitarias viene, por último, a reforzar lo planteado en términos de la existencia de movimientos relativamente limitados entre zona. Lo anterior, sin perjuicio del bajo poder discriminante asociado a la baja prevalencia de parásitos encontrada en esta especie.

5. Conclusiones

Considerando las piezas de evidencia generadas por el presente estudio, proponemos el siguiente modelo conceptual:

- Existencia de una única unidad evolutiva en aguas chilenas, conformada por múltiples unidades demográficas de conectividad limitada, pero suficiente para mantener la integridad genética de la población.
- Existencia de, al menos, tres unidades demográficas, sustentadas en la fidelidad relativa de los adultos a su sitio natal, traducida en desplazamientos limitados de ejemplares adultos a zonas de alimentación más frías y/o profundas, relativamente próximas a sus respectivas zonas de crianza

OBJETIVO 4: ESTIMAR EL GRADO DE MEZCLA ENTRE LAS UNIDADES POBLACIONALES.

5.1. Introducción

La utilización de enfoques multidisciplinarios para la identificación de unidades poblacionales o demográficas se ha transformado en una práctica frecuente durante las últimas décadas (Begg et al. 1999, Begg & Waldman 1999, Abaunza 2008). Sin embargo, y a pesar de la intención declarada o implícita de combinar múltiples fuentes de información (el llamado “enfoque holístico”), son todavía poco frecuentes los casos donde esta información es efectivamente integrada a nivel de las pruebas de hipótesis y/o la estimación de parámetros relevantes para la evaluación del stock y/o la toma de decisiones. Es así como muchos estudios finalizan con un conjunto de estimaciones paralelas, discrepantes en métodos y resultados (Smith & Campana 2010), que pueden llegar a oscurecer más que a aclarar la toma de decisiones.

Los esfuerzos más concretos en la dirección de un enfoque holístico han sido desarrollados a partir del desarrollo de modelos de distribuciones mezcladas (Everitt & Hand 1981), introducidos a las ciencias pesqueras por Fournier et al. (1984) y Millar (Millar 1987, 1990). Esta aproximación forma la base de la mayoría de los métodos de análisis integrado basados en modelos de mezcla usados en la actualidad (Pella & Masuda 2001, Niklitschek et al. 2010, Smith & Campana 2010). Es común a todos estos métodos considerar que las contribuciones de distintas poblaciones o stocks de origen (fuentes) a una determinada mezcla (zona de desove, captura o alimentación) son parámetros desconocidos y estimables, con valores entre 0 y 1 (stock único). Es importante mencionar que la estimación de estos parámetros es formal y explícita y no guarda relación, al menos directa, con las matrices de errores de clasificación que resultan de la aplicación de técnicas multivariadas como el análisis de conglomerados o el análisis discriminante.

En el presente proyecto, utilizamos la versión de modelos de mezcla de distribuciones finitas para fuentes desconocidas propuesta por Niklitschek & Darnaude (2016), la que permite estimar en un mismo procedimiento el número más verosímil de fuentes u orígenes, sus contribuciones a cada una de las mezclas analizadas y los parámetros que caracterizan las distribuciones de origen para cada una de las variables-respuesta integradas en el análisis.

5.2. Metodología

El análisis integrado consideró tres tipos de fuentes de información: análisis microestructural (AMO), composición isotópica (CIO) y composición elemental (CEO) de otolitos de peces. Considerando las piezas de evidencia generadas por el presente estudio, proponemos el siguiente modelo conceptual:

- Existencia de una única unidad evolutiva en aguas chilenas, conformada por múltiples unidades demográficas de conectividad limitada, pero suficiente para mantener la integridad genética de la población.
- Existencia de, al menos, tres unidades demográficas, sustentadas en la fidelidad relativa de los adultos a su sitio natal, traducida en desplazamientos limitados a zonas de alimentación más frías y/o profundas, relativamente próximas a sus respectivas zonas de crianza. juveniles y adultos.

Fueron excluidos de este análisis los datos de genética, morfometría de otolitos y composición parasitaria. Los primeros fueron excluidos dado que los resultados del presente estudio confirmaron la ausencia de diferencias genéticas significativas entre las zonas más extremas del área de estudio. Los datos de morfometría de otolitos fueron excluidos dada la estrecha relación entre forma y tamaño que dificulta la aplicación de parámetros derivados de peces juveniles (orígenes conocidos) al análisis de las mezclas de peces adultos (de origen desconocido). La exclusión de los datos de composición parasitaria obedeció a una lógica similar, donde la ausencia de parásitos en peces juveniles impidió la utilización de estos marcadores para estimar las contribuciones de cada origen potencial a las mezclas analizadas.

El análisis integrado se llevó a cabo mediante modelos de mezcla de distribuciones finitas (Everitt & Hand 1981), ajustados a través del algoritmo EM (Expectation-Maximization) de Dempster (1977) siguiendo la modificación presentada por Niklitschek & Darnaude (2016). Este procedimiento apunta a maximizar la verosimilitud (probabilidad conjunta de las muestras obtenidas en cada zona de interés), en función de la participación proporcional de cada zona de origen dentro de cada zona de muestreo y de los parámetros (medias y matrices de varianza-covarianza) estimados para cada set de variables-respuesta, dentro de cada zona de origen. Lo anterior, siguiendo la forma general (Smith & Campana 2010):

$$l(\psi|\mathbf{X}) = \prod_{a=1}^A \prod_{m=1}^M \prod_{s=1}^S \hat{p}_{as} \cdot g_{ms}(x_{am}|\psi)$$

donde,

A : número de mezclas (áreas de desove o captura)

M : número de marcadores seleccionados

S : número de orígenes natales (áreas de crianza)

\hat{p}_{as} : proporción estimada de la contribución del origen s a la mezcla a

g_{ms} : función de densidad de probabilidad de cada tipo de marcador m en cada origen s

x_{am} : matriz de valores observados para el tipo de marcador m en la mezcla a

ψ : vector de parámetros (medias y covarianzas de cada marcador en cada zona)

En la presente implementación, se utilizó un modelo condicional donde los vectores de medias y matrices de covarianzas fueron estimados ex-ante a partir de los datos obtenidos de peces juveniles, dentro de cada zona, utilizando modelos mixtos multivariados de tipo bayesiano, implementados en el paquete R MCMCglmm (Hadfield 2010). De esta manera, los parámetros ajustados mediante los modelos de mezcla correspondieron a las proporciones estimadas en que cada origen natal contribuyó a cada zona de captura, con sus correspondientes errores estándar. Se comparó modelos de mezcla basados en uno, dos y tres orígenes, donde el modelo de dos orígenes fusionó las Zonas I y II en un origen común. Para realizar estas comparaciones se calculó los criterios de información de Akaike (1973) y bayesiano de Schwartz (1978).

5.3. Resultados

La comparación de modelos de mezcla basados en uno, dos y tres orígenes mostró que la hipótesis de tres orígenes fue la más informativa para los datos de análisis microestructural, mientras que los modelos de dos orígenes fueron los más informativos para los datos de composición isotópica y composición elemental, y para el modelo integrado. Dada la inconsistencia anterior, se reportan resultados del análisis de mezcla para dos (Tablas 52, 53 y 54) y tres orígenes (Tablas 55, 56 y 57).

5.3.1. Modelos basados en hipótesis de dos orígenes

Existió un alto grado de concordancia entre los resultados proporcionados por los distintos modelos parciales y por el modelo integrado (Tablas 52, 53 y 54). En todos ellos, se estima una muy baja mezcla de orígenes en la Zona I, con una contribución de 99.99% del origen I-II, y con mezclas algo mayores en las Zonas II (0-8% de contribución de la Zona III) y III (0-6% de contribución de la Zona I-II).

Tabla 52: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona I (Arica-Parinacota a Antofagasta). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes

Método	Contribución estimada y error estándar según origen			
	Zonas I+II	EE I+II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	0.999	< 0.0001	0.0000	< 0.0001
Composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$)	1.000	< 0.0001	0.0000	< 0.0001
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	1.000	< 0.0001	0.0000	< 0.0001
Integrado	0.974	0.03271	0.026	0.03271

Tabla 53: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona II (Atacama-Coquimbo). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes.

Método	Contribución estimada y error estándar según origen			
	Zonas I+II	EE I+II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	1.000	< 0.0001	0.000	< 0.0001
Composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$)	1.000	< 0.0001	0.0000	< 0.0001
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	0.862	0.2126	0.138	0.2126
Integrado	0.717	0.0704	0.2830	0.0704

Tabla 54: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona III (Valparaíso-Los Lagos). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de dos orígenes.

Método	Contribución estimada y error estándar según origen			
	Zonas I+II	EE I+II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	0.062	0.1918	0.938	0.1918
Composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$)	0.030	0.0867	0.970	0.0867
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	0.000	< 0.0001	1.000	< 0.0001
Integrado	0.000	< 0.0001	0.9999	< 0.0001

5.3.2. Modelos basados en hipótesis de tres orígenes

Existió un alto grado de concordancia entre los resultados proporcionados por los modelos de mezcla construidos individualmente para los datos de análisis microestructural y composición isotópica de otolitos (Tablas 55, 56 y 57). Ambos coincidieron en estimar que 89-100% de los adultos presentes en

cada una de las zonas de muestreo habría tenido su origen en la misma zona de captura. El modelo construido a partir de los datos de composición elemental, sin embargo, estimó niveles de mezcla elevados entre las Zonas I y II, donde 48-60% de los adultos podrían haber sido originados en la zona adyacente. El modelo de mezcla integrado estimó que un 72-99% de los adultos muestreados tuvo origen en su propia zona de captura, con niveles de 0-24% de mezcla entre las Zonas I y II, 4-5% de mezcla entre las Zonas II y III y una mezcla marginal (~1%) entre las Zonas I y III (Tablas 55, 56 y 57).

Tabla 55: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona I (Arica-Parinacota a Antofagasta). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.

Método	Contribución estimada y error estándar según origen					
	Zona I	EE I	Zona II	EE II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	0.999	0.0000	0.000	< 0.0001	0.000	< 0.0001
Composición isotópica ($\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$)	0.999	0.0000	0.000	< 0.0001	0.000	< 0.0001
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	0.394	0.3540	0.606	0.3540	0.000	< 0.0001
Integrado	0.999	0.0012	0.001	0.0012	0.000	< 0.0001

Tabla 56: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona II (Atacama-Coquimbo). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.

Método	Contribución según origen					
	Zona I	EE I	Zona II	EE II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	0.131	0.2033	0.896	0.2033	0.000	< 0.0001
Composición isotópica ($\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$)	0.000	< 0.0001	1.000	< 0.0001	0.000	< 0.0001
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	0.371	0.3406	0.526	0.3281	0.104	0.1890
Integrado	0.235	0.0642	0.716	0.0578	0.050	0.0448

Tabla 57: Contribución estimada de las distintas zonas de origen a la mezcla de adultos de anchoveta *Engraulis ringens* presentes en la Zona III (Valparaíso-Los Lagos). Estimaciones obtenidas bajo la hipótesis de tres orígenes.

Método	Contribución según origen					
	Zona I	EE I	Zona II	EE II	Zona III	EE III
Análisis microestructural (R_{30} , R_{40} , g_{10-40})	0.000	< 0.0001	0.111	0.2122	0.889	0.2122
Composición isotópica ($\delta^{18}O$ y $\delta^{13}C$)	0.035	0.0948	0.000	< 0.0001	0.965	0.0948
Composición elemental (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{88}Sr , ^{138}Ba)	0.000	< 0.0001	0.000	< 0.0001	1.000	< 0.0001
Integrado	0.012	0.0182	0.037	0.0408	0.951	0.0447

5.4. Discusión

Los distintos métodos de análisis de unidades demográficas aplicados presentaron distintos niveles de resolución, particularmente, en lo que se refiere a las Zonas I y II. El análisis microestructural permitió identificar patrones de crecimiento temprano (0-40 días de vida) característicos de cada zona, lo que después permitió identificar con gran precisión a los adultos procedentes de cada uno de estos orígenes. Una limitación de este enfoque fue, no obstante, el menor tamaño de muestras asociado a la existencia de una proporción importante de otolitos ilegibles. Los análisis de composición elemental e isotópica de otolitos, por su parte, presentaron dificultades para discriminar entre juveniles de las Zonas I y II, aunque fueron muy efectivos para diferenciar estas dos zonas de la Zona III. La menor resolución de ambos enfoques químicos podría estar relacionada con una alta homogeneidad de las condiciones físico-químicas de las aguas de las Zonas I y II y/o a un desplazamiento temprano de los juveniles originados en cada zona. Esta última hipótesis parece débil frente a la consistente diferencia observada en los datos de microestructura, pero podría ser evaluada cambiando la resolución temporal de análisis de los perfiles disponibles de composición elemental. De esta manera, es posible especular que las Zonas I y II presentan condiciones físico-químicas similares, pero diferencias en factores biológicos (p.e. oferta de alimento) que permiten explicar tasas de crecimiento significativamente mayores en la Zona II.

Al comparar nuestros resultados con las actuales unidades de manejo, es posible plantear una eventual fusión de las unidades de pesquería equivalentes a las Zonas I y II de nuestro estudio. Ante esta disyuntiva, creemos que existe una duda razonable de que ambas zonas pertenezcan a unidades demográficas distintas, sustentada en las diferencias significativas encontradas en las tasas de crecimiento temprano y en la limitada evidencia de migración entre zonas encontrada por la mayoría de

las técnicas aplicadas. Frente a la duda, es posible plantear que, salvo errores o distorsiones de implementación, la estrategia más precautoria será aquella que contemple un mayor número de unidades de manejo y se oriente a evitar agotamientos locales (Taylor & Dizon 1999). Las tasas de mezcla estimadas en el presente proyecto podrían ser utilizadas para incorporar el intercambio entre unidades dentro de los modelos de evaluación de stock utilizados para el manejo de esta pesquería. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas tasas de mezcla pueden variar en respuesta a cambios ambientales en la calidad del hábitat y/o en el tamaño de la población (MacCall 1989). En este sentido, es importante señalar que el periodo analizado (2015-2016) coincidió con una fase cálida de la Oscilación del Sur del Niño (Santoso et al. 2017). Durante este fenómeno se producen diferentes anomalías en la columna de agua (ej: aumento de temperatura, profundización de la termoclina) y se han reportado variaciones importantes en la abundancia y distribución de pequeños pelágicos (Sánchez-Velaso et al. 2000, Garcia et al. 2012). Bajo esta situación de extrema inestabilidad se recomienda el análisis de un año de condiciones “normales” con el fin estimar la variación y el grado de incertidumbre que enfrentamos en este caso particular.

5.5. Conclusiones

- Los análisis microestructural, de composición isotópica y de composición elemental de otolitos proporcionaron datos de calidad adecuados para ajustar modelos de mezcla y, de esta manera, estimar la contribución de distintas áreas de crianza a las tres zonas de estudio.
- El número más informativo de orígenes dependió de la resolución de la técnica aplicada. El análisis microestructural mostró mayor capacidad para discriminar las Zonas I y II y condujo a una solución de un origen distinto para cada zona de estudio.
- Los análisis de composición elemental e isotópica, por su parte, presentaron una capacidad más limitada para discriminar entre las Zonas I y II y condujeron a una solución de sólo dos orígenes distintos para las tres zonas de estudio.
- Al integrar todos los métodos de análisis, se encontró una fuerte evidencia de que la Zona III corresponde a una unidad demográfica claramente separada de las Zonas I y II, con las cuales presentaría niveles de mezcla inferiores al 5%.
- Considerando el análisis integrado, se encontró evidencia de que las Zonas I y II presentan niveles mayores de mezcla, entre 0 y 24%.
- Se debe considerar que las tasas de mezcla antes señaladas pueden ser afectadas por cambios ambientales y/o en el tamaño de la población. En este sentido, las estimaciones presentadas

fueron obtenidas durante el período 2015-2016, el que coincidió con una fase cálida de la Oscilación del Sur del Niño.

- A partir de lo anterior, se recomienda repetir el análisis integrado y estimación de mezcla presentado, con datos procedentes de períodos contrastante (fase intermedia y/o fría de la Oscilación del Sur del Niño).

CONCLUSIONES GENERALES

Esta investigación se enfocó en la determinación de unidades poblacionales de anchoveta (*Engraulis ringens*) en el Océano Pacífico sur. Para lograr este objetivo se utilizaron diversas aproximaciones que incluyeron: el uso de parásitos, análisis de química de los otolitos (metales e isótopos estables), evaluación de la microestructura de otolitos, morfometría de otolitos y finalmente una mirada más evolutiva desde el punto de vista de la genética de poblaciones. Se debe considerar que en el análisis de algunas aproximaciones se asumió independencia de todas las muestras, es decir, no se consideró las posibles correlaciones existentes entre lances, que podría modificar las conclusiones del análisis de estos resultados. Las principales conclusiones que emanan de esta investigación son las siguientes:

- Los elementos que presentaron diferencias univariadas significativas entre zonas de crianza en individuos del periodo 2012-2013 fueron ^{23}Na , ^{55}Mn y ^{88}Sr . Mientras que para los individuos del periodo 2015-2016 sólo ^{55}Mn presentó diferencias significativas entre zonas.
- Se encontró diferencias univariadas significativas de $\delta^{18}\text{O}$ entre zonas de crianza, mientras que $\delta^{13}\text{C}$ no presentó diferencias significativas entre zonas.
- Los modelos multivariados (composición elemental e isotópica en otolitos) permitieron identificar al menos dos zonas de crianza de anchoveta, dependiendo de la aproximación metodológica y el período de tiempo analizado. Sin perjuicio de lo anterior, ambas aproximaciones mostraron existencia de segregación entre la Zona I y III.
- Diferencias en la composición elemental e isotópica de otolitos entre fases de vida de anchoveta sugieren un cambio de hábitat entre su etapa juvenil y adulta. Esto estaría relacionado a una migración batimétrica en la columna de agua, o a migraciones tróficas a zonas de surgencia.
- Los resultados obtenidos permitieron construir vectores de medias y matrices de varianza-covarianza característicos de cada zona de crianza, adecuados para la aplicación de modelos de mezcla de poblaciones finitas y, de este modo, para la estimación de la contribución de cada zona de crianza a las mezclas de adultos presentes en cada zona de captura.
- La aproximación parasitaria sugiere la existencia de dos unidades demográficas de anchoveta: una unidad sur, caracterizada por una alta prevalencia de *Anisakis sp.* y una unidad norte con bajos valores de prevalencia de este parásito, lo que es concordante con lo indicado por Valdivia et al. (2007).

- La fauna de parásitos analizada, resultó escasa en términos cualitativos y cuantitativos. Sin embargo sugiere aportes desde la Zona III (stock sur) a la Zona II del $1.14\% \pm 0.013$ y un aporte del $0.036\% \pm 0.011$ desde la Zona II a la Zona I.
- En cuanto al análisis de microestructura, este encontró una elevada proporcionalidad entre el tamaño del otolito y las mediciones radiales, las cuales fueron independientes de la zona analizada, evidenciando que el crecimiento antero-posterior del otolito tiende a mantenerse constante.
- La microestructura permitió distinguir mediante un análisis discriminante lineal las tres zonas estudiadas, utilizando el radio y grosor como variables independientes, en el periodo de mayor crecimiento entre los primeros 20 y 50 días de vida para el periodo 2015-2016.
- Los algoritmos de clasificación derivados del registro del radio y grosor de juveniles tempranos de origen conocido permitieron clasificar adultos recolectados cercanos a las áreas de crianza de las tres zonas estudiada para el periodo 2015-2016, revelándose que existe una separación en los ciclos de vida entre los ejemplares de la zona norte (zona I) y centro-sur (zona III).
- El análisis de la microestructura indica que la zona de Atacama-Coquimbo (zona II) contiene un porcentaje cercano a 35% de mezcla, de ejemplares provenientes mayoritariamente de la zona norte (zona I) y una pequeña fracción de ejemplares adultos que ocurren en esta zona provienen de la zona centro-sur (zona III).
- El ANDEVA del GAM que incluyó la zona como factor predictor de los índices de forma de los otolitos, evidenció para el factor de forma, redondez y elipticidad la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas. Este resultado es consistente con el análisis descriptivo, que sugiere la existencia de un gradiente latitudinal de norte a sur en la elipticidad de los otolitos, siendo los otolitos de peces de la zona I más elípticos que aquellos provenientes de la zona II y III. En forma inversa los otolitos de la zona III son más próximos a la forma circular que aquellos provenientes de la zona II y I.
- El análisis discriminante de los DF en peces juveniles de 2016 como adultos de 2016 y 2013 mostró la existencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas, con altos porcentajes de clasificación a su zona de origen, mayores al 81%, lo cual sugiere que la zona I (Arica-Antofagasta), II (Atacama-Coquimbo) y III (Talcahuano-Valdivia) corresponde unidades demográficas independientes.

- La evaluación de marcadores moleculares no detectan diferencias genéticas entre las distintas agrupaciones evaluadas,
- Los resultados indican que la hipótesis de una unidad evolutiva común para la anchoveta, *E. ringens* en las costas del Pacífico Sur Oriental resulta la más plausible, es decir, existe conectividad reproductiva, de importancia evolutiva desde el norte del Perú hasta el extremo austral de su distribución.
- Cabe destacar que valores de F_{st} significativos estimados entre zonas de muestreo en 2008, sector sur de Chile (Golfo de Arauco a Región de Los Ríos), y el sector norte (Iquique a Valparaíso) muestran patrones de aislamiento genético por distancia, soportando este escenario los valores de R_{st} al límite de la significancia entre la Zona I y Zona III de muestras de 2015-2016. Estos resultados deben ser interpretadas de manera cuidadosa, y nuevos análisis deben ser incorporados con la finalidad de dar soporte a estos nuevos escenarios.
- Al integrar todos los métodos de análisis, se encontró una fuerte evidencia de que la Zona III corresponde a una unidad demográfica claramente separada de las Zonas I y II, con niveles de mezcla inferiores al 5%. Las Zonas I y II, por su parte, presentaron niveles mayores de mezcla, llegando hasta un 24%.
- Considerando las piezas de evidencia generadas por el presente estudio, proponemos el siguiente modelo conceptual:
 - Existencia de una única unidad evolutiva en aguas chilenas, conformada por múltiples unidades demográficas de conectividad limitada, pero suficiente para mantener la integridad genética de la población.
 - Existencia de, al menos, dos y, probablemente, tres unidades demográficas, sustentadas en la fidelidad relativa de los adultos a su sitio natal, traducida en desplazamientos limitados a zonas de alimentación más frías y/o profundas, relativamente próximas a sus respectivas zonas de crianza.
- En términos del manejo pesquero de la especie consideramos precautorio mantener la separación del recurso en tres unidades de manejo espacialmente separadas lo que contribuye a evitar agotamientos locales, a mantener su variabilidad genética y, por lo tanto, su resiliencia frente a cambios ambientales futuros, sean estos de origen natural o antrópico.

- Debe considerarse que los niveles de mezcla entre unidades demográficas y/o de manejo, estimados en el presente estudio fueron obtenidas durante el el período 2015-2016, el que coincidió con una fase cálida de la Oscilación del Sur del Niño. Para obtener estimaciones más exactas de la condición promedio de la población, se recomienda obtener estimaciones adicionales de mezcla para períodos contrastante (fases intermedias y fría de la Oscilación del Sur del Niño).

REFERENCIAS

- Abaunza P (2008) Horse mackerel: Identification of stocks. *Fisheries Research* 89:101-103.
- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Caski F (eds) *Second International Symposium on Information Theory*. Akademiai Kiado, Budapest, p 267–281
- Araya M, Niklitschek EJ, Secor DH, Piccoli PM (2014) Partial migration in introduced wild chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of southern Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 149:87–95
- Begg GA, Brown RW (2000) Stock identification of haddock *Melanogrammus aeglefinus* on Georges Bank based on otolith shape analysis. *Transactions of the American Fisheries Society* 129:935–945
- Begg GA, Friedland KD, Pearce JB (1999) Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fisheries Research* 43:1–8
- Begg G, Overholtz W, Munroe N (2001) The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on George Bank. *Fish Bull* 99:1-14.
- Begg GA, Waldman JR (1999) An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research* 43:35–44
- Bentzen P, Bradbury IR (2016) Don't bet against the natal homing abilities of marine fishes. *Molecular Ecology* 25:2691–2692
- Bergenius MA, Mapstone BD, Begg GA, Murchie CD (2005) The use of otolith chemistry to determine stock structure of three epinepheline serranid coral reef fishes on the Great Barrier Reef, Australia. *Fisheries Research* 72:253–270
- Bird JL, Eppler DT, Checkley Jr DM (1986) Comparisons of herring otoliths using Fourier series shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:1228–1234
- Bolles KL, Begg GA (2000) Distinction between silver hake (*Merluccius bilinearis*) stocks in US waters of the northwest Atlantic based on whole otolith morphometrics. *Fishery Bulletin* 98:451–462
- Bonanomi S, Overgaard Therkildsen N, Retzel A, Berg Hedeholm R, Waaever Pedersen M, Meldrup D, Pampoulie C, Hemmer-Hansen J, Grønkvist P, Nielsen EE (2016) Historical DNA documents long distance natal homing in marine fish. *Molecular ecology*
- Box GE, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 26:211–252
- Bradbury IR, Laurel BJ (2007) Defining 'natal homing' in marine fish populations: comment on Svedäng et al. (2007). *Marine Ecology Progress Series* 349:307–308
- Brochier T, Colas F, Lett C, Echevin V, Cubillos LA, Tam J, Chlaida M, Mullon C, Fréon P (2009) Small pelagic fish reproductive strategies in upwelling systems: a natal homing evolutionary model to study environmental constraints. *Progress in Oceanography* 83:261–269
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453–455

- Brophy D, Danilowicz BS, King PA (2006) Spawning season fidelity in sympatric populations of Atlantic herring (*Clupea harengus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63:607–616
- Brunenmeister S (1980) A summary and discussion of technical information pertaining to the geographical discreteness of Atlantic bluefin tuna resources. Inter Comm Cons Atlan Tunas, Coll Vol Sci Pap 9:506–527
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J Parasitol 83:575–583
- Cadrin SX (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. Reviews in Fish Biology and Fisheries 10:91–112
- Cadrin S, Friedland KD, Waldman J (2005) Stock identification methods: an overview. In: Cadrin S, Friedland KD, Waldman J (eds) Stock identification methods. Elsevier Academic Press, San Diego, California, p 3–6
- Campana SE (1999) Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine Ecology Progress Series 188:263–297
- Campana S, Casselman JM (1993) Stock discrimination using otolith shape analysis. Can J Fish Aquat Sci 50:1062–1083
- Campana SE, Chouinard GA, Hanson JM, Frechet A, Bratley J (2000) Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. Fisheries Research 46:343–357
- Campana S, Fowler AJ, Jones CM (1994) Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 51:1942–1950
- Campana SE, Jones CM (1993) Analysis of otolith microstructure data. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences:73–73
- Canales TM, Leal E (2009) Parámetros de historia de vida de la anchoveta *Engraulis ringens* Jenyns, 1842, en la zona centro norte de Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 44:173–179
- Canales-Aguirre CB, Ferrada S, Hernández CE, Galleguillos R (2010) Population structure and demographic history of *Genypterus blacodes* using microsatellite loci. Fisheries Research 106:102–106
- Canales-Aguirre C, Ferrada-Fuentes S, Galleguillos R, Sepúlveda HH, Artal O, Parada C, Medel M, Niklitschek EJ, Garcés C, Aedo G, Hernández CE, Rivera R, Santis O, Gormáz A (2017) Identificación de áreas de conservación o resguardo para los recursos sardina común y anchoveta en la zona centro-sur de Chile. Pre-Informe final FIPA 2016-34. Universidad de los Lagos, Puerto Montt, Chile
- Cañas L, Stransky C, Schlickeisen J, Sampedro MP, Fariña AC (2012) Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 69:250–256
- Cardinale M, Doering-Arjes P, Kstowsky M, Mosegard H (2004) Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. Can J Fish Aquat Sci 61:158–167
- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. Journal of Heredity 99:616–623

- Casacci LP, Barbero F, Balletto E (2014) The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology* 81:182–193
- Castillo J, Barbieri MA, Espejo M, Catasti V, Rosales S, Osses J, Barria P, Daneri G, Gonzalez HE (1998) Estimación del reclutamiento de anchoveta en las regiones I y II. Informe Final FIP-IT/ 97-51. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Valparaíso, Chile
- Castillo J, Saavedra A, Catasti V, Leiva F, Lang C, Vargas R, Reyes H, Pizarro M, Molina E, Cerna F, López A, Nuñez S, Valenzuela L, Vasquez S (2012) Evaluación hidroacústica del reclutamiento de anchoveta y sardina común entre la V y X Regiones, año 2012. Informe Final Proyecto FIP 2011-07. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Valparaíso, Chile
- Castoe TA, Poole AW, Koning AJ de, Jones KL, Tomback DF, Oyler-McCance SJ, Fike JA, Lance SL, Streicher JW, Smith EN, Pollock D (2012) Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PloS one* 7:e30953
- Castro LR, Hernandez EH (2000) Early life survival of the anchoveta *Engraulis ringens* off central Chile during the 1995 and 1996 winter spawning seasons. *Transactions of the American Fisheries Society* 129:1107–1117
- Cerna F, Machuca C, López A, Serra R, Ojeda V, Gaspar C, Muñoz L, Saavedra J, Plaza G, Moyano G, Carreño D (2011) Revisión de la asignación por grupo de edad en la anchoveta de la zona norte. Informe Final FIP 2009-17. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Valparaíso, Chile
- Cerna F, Plaza G (2016) Daily growth patterns of juveniles and adults of the Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) in northern Chile. *Marine and Freshwater Research*
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* 24:621–631
- Claude J (2008) *Morphometrics with R*. Springer Science & Business Media, New York, USA
- Clausen LAW, Bekkevold D, Hatfield EMC, Mosegaard H (2007) Application and validation of otolith microstructure as a stock identification method in mixed Atlantic herring (*Clupea harengus*) stocks in the North Sea and western Baltic. *ICES J Mar Sci* 64:377–385
- Córdova J, Legua J (2015) Evaluación acústica del reclutamiento de anchoveta en la XV y II regiones, enero 2015. Informe Final. Instituto de Fomento Pesquero
- Cubillos LA, Castro L (2016) Evaluación del stock desovante de anchoveta y sardina común entre la V y X regiones. Año 2015. Informe final. Convenio de desempeño 2015 - IFOP / Subsecretaria de Economía y EMT.
- Cubillos LA, Ruiz P, Claramunt G, Gacitúa S, Nuñez S, Castro LR, Riquelme K, Alarcón C, Oyarzún C, Sepúlveda A (2007) Spawning, daily egg production, and spawning stock biomass estimation for common sardine (*Strangomera bentincki*) and anchovy (*Engraulis ringens*) off central southern Chile in 2002. *Fisheries Research* 86:228–240
- Curin-Osorio S, Cubillos LA, Chong J (2012) On the intraspecific variation in morphometry and shape of sagittal otoliths of common sardine, *Strangomera bentincki*, off central-southern Chile. *Scientia Marina* 76:659–666
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509

- De Woody J, Avise J (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56:461-473.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 39:1–38
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7:214
- Duponchelle F, Pouilly M, Pécheyran C, Hauser M, Renno J-F, Panfili J, Darnaude AM, García-Vasquez A, Carvajal-Vallejos F, García-Dávila C, others (2016) Trans-Amazonian natal homing in giant catfish. *Journal of Applied Ecology* 53:1511–1520
- Earl DA, vonHoldt B. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4:359–361
- Elsdon TS, Gillanders BM (2003) Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13:219–235
- Elsdon TS, Gillanders BM (2005) Alternative life-history patterns of estuarine fish: barium in otoliths elucidates freshwater residency. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62:1143–1152
- Elsdon TS, Gillanders BM (2006) Temporal variability in strontium, calcium, barium, and manganese in estuaries: Implications for reconstructing environmental histories of fish from chemicals in calcified structures. *Estuar Coast Shelf Sci* 66:147–156
- Elsdon TS, Wells BK, Campana S, Gillanders BM, Jones CM, Limburg KE, Secor DH, Thorrold SR, Walther BD (2008) Otolith chemistry to describe movements and life history parameters of fishes: hypotheses, Assumptions, limitations and inferences. In: *Oceanography and Marine Biology*.p 297–330
- Engstedt O, Engkvist R, Larsson P (2014) Elemental fingerprinting in otoliths reveals natal homing of anadromous Baltic Sea pike (*Esox lucius* L.). *Ecology of Freshwater Fish* 23:313–321
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14:2611–2620
- Everitt BS, Hand DJ (1981) *Finite mixture distributions*. Chapman & Hall, London-New York
- Excoffier L, Lischer HE. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567
- Ferrada S, Hernández K, Montoya R, Galleguillos R (2002) Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1842) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de ADN. *Gayana (Concepc)* 66:243–248
- Fournier DA, Beacham TD, Riddell BE, Busack CA (1984) Estimating stock composition in mixed stock fisheries using morphometric, meristic, and electrophoretic characteristics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41:400–408
- Fox J (2002) *An R and S-Plus companion to applied regression*. SAGE Publications, Incorporated
- Fox J, Weisberg S (2011) *An R companion to applied regression*, 2nd edn. Sage Publications, California, USA.

- Gaemers PA (1983) Taxonomic position of the Cichlidae (Pisces, Perciformes) as demonstrated by the morphology of their otoliths. *Netherlands Journal of Zoology* 34:566–595
- Galleguillos R, Canales-Aguirre CB, Ferrada S (2012) Genetic variability in jack mackerel *Trachurus murphyi* Nichols: New SSRs loci and application/ Variabilidad genética en jurel (*Trachurus murphyi* Nichols): Nuevos loci SSRs y aplicación. *Gayana* 76:67
- Galleguillos R, Chong J, Oyarzún C, Oliva M, Roa R (1996) Unidades de stock en los recursos sardina común y anchoveta de la zona centro-sur. Informe Final Proyecto FIP 94-20. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Talcahuano
- Galleguillos R, Ferrada S, Canales C, Hernández C, Oliva M, González MT, Cubillos L, Niklitschek E, Toledo P (2012) Determinación de unidades poblacionales de sardina austral entre la X y XII regiones de Chile. Informe Final Proyecto FIP 2010-17. Universidad de Concepción, Concepción, Chile
- Galleguillos R, Troncoso L, Oyarzún C (1997) Diferenciación poblacional en la sardina chilena *Strangomera bentincki* (Pisces: Clupeidae) análisis genético de variabilidad proteínica. *Revista Chilena de Historia Natural* 70:351–361
- Garcia AM, Vieira JP, Winemiller KO, Moraes LE, Paes ET (2012) Factoring scales of spatial and temporal variation in fish abundance in a subtropical estuary. *Marine Ecology Progress Series* 461:121–135
- Garrido S, Ben-Hamadou R, Santos AMP, Ferreira S, Teodósio MA, Cotano U, Irigoien X, Peck MA, Saiz E, Ré P (2015) Born small, die young: Intrinsic, size-selective mortality in marine larval fish. *Scientific reports* 5
- Gauldie RW, Nelson DGA (1990) Otolith growth in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 97:119–135
- Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Rubin DB (2014) Bayesian data analysis. Chapman & Hall/CRC Boca Raton, FL, USA
- George-Nascimento M (1996) Populations and assemblages of metazoan parasites in the hake *Merluccius gayi* (Guichenot) (Gadiformes: Merluccidae) from the Southeastern Pacific Ocean: stock implications. *J Fish Biol* 48:557–568
- George-Nascimento M (2000) Geographical variations in the jack mackerel *Trachurus symmetricus murphyi* populations in the southeastern Pacific Ocean as evidenced from the associated parasite communities. *J Parasitol* 86:929–932
- George-Nascimento M, Moscoso D (2013) Variación local y geográfica de las infracomunidades de parásitos de la anchoveta *Engraulis ringens* en Chile. *Revista de biología marina y oceanografía* 48:207–212
- George-Nascimento M, Oliva M (2015) Fish population studies using parasites from the Southeastern Pacific Ocean: considering host population changes and species body size as sources of variability of parasite communities. *Parasitology* 142:25–35
- González L, Carvajal J (1994) Estudio parasitológico de *Merluccius australis* (Hutton, 1972) del mar interior de Aysén. *Investigación Pesquera* 38

- Guia APO de, Saitoh T (2007) The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecological Research* 22:604–612
- Guidetti P, Petrillo M, De Benedetto G, Albertelli G (2013) The use of otolith microchemistry to investigate spawning patterns of European anchovy: A case study in the eastern Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Fisheries Research* 139:1–4
- Guillot G (2008) Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation - the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24:2222–2228
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170:1261–1280
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712–715
- Hadfield JD (2010) MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. *Journal of Statistical Software* 33:1–22
- Hamer PA, Jenkins GP (1997) Larval supply and short-term recruitment of a temperate zone demersal fish, the King George whiting, *Sillaginodes punctata* Cuvier and Valenciennes, to an embayment in south-eastern Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208:197–214
- Hecht T, Appelbaum S (1982) Morphology and taxonomic significance of the otoliths of some bathypelagic Anguilloidei and Saccopharyngoidei from the Sargasso Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 35:301–308
- Herrington WC (1939) Observations on the life history, occurrence, and distribution of the redfish parasite *Sphyrion lumpi*. United States Bureau of Fisheries
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal* 50:346–363
- Houde ED, Zastrow CE (1993) Ecosystem-and taxon-specific dynamic and energetics properties of larval fish assemblages. *Bulletin of Marine Science* 53:290–335
- Husebø AA, Slotte A, Clausen LAW, Mosegaard H (2005) Mixing of populations or year class twinning in Norwegian spring spawning herring? *Marine and Freshwater Research* 56:763–772
- Ihering H von (1891) On the ancient relations between New Zealand and South America. In: *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute*.p 431–445
- Iriarte JL, González HE (2004) Phytoplankton size structure during and after the 1997/98 El Niño in a coastal upwelling area of the northern Humboldt Current System. *Marine ecology progress series* 269:83–90
- Jarne P, Lagoda J (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11:424–429
- Jemaa S, Bacha M, Khalaf G, Amara R (2015) Evidence for population complexity of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) along its distributional range. *Fisheries Research* 168:109–116
- Jenkins GP (1987) Age and growth of co-occurring larvae of two flounder species, *Rhombosolea tapirina* and *Ammotretis rostratus*. *Marine Biology* 95:157–166

- Kalish JM (1991) ^{13}C and ^{18}O isotopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Mar Ecol-Prog Ser* 75:191–203
- Kim ST, O'Neil JR (1997) Equilibrium and nonequilibrium oxygen isotope effects in synthetic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:3461–3475
- Kim S-T, O'Neil JR, Hillaire-Marcel C, Mucci A (2007) Oxygen isotope fractionation between synthetic aragonite and water: influence of temperature and Mg^{2+} concentration. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71:4704–4715
- Kornfield I, Parker A (1997) Molecular systematics of a rapidly evolving species flock. The mbuna of Lake Malawi and the search for phylogenetic signal. In: Kocher T, Stepien C (eds) *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, California, USA., p 314
- Kuhl FP, Giardina CR (1982) Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics and image processing* 18:236–258
- Laikre L, Palm S, Ryman N (2005) Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 34:111–119
- Larsson LC, Laikre L, Palm S, André C, Carvalho GR, Ryman N (2007) Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology* 16:1135–1147
- LeGrande AN, Schmidt GA (2006) Global gridded data set of the oxygen isotopic composition in seawater. *Geophys Res Lett* 33:L12604
- Leiva F, Legua J, Cifuentes Ú, Giglio S, Reyes H, Pizarro M, Vargas R, Cerna F, López A, Catasti V, Lang C, Mujica A, Navas ML, Saavedra M, Herrera L (2014) Evaluación hidroacústica del reclutamiento de anchoveta en la III y IV Regiones, año 2014. Informe Final FIP N° 2013-04. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile
- Leiva F, Legua J, Cifuentes Ú, Grendi C, Pizarro M, Vargas R, Cerna F, López A, Catasti V, Lang C, Mujica A, Navas ML, Saavedra M, Herrera L (2015) Evaluación hidroacústica del reclutamiento de anchoveta en la III y IV Regiones, año 2015. Informe Final. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile
- Leiva F, Vargas R, Grendi C, Cifuentes U, Rozas C, Leiva B, Cerna F, López A, Herrera L, Jaque AJ, Lang C, Angulo J, Valenzuela V (2016) Evaluación hidroacústica del reclutamiento de anchoveta en la XV, I y II Regiones, año 2015. Informe Final. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Valparaíso, Chile
- Letelier J, Soto-Mardones L, Salinas S, Vincenti L, Pavez R, Arriagada M (2012) Influencia de la península de Mejillones en la variabilidad oceanográfica anual e interanual frente al norte de Chile. *Revista de biología marina y oceanografía* 47:513–526
- Levene H (1960) Robust tests for equality of variances. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB (eds) *Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, Stanford, California (USA), p 278–292
- Lindgren F, Rue H avarð (2015) Bayesian spatial modelling with R-INLA. *Journal of Statistical Software* 63
- Littel RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD (1996) SAS system for mixed models. Sas Institute Inc., Cary, N.C.

- Llanos-Rivera A, Castro LR (2004) Latitudinal and seasonal egg-size variation of the anchoveta (*Engraulis ringens*) off the Chilean coast. *Fishery Bulletin* 102:207–212
- Llanos-Rivera A, Castro LR (2006) Inter-population differences in temperature effects on *Engraulis ringens* yolk-sac larvae. *Marine Ecology Progress Series* 312:245–253
- Leonart J, Salat J, Torres GJ (2000) Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology* 205:85–93
- Lombarte A, Leonart J (1993) Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental biology of fishes* 37:297–306
- Luck GW, Daily GC, Ehrlich PR (2003) Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology & Evolution* 18:331–336
- Luo D, Koolgaard J (2014) predictmeans: Calculate Predicted Means for Linear Models.
- MacCall AD (1989) *Dynamic geography of marine fish populations*. University of Washington Press, Seattle and London
- MacKenzie K, Abaunza P (2005) Parasites as biological tags. In: Cadrin SX, Friedland KD, Waldman JR (eds) *Stock identification methods: applications in fisheries science*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, p 211–226
- Mank JE, Avise JC (2004) Individual organisms as units of analysis: Bayesian-clustering alternatives in population genetics. *Genetical research* 84:135–143
- Mann S, Parker SB, Ross MD, Skarnulis AJ, Williams RJP (1983) The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 218:415–424
- Meneses D, Oliveira LA de, Fernandes TM, Garcia M (2010) Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Biology* 33:390–393
- Millar RB (1987) Maximum likelihood estimation of mixed stock fishery composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44:583–590
- Millar RB (1990) *A versatile computer program for mixed stock fishery composition estimation*. Fisheries and Oceans, Canada, St. John's, Newfoundland
- Miller TJ, Crowder LB, Rice JA, Marschall EA (1988) Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45:1657–1670
- Montecino V, Quiroz D (2000) Specific primary production and phytoplankton cell size structure in an upwelling area off the coast of Chile (30 S). *Aquatic Sciences* 62:364–380
- Morales CE, Torreblanca ML, Hormazabal S, Correa-Ramírez M, Nuñez S, Hidalgo P (2010) Mesoscale structure of copepod assemblages in the coastal transition zone and oceanic waters off central-southern Chile. *Progress in Oceanography* 84:158–173
- Moritz C (1994) Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9:373–375

- Mujica A, Nava ML, Matsuda K, Vargas A (2016) Distribution and abundance of *Engraulis ringens* eggs along the north-central Chilean coastline (25.0-31.5° S) during February 2008 to 2014. *Latin american journal of aquatic research* 44:65–75
- Neilson JD, Geen GH, Chan B (1985) Variability in dimensions of salmonid otolith nuclei: Implications for stock identification and microstructure interpretation. *Fishery Bulletin* 83:81–89
- Niels T., Corten A, Gerlotto F, Habasque J, Bertrand A, Lehodey P, Brunel T, Dragon A-C, Senina I (2014) Hydrography and jack mackerel stock in the South Pacific - Final report. IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies, Wageningen, UR
- Niklitschek EJ, Darnaude AM (2016) Performance of maximum likelihood mixture models to estimate nursery habitat contributions to fish stocks: a case study on sea bream *Sparus aurata*. *PeerJ* 4:e2415
- Niklitschek EJ, Leiva F, Robles Y, Garcés C (2015) Marcadores biológicos: Microquímica en otolitos. In: Ferrada S, Canales-Aguirre C, Oliva M, Niklitschek EJ, Leal E, Carrasco C (eds) Origen natal y distribución geográfica de reineta en Chile. Proyecto FIP 2013-21. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, p 79–98
- Niklitschek EJ, Secor DH, Roa-Ureta R, Lafon A, Valenzuela X (2008) Comparación de la composición microquímica de otolitos de merluza de tres aletas *Micromesistius australis* entre áreas de reproducción de los océanos Atlántico y Pacífico. In: Niklitschek E, Toledo P, Lafon A (eds) Unidades poblacionales de merluza de tres aletas (*Micromesistius australis*). Informe Final FIP 2006-15. Universidad Austral de Chile (Centro Trapanada), Coyhaique, Chile, p 73–81
- Niklitschek EJ, Secor DH, Toledo P, Lafon A, George-Nascimento M (2010) Segregation of SE Pacific and SW Atlantic blue whiting stocks: evidence from complementary otolith microchemistry and parasite assemblages. *Env Biol Fish* 89:399–413
- Niklitschek EJ, Toledo P (2011) Origen natal de contingentes de bacalao de profundidad (*Dissostichus eleginoides*) capturados en aguas chilenas. Informe final subcontrato Universidad de Concepción / Universidad Austral de Chile-Universidad de Los Lagos. Universidad de Los Lagos, Puerto Montt, Chile
- Niklitschek EJ, Toledo P, Rojas O, Barría C (2012) Aproximación basada en microquímica de otolitos. In: Galleguillos R, Ferrada S, Canales C, Hernández C, Oliva M, González MT, Cubillos L, Niklitschek E, Toledo P (eds) Determinación de unidades poblacionales de sardina austral entre la X y XII regiones de Chile. Informe Final Proyecto FIP 2010-17. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, p 146–166
- Noble ER, Noble GA (1982) Parasitology. The biology of animal parasites. Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson L, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2011) Vegan: community ecology package.
- Oliva ME (2001) Metazoan parasites of *Macruronus magellanicus* from southern Chile as biological tags. *Journal of Fish Biology* 58:1617–1622
- Oliva M (2013) Is *Anisakis simplex* s.l. a biological marker for stock identification of *Strangomera bentincki* from Chile? *Journal of fish biology* 83:412–416
- Oliva ME, Ballón I (2002) Metazoan parasites of the Chilean hake *Merluccius gayi gayi* as a tool for stock discrimination. *Fisheries Research* 56:313–320

- Oliva ME, Espinola JF, Ñacari LA (2016) Metazoan parasites of *Brama australis* from southern Chile: a tool for stock discrimination? *Journal of fish biology* 88:1143–1148
- Oliva ME, González MT (2004) Metazoan parasites of *Sebastes capensis* from two localities in northern Chile as tools for stock identification. *Journal of Fish Biology* 64:170–175
- Oliva ME, González M, Acuña E (2004) Metazoan parasite fauna as a biological tag for the habitat of the flounder *Hippoglossina macrops* from northern Chile, in a depth gradient. *Journal of Parasitology* 90:1374–1377
- Oliva ME, Sánchez MF (2005) Metazoan parasites and commensals of the northern Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) as tools for stock identification. *Fisheries Research* 71:71–77
- Oosterhout C van, Hutchinson WF, Wills DP., Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol* 4:535–538
- Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Mol Biol Evol* 5:568–583
- Panfili J, De Pontual H, Troadec H, Wrigh PJ (2002) Manual of fish sclerochronology. Ifremer-IRD, Brest, France
- Pannella G (1971) Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173:1124–1127
- Parisi-Baradad V, Lombarte A, García-Ladona E, Cabestany J, Piera J, Chic O (2005) Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms and curvature scale space representation. *Marine and Freshwater Research* 56:795–804
- Paton C, Hellstrom J, Paul B, Woodhead J, Hergt J (2011) Iolite: Freeware for the visualisation and processing of mass spectrometric data. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26:2508–2518
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539
- Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fishery Bulletin* 99:151–167
- Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed effects models in S and S-PLUS. Springer Verlag, New York (USA)
- Plaza G, Honda H, Sakaji H, Nashida K (2005) Preparing sagittae for examination of daily growth increments of young-of-the-year fishes: a modification of the embed method. *Journal of Fish Biology* 66:592–597
- Plaza G, Honda H, Sakaji H, Nashida K (2006) Patterns of growth in the early life history of the round herring *Etrumeus teres*. *Journal of Fish Biology* 68:1421–1435
- Pothin K, Gonzalez-Salas C, Chabanet P, Lecomte-Finiger R (2006) Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (south-west Indian Ocean) based on otolith morphometrics. *Journal of Fish Biology* 69:38–53
- Poulin R, Kamiya T (2015) Parasites as biological tags of fish stocks: a meta-analysis of their discriminatory power. *Parasitology* 142:145–155

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Quay P, Sonnerup R, Westby T, Stutsman J, McNichol A (2003) Changes in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of dissolved inorganic carbon in the ocean as a tracer of anthropogenic CO_2 uptake. *Global Biogeochemical Cycles* 17:4-1
- Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A (2014) Tracer v1. 6 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (Online 2015, May 29)
- Reiss H, Hoarau G, Dickey-Collas M, Wolff WJ (2009) Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries* 10:361-395
- Reyes H, Valenzuela V, Moreno P, Azocar C, Pizarro M, Claramunt G, Herrera G, Diaz E, Böhm MG, Espíndola F, Saavedra JC, Catasti V (2014) Evaluación del stock desovante de anchoveta en la XV, I y II Regiones, año 2013. Informe Final FIP 2013-06. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile
- Rico C, Ibrahim KM, Rico I, Hewitt GM (1997) Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology* 51:462-475
- Rojas D (2010) Evaluación de marcadores moleculares ILPs y STRs heterólogos en *Engraulis ringens*. Universidad Mayor de San Marcos, Lima
- Rooker J, Secor DH (2004) Stock structure and mixing of Atlantic bluefin tuna: evidence from stable $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopes in otoliths. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT* 56:1115-1120
- Rooker JR, Secor DH, DeMetrio G, Kaufman AJ, Rios AB, Ticina V (2008) Evidence of trans-Atlantic movement and natal homing of bluefin tuna from stable isotopes in otoliths. *Marine Ecology-Progress Series* 368:231-239
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources* 8:103-106
- Royston JP (1983) Some techniques for assessing multivariate normality based on the shapiro-wilk w. *Applied Statistics*:121-133
- Rue H avar, Martino S, Chopin N (2009) Approximate Bayesian inference for latent Gaussian models by using integrated nested Laplace approximations. *Journal of the royal statistical society: Series b (statistical methodology)* 71:319-392
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* 1:9-10
- Ryman N, Jorde PE (2001) Statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology* 10:2361-2373
- Ryman N, Palm S (2006) POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology Notes* 6:600-602
- Ryman N, Palm S, André C, Carvalho GR, Dahlgren TG, Jorde PE, Laikre L, Larsson LC, Palmé A, Ruzzante DE (2006) Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology* 15:2031-2045

- Saavedra A, Catasti V, Leiva F, Vargas R, Cifuentes Ú, Reyes H, Rozas C, Pizarro M, Lang C, Molina E, Cerna F, Lopez A, Nuñez S, Valenzuela L, Silva J, Vasquez S (2014) Evaluación hidroacústica de los stocks de anchoveta y sardina común entre la V y X Regiones, año 2014. Informe Final FIP N° 2013-05. Instituto de Fomento Pesquero, Valparaíso, Chile
- Sánchez-Velaso L, Shirasago B, Cisneros-Mata MA, Avalos-García C (2000) Spatial distribution of small pelagic fish larvae in the Gulf of California and its relation to the El Niño 1997–1998. *Journal of Plankton Research* 22:1611–1618
- Santoso A, McPhaden MJ, Cai W (2017) The defining characteristics of ENSO extremes and the strong 2015/2016 El Niño. *Reviews of Geophysics* 55:1079–1129
- Schismenou E, Palmer M, Giannoulaki M, Alvarez I, Tsiaras K, Triantafyllou G, Somarakis S (2016) Seasonal changes in otolith increment width trajectories and the effect of temperature on the daily growth rate of young sardines. *Fisheries Oceanography* 25:362–372
- Schismenou E, Tsiaras K, Kourepini MI, Lefkaditou E, Triantafyllou G, Somarakis S (2013) Seasonal changes in growth and condition of anchovy late larvae explained with a hydrodynamic-biochemical model simulation. *Marine Ecology Progress Series* 478:197–209
- Schmidt GA, Bigg GR, Rohling EJ (1999) Global seawater oxygen-18 database–v1. 22. Online at <http://data.giss.nasa.gov/o18data>, online at <http://data.giss.nasa.gov/o18data>
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics* 6:461–464
- Secor DH (2015) Migration ecology of marine fishes, 1st edn. JHU Press, Baltimore, USA
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9:615–629
- Shepherd JG, Cushing DH (1980) A mechanism for density-dependent survival of larval fish as the basis of a stock-recruitment relationship. *Journal du Conseil* 39:160–167
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457–462
- Smith MK (1992) Regional differences in otolith morphology of the deep slope red snapper *Etelis carbunculus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49:795–804
- Smith S, Campana S (2010) Integrated stock mixture analysis for continuous and categorical data, with application to genetic-otolith combinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67:1533–1548
- Spanakis E, Tsimenides N, Zoures E (1989) Genetic difference between populations of sardine *Sardina pilchardus*, and anchovy *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. *Journal of Fish Biology* 35:365–378
- Sponaugle S, Cowen RK (1994) Larval durations and recruitment patterns of two Caribbean gobies (Gobiidae): contrasting early life histories in demersal spawners. *Marine Biology* 120:133–143
- Stenevik EK, Fossum P, Johannessen A, Folkvord A (1996) Identification of Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.) larvae from spawning grounds off western Norway applying otolith microstructure analysis. *Sarsia* 80:285–292

- Strub PT, Mesías JM, Montecino V, Rutllant J, Salinas S (1998) Coastal ocean circulation off western South America. In: Robinson AR, Brink KH (eds) *The Sea*. John Wiley & Sons, Inc., p 273–313
- Subpesca (2016) Estado de situación de las principales pesquerías chilenas, 2015. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Chile
- Svedäng H, Righton D, Jonsson P (2007) Defining ‘natal homing’ in marine fish populations; need for inference in fishery science: reply to Bradbury & Laurel (2007). *Marine Ecology Progress Series* 349:309–310
- Swan SC, Gordon JDM, Shimmield T (2003) Preliminary investigations on the uses of otolith microchemistry for stock discrimination of the deep-water black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) in the Northeast Atlantic. *J Northw Atl Fish Sci* 31:221–231
- Tarifeño E, Carmona M, Llanos-Rivera A, Castro LR (2008) Temperature effects on the anchoveta *Engraulis ringens* egg development: do latitudinal differences occur? *Environmental biology of fishes* 81:387–395
- Taylor BL, Dizon AE (1996) The need to estimate power to link genetics and demography for conservation. *Conservation Biology* 10:661–664
- Taylor BL, Dizon AE (1999) First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* 8:S11–S16
- Thiel M, Macaya EC, Acuña E, Arntz WE, Bastias H, Brokordt K, Camus PA, Castilla JC, Castro LR, Cortes M, Dumont C, Escribano R, Fernandez M, Others (2007) The Humboldt Current system of northern and central Chile: oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. In: Gibson RN, Atkinson RJA, Gordon JDM (eds) *Oceanography and Marine Biology an Annual Review*, 1st edn. Taylor & Francis Group, Florida, USA, p 195–344
- Thorrold SR, Campana S, Jones CM, Swart PK (1997) Factors determining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim Cosmochim Acta* 61:2909–2919
- Thresher RE (1999) Elemental composition of otoliths as a stock delineator in fishes. *Fish Res* 43:165–204
- Timi JT (2003) Parasites of Argentine anchovy in the south-west Atlantic: latitudinal patterns and their use for discrimination of host populations. *Journal of Fish Biology* 63:90–107
- Torres GJ, Lombarte A, Morales-Nin B (2000) Sagittal otolith size and shape variability to identify geographical intraspecific differences in three species of the genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 80:333–342
- Tudela S (1999) Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research* 42:229–243
- Turan C (2000) Otolith shape and meristic analysis of herring (*Clupea harengus*) in the North-East Atlantic. *Archive of Fishery and Marine Research* 48:213–225
- Turan C, Oral M, Öztürk B, Düzgüneş E (2006) Morphometric and meristic variation between stocks of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and northeastern Mediterranean Seas. *Fisheries Research* 79:139–147

- Tuset VM, Lozano IJ, Gonzalez JA, Pertusa JF, García-Díaz MM (2003) Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 19:88–93
- Valdivia IM, Chávez RA, Oliva ME (2007) Metazoan parasites of *Engraulis ringens* as tools for stock discrimination along the Chilean coast. *Journal of Fish Biology* 70:1504–1511
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern applied statistics with S*, 4th edition. Springer, New York
- Victor BC (1982) Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses, *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus*. *Marine Biology* 71:203–208
- Vignon M (2012) Ontogenetic trajectories of otolith shape during shift in habitat use: Interaction between otolith growth and environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 420:26–32
- Vignon M, Morat F (2010) Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* 411:231–241
- Volkoff MC, Titus RG (2007) Use of otolith microstructure to discriminate stocks of juvenile Central Valley, California, fall-run Chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 136:195–210
- Volpedo AV, Miretzky P, Fernandez Cirelli A (2006) Stocks pesqueros de *Cynoscion guatucupa* y *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae), en la costa atlántica de Sudamérica: comparación entre métodos de identificación. *Memoria* 66:115–130
- Wahlund S (1928) Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11:65–106
- Walters V (1980) Ectoparasites of eastern and western Atlantic bluefin tunas. *ICCAT Coll Vol Sci Papers* 9:491–498
- Wang IJ (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* 19:2605–2608
- Watanabe Y, Ochiai S, Fukamichi K (2014) Larval growth rates differ in response to seasonal temperature variations among clupeoid species inhabiting the Pacific coastal waters of Japan. *Fisheries science* 80:43–51
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370
- Welham S, Cullis B, Gogel B, Gilmour A, Thompson R (2004) Prediction in linear mixed models. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* 46:325–347
- Wilkinson L (1990) *The system for statistics*. Systat, Evanston, IL
- Wood S (2006) *Generalized additive models: an introduction with R*. CRC press
- Wood CL, Lafferty KD, Micheli F (2010) Fishing out marine parasites? Impacts of fishing on rates of parasitism in the ocean. *Ecology Letters* 13:761–775
- Wurster C, Patterson W, Cheatham M (1999) Advances in micromilling techniques: a new apparatus for acquiring high-resolution oxygen and carbon stable isotope values and major/minor elemental ratios from accretionary carbonate. *Computers & Geosciences* 25:1159–1166

- Xu X, Werner M, Butzin M, Lohmann G (2012) Water isotope variations in the global ocean model MPI-OM. *Geoscientific Model Development Discussions* 5:277–307
- Yeo I-K, Johnson RA (2000) A new family of power transformations to improve normality or symmetry. *Biometrika* 87:954–959
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation. A review *Molecular Ecology* 11:1–16
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th edn. Prentice-Hall Inc.
- Zengin M, Saygin S, Polat N (2015) Otolith shape analyses and dimensions of the anchovy *Engraulis encrasicolus* L. in the Black and Marmara Seas. *Sains Malaysiana* 44:657–662

ANEXO 1. PROTOCOLO PARA ANÁLISIS DE OTOLITOS MEDIANTE LA-ICPMS.

Protocol for LA-ICPMS analyses of otolith material: spot method

Audrey Darnaude, Franck Ferraton, Mathieu Leisen

Sample preparation

1. The otolith has to be extracted, photographed, included in Buehler EPOXY resin, cut and polished under "clean" conditions in order to avoid/reduce contamination at all stages (see detailed protocol for this)
2. The goal is to obtain a ~250 μm thick transverse section with:
 1. the otolith core positioned at 10-20 μm depth below the surface (to allow for pre-ablation with the laser without losing the signature of the core) and ...
 2. an edge as perpendicular to the surface as possible (to avoid biasing the measure of the signature of the last water masses encountered by contaminating them with that of the resin or that of another otolith layer located below in the otolith)
3. As soon as possible during the polishing, the section must be glued to a small piece of glass slide (1 x 1.5 cm maximum) using Buehler EPOXY resin. When the section is ready, the whole thing (section +glass stand) is sonicated in ultra-pure water (5 minutes) and left to dry under a class 100 fume hood (>12h).
4. Just before the analysis, several samples (otoliths on their glass stand) can be glued on the same analysis slide using thermoplastic resin (Cristal bond).



Sample analysis

1. The laser is operated in "line of spots" mode (= adjacent yet non-overlapping spots), along a linear (or semi-linear?) transect:

1. continuously perpendicular to the maximum axis for otolith growth
2. starting on the core (first spot positioned on the core)
3. finishing as close as possible of the edge of the otolith (last spot on the edge)



The ICPMS is running during the whole procedure.

1. Adjacent spots (of 30 μm diameter and $\sim 40 \mu\text{m}$ depth) along the transect are ablated (and analyzed) successively with no pre-ablation (as the first 10 seconds of ablation on each spot will be removed from the final results).
2. Before and after this procedure, 2 spots of the same diameter (30 μm) are ablated on the standard (NIST 612) to get the number of cps corresponding to the known NIST concentrations for each element (it will serve to translate the numbers of cps measured on the otolith into concentrations).
3. Between any pairs of consecutive laser ablations, at least 20 seconds are left for the ICPMS to eliminate potential residues from the previous sample analyzed.

Instrumental settings

1. The ICPMS is running during the whole procedure, with the following settings:

List of elements analyzed (analysis time ~ 0.6 s) NB: all channels are set up at 1 but for ^{11}B (11), ^{55}Mn (5) and ^{208}Pb (5).	^7Li , ^{11}B , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{31}P , ^{43}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{85}Rb , ^{86}Sr , ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{120}Sn , ^{121}Sb , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{139}La , ^{140}Ce , ^{141}Pr , ^{146}Nd , ^{147}Sm , ^{169}Tm , ^{174}Yb , ^{175}Lu , ^{208}Pb , ^{232}Th , ^{238}U
Duration of the blank before ablations	90 s
Helium flow	0.35 l.min $^{-1}$ for MFC1 and 0.35 l.min $^{-1}$ for MCF2
Argon flow	~ 0.87 l.min $^{-1}$ for Nebulizer and ~ 0.85 l.min $^{-1}$ for Auxiliary

2. The laser is operated with the following settings:

Spot diameter for spot ablation	30 μm
Distance between 2 adjacent spots	15 μm (45 μm between spot centers)
Energy flow	7 J. cm^{-2}
Frequency	10 Hz
Ablation time per spot	50 s

Procedure for the analysis

For a given otolith the analysis procedure can be summarized as follow:

1. START of the analysis with the ICPMS
2. 90s of blank
3. 1st spot on the standard (30 μm beam diameter)
4. 90s of blank
5. 2nd spot on the standard (30 μm beam diameter)
6. 90s of blank
7. 1st spot on the otolith (30 μm beam diameter)
8. 90s of blank
9. 1st spot of the transect on the otolith (30 μm beam diameter)
10. 90s of blank
11. 2nd spot of the transect on the otolith (30 μm beam diameter)
12. 90s of blank
13. ...
14. 90s of blank
15. last spot of the transect on the otolith (30 μm beam diameter)
16. 90s of blank
17. 1st spot on the standard (30 μm beam diameter)
18. 90s of blank
19. 2nd spot on the standard (30 μm beam diameter)
20. 180s of blank
21. END of the analysis with the ICPMS

Parameters for data reduction

Only part of the data measured during laser ablation (Ca plateau from the analysis of the standard or the otolith) must be used to produce average elemental concentrations for each spot. The data from the 60 s blank just before analysis is used as well. Data reduction is made with IOLITE (IGOR PRO), which is available in Santiago. It involves the following steps:

1. Selection of the signatures of the blanks and the spots (based on Ca plateaus or total beam variations)
2. Removal of the first 10 seconds of the plateaus (= potential surface contamination recorded at the beginning of each spot ablation) and sometimes of the last 10 s if the ratios element/Ca are not stable.
3. Suppression of artificial spikes in all plateaus, subtraction of the blank and calculations of the LODs, correction for potential machine drift during the session, standardization to Ca for all elements and calculation of real concentrations per spot (averages over the plateau) based on the values (averages over the plateau) from the standards.
4. Drawing the graphs for each element, using 1 data point per spot (=corresponding each to an average over at least 30 measures from the middle of the ablation plateau).

ANEXO 2. TALLER DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS PROYECTO FIPA 2015-22

Programa Taller de Difusión Proyecto Fipa 2015-22

09:30-09:40 Introducción (Edwin Niklitschek, Universidad de Los Lagos)

09:40-10:00 Diseño muestral adecuado para la identificación de las unidades poblacionales de anchoveta en Chile, Objetivo 1 (Cristóbal Garcés, Universidad de Los Lagos)

Determinar unidades poblacionales de anchoveta en Chile y sus límites espaciales a través de análisis multi-metodológico (Objetivo 2)

10:00-10:20 Marcadores moleculares (Sandra Ferrada, Universidad de Concepción)

10:20-10:40 Composición de la fauna parasitaria de *Engraulis ringens* (Marcelo Oliva, Universidad. de Antofagasta)

10:40-11:00 Café

11:00-11:20 Morfometría de otolitos (Francisco Cerna, Instituto de Fomento Pesquero)

11:20-11:40 Análisis de composición elemental e isotópica de otolitos de anchoveta *Engraulis ringens* (Cristobal Garcés, Universidad de Los Lagos)

11:40-12:00 Análisis de la microestructura de otolitos (AMO). (Guido Plaza, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso)

12:00-12:30 Modelo conceptual y estimación del grado de mezcla entre las unidades poblacionales (Objetivos 3 y 4) (Edwin Niklitschek, Universidad de Los Lagos)

12:30:13:00 **Conclusiones.**

Asistentes

Nombre	Institución
Silvia Hernández	Subsecretaría de Pesca
Joyce Méndez	Subsecretaría de Pesca
Fernando Uribe	Pesquera Bahía Caldera
Enrique Cisterna	Blumar S.A.
Victoria Rubio	STI SIPARMAR Talcahuano
Maria Gabriela Böhm	Instituto de Fomento Pesquero
Luis Carroza	Fondo de Investigación Pesquera
Paola Poblete	SIPARMA - Lota
Mauricio Ulloa	Bio-Bio Pesca
Néstor Velásquez	ENAPESCA
Juan Carlos Vargas	STI SARPE
Pedro Marín	A.G. Armadores Artesanales San Antonio
Jorge Oliva	CIAM CCT-PP
Fernando Espíndola	Instituto de Fomento Pesquero
Gustava Aedo	Universidad de Concepción
Allan Gómez	DZP Subpesca
Angel Martínez	SITRINAVES
Miguel Angel Escobar	CORPESCA
Andrea Monsalve	CORPESCA
Alvaro Saavedra	Instituto de Fomento Pesquero
Jorge Castillo	Instituto de Fomento Pesquero
C. Salazar	ALIMAR
Mario Acevedo	Subsecretaría de Pesca
Adolfo Carvajal	Pesquera Camanchaca
Marcos Arteaga	INPESCA
Doris Bucarey	Instituto de Fomento Pesquero
Esteban Molina	Instituto de Fomento Pesquero
Cecilia Machuca	Instituto de Fomento Pesquero
Lizandro Muñoz	Instituto de Fomento Pesquero

Notas sobre el Taller:

- Al taller fueron invitados funcionarios de la Subsecretaria de Pesca y Acuicultura de Valparaíso, del Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura, miembros del Comité

Científico y de los distintos Comités de Manejo además de organizaciones que operan sobre el recurso anchoveta, además del Equipo de Evaluación de Stock y Directa de IFOP.

- Se da comienzo al taller en la ciudad de Valparaíso el día viernes 16 de junio de 2017 con la presentación inicial y palabras de bienvenida dadas por el coordinador del proyecto, Dr. Edwin Niklitschek. La introducción indicó las instituciones y el personal participante en el proyecto. Cabe destacar la introducción expuesta referente a los distintos enfoques que se pueden hacer de las unidades poblacionales: evolutivas, demográficas y de manejo o gestión. Se presentan los objetivos del proyecto.

Presentación objetivo 1, Cristobal Garcés, Universidad de Los Lagos

- Luego de la presentación el Sr. F. Uribe indica que el número de lances a partir de los cuales se tomaron las muestras para realizar los análisis es muy pequeño indicando la gran cantidad de lances que realiza la industria. Se responde que tanto los lances como el número de muestras seleccionadas es suficiente para representar la zona de estudio y que se cumple con la independencia de las muestras, que es lo que se quería conseguir.

Presentación objetivo 2.1. Aproximación genérica, Sandra Ferrada, Universidad de Concepción

- El Sr. J. Castillo corrobora que se habla de una unidad reproductiva. Se cuestiona porque no se muestreó la Zona II y sólo se evaluaron las Zona I y III. Se indica que inicialmente había estudios que indicaban que había una unidad evolutiva y se quería verificar que pasaba en las zonas más extremas. Por eso sólo se evaluó esas zonas, sin embargo se tienen muestras de los peces pertenecientes a la Zona 2, por si se quiere evaluar. Se hace énfasis en que anchoveta representa una unidad evolutiva. Sin embargo, se encontró diferencias entre ejemplares de las zonas extremas no siendo significativas.

Presentación objetivo 2.2, Aproximación parasitológica, Marcelo Oliva, Universidad de Antofagasta

- Se corrobora que hay diferencia entre años y entre adultos y juveniles, ya que en juveniles no se encontraron parásitos. Con el tiempo ha cambiado el grado de infección, actualmente ésta es muy pobre. Esta aproximación permitiría hablar de dos stocks, una norte (Zona I y Zona II) y una sur (Zona III)
- Se pregunta por qué genéticamente es una población y los parásitos separan en dos stocks. Se responde que esto es por el enfoque, que sea una población genética, es decir es una misma

especie, no indica que no puedan haber unidades discretas dentro de la población, lo que puede ser determinado con las otras aproximaciones.

- Sra. Joyce pregunta si los estudios de genética anteriores se habían realizado con individuos adultos o juveniles, se le responde que con adultos.

Presentación objetivo 2.3, Aproximación morfometría de otolitos, Francisco Cerna, IFOP

- Esta aproximación también indica que lo óptimo es dividir en dos grupos, uno norte (Zona I y Zona II) y otro sur (Zona III).

Presentación objetivo 2.4, Aproximación química de otolitos, Cristobal Garcés, Universidad de Los Lagos

- Esta aproximación mostró que el mejor modelo fue aquel que consideraba tres zonas separadas, esto fue tanto para los isótopos estables como para los metales.
- El Sr. G. Aedo pregunta por los límites de las zonas, se le indica que los límites mostrados son solo referenciales para el estudio, sin embargo este estudio no está enfocado en determinar este límite que además, dadas las características de los organismos debiera ser difuso, poco definido.
- Se pregunta por resultados de muestras de Perú, sin embargo por esta aproximación esas muestras no estaban comprometidas ni disponibles.
- Se indica que los peces adultos y juveniles están efectivamente a distinta profundidad, lo que emanó de los resultados del análisis químico de otolitos ya que mostraba que a medida que se hacían adultos los peces habían estado en aguas de menor temperatura, ya sea a mayor profundidad o migrado hacia el sur (aguas más frías). Se indica que esto podría servir para la pesca industrial en el sentido de capturar individuos adultos.

Presentación objetivo 2.5, Aproximación Microestructura en otolitos, Guido Plaza, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

- Esta aproximación tiende a encontrar dos grupos, uno en la zona norte (Zona I y II) y otro en el sur (Zona III).
- El Sr. Aedo pregunta si esta técnica tiende a diferenciar grupos, si funciona a largo plazo, el señor Plaza le indica que dado a que todo es dinámico, los eventos como El Niño u otras perturbaciones pueden afectar los resultados pero es una buena herramienta para encontrar diferencias entre grupos de peces.

Presentación objetivos 3 y 4 Modelo conceptual y estimación del grado de mezcla, Edwin Niklitschek, Universidad de Los Lagos

- De esta presentación se concluye la existencia de una única unidad evolutiva en aguas chilenas, conformada por múltiples unidades demográficas de conectividad limitada, pero suficiente para mantener la integridad genética de la población. Estas tres unidades demográficas estarían sustentadas en la fidelidad relativa de los adultos a su sitio natal, desplazamientos limitados de ejemplares adultos a zonas de alimentación más frías y/o profundas, relativamente próximas a sus respectivas zonas de crianza. Considerando el análisis integrado, se encontró evidencia de que las Zonas I y II presentan niveles mayores de mezcla, entre 21 y 26%.
- El Sr. Castillo y otros participantes indican lo interesante que sería poder realizar un estudio de toda el área de distribución de la especie. El Sr. A. Gómez indica que otros estudios muestran al norte de la Zona III poblaciones que presentan diferencias. El Dr. Niklitschek le indica que es necesario lograr una mayor resolución ambiental para encontrar diferencias.
- El Sr. Oliva además indica que siempre se presentan dificultades para realizar un buen muestreo.
- Otro participante indica que falta establecer la competencia entre sardina y anchoveta
- Implicancias sobre la certificación la única forma de saber que ocurre es realizando estudio en años con y sin ENSO para conocer como afecta realmente al recurso
- El señor Luis Carroza agradece la concurrencia y sugiere plasmar los comentarios de este taller en el informe final

ANEXO 3. COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE OTOLITOS DE ANCHOVETA *ENGRAULIS RINGENS* EN EL MAR INTERIOR DE CHILOÉ

1. Composición isotópica de otolitos de anchoveta *Engraulis ringens* del Mar Interior de Chiloé

Edwin Niklitschek, Cristóbal Garcés, Centro i~mar, Universidad de Los Lagos;

1.1. Antecedentes

Como actividad sustitutiva y complementaria del presente proyecto, se comprometió a analizar la composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$) en otolitos de anchovetas juveniles y adultas provenientes del Mar Interior de Chiloé. Se lograron recolectar 122 individuos de anchoveta provenientes de cinco lances de pesca, realizados entre el 10 y 16 de marzo de 2016 (Figura 1). De este total, se analizó la composición isotópica de la sección nuclear del otolitos de 42 individuos.

1.2. Metodología de trabajo

Anchovetas juveniles y adultos fueron obtenidas a bordo de la embarcación L/M Guayacan, de cinco lances diferentes. Los ejemplares muestreados fueron congelados enteros, hasta su posterior muestreo y extracción de otolitos en dependencias del Centro i~mar en Puerto Montt. Como primer paso, cada otolito se limpió con agua ultrapura (18,2 M Ω), asegurándose de extraer cualquier tejido remanente. Luego fue sonicado con agua ultrapura durante 5 min y secado bajo campana de flujo laminar. Luego, cada otolito fue embebido en resina epóxica de alta pureza (Buehler), con ayuda de moldes plásticos y secado a temperatura constante (50°C) por cinco horas. Posteriormente, fue seccionado transversalmente utilizando una sierra de corte lento (ISOMET Buehler) y luego cada sección fue pulida con paños de carburo de silicio de graduación 1500, 2000 y 2400, para incrementar su transparencia y reducir su espesor a ~300 μm .

Se utilizó un microtaladro (New Wave Research) provisto de una fresa de 500 μm de diámetro, buscando extraer >30 μg (límite de detección para análisis isotópico) del material calcáreo contenido en secciones del otolito. Para obtener la señal isotópica de los primeros meses de vida (<3 meses) en ejemplares juveniles y adultos, se definió un polígono estandarizado (el mismo utilizado para zonas comprometidas del proyecto; Ver Objetivo 2). De esta manera se eliminó la zona marginal de cada otolito y se obtuvo la sección nuclear en forma de prismas o polvo.

Los prismas o polvo de los otolitos fueron colectados y almacenados en microtubos Eppendorf limpios, previamente descontaminados en ácido nítrico (HNO₃, 5%). Estas muestras fueron analizadas en el

Laboratorio Ambiental de Geoquímica de Isótopos de la Universidad de Arizona mediante un dispositivo automatizado de preparación de carbonato KIEL-III, acoplado a un espectrómetro de radio-gas Finnigan MAT 252. Los prismas o polvo de otolitos se digirieron con ácido fosfórico deshidratado en vacío, a 70°C, donde el CO₂ generado por la reacción determina la concentración de isótopos $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Los resultados se expresaron en partes por mil relativas a un estándar (Vienna Pee Dee Belemnite, VPDB), utilizando los estándares internacionales NBS-19 y NBS-18.

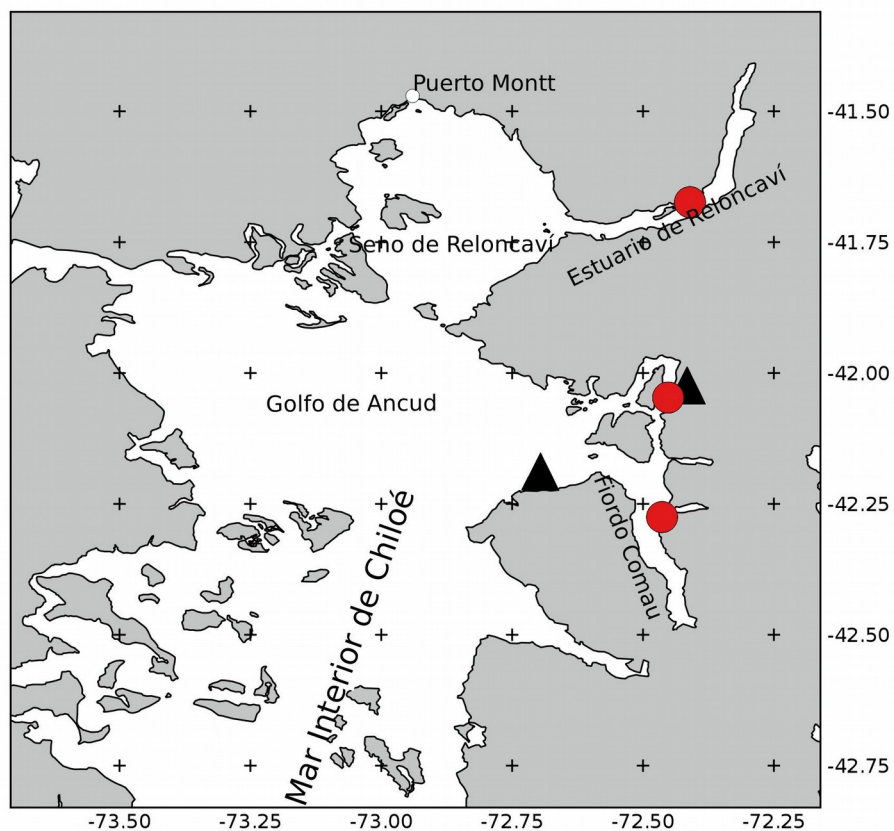


Figura 1: Distribución de muestras de individuos juveniles (triángulos negros) y adultos (círculos rojos) en el Mar Interior de Chiloe.

v. Análisis estadísticos

Se realizaron análisis univariados con el fin de comparar la concentración isotópica entre secciones nucleares de otolitos de anchovetas juveniles y adultas. Eventos de muestreo (lances de pesca) fueron considerados como variables aleatorias. Los análisis se realizaron mediante modelos lineales mixtos (LMM) implementados en librería “lme4” de R (Littel et al. 1996, Pinheiro & Bates 2000). Los supuestos de normalidad univariada fueron evaluados gráficamente, comparando las distribuciones teóricas y observadas de los residuales mediante diagramas quantil-quantil (Q-Q) (Venables & Ripley 2002). Los supuestos de homocedasticidad fueron evaluados mediante el test de Levene (1960), para cada variable respuesta utilizada. Cuando no se cumplió con estos supuestos ($\delta^{18}\text{O}$), la variables fueron transformadas mediante el algoritmo de Yeo-Johnson. Las hipótesis nulas fueron rechazadas bajo un nivel de significancia (α) de 0,05.

1.3. Resultados

Sólo 29 secciones nucleares de otolitos estuvieron sobre el límite de detección (Tabla 1). La talla media de juveniles (n =14) fue 9.7 ± 0.7 (DS) cm. Mientras que para adultos (n=15) fue 15.9 ± 1.0 cm (Figura 2).

La concentración relativa de ^{18}O en juveniles fue menor que en adultos, presentando valores de -0.5 ± 0.76 y -0.3 ± 0.70 , respectivamente (Figura 3). Esta diferencia entre etapas, no fue estadísticamente significativa. La concentración relativa de ^{13}C también fue menor en otolitos de individuos juveniles (-3.2 ± 0.47), en comparación con individuos adultos (-3.0 ± 0.70) (Figura 3). Sin embargo, esta diferencia de $\delta^{13}\text{C}$ entre etapas, tampoco fue significativa.

Tabla 1: Número de muestras de otolitos de *Engraulis ringens* para análisis de isotopos estables.

Fase representada	Individuo	Nº muestras analizadas	Nº muestras sobre límite detección
Juvenil	Juvenil	20	14
Juvenil	Adulto	22	15

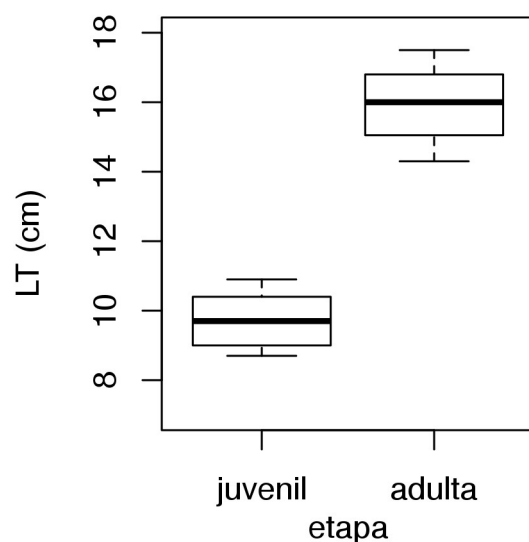


Figura 2: Distribución de tallas (LT=Longitud total) de anchovetas a las cuales se les realizó el análisis de composición isotópica de otolitos.

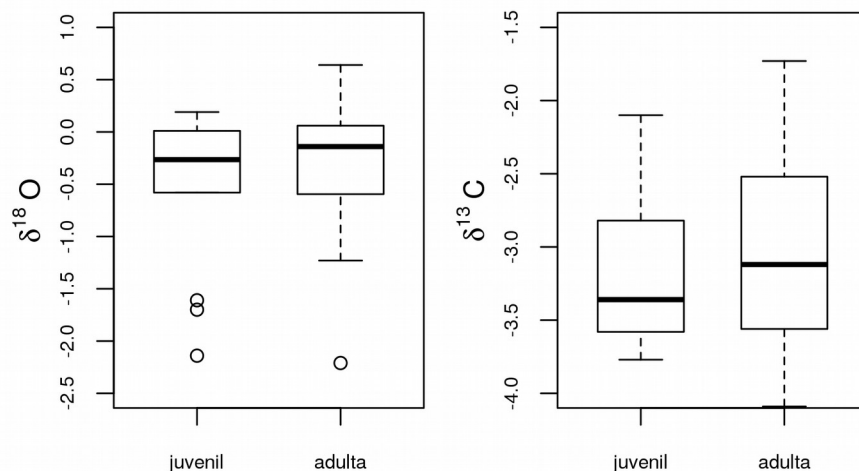


Figura 3: Concentraciones relativas de ^{18}O (panel izquierdo) y $\delta^{13}\text{C}$ (panel derecho) en sección nuclear de otolitos de anchovetas juveniles y adultas provenientes del Mar Interior de Chiloe.

1.4. Análisis y discusión de los resultados

La similaridad en la composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$) de la sección nuclear de otolitos de juveniles y adultos sugiere una zona común de crianza para ambas cohortes. Los valores de $\delta^{18}\text{O}$ fueron menores a los observados en las zonas de estudio propuestas en el proyecto (Tabla 2 y Figura 4). Mientras que $\delta^{13}\text{C}$ mostró valores similares a los de la etapa juvenil de individuos provenientes de la zona III, ubicada entre Talcahuano y Corral (Tabla 2 y Figura 4). La diferencia observada en $\delta^{18}\text{O}$ permite señalar que estos individuos podrían presentar una zona de crianza

diferente a los individuos muestreados entre Arica y Corral. La cual podría encontrarse en la cuenca norte del Mar Interior de Chiloé, cercano al origen de individuos muestreados (Figura 1). Importantes abundancia de huevos y larvas se han reportado en este ecosistema (Landaeta et al., 2014; Castro et al., 2015), donde focos de gran abundancia de huevos (>500 huevos/10 m²) se han observado en el Estuario de Reloncaví, Seno de Reloncaví y Canal Hornopirén (Castro et al., 2015).

Tabla 2: Medias y desviación estandar de concentración relativa de ¹⁸O y ¹³C en sección nuclear y marginal de otolitos de anchoveta en cada zona de muestreo.

Etapa anchoveta	Zona	Estructura otolito	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$
juvenil	I	núcleo	0.2±0.25	-3.7±0.85
juvenil	II	núcleo	0.3±0.23	-4.1±0.55
juvenil	III	núcleo	0.8±0.29	-3.4±0.63
juvenil	MIC	núcleo	-0.5±0.76	-3.2±0.48
adulta	I	núcleo	0.3±0.20	-3.7±0.72
adulta	II	núcleo	0.2±0.24	-4.2±0.59
adulta	III	núcleo	0.8±0.26	-3.3±0.72
adulta	MIC	núcleo	-0.4±0.71	-3.0±0.71
adulta	I	borde	0.8±0.24	-2.0±0.52
adulta	II	borde	0.8±0.24	-2.2±0.73
adulta	III	borde	1.3±0.19	-1.5±0.57

1.5. Conclusiones

- No se encontraron diferencias significativas de la composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$) entre la sección nuclear de otolitos de anchovetas juveniles y adultas
- Los valores $\delta^{18}\text{O}$ de individuos del Mar Interior de Chiloé fueron diferentes a los de individuos provenientes entre Arica y Corral. Esta evidencia permite señalar la existencia de una zona de crianza en el Mar Interior de Chiloé.

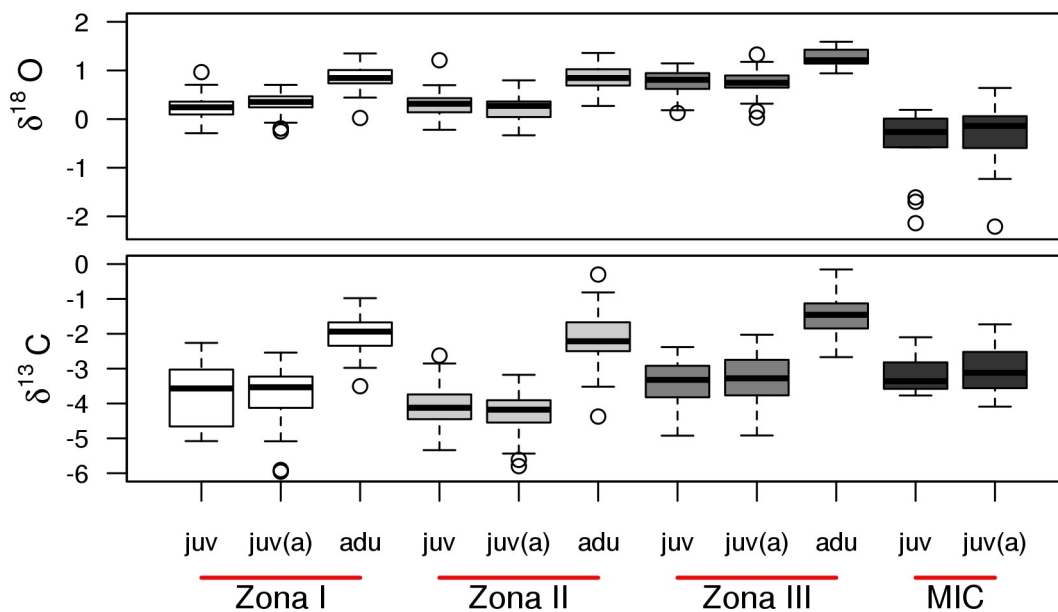


Figura 4: Concentraciones relativas de ^{18}O y ^{13}C en zonas nucleares (juv: ; juv (a)) y marginales (adu:adultos) de otolitos de anchovetas en zonas de muestreo. Zona I: Arica-Antofagasta, Zona II: Atacama-Coquimbo, Zona III: Valparaíso-Los Lagos y MIC: Mar Interior de Chiloé

1.6. Referencias

- Castro, L., Soto, S., Llanos, A., Pérez, I., Cubillos, L., Alarcón, R., Claramunt, G., *et al.* 2015. Identificación de zonas de desove y estadios tempranos de pelágicos pequeños en aguas interiores de la X y XI regiones. Proyecto FIP 2013-17. Universidad de Concepción, Concepción.
- Landaeta, M. F., Ochoa-Muñoz, M. J., and Bustos, C. A. 2014. Feeding success and selectivity of larval anchoveta *Engraulis ringens* in a fjord-type inlet from northern Patagonia (Southeast Pacific). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49.
- Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. *In Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling*, pp. 278–292. Ed. by I. Olkin, S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow, and H. B. Mann. Stanford University Press, Stanford, California (USA).
- Littel, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., and Wolfinger, R. D. 1996. SAS system for mixed models. Sas Institute Inc., Cary, N.C. 455 pp.
- Pinheiro, J. C., and Bates, D. M. 2000. Mixed effects models in S and S-PLUS. Springer Verlag, New York (USA). 528 pp.
- Venables, W. N., and Ripley, B. D. 2002. Modern applied statistics with S. Springer, New York. 495 pp.