

UCH-FC
DOC-EBE
6934
C1



**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA, MORFOLÓGICA Y ECOLÓGICA EN EL
COMPLEJO *AGASSIZII* DEL GENERO *ORESTIAS* EN LAS CUENCAS DE
LA PUNA DEL NORESTE DEL CHILE**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Ecología Y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

CLAUDIA JIMENA GUERRERO JIMÉNEZ

MARZO, 2013

Director de Tesis Dr: Elie Poulin

Co-Directora de Tesis Dra: Irma Vila

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

CLAUDIA JIMENA GUERRERO JIMÉNEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de Noviembre de 2012.

Director de Tesis:
Dr. Elie Poulin

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Elie Poulin", written over a dotted line.

Co-Director de Tesis
Dra. Irma Vila

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Irma Vila", written over a dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

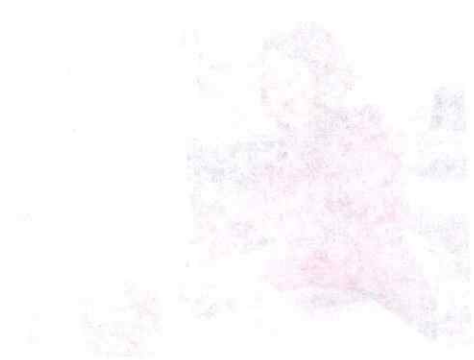
Dr. Alberto Veloso

Dr. Claudio Latorre

Dr. Sylvain Faugeron

Three handwritten signatures in blue ink, corresponding to Dr. Alberto Veloso, Dr. Claudio Latorre, and Dr. Sylvain Faugeron, each written over a dotted line.

Dedicatoria,



“Yo subí a las montañas, también hechas de sueños, yo ascendí, yo subí a las montañas donde un grito persiste entre las alas de palomas salvajes”.

AURELIO ARTURO (Poeta Nariñense 1906 -1974)

Morada al Sur. Revista de la Universidad Nacional de Colombia



Soy Claudia Jimena Guerrero Jiménez nací en la ciudad de Pasto-Nariño –Colombia. Estudié mi enseñanza básica y media en el Colegio Filipense. Desde 1992 hasta 1998 estudié la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias Básicas de la Pontificia Universidad Javeriana en la ciudad de Bogotá – Colombia. En el transcurso de mi carrera fui ayudante de varios cursos y proyectos de investigación. Me titulé en 1998 de Biología. Luego en el año 1999 inicié mis estudios de Magister en Genética Humana en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Desde 1998 hasta el 2007 trabajé como docente en diferentes disciplinas como Biología Celular, Bioquímica, Evolución, Genética, Ciencias Biomédicas, en la Pontificia Universidad Javeriana – Bogotá y Universidad Jorge Tadeo Lozano – Bogotá. En el año 2007 inicié mis estudios de Doctorado en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva (EBE) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Desde el 2008 he participado en varios congresos, evaluaciones de proyectos y cotutorías de trabajos de grado.

Agradecimientos,

Expreso mis profundos agradecimientos a mis colegas, amigos y familiares que de alguna manera que de alguna manera, me ayudaron en el desarrollo de mi tesis de doctorado.

Primero doy gracias a Dios, a mis padres Omar y Amparo, mis hermanas Lorena y Vanessa, por apoyarme incondicionalmente en realizar mi sueño del Doctorado y ser parte de un nuevo país.

Agradezco a mi tutor Dr. Elie Poulin por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su laboratorio, por haberme ayudado en el financiamiento de congresos para la divulgación y de mi trabajo de investigación, y por aportarme intelectualmente en la redacción de mi tesis. También doy gracias a mi cotutora Profesora Irma Vila, quien me apoyó académica y emocionalmente en todos estos años del doctorado y mi vida en Chile. Por sus consejos de madre y un gran apoyo moral cuando la ausencia de la patria me invadía.

A mis buenos compañeros de terreno altiplánico, quienes con su colaboración, disponibilidad y amabilidad hicieron que los viajes al altiplano fueran muy gratos.

Agradezco también a todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular, y Limnología quienes me ayudaron con los análisis de las muestras y pruebas de laboratorio. En especial a Christian Ibañez que con su paciencia me ayudo con los análisis estadísticos de mi tesis. De igual manera a mi compatriota Gabriel Castaño, por su disponibilidad para explicarme estadística.

Agradezco también a colegas del Museo Nacional de Historia Natural de París, PhD(c) Yareli Esquer y PhD. Philippe Gaubert, quienes me ayudaron en el análisis de microsatélites y me colaboraron en la terminación de la fase de laboratorio de mi tesis.

También agradezco a los miembros de la comisión evaluadora de la tesis al Dr. Alberto Veloso (UCHILE), Dr. Claudio Latorre (PUC) y Dr. Sylvain Faugeron (PUC), quienes han aportado con su visión crítica desde distintos puntos de vista, incluyendo la paleoecología, ecología, genética de poblaciones, estadística y evolución.

Finalmente quiero expresar mis agradecimientos a CONICYT, Universidad de Chile y el Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por el gran apoyo financiero de las becas de Doctorado, Apoyo de Tesis, Pasantías y Congresos, a todos ellos,

GRACIAS TOTALES

INDICE DE MATERIAS

	PAGINA
RESUMEN	xvi
CAPITULO I Introducción	
1.2. Mecanismos de Especiación	1
1.3 Género <i>Orestias</i>	5
1.4. Planteamiento de Hipótesis y Objetivos	17
CAPITULO II Diferenciación genética de <i>Orestias</i> (Complejo <i>Agassii</i>) en el Altiplano suroeste	18
CAPITULO III Trophic Differentiation of <i>Orestias</i> : (Teleostei: Cyprinodontidae) in the Chilean Altiplano	88
CAPITULO IV. Caracterización morfológica del género <i>Orestias</i> en el Altiplano sur oeste Chile	118
CAPÍTULO V : Discusión general	143

LISTA DE TABLAS

CAPITULO II

Tabla 2.1: *Características de los loci microsatélites utilizados en Orestias del Altiplano suroeste. Modificado de Esquer et al 2011. T^oa: temperatura de annealing.*

Tabla 2.2. *Índices de diversidad genética de D-loop en distintas poblaciones de Orestias.*

Tabla 2.3. Φ_{ST} *entre las poblaciones de Orestias del Parque Nacional Lauca y Ancuta-Chureaque.*

Tabla 2.4 *Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA) de D-loop en distintos grupos geográficos.*

Tabla 2.5: *Índices demográficos Tajima's D, Fs de Fu, de los diferentes grupos genéticos de Orestias en el Parque Nacional Lauca.*

Tabla 2.6. *Calculo del tamaño efectivo poblacional y el tiempo de expansión bajo los modelos de crecimiento instantáneo y exponencial de los diferentes grupos genéticos de Orestias en el PNL.*

Tabla 2.7. *Tiempo del ancestro común más reciente TMRCA mediante análisis de Bayesian skyline para los tres grupos genéticos con señal de crecimiento.*

Tabla 2.8. *Medidas de diversidad genética de 8 loci microsatélites en las distintas localidades de Orestias del PNL.*

Tabla 2.9. *Medidas de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintas poblaciones de Orestias basado en la información de 8 loci microsatélites.*

Tabla 2.10. *Resultados de los análisis de cuello de botella de las diferentes localidades y los ocho loci microsatélites.*

Tabla 2.11. *Resultados del análisis discriminante de diferentes grupos genéticos de Orestias.*

CAPITULO III

Tabla 3.1. *Geographic position and watershed of localities sampled of Orestias of the Southwest Altiplano*

Tabla 3.2. *Frequency of occurrence (% F) and number (% N) of prey items that contribute to the diet of the species of Orestias in Southwest Altiplano localities.*

Tabla 3.3. *Richness (Rich), relative abundance (A.R), diversity (HB), niche breadth (Bst), Dominance (D) in stomach of different species of Orestias in Southwest Altiplano*

Tabla 3.4. *Niche overlap of Orestias in Southwest Altiplano.*

CAPITULO IV

Tabla 4.1. *Estadísticos descriptivos de la Longitud estándar en las diferentes especies de Orestias.*

Tabla 4.2. *Funciones discriminantes para las variables morfométricas de las especies nominales de Orestias, en el PNL.*

Tabla 4.3 *Resultados del análisis discriminante de los caracteres morfológicos s de las especies de Orestias.*

Tabla 4.4. *Resultados del análisis discriminante de los caracteres morfológicos con respecto a los grupos genéticos.*

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1.1 *Ubicación geográfica del Altiplano*

Figura 1.2. *Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae: A) género Cubanichthys, B) el género Orestias C) Kosswigichthyslos (modificado de Parker & Kornfield, 1995, Parenti, 1984a)*

Figura 1.3. *Diagrama de las sinapomorfias del complejo agassii. (Modificado de Parenti, 1984)*

Figura 1.4.. 2 *Reconstrucción de los ciclos lacustres presentes en el Altiplano en los últimos 12000 años (fuente: Placzek et al 2006).*

Figura 1.5. *Mapa de la cuenca del río Lauca y las dos subcuencas Chungará y Cotacotani que se originaron posteriormente al colapso del volcán Parinacota.*

Figura 1.6. *Reconstrucción de la evolución volcánica en el Lago Chungará en los últimos 12000 años BP. Comparación con las partículas de cenizas en el Ice Core del Nevado de Sajama. En Asterisco se destacan los principales eventos volcánicos. (Modificado Giralt et al 2008, Saez et al 2007)*

Figura 1.7 *Reconstrucción de la disponibilidad de agua en el Lago Chungará,, Paco Cocha y las diatomeas bentónicas en el Lago Titicaca, para los últimos 12000 cal. años BP.(Modificado de Giralt et al 2008).*

CAPITULO II

Figura.2.1: *Mapa de los localidades de muestreo para Orestias en el Altiplano suroeste*

Figura.2.2. *Red de haplotipos para las poblaciones de Orestias del PNL y Ancuta.-*

Chureaque.

Figura 2.3. *Interpolación de la forma del paisaje en relación a la diversidad genética de ADNmt.*

Figura 2.4. *Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para Parinacota con distribución bimodal. El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia bajo los modelos de Rogers & Harpending (1992)(R&H).*

Figura 2.5 *Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para los grupos genéticos con distribución unimodal*

Figura 2.6. *Variación del tamaño efectivo ($N_e = q/2$) de los grupos genéticos Chungará, Piacota, y Grupo Lauca en función del tiempo, estimada por método de Máxima Verosimilitud*

Figura 2.7. *Bayesian skyline plot. Reconstrucción del TMRCA de los grupos genéticos Chungará (A), Piacota (B) y Lauca-Misituni-Chuviri-Copapujo (C).*

Figura 2.8. *Análisis de Componentes Principales (PCA) para las distintas poblaciones de Orestias con 8 loci microsatélites.*

Figura 2.9. *Resultados de estructuración genética y asignación a clusters del programa Structure basado en la información de 8 loci microsatélites. Cada línea vertical representa un individuo. Los individuos están agrupados de acuerdo a su localización de origen.*

Figura 2.10 a y b. *Resultados de $DK(a)$ y $\ln(P)(b)$ de los asignamientos de clusters en el programa Structure basado en la información de 8 loci microsatélites.*

Figura 2.11. *Red de haplotipos para las poblaciones de Orestias del PNL, Ancuta y Rio Mogachi laguna Macaya Bolivia.*

CAPITULO III

Figura 3.1. *Bi-plot ordination of Detrended Correspondence Analysis showing the position*

of prey (a) and Orestias species (b) in a reduced space.

CAPITULO IV

Figura 4.1 *a. Mediciones morfológicas analizadas en las especies de Orestias. b. Ejemplar de Orestias del complejo agassii (Modificado de Lauzzane 1982).*

Figura 4.2. *Bi-plot del las dos raíces canónicas más importantes del análisis discriminante para los machos de las diferentes especies de Orestias.*

Cantidades y simbología de las unidades de medida utilizadas

Longitud Kilometro km, m, cm, mm, mm

Volumen Litro L, ml, ml

Tiempo Minuto min, seg, ms, ms

Masa Gramo kg, mg, mg, ng g

Concentración Molaridad M, mM, mM

Tamaño molecular Pares de bases pb

Temperatura Grados Celsius °C

Abreviaciones estándar.

Π Número promedio de diferencias pareadas.

π Diversidad nucleotídica.

Fst: Índice de diferenciación entre pares de secuencias, entre poblaciones.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

D-loop: Región control de ADN mitocondrial.

dNTPs: Desoxi-nucleótidos trisfosfato.

Hd Diversidad haplotípica.

K: Número de Haplotipos

MCMC: Cadenas de Markov, Método Monte Carlo

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

S: Número de sitios polimorfos

Taq: DNA Polimerasa

Cal.BP: Años calibrados antes del presente.

PNL: Parque Nacional Lauca.

RESUMEN

A finales del Pleistoceno y en el Holoceno, el Altiplano sur (17° a 22°S) fue afectado por reiteradas variaciones en los niveles de agua, una intensa actividad volcánica e importantes movimientos tectónicos. En esta región del Altiplano, estos eventos geológicos habrían formado los lagos y ríos endorreicos. En el Altiplano Sur, las especies de peces del género *Orestias* se caracterizan generalmente por sus reducidas distribuciones geográficas y endemismo local. Se han descrito recientemente cuatro especies en la región de Parinacota (Parque Nacional Lauca), las cuales se encuentran supuestamente aisladas una de otra, en ambientes diferentes tales como lagos, lagunas, bofedales y ríos.

Aproximaciones genéticas, tróficas y morfológicas fueron utilizadas para relacionar los procesos microevolutivos que han promovido la diferenciación de las especies de *Orestias*. Los eventos vicariantes de las cuencas endorreicas Lauca, Cotacotani y Chungará habrían iniciado un proceso de especiación alopátrica entre las poblaciones de *Orestias*. En general, los resultados de los análisis genéticos mostraron la existencia de grupos genéticos diferenciados que coinciden con los eventos vicariantes y climáticos que afectaron el Parque Nacional Lauca. Sin embargo, las aproximaciones demográficas mostraron que esta diferenciación corresponde a un fenómeno de separación reciente. En cuanto a la dieta de las especies nominales de *Orestias* de Parque Nacional Lauca se caracterizó por una baja riqueza de presas y por una estrategia de forrajeo dependiente del recurso, lo cual fue revelado por los bajos solapamientos de nichos entre las diferentes localidades, independientemente si las muestras pertenecían o no a la misma especie. A nivel

morfológico, las variaciones estuvieron centradas en la cabeza, sin embargo, se evidenció sobreposición entre las diferentes especies nominales, por lo tanto estas variaciones no son diagnósticas para diferenciar especies.

En relación a la cronología de los eventos vicariantes en el Parque Nacional Lauca, podemos determinar que la separación de las poblaciones de *Orestias* se dieron de manera gradual. En primer lugar, el colapso volcánico de Parinacota (12.500 años atrás) habría iniciado la separación de *Orestias laucaensis* (Lauca) y *Orestias chungarensis* (Chungará). Los episodios de aridez (7.000-6.000 años atrás) habrían separado *Orestias piacotensis* de *Orestias parinacotensis*. Finalmente, el retorno de los periodos de humedad después de los 4.000 años atrás permitió la reconexión de las lagunas de Cotacotani con el río Lauca, que se evidencia con la presencia de *Orestias laucaensis* en dos sistemas diferentes pero como un solo grupo genético, trófico y morfológico.

Teniendo en cuenta la cronología de los procesos vicariantes del Parque Nacional Lauca, y mediante las tres aproximaciones podemos concluir que las localidades analizadas, no son unidades evolutivas separadas pero si son grupos en procesos de diferenciación. Por lo tanto las especies nominales de *Orestias* no se ajustarían a los criterios filogenéticos, morfológicos y ecológicos. Teniendo en cuenta el fenómeno incipiente de especiación, los eventos alopátricos no generan presión rápida en la variación ecológica y morfológica, pero si permiten la diferenciación genética entre las poblaciones. Se sugiere experimentos de cruces entre las diferentes especies nominales para comprobar la posible especiación biológica en este grupo.

ABSTRACT

Late Pleistocene and the Holocene, the Southern Altiplano (17 ° to 22 ° S) was affected by repeated changes in water levels, intense volcanic activity and major tectonic movements. In this region of the Altiplano, these geological events have formed lakes and endoreic rivers. In the Southern Altiplano, the fish species of the genus *Orestias* are generally characterized by its small geographic distributions and local endemism. Recently four species has described in the region of Parinacota (Lauca National Park), which are supposedly isolated from one another, in different environments such as lakes, ponds, wetlands and rivers.

Genetic, trophic and morphological approaches were used to link microevolutionary processes that have promoted the differentiation of species *Orestias*. Vicariant events in Lauca, Chungará Cotacotani endoreic basin, have begun a process of allopatric speciation between populations *Orestias*. In general, our results of genetic analyzes showed the existence of different genetic groups that match with vicariant and climate events that affected the Lauca National Park. However, the demographic approach showed that differentiation corresponds to a recent separation phenomenon. The diet of nominal species *Orestias* in Lauca National Park is characterized by low richness of prey and foraging strategy dependent resource, which was revealed by low breath niche between different localities. At the morphological level, variations centered on the head, however, was evident a overlap among different species and these variations are not diagnostic for differentiating species.

The timing of vicariant events in Lauca National Park, we can determine that the

separation of populations *Orestias* occurred gradually. First, the collapse volcanic Parinacota (12,500 years ago) have begun separation between *Orestias laucaensis* (Lauca) and *Orestias chungarensis* (Chungará). The episodes of aridity (7000-6000 years ago) have separated *Orestias piacotensis* of *Orestias parinacotensis*. Finally, the return periods of moisture after the 4,000 years ago allowed the reconnection of Cotacotani lagoon with Lauca River, which was evidence by the presence of *Orestias laucaensis* in two different systems but as a single genetic group, trophic and morphological.

With the timing of vicariant processes in Lauca National Park, and by the three approaches analyzed, we can conclude that the locations are not separate evolutionary units but are groups in differentiation processes. Therefore *Orestias* nominal species not correspond with the criteria phylogenetic, morphological and ecological. Given the emerging phenomenon of speciation, allopatric events do not generate quick pressure on the ecological and morphological variation, but they allow genetic differentiation between populations. It suggests breeding experiments between species nominal to check possible biological speciation in this group.

INTRODUCCIÓN

1.1. MECANISMOS DE ESPECIACIÓN

La formación de nuevas especies puede ser considerada como un proceso temporal por el cual algunas poblaciones se diferencian y alcanzan independencia evolutiva a través del aislamiento reproductivo. En este contexto, el proceso de especiación presenta varios componentes geográficos, ecológicos, morfológicos y genéticos (Perfectti 2003, Soler 2003). Cuando las poblaciones de la misma especie habitan diferentes hábitats, es posible que la selección pueda causar diferenciación en los caracteres ecológicamente importantes generalmente asociados a cambios morfológicos (Schluter 2000). Diversos estudios han demostrado que la variación entre los diferentes ambientes pueden llevar a las poblaciones a diferenciarse en base a los ejes del nicho ecológico (Rabosky et al. 2007, Burbrink & Pyron 2009). Además, se ha observado que la colonización de nuevas zonas libre de competidores ayudaría al incremento de la variación morfológica en algunas poblaciones (Nosil & Reimchen 2005) que podría llevar a un aislamiento reproductivo entre ellas.

En este contexto, los modos de especiación se podrían clasificar de acuerdo al tipo y la magnitud de los diversos mecanismos que controlen la divergencia (Gavrilets 2003): Es por esta razón, las diferentes propiedades biológicas han llevado al planteamiento de diferentes conceptos de especie, basado en el aislamiento reproductivo, la ocupación de distintos nichos o zonas adaptativas, y la fijación de diversos estado de carácter (De Queiroz 2007).

Sin embargo, tradicionalmente en biología evolutiva, los mecanismos de especiación se han clasificado de acuerdo a los niveles de migración entre las poblaciones divergentes (Mayr 1963; Gavrilets 2004), enmarcando a la especiación en los tipos básicos: Simpatría y Alopatria (Mayr 1942, Gavrilets 2003, Coyne & Orr 2004).

En Simpatría, los mecanismos de especiación estarían relacionados con las variaciones en los rasgos asociados con la competencia, depredación, elección de hábitat y selección sexual, cuyas diferencias facilitarían la separación de las poblaciones aún con un flujo génico alto entre ellas (Hatfield & Schluter, 1999, Coyne & Orr 2004). Dentro de la alopatria, los eventos vicariantes permitirían la separación de una especie ancestral en dos o más poblaciones aisladas, donde los procesos microevolutivos como la adaptación local y deriva genética facilitarían la divergencia (Bolnick & Fitzpatrick 2007, Nossil 2008).

Aunque el proceso de especiación es difícil de analizar en un tiempo corto, existen grupos de organismos cuya tasa de especiación es inusualmente alta, los cuales permiten estudiar los procesos implicados en la generación de especies (Ribbink, 1984, Shluter & Mc Phail 2009; Mehner et al 2011). Los peces son ejemplos interesantes para este tipo de estudios de especiación. Tal es el caso del género *Gasterosteus*, el cual presenta diferenciación genética significativa, y diferencias ecológicas entre las diferentes especies del género dentro de los lagos Bálticos. Esto sugiere una especiación en Simpatría generada por competencia de los recursos que habría favorecido la variación trófica (Kornfield & Smith 2000, Hudson et al 2007). Otro caso son los peces de la familia *Cichlidae* que habitan el lago Apoyo de

Nicaragua y los lagos africanos mas grandes (e.g. Lago Victoria) (Salzburger et al 2004; Joyce et al 2005, Elmer et al 2010 a, Elmer et al 2010b; Bezault et al 2011), donde la especiación en simpatria podría explicar la gran diversidad de especies dentro de un mismo lago, sin barreras físicas aparentes. En este caso, las especializaciones tróficas y las diferencias morfológicas habrían promovido la evolución de estas especies a partir de un ancestro (Kornfield & Smith, 2000, Barluenga et al. 2006, Elmer et al 2010).

Por otro lado, algunas de estas especies de cíclidos han mostrado características morfológicas similares (Danley & Kocher 2001, Kocher 2004) lo que plantea que la radiación de estos grupos de especies estarían relacionada con varios eventos de colonización por diferentes linajes por alopatria. Estos eventos vicariantes estarían relacionados con los cambios sustanciales en el clima y la precipitación en los lagos de África, que pudieron ser fragmentados en la época de sequía (Owen *et al.* 1990) aumentando la tasa de extinción de los organismos que los ocupaban, por la pérdida del hábitat (Owen *et al.* 1990; Sturmbauer & Meyer 1992; Verheyen *et al.* 1996; Rüber *et al.* 1998, Rüber *et al.* 1999).

Al igual que en los lagos Africanos, la región del Altiplano en Suramérica (17°-22°S), una extensa planicie intermontañosa con una altitud entre los 3700- 5000 msnm, ubicada entre el centro y sur del Perú, el este de Bolivia, el noroeste de Argentina y el nororiente de Chile (figura 1.1); se ha caracterizado por presentar ciclos extensos de sequía y humedad, y que actualmente presenta dos estaciones, una temporada seca y otra húmeda. En esta última, el régimen de lluvia se presenta

durante los meses de diciembre a marzo con precipitaciones entre los 50 y 200 mm por año, durante lo que se denomina invierno altiplánico (Hulbert y Chang 1984; Aceituno y Salazar 1997). Esta región presenta un clima semiárido además de su alta exposición a la radiación y bajas temperaturas (Risarcher et al 2003; Sáez et al 2007, Placzek et al 2009).

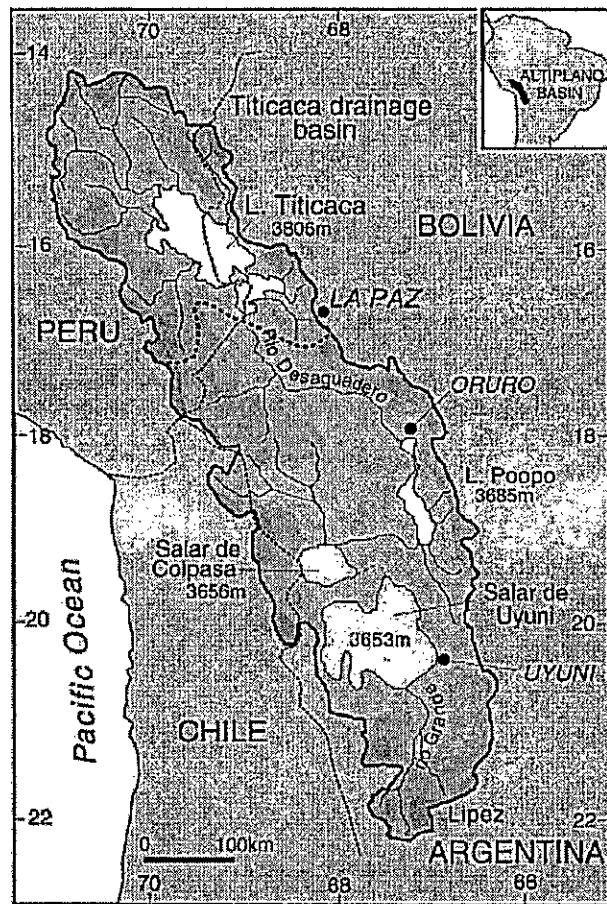


Figura 1.1. Ubicación geográfica del Altiplano

En el Altiplano se han descrito numerosas cuencas hidrográficas, las cuales se caracterizan por ser endorreicas y no presentan interconexión entre ellas. Este aislamiento habría permitido la diferenciación de sistemas particulares como bofedales, ríos lagos, lagunas y los salares. (Márquez et al 2009). Estos sistemas

acuáticos particulares, en conjunto con las particulares características ambientales del Altiplano, han permitido el desarrollo de una biodiversidad única que los convierte en un laboratorio natural para comprender los procesos de especiación.

1.2 GÉNERO *Orestias*

Uno de los ejemplos de la alta especiación y endemismo es el género *Orestias*, el cual puede ser comparado con los procesos de especiación de los cíclidos. Este género pertenece a la familia Cyprinodontidae, junto con los géneros *Aphanius* en el Mediterráneo y *Cyprinodon* en Norte América. *Orestias* fue el único género de la familia que colonizó la región Altiplánica hace 80 a 100 millones de años (Parker & Kornfield, 1995).

Durante este periodo el mar alcanzó su nivel más alto, formándose mares epicontinentales que cubrieron grandes zonas de África, Norteamérica y la región norte de Sudamérica (Barron et al, 1989) hasta el lado este de la cordillera de los Andes (Willis, 1910; Haq et al 1987). Esto permitió que el ancestro de *Orestias* ocupara los nuevos hábitats costeros (Parker & Kornfield, 1995). Al continuar los cambios orogénicos, nuevas cuencas y pequeños ríos fueron formados quedando aislados aproximadamente hace 15 Ma. Estos cambios habrían permitido la dispersión de los peces hacia el sur de lo que es actualmente el lago Titicaca (Figura 1.2) (Barron et al, 1989, Parker & Kornfield, 1995). Actualmente, el género *Orestias* se distribuye en el Altiplano, desde el Lago Lacsha (9°S) en el centro del Perú hasta el Salar de Ascotán en el norte de Chile (22°S)(Vila et al 2010).

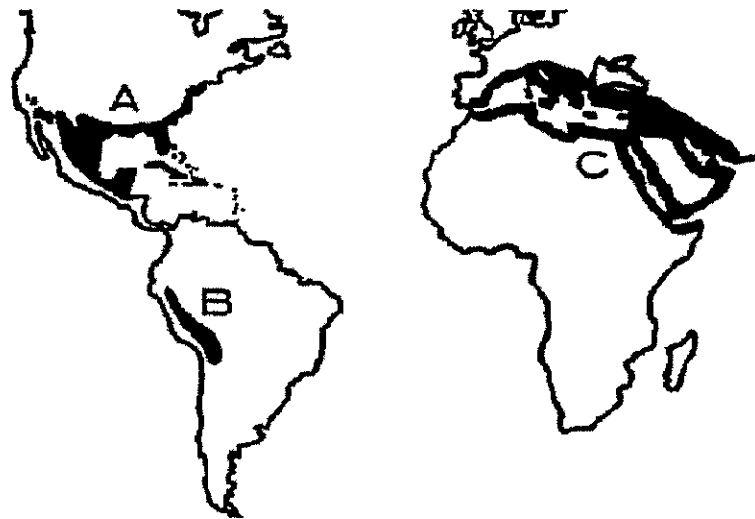


Figura 1.2 Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae: A) genero Cubanichthys, B) el género Orestias C) Kosswigichthyslos (modificado de Parker & Kornfeld, 1995, Parenti, 1984a).

El género presenta descritas 45 especies, de las cuales 23 se encuentran en Simpatría en el lago Titicaca. Se ha propuesto como una posible explicación, la especialización trófica como mecanismo de diferenciación y se han descrito complejos de especies con morfotipos especializados en zonas pelágicas, litorales y bénticas. (Lauzanne 1982, Parenti 1984 a; Parenti 1984 b). Por otro lado, morfológicamente, Parenti, (1984) reconoce para las especies distribuidas dentro del Lago Titicaca, cuatro grupos o complejos diferenciados por el patrón de escamación, forma del cuerpo, patrón de neuromastos y caracteres merísticos, clasificados como: complejo *cuvieri* con cuatro especies, complejo *mulleri* con 5 especies, complejo *gilsoni* con 10 especies y el complejo *agassii* con 25 especies, los cuales formarían ensambles

parafiléticos (Parenti 1984 a, Scott 2010, Vila et al 2010). Dentro de este complejo, 22 especies se encuentran fuera del lago Titicaca .

Taxonómicamente, Parenti 1984 divide al complejo *agassii* en tres clados monofiléticos cada uno con sus propias sinapomorfías. Un primer grupo correspondería a las especies del Lago Titicaca, *Orestias ututo*, *O. hardini* y *O. mundus*. Un segundo grupo estaría conformado por las especies distribuidas fuera del Lago Titicaca como son *O. gymnotus*, *O. elegans*, *O. ascotanensis*, *O. parinacotensis*, *O. laucaensis* y un tercer clado con las especies del grupo *luteus* y las demás especies del complejo *agassii* (figura 1.3) (Parenti 1984 a). Sin embargo, posterior a Parenti 1984 se han descrito nuevas especies nominales en la región del Altiplano suroeste que presentan distribución restringida a un solo ambiente: *Orestias chungarensis* en el Lago Chungará, *Orestias piacotensis* en la Laguna de Piacota y *Orestias gloriae* en salar de Carcote (Vila & Pinto 1986, Vila 2006, Vila et al 2011).

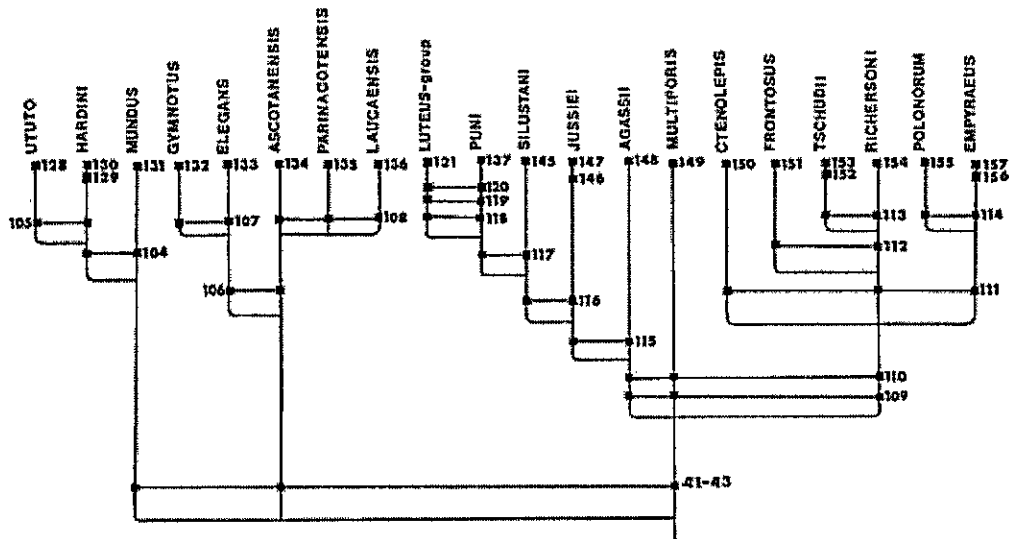


Figura 1.3. Diagrama de las sinapomorfias del complejo *agassii*. (Modificado de Parenti, 1984).

Diversos estudios han validado la existencia de las especies del género. Parenti (1984a) y Costa (2003) plantean que son especies cuyo centro de origen fue el lago Titicaca y radiaron hacia el sur del Altiplano. Adicionalmente, análisis citogenéticos han demostrado que *O. ascotanensis*, *O. parinacotensis* y *O. agassii* presentan un mismo número cromosómico ($2n=48$) pero con morfología cromosómica diferente, característica de cada especie. En contraste, las especies *O. laucaensis* ($2n=48$), *O. piacotensis* ($2n=54$) y *O. chungarensis* ($2n=55$) presentan cariotipos diferentes (Arratia, 1984; Vila et al, 2007, Vila et al, 2010). Esta variación entre las especies, puede explicarse por rearrreglos cromosómicos de tipo Robertsonianos que podrían jugar un papel en la variación del número diploide entre estas especies (Vila et al 2010).

Análisis filogenéticos moleculares revelan clados definidos para las especies del altiplano sur-oeste. El primero agrupa a *O. agassii* cf del río Isluga con *O. puni* del Titicaca. Un segundo clado *O. ascotanensis*, *O. agassii* cf de río Huasco y un tercer clado con las especies *O. piacotensis*, *O. chungarensis*, *O. parinacotensis* y *O. laucaensis* bien diferenciado del resto de las *Orestias* del Altiplano suroeste aunque no presentan resolución entre ellas (Scott 2010). Sin embargo, Lüssen et al (2003) con base en la variación de la región variable mitocondrial (D-loop) postula que son poblaciones diferenciadas de una misma especie. Las discrepancias estarían relacionadas por los diferentes enfoques que se han utilizado para describir estas especies.

A pesar de las discrepancias entre la validez de las especies del Altiplano sur, la característica importante de éstas especies fuera del Lago Titicaca, es que se encuentran distribuidas alopátricamente en diversos sistemas hídricos como los salares, ríos, bofedales y lagos (Arratia, 1984, Vila & Pinto 1986, Vila et al 2011). Estos sistemas se habrían formado como resultado de los avances y retrocesos de los grandes paleolagos (Placzek et al 2006; Moreno et al 2009), así como de las variaciones tectónicas y volcánicas que presentó el Altiplano (Sáez et al 2007).

En el Altiplano sur, durante el Pleistoceno, las variaciones en los niveles hidrológicos con períodos secos y húmedos, permitieron la existencia de paleolagos que cubrieron extensas áreas geográficas, y que han sido descritos en cronologías diferentes (Fornari et al, 2001; Fritz et al, 2004; Rigsby et al, 2005). Una de ellas es la de Placzek et al (2006) que estima la edad y duración de estos paleolagos o ciclos lacustres en las cuencas de los lagos Poopó, Uyuni y Copasa (Figura. 1.4). El ciclo de mayor extensión geográfica fue el Tauca ,hace 18-14 mil años, al tener una cota de 3780 msnm y 140 metros de profundidad. Este último gran paleolago habría logrado conectar desde la cuenca del Poopó hasta el salar de Carcote en el extremo sur del Altiplano, pasando por los salares de Coipasa y Uyuni.

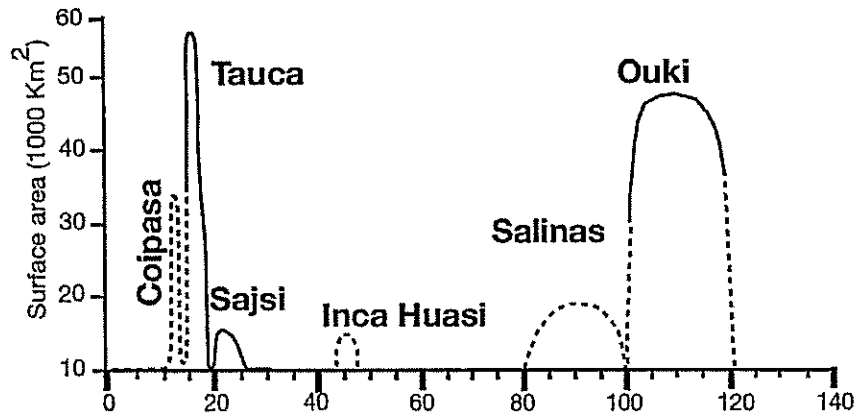


Figura 1.4 Reconstrucción de los ciclos lacustres presentes en el Altiplano en los últimos 12000 años (fuente: Placzek et al 2006).

Los avances y retrocesos de los grandes paleolagos, además del volcanismo que presenta la zona del altiplano sur, habrían aislado las poblaciones de *Orestias* en ambientes diferentes y con el tiempo especiar. Morales et al 2011, estudió las poblaciones en los salares de Ascotán y Carcote y observó una gran distancia genética entre cada salar, lo que plantea que habría existido una barrera más antigua (280 mil años) al flujo génico, que la cronología de lo paleolagos (el más antiguo es el paleolago Ouki, hace 120 mil años atrás; Placzek et al, 2006). Sin embargo, hace 300 mil años atrás estaba comenzando una transición desde una fase glacial a una interglaciación, por lo tanto, es posible que hubiese existido un paleolago en la zona altiplánica conectando ambos salares, que se separaron cuando éste se secó.

De esta manera, las fluctuaciones en los niveles de los lagos serían los eventos vicariantes, donde el ancestro de *Orestias* pudo haber colonizado distintas cuencas del altiplano. Una vez que el nivel de agua disminuyó, éstas quedaron aisladas y las

poblaciones dentro de cada una de ellas comenzaron a divergir, hasta que finalmente pasaron a ser especies diferentes (Morales 2010, Morales et al 2011, Scott, 2010).

En contraste con las zonas previamente mencionadas, la región más alta del Altiplano sureste, que supera generalmente los 4000 msnm, no fue alcanzada por la extensión de los paleolagos. Sin embargo, los avances o retroceso de los glaciares y los eventos volcánicos marcaron los cambios en el paisaje y la fragmentación de las cuencas. En esta zona se han descrito 4 especies del género *Orestias*, la mayoría de ellas restringidas a un solo ambiente. En el bofedal de Parinacota se encuentra *O. parinacotensis*, en las lagunas de Cotacotani y el río Lauca se ha descrito *O. laucaensis*; *O. chungarensis* en el lago Chungará, *O. piacotensis* en la laguna de Piacota (estas especies se ubican todas dentro del Parque Nacional Lauca) (Arratia, 1984; Vila et al, 2007, Vila et al, 2010).

A fines del Pleistoceno, el paleorío Lauca, fluía hacia el norte desde Guallatire hasta Cotacotani, pasando entre los volcanes de Ajoya y Parinacota. Posteriormente se dirigía hacia el oeste hacia el pueblo de Parinacota y finalmente giraba a Bolivia (Sáez et al 2007). Durante el Holoceno, alrededor de 12.500 años atrás, el volcán Parinacota presentó un colapso de su cono volcánico que modificó la cuenca Lauca, aislándola en dos subcuencas: subcuenca Chungará y la subcuenca Cotacotani (Clavero et al 2002; Clavero et al 2004, Sáez et al 2007, Giralt et al 2008) (Figura 1.5). Registros paleoclimáticos del Lago Chungará indican un aumento de la actividad volcánica entre los 7.800 a los 1.000 años BP, que formó el nuevo cono volcánico del Parinacota y manteniendo aisladas las cuencas Lauca, Chungará y

Cotacotani (Giralt et al 2008). (Figura 1.6).

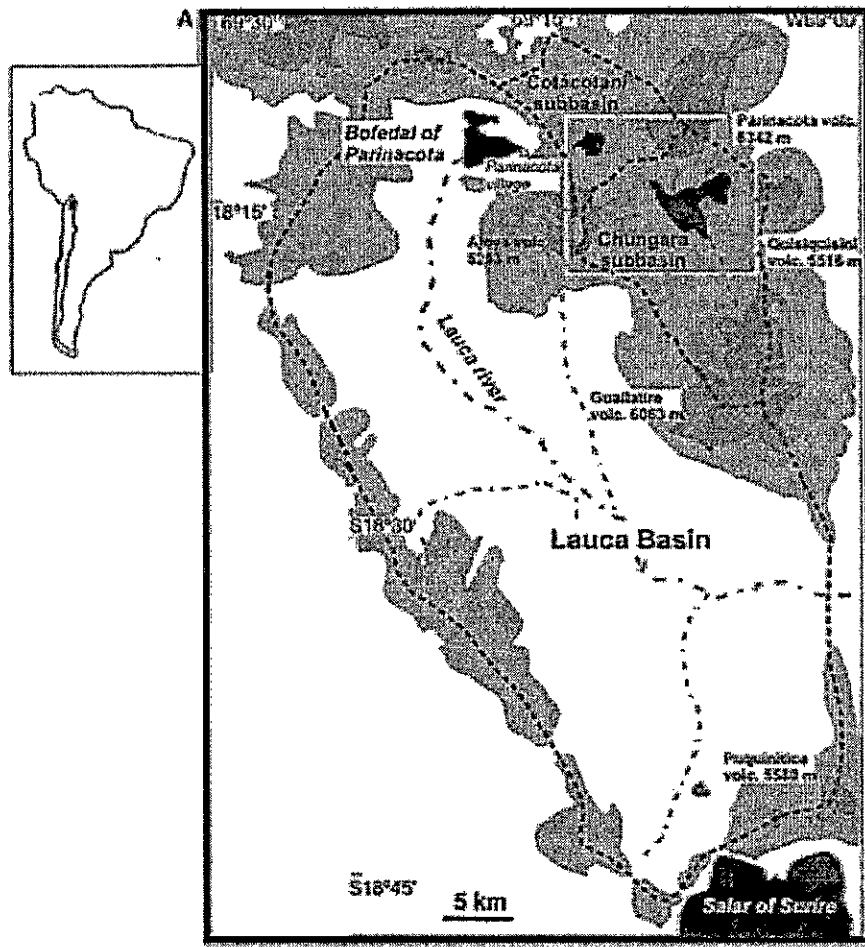


Figura 1.5. Mapa de la cuenca del río Lauca y las dos subcuencas Chungará y Cotacotani que se originaron posteriormente al colapso del volcán Parinacota.

La transición del Último Glacial y el inicio del Holoceno, estuvo constituida por una fase húmeda que estaría relacionada con la fase Coipasa de los paleolagos del altiplano sur (Placzek et al. 2006). Sin embargo, en este periodo se presentaron oscilaciones en las condiciones de sequía y humedad lo que habría generado que el lago Chungará presentara variaciones en su profundidad (Sáez et al, 2007), forma del lago y batimetría (Giralt et al 2007, Hernández et al, 2007).

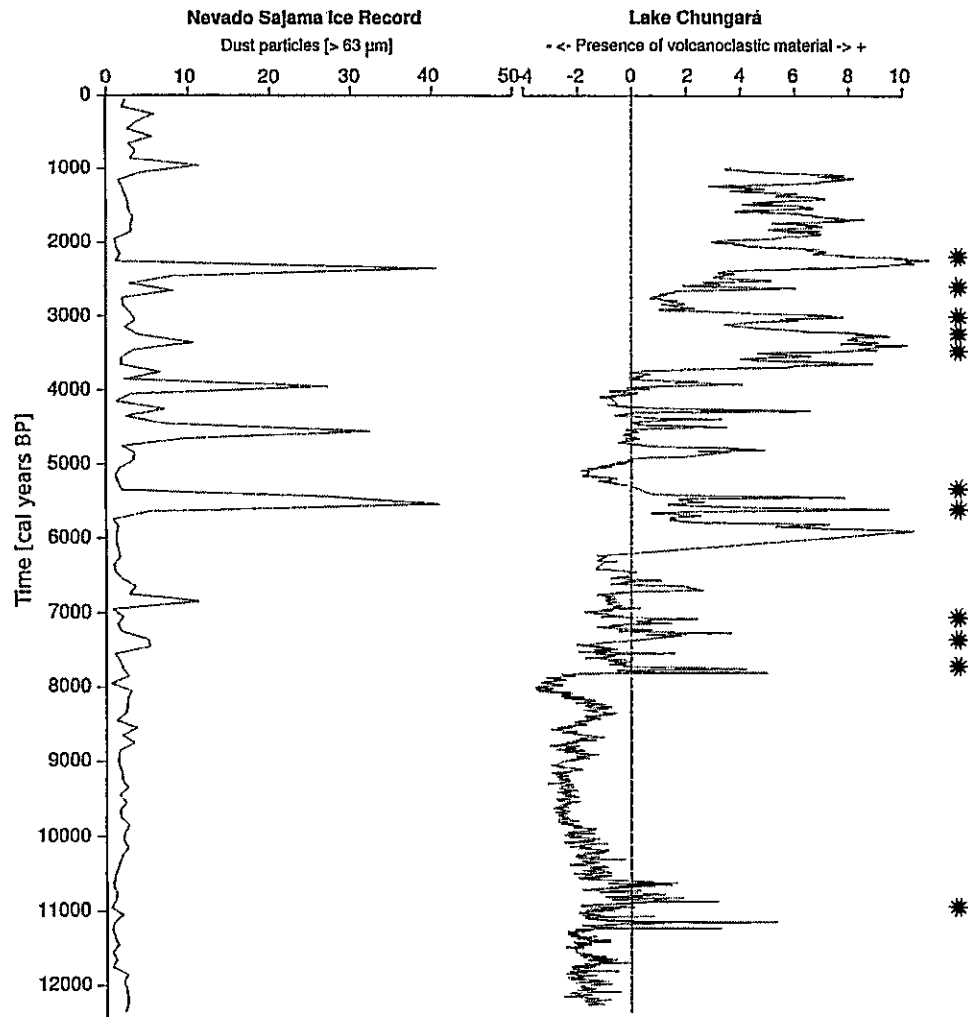


Figura 1.6. Reconstrucción de la evolución volcánica en el Lago Chungará en los últimos 12000 años BP. Comparación con las partículas de cenizas en el Ice Core del Nevado de Sajama. En Asterisco se destacan los principales eventos volcánicos. (Modificado Giralt et al 2008, Saez et al 2007)

Posteriormente en el inicio del Holoceno, registros paleoclimáticos muestran que el periodo de aridez estuvo entre los 8000 – 4000 cal. años BP, con abruptos cambios de humedad y sequía. La intensidad del periodo de aridez en el Chungara ocurrió

entre los 7400 cal. años BP y los 6600 cal. años BP.(Moreno et al 2007, Giralt et al 2008). Este periodo de aridez en combinación con la posterior erupción del volcán Ajata aproximadamente 8 mil años atrás, aisló completamente los sistemas (Sáez et al 2007, Giralt et al 2008) entre los que se destacan la Laguna de Piacota, la cual se separó del bofedal de Parinacota y del río Lauca, quedando como un sistema aislado que recibe sus aguas de la precipitación del invierno altiplánico (Márquez et al 2009) (Figura 1.7).

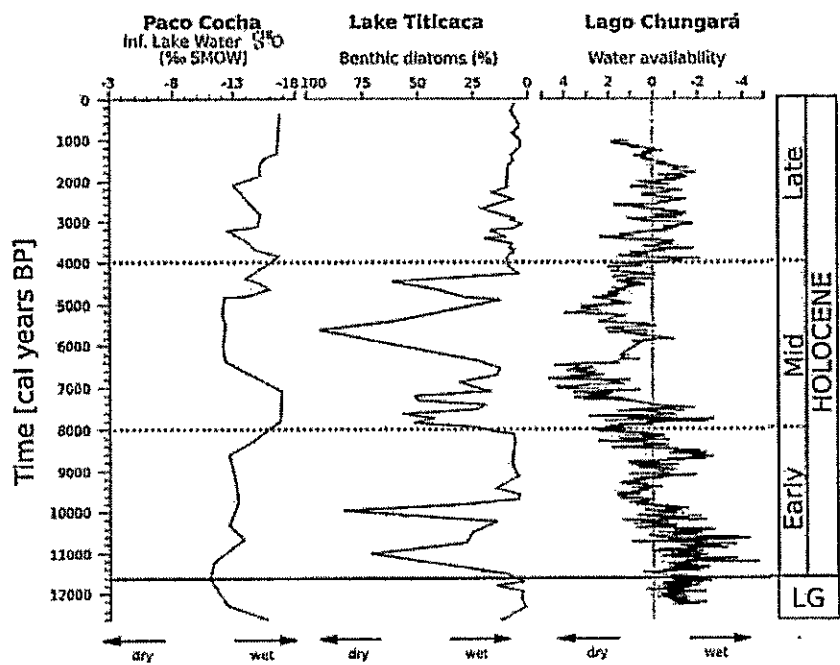


Figura 1.7 Reconstrucción de la disponibilidad de agua en el Lago Chungará,, Paco Cocha y las diatomeas bentónicas en el Lago Titicaca, para los últimos 12000 cal. años BP.(Modificado de Giralt et al 2008).

Teniendo en cuenta este escenario en la zona del Lauca, los eventos vicariantes que se presentaron habrían separado el ancestro de *Orestias* en diferentes momentos geológicos. Durante el colapso volcánico del Parinacota, las poblaciones de *Orestias*

habrían sufrido un cuello de botella drástico y los individuos que sobrevivieron colonizaron los nuevos sistemas acuáticos, el Lago Chungará y las lagunas de Cotacotani. Por lo tanto se esperaría una separación inicial de *Orestias chungarensis* (Chungará) de *Orestias laucaensis* (Lauca).

Posteriormente, las variaciones en la aridez de la zona, entre los 8000- 4000 cal años BP, disminuyeron los niveles de agua que separaron los sistemas acuáticos más cercanos, como son el bofedal de Parinacota de la laguna de Piacota. Este aislamiento se habría intensificado por la erupción del Volcán Ajata (hace 8000 años). Estos eventos vicariantes, habrían determinado el aislamiento de las poblaciones del bofedal, *Orestias parinacotensis* de la laguna de Piacota, *Orestias piacotensis*; por lo tanto bajo este escenario se esperaría una alta diferenciación entre ellas.

Las diferencias en las características, físicas, hidrológicas y químicas de los sistemas que habitan estas especies junto con la variación de la vegetación de borde, podría determinar la diferencia en los recursos disponibles y asociada con la diversificación del género (Lauzanne 1982; Dejoux & Iltis 1991, Gerking 1994; Maldonado et al 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación se propuso relacionar los procesos microevolutivos que han promovido la diferenciación de las especies de *Orestias* con las variaciones morfológicas y ecológicas que las caracterizan. Los eventos vicariantes de las cuencas endorreicas Lauca, Cotacotani y Chungará habrían iniciado un proceso de especiación alopátrica entre poblaciones de *Orestias*. Combinando el uso de marcadores moleculares, los análisis morfológicos y la

caracterización ecológica de cada especie con su entorno físico y biótico, se intentó avanzar en la comprensión de los mecanismos evolutivos y ecológicos responsables del fenómeno de radiación en el género *Orestias*.

1.4. Planteamiento de Hipótesis y Objetivos

1.4.1. Hipótesis

H₁: La presencia de cuatro especies nominales de *Orestias* en la región de Parinacota representaría una etapa precoz de un proceso de especiación ligado a eventos vicariantes. Bajo esta hipótesis, se espera encontrar una baja divergencia molecular entre taxa asociada a diferencias morfológicas y ecológicas ligada a los diferentes ambientes que ocupan.

H₂: Las conexiones entre las lagunas de Cotacotani y en los bofedales asociados a la cuenca del Lauca, permitiría la persistencia de flujo génico de *Orestias laucaensis* entre estos ambientes y así limitaría la diferenciación genética, morfológica y ecológica observada en las otras especies, cada una restringida a un solo ambiente.

1.4.2. Objetivos:

O₁: Evaluar el nivel de diferenciación genética, el grado de estructuración genética entre las diferentes especies de *Orestias* descritas en la región de Parinacota.

O₂: Inferir los procesos demográficos históricos de las *Orestias* con base en su diversidad genética.

O₃: Evaluar la posible diferenciación del género *Orestias* mediante el análisis dietario y morfológico en relación a sistema hidrológico donde habitan.

CAPITULO II

Diferenciación genética de *Orestias* (Complejo *Agassizii*) en el Altiplano suroeste

2.1. INTRODUCCIÓN

En un contexto genético, los procesos de especiación se asocian generalmente con una reducción o interrupción del flujo genético entre poblaciones que conlleva a un aislamiento reproductivo (Mayr 1963; Gavrillets 2004). En alopatria, los mecanismos vicariantes impedirían el flujo genético entre ellas, por lo tanto los procesos microevolutivos como la adaptación local y la deriva genética (Bolnick & Fitzpatrick 2007, Nossil 2008) favorecerían la divergencia. Por otro lado, en simpatria, el aislamiento reproductivo que presentarían las nuevas especies, estaría influenciado por los mecanismos ecológicos, y facilitaría la separación de las poblaciones aún cuando el flujo génico sea alto (Doebeli & Dieckmann 2000, Rundle & Nosil 2005, Gavrillets et al 2007).

La alta tasa de radiación que muestran algunos grupos peces ha sido un hito importante para los estudios evolutivos (Meyer et al 1990; Nagl et al 2000; Joyce et al 2005 Elmer et al 2010 a, Elmer et al 2010b; Bezault et al 2011). En el caso del Altiplano, las especies de *Orestias* estarían relacionados con procesos simpátricos en el lago Titicaca (Lauzanne 1982, Parenti 1984 a; Parenti 1984 b, Mourguiart et al

1995). Sin embargo en los sistemas hídricos fuera del lago, las especies de *Orestias* que los habitan se pudieron generar mediante alopatria, como resultado de los avances y retrocesos de los grandes paleolagos del Pleistoceno (Placzek et al 2006; Moreno et al 2009; Morales 2009; Morales et al 2011), las variaciones tectónicas y volcánicas que habrían fragmentado el paisaje en numerosas cuencas evaporíticas, reduciéndose a ríos endorreicos y vertientes de los salares (Fornari et al 2001).

Un caso interesante de fragmentación de los sistemas acuáticos es el Parque Nacional Lauca (PNL), donde se destacan barreras físicas que son productos de las variaciones del río Lauca y el colapso volcánico del Parinacota que originó las Lagunas de Cotacotani, Piacota y el lago Chungará (Sáez, 2007, Giralt et al 2008). Esta fragmentación habría provocado el aislamiento de varias poblaciones de las cuales se originaron las cuatro especies del género *Orestias* en sistemas hídricos diferentes (Parenti 1984b, Vila & Pinto 1986, Vila et al 2010): *O. chungarensis*, en el Lago Chungará, *O. piacotensis* en la laguna de Piacota, *O. parinacotensis* en el bofedal de Parinacota y *O. laucaensis* en el río Lauca y Lagunas de Cotacotani. Por lo tanto la presencia de ellas en cada sistema estaría relacionada con las variaciones de los sistemas hídricos en el Holoceno (12000 años), lo que nos lleva a plantear una diferenciación reciente de las especies.

Teniendo en cuenta la variación física de los sistemas hídricos y las variaciones morfológicas que muestran estas especies, nuestro objetivo fue comprender los mecanismos de la diferenciación genética entre poblaciones geográficas de las cuatro especies nominales de *Orestias* presentes en el PNL, mediante el uso de marcadores

moleculares mitocondriales y nucleares (microsatélites) para aprehender así los procesos de especiación en este grupo. Considerando que la radiación de las especies de *Orestias* en la zona del Altiplano suroeste ha sido en un tiempo corto (12 mil años), se espera encontrar una baja divergencia molecular entre estas especies nominales ligada a los diferentes ambientes que ocupan. Por otro lado, las conexiones entre las lagunas de Cotacotani y el río Lauca, permitiría la persistencia de flujo génico de *Orestias laucaensis* y así limitaría la diferenciación genética entre las poblaciones a diferencia de las otras especies, cada una restringida a un solo ambiente.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Sitios de muestreo y aislamiento de ADN

Las muestras fueron recolectadas en 8 localidades del Parque Nacional Lauca que abarcan la distribución de las 4 especies de *Orestias* (Figura 2.1). Muestras de tejido fueron colectadas sobre los individuos capturados para los análisis estomacales y morfológicos. Las muestras fueron fijadas en etanol 95% y se etiquetaron con el nombre de la localidad y fecha de colecta, para posteriormente trasladarlas al laboratorio de Ecología Molecular (LEM), Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Se realizó la extracción de ADN basado en el método de extracción salina (Aljanabi & Martínez 1997). Para cuantificar y determinar la pureza del ADN extraído se empleó el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

2.2.2. ADN mitocondrial (D-loop)

2.2.2.1. Amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial (D-loop).

La amplificación de la región control del ADN mitocondrial (D-Loop) se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) empleando los partidores específicos para el género: (DO-F) de 19 nucleótidos (Forward 5' ACC CCT AAC TCC CAA AGC T 3') e inverso (DO-R) (Reverse 5' TGA TAG TAA AGT CAG GAC CAA 3') de 21 nucleótidos (Morales 2009; Morales et al 2011).

La reacción de PCR se estandarizó en un volumen de 25 μ l que contenían 2,5 μ l de Buffer de PCR 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,0 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 2,0 μ l de cada partidor a 10 pm/ μ l, 2,0 μ l de cada dNTP 2,5 mM, 0,5 μ l Taq (Invitrogen), 9 μ l de agua ultra pura, 1 μ l DMSO y 10 ng/ μ l de ADN.

Después de la primera fase de denaturación (5 minutos 94°C), la reacción fue de 38 ciclos compuestos de: 45 segundos 94°C, 1 minuto 30 segundos 66°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C; seguida por una fase de extensión final 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para verificar una amplificación positiva. Posteriormente los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen Inc., en Corea del Sur (www.macrogen.com). Las secuencias del D-Loop fueron alineadas, editadas y ensambladas utilizando el programa Proseq v.2.91 (Filatov, 2002).

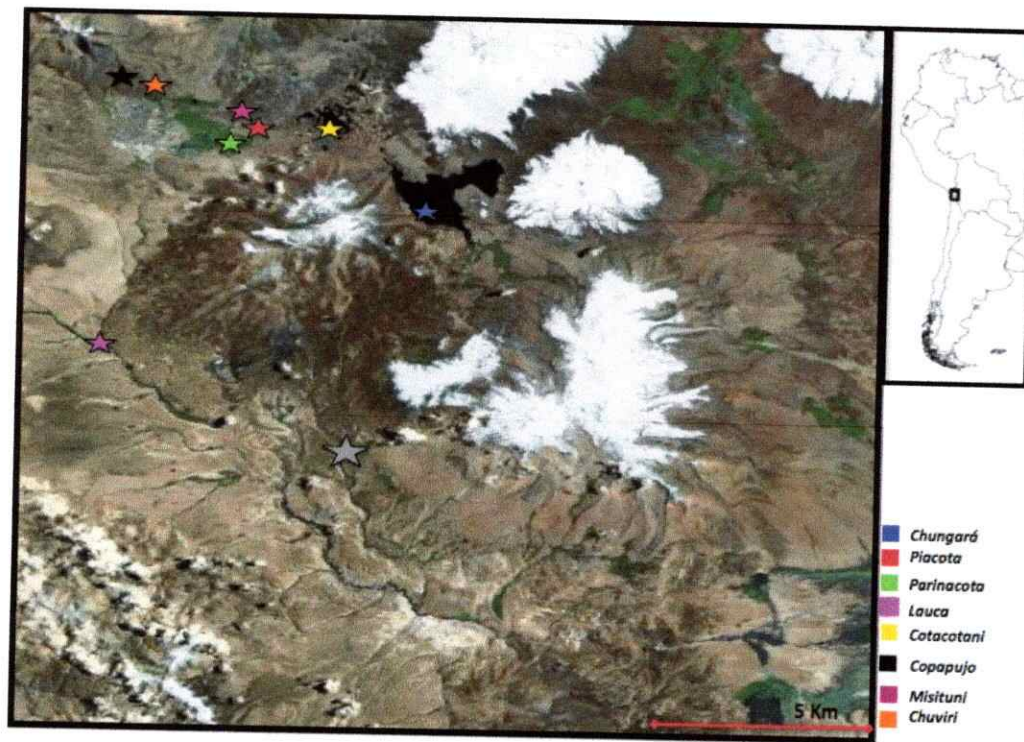


Figura 2.1. Mapa de las localidades de muestreo para Orestias en el Altiplano suroeste.

2.2.2.2 Análisis Genético poblacionales

A partir de las secuencias de la región control (D-loop), se estimaron para cada localidad los diferentes índices de diversidad. En primer lugar, se calculó el número de Haplotipos (K), el cual fue corregido mediante rarefacción para evitar el efecto de las diferencias en los tamaños muestrales sobre el número de haplotipos (PAST 1.75) (Hammer et al, 2001). Luego, se calculó el número de sitios polimorfos (S), la diversidad haplotípica (H), el número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) y la diversidad nucleotídica (π) usando el programa DnaSP v.5. (Librado & Rozas 2009).

Las relaciones genealógicas entre haplotipos fueron graficadas con la construcción de la red de haplotipos usando el algoritmo median-joining implementado en el software Network versión 4.501 (Bandelt et al. 1999). Cada haplotipo diferente es representado por un círculo donde el tamaño varía según la frecuencia de dicho haplotipo y la distancia entre estos es proporcional al número de pasos mutacionales.

Para determinar la existencia y el nivel de diferenciación genética entre cada par de poblaciones de *Orestias* se realizaron pruebas pareadas con el programa Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). Se usaron dos índices diferentes, el Φ_{ST} , basado en el número de diferencia entre pares de secuencias, y el F_{ST} , basado en las diferencias de frecuencias haplotípicas.

La estructura genética en función de la componente geográfica fue analizada mediante un Análisis de Varianza Molecular Espacial, SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VARIance; (Dupanloup et al, 2002) El método se basa en la maximización de la varianza genética producto de la diferencia entre grupos de poblaciones, para esto los grupos deben cumplir con la condición de ser genéticamente homogéneas y geográficamente cercanas. Este análisis compara la diversidad genética en los distintos grupos geográficos, determinando la varianza dentro y entre grupos, y finalmente identifica grupos de poblaciones que son homogéneos geográficamente (presentan la menor varianza *dentro* del grupo) y poseen máxima proporción de varianza genética total dada por diferencias entre grupos (presentan la mayor variación *entre* grupos).

Con la finalidad de evaluar el patrón de distribución geográfica de la diversidad genética se realizó un Análisis de Interpolación de la Forma del Paisaje utilizando el programa Alleles in Space (AIS) (Miller 2005, Miller et al 2006). Este método permite visualizar patrones de diversidad a través del paisaje muestreado. El programa aplica una red de conectividad por triangulación de Delaunay a los sitios de muestreo y asigna una distancia genética al punto medio de cada par de sitios. Las distancias genéticas sobre la superficie del paisaje son luego interpoladas a través de todo el rango geográfico muestreado. Este método es cualitativo, pero provee una útil representación gráfica de las distancias genéticas sobre el área de muestreo. El análisis arroja una superficie tridimensional donde los ejes X e Y corresponden a localizaciones geográficas (latitud y longitud, respectivamente), mientras que el eje Z representa las distancias genéticas medidas como diferencias entre par de secuencias, las que corresponden a distintas altitudes o depresiones en la superficie. Las alturas máximas representan áreas donde existen grandes distancias genéticas.

Se realizaron los test de Tajima (Tajima, 1989) y Fu (Fu, 1997), en cada grupo genético para detectar desviaciones al equilibrio mutación-deriva bajo el modelo Wright-Fisher, que podrían indicar expansiones poblacionales o cuellos de botella bajo el supuesto de neutralidad.

Para evaluar cambios demográficos pasados, usamos tres métodos diferentes, cada uno basado en distintos modelos demográficos. En primer lugar, usando el programa DnaSP v.5, se construyó una distribución mismatch para cada grupo genético y se

estimó, cuando fue pertinente, los parámetros demográficos de la expansión bajo el modelo de crecimiento instantáneo de Rogers & Harpending (1992). Se estimaron los parámetros de expansión demográfica $\tau = 2ut$, (Tau) el cual está relacionado con el tiempo t transcurrido desde la expansión (en unidades de tiempo mutacionales) y u es la tasa de sustitución nucleotídica. El parámetro Theta inicial $\theta_0 = 2N_t u$ (donde N_t es el tamaño efectivo poblacional en la actualidad, y u es la tasa de mutación por secuencia, por año) es estimado antes del crecimiento de la población, y Theta final $\theta_1 = 2N_t u$ es medido después del crecimiento. Se construyó la distribución mismatch por medio del método propuesto por Shneider & Excoffier (1999) en ARLEQUIN 3.1, el cual estima los parámetros relativos a la expansión poblacional, τ , θ_0 (correspondiente al inicio de la expansión) y θ_1 (correspondiente al final de la expansión). Este método busca aquellos valores de parámetros que minimicen la suma de las desviaciones cuadradas (SSD) entre la distribución mismatch observada y la esperada bajo el modelo de expansión súbita.

En segundo lugar, se reconstruyó la historia demográfica de cada grupo genético utilizando el programa LAMARC 2.1.5 (Kuhner, 2006). Este construye árboles de coalescencia utilizando el criterio de optimización de Máxima Verosimilitud, a partir de los cuales estima distintos parámetros poblacionales. La tasa de crecimiento g , así como el valor del parámetro θ , son estimados bajo el supuesto de un crecimiento exponencial que sigue la siguiente fórmula: $\theta_t = \theta_0 e^{-gt}$, donde θ_t es el valor del parámetro θ en el tiempo t , y θ_0 es el valor actual de θ . El tiempo del inicio de expansión se identificó en aquel momento en que θ_t equivale a 1% del valor de θ_0 (como lo recomiendan los autores del programa). Sobre la base de los parámetros

arrojados por los análisis anteriores, se estimó las fechas de los cambios demográficos en unidades de tiempos mutacionales.

Finalmente, la historia demográfica de las poblaciones también fue inferida mediante un análisis de Bayesian Skyline Plot (BSP) en el programa BEAST versión 1.7.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Este programa, utiliza Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), que eficientemente van muestreando variantes del generalized skyline plot para generar una distribución *a posteriori* del parámetro tamaño efectivo poblacional (N_e) a través del tiempo, y estimar el tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA) en las genealogías de coalescencia. Estas distribuciones generan intervalos de credibilidad a posteriori (95% HPD, Highest Posterior Density), representando la incerteza en el N_e y del tMRCA, (Drummond et al, 2005). Antes de realizar el análisis de Bayesian Skyline Plot, se estimó el mejor modelo de sustitución nucleotídica bajo un criterio de decisión bayesiana (BIC), en el programa jModelTest (Posada 2008).). Los supuestos que se asumieron para la generación de árboles de coalescencia fueron modelos de evolución molecular con reloj relajado. La generación de árboles con reloj relajado se realizó con distribución exponencial y una tasa de mutación de 2,8% por millón de años (Strecker et al 1996, Morales et al 2011). Estos análisis fueron realizados con cadenas de MCMC de 300000000 de iteraciones que fueron muestreando parámetros y árboles cada 1000 generaciones, descartando los primeros 100000 millones de iteraciones. Los resultados fueron visualizados y graficados en el programa Tracer versión 1.7 (Rambaut & Drummond, 2009).

Sobre la base de los parámetros arrojados por los análisis anteriores, se estimó las fechas de los cambios demográficos en unidades de tiempos mutacionales. A partir de estos datos y asumiendo una tasa de mutación de 2,8% del género *Cyprinodon* (Strecker et al 1996, Morales et al 2011) se calcularon los tamaños efectivo poblacional iniciales y finales los modelos demográficos de crecimiento instantáneo y exponencial.

2.2.3. Microsatélites

Se amplificaron 10 loci microsatélites inicialmente optimizados en *O. agassii* de Bolivia por Esquer et al (2011), para cada una de las localidades de las diferentes especies de *Orestias* del Altiplano suroeste (Tabla 4.1). La reacción de PCR se estandarizó en un volumen de 10 μ l que contenían: 2 μ l de Buffer de PCR 5X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 0,8 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l de BSA 0,1mg/ μ l, 0,5 μ l de cada partidor a 50 pm/ μ l, 0,8 μ l de cada dNTP 2,5 mM, 0,1 μ l Taq (Promega Inc.), 4,3 μ l de agua ultra pura y 1 μ l de 50 ng/ μ l de ADN.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: primera fase de denaturación 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos: 92 °C por 30 s, 30 s en la temperatura de annealing locus-especifica (T° a) (Tabla 4.1), una extensión en 72 °C por 1 min, y una fase final de extensión de 20 min a 72 °C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio para verificar una amplificación positiva. Los productos de amplificación fueron enviados a genotipificar a Macrogen Inc. El análisis de fragmentos se realizó en el software GENEMAPPER 3.0 (Applied

Biosystems) y se compararon los alelos de las especies chilenas con los controles bolivianos (Esquer et al 2011) para todos los loci.

Tabla 2.1. Características de los loci microsatélites utilizados en *Orestias* del Altiplano suroeste. Modificado de Esquer et al 2011. T^oa: temperatura de annealing.

Locus	Motivo repetición	Primers(5'-3')	Dye	T ^o a (°C)
A106	CA ₆₈	F: TGGCTGATGGTATTGGTTG R: ^a AGCACACCTTCACAGGATG	VIC	58
A116	CA ₅ GC ₁ CA ₆ CC ₁ CA ₁ 4	F: TCGCTACTTACTCCGACCTC R: AAATCACAATGGCTTTCTCTG	PET	54
B1	CT ₂ TT ₁ CT ₁₄	F: TACAAACACATCCATCTCAGTC R: AACACTCCTATCATCCATCATC	PET	58
B103	CT ₃ CCATCG ₁ CT ₁₄	F: TATTATCCACTCCTGGTCAGTC R: GTTGAAGCGTTTCCAAGAT	FAM	51
B104	CT ₂ CG ₁ CT _{4...CT} ₁₀	F: ACCGTAGTTGCCTGGTTACA R: AGGGTGCTGTCAGAGATGAG	VIC	63
C102	CCAT ₁₅	F: TTCCAAACCACATTTTAGATCC R: CAGCCTTTTGATTATGGAGGT	NED	62
C105	CCAT ₁ CCAA ₁ CCA T ₈	F: AGCAAGACCAGTTTGAAATCT R: GTTGCCCTGCGATGTAC	PET	58
D110	GATA ₂₆	F: ATCACAAGACGAGGTTCTCAC	FAM	58

2.2.3.1. Características de Microsatélites

Se revisaron los perfiles alélicos de cada uno de los loci mediante el programa Genemapper v.3.0. Posteriormente se revisó el exceso de homocigotos o heterocigotos para corregir alelos con grandes peaks y presencia de stutters que generan errores de lectura y detectar la presencia de alelos nulos para cada loci con el programa Micro-Checker (Microsatellite Data Checking Software) (Oosterhout et al 2004).

2.2.3.2. Análisis Genético poblacionales.

Para cada locus se calcularon las frecuencias alélicas, heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e) y heterocigocidad esperada corregida (H_b), en los software Genetix v. 4.05 (Belkhir et al 2004). Los valores de Fis por cada locus en cada localidad fueron calculados en Genetix v.4.05y se realizó un test exacto para cada locus en cada localidad en Genepop on the web (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

Para analizar el grado de estructuración genética entre especies se analizaron las diferencias de frecuencias alélicas, calculando los índices F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) entre pares de localidades. Para determinar la significancia de los F_{ST} se realizaron 10000 permutaciones en el programa Genetix 4.05. Para graficar las diferencias entre las poblaciones se realizó un Análisis de Componentes principales (PCA) en PCA-Gen V.1.2.1.

Posteriormente se realizó el análisis bayesiano para inferir el número de grupos genéticos (K) de los datos genotípicos individuales con el software STRUCTURE V.2.0 (Pritchard et al. 2000). Se realizaron 10 diferentes corridas quemando las primeras 10000, seguido por 500000 iteraciones MCMC; estos parámetros fueron calculados para cada valor de K, bajo el modelo de mezcla (Admixture model) y frecuencias alélicas correlacionadas entre grupos (clusters). El valor de Alpha, el grado de mezcla entre los K grupos, fue evaluado para cada grupo por separado. Se analizaron de 1 a 8 grupos y el valor de K fue escogido con base en el valor del logaritmo de la verosimilitud de los datos observados ($\ln P(D)$; the logarithm of the likelihood of observing the data) como una función de K. Además se calculó el ΔK con base en la tasa de cambio del logaritmo de la verosimilitud de los datos entre los sucesivos valores de K, obteniendo el valor más probable (Evanno et al 2005).

Para detectar los recientes cuellos de botellas demográficos de las localidades se utilizó el programa BOTTLENECK ver 1.2 (Piry et al. 1999). Este programa estima la heterocigocidad esperada al equilibrio de Wright-Fisher (H_{eq}) a partir del número de alelos observados (k) en el tamaño muestral (n) de cada localidad, bajo el modelo de equilibrio Mutación-Deriva. Esta distribución se obtiene mediante simulaciones de coalescencia de los loci bajo dos posibles modelos: el IAM (infinite allele model) y SMM (step mutation model) (Piry et al 1999). Esto permite el cálculo de la Heterocigocidad (exp) promedio la cual es comparada con la heterocigocidad observada (H_{obs}) para establecer si hay un déficit o exceso de heterocigocidad en cada locus. Asumiendo las condiciones del equilibrio mutación deriva se evaluó la significancia de la heterocigocidad en cada una de las localidades. Se utilizó el test

de Wilcoxon implementado en el programa para probar la concordancia de la heterocigocidad (H_e) esperada y la heterocigocidad esperada bajo equilibrio (H_{eq}) .

Se realizó un test de asignamiento de cada uno de los individuos en los diferentes grupos genéticos, mediante el programa GeneClass2 (Piry et al 2004). El objetivo general de los métodos de asignación genética es asignar o excluir poblaciones de referencia como posibles orígenes de los individuos sobre la base de genotipos multilocus.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. ADN mitocondrial: Región Control D-loop

Se obtuvieron en total 313 muestras provenientes de los 8 sitios de muestreo, los cuales abarcan la distribución geográfica de *Orestias*, en el Parque Nacional Lauca. Para los análisis con el marcador mitocondrial D-loop, se incluyeron poblaciones del Ancuta-Chureaque obteniendo 61 haplotipos de 313 secuencias D-loop. (Tabla 2.2).

Los índices descriptivos de diversidad genética de ADN mitocondrial (D-loop) para *Orestias* muestran un total de 89 sitios polimórficos (S), el número de haplotipos totales fue de $K=61$, la diversidad haplotípica total fue de $Hd=4.1530$ y el total de diferencias entre par de secuencias de $\Pi = 6,029$ (Tabla 2.2).

Para las localidades Parque Nacional Lauca, *O. piacotensis* en la laguna de Piacota presentó el menor número de haplotipos ($K=4$ con $N=46$), baja diversidad haplotípica ($Hd= 0.128$) y bajo número de diferencias entre pares de secuencias $\Pi= 0.174$. Por el contrario, *Orestias parinacotensis* en el bofedal de Parinacota muestra un alto número de haplotipos ($K=11$ con $N=29$), la mayor diversidad haplotípica ($Hd= 0,79$) y el más alto número de diferencias entre pares de secuencias ($\Pi=2.192$)

Para el caso de la localidad de Ancuta-Chureaque se observaron dos haplotipos ($H=2$ $N=43$) con valores bajos de diferencias entre pares de secuencias ($\Pi=0.173$) y diversidad haplotípica ($Hd=0.173$).

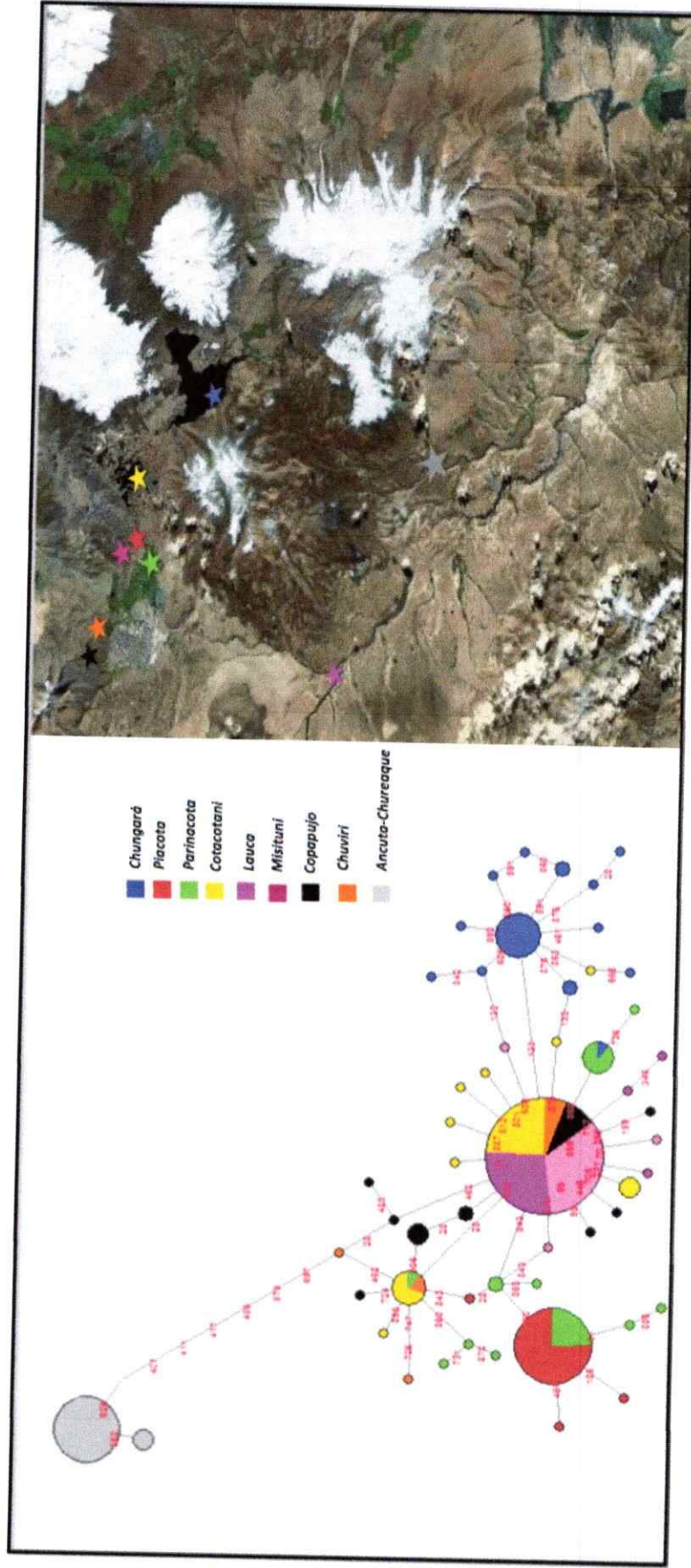
Tabla 2.2. Índices de diversidad genética de D-loop en distintas poblaciones de *Orestias*. N: tamaño de la muestras; S: Sitios polimórficos, K: Número de haplotipos, () : rarefacción del número de haplotipos, Hd: Diversidad haplotípica π : Diversidad nucleotídica, Π : Número promedio de diferencias entre pares de secuencias.

Localidades	N	S	K	Hd	π	Π
Chungará	32	13	13 (5.590 ± 1.294)	0.688	0.0013	1.159
Parinacota	29	10	11 (5.976 ± 1.129)	0.793	0.00246	2.192
Piacota	46	4	4 (1.717 ± 0.727)	0.128	0.0002	0.174
Cotacotani	44	9	9 (3.821± 1.100)	0.518	0.00075	0.668
Lauca	37	3	4 (1.89 ± 0.76)	0.158	0.00024	0.213
Misituni	48	6	7 (2.467± 0.924)	0.340	0.00041	0.368
Copapujo	11	4	4	0.600	0.00118	1.055
Chuviri	23	11	9 (5.552±1.0869)	0.755	0.00182	1.621
Ancuta-Chureaque	43	1	2 (1.708±0.454)	0.173	0.00019	0.173
Total	313	89	61	4.1530	0.00855	6,029

La red de haplotipos (median-joining) reveló una clara separación entre las localidades del Parque Nacional Lauca (PNL) y la de Ancuta-Chureaque, con 8 pasos mutacionales entre los dos haplogrupos. Ancuta se muestra como una unidad evolutiva diferente de las localidades del PNL, por lo tanto no se tomará en cuenta para los análisis siguientes. Con respecto a las localidades del PNL, la red de

haplotipos mostró una baja pero clara diferenciación de *O. piacotensis* (Piacota), *O. chungarensis* (Chungará) y *O. laucaensis* (Lauca, Misituni, Cotacotani), con señal de crecimiento poblacional sugerida por la presencia de un haplotipo central con ramificaciones cortas. Por el contrario, *O. parinacotensis*, (Parinacota) mostró una red de haplotipos mucho más dispersa (Figura 2.2).

Figura 2.2. Red de haplotipos para las poblaciones de *Orestias* del PNL y Ancuta-Chureaque. Cada círculo corresponde a un haplotipo distinto, el tamaño del círculo corresponde a su frecuencia y los colores corresponden a las localidades estudiadas. En el mapa se ubican con color las localidades estudiadas.



2.3.1.1. Análisis Poblacionales

Para evaluar la existencia de diferenciación genética significativa entre pares de poblaciones se realizó un test de Φ_{ST} pareado (parwise Φ_{ST}) (Tablas 2.3). Valores bajos y significativos se obtuvieron para la mayoría de las comparaciones entre localidades de *Orestias* del Parque Nacional Lauca. Las comparaciones incluyendo la localidad de Ancuta-Chureaque presentaron valores altos de Φ_{ST} ($\Phi_{ST} > 0,90$), siendo todos altamente significativos con todas las poblaciones el PNL.

Para las poblaciones de *Orestias laucaensis*, los valores de Φ_{ST} entre las lagunas de Cotacotani y las localidades Lauca ($\Phi_{ST}= 0,0897$) y Misituni ($\Phi_{ST}= 0,0541$) fueron bajos pero significativos, lo que evidenciaría la existencia de flujo génico restringido entre estas localidades.

En contraste, entre las poblaciones del río Lauca y Misituni el Φ_{ST} es bajo ($\Phi_{ST}= 0,0321$) pero no significativo, lo que sugiere la existencia de conectividad importante en el río. De manera similar no se observa diferencia significativa ($\Phi_{ST}= 0,0199$) entre las localidades de los Bofedales de Copapujo y Chuviri, permitiendo agrupar estas localidades en un solo grupo.

Tabla 2.3: Φ_{ST} entre las poblaciones de Orestias del Parque Nacional Lauca y Ancuta-Chureaque. Debajo de la diagonal se muestran los valores de Φ_{ST} obtenidos entre pares de poblaciones. Arriba de la diagonal se muestra el grado de significancia

Φ_{ST}	Chungará	Parinacota	Piacota	Cotacotani	Lauca	Misituni	Copapujo	Chuviri	Ancuta-Chureaque
Chungará		0.00000±0.0	0.00000±0.0	0.00000±0.0	0.00000±0.00.	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00
Parinacota	0.25408		0.00000±0.0	0.00000±0.0	0.00000±0.00.	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00
Piacota	0.62577	0.33100		0.00000±0.0	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00	0.00000±0.00
Cotacotani	0.40324	0.35221	0.68033		0.00624±0.0008	0.00000±0.00	0.02030±0.0015	0.89961±0.0029	0.00000±0.00
Lauca	0.58954	0.54745	0.85885	0.08971		0.09385±0.03	0.00000±0.00	0.01574±0.001	0.00000±0.00
Misituni	0.54539	0.50338	0.79978	0.05415	0.00321		0.00000±0.00	0.03089±0.0018	0.00000±0.00
Copapujo	0.28069	0.22533	0.62907	0.06261	0.22134	0.16570		0.20790±0.0041	0.00000±0.00
Chuviri	0.34673	0.28203	0.75362	-0.03682	0.16688	0.09135	0.01996		0.00000±0.00
Ancuta-Chureaque	0.59375	0.55295	0.85052	0.65328	0.83430	0.77627	0.59248	0.71139	

En la Tabla 2.4 se indica el porcentaje de variación *entre y dentro* de grupos para distintas agrupaciones, obtenido con el Análisis de Varianza Molecular Espacial, o SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VARIance; Dupanloup et al.2002). La variación *entre* grupos es máxima cuando la muestra se divide se divide en 4 grupos (59,92%), y la variación *dentro* de grupos a la que corresponde este agrupamiento es baja (2,14%), aunque significativa. Los 4 grupos genéticos en el Parque Nacional Lauca son: Grupo 1: Chungará; Grupo 2: Parinacota; Grupo 3: Piacota y Grupo 4: Lauca, Misituni, Cotacotani Copapujo y Chuviri. (Tabla 2.4).

*Tabla 2.4. Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA) de D-loop en distintos grupos geográficos. 1=Chungará, 2=Parinacota, 3=Piacota, 4=Cotacotani,, 5=Lauca, 6=Misituni, 7= Copapujo, 8= Chuviri. *P< 0,05. **P<0.01. *** P<0.0001*

Grupos (Localidades)	% Varianza total Entre grupos	% Varianza total Entre poblaciones dentro de grupos
2 grupos 3,(1+2+4+5+6+7+8)	51.39	17.68***
3 grupos 1,3,(2+4+5+6+7+8)	54.49*	10.64***
4 grupos: 1,2,3,(4+5+6+7+8)	59.92**	2.14***
5 grupos 1,2,3,(5+6+7),8	57.65***	1.25***

Esta división es congruente a lo ya observado en la red de haplotipos (Figuras 2.2) y con los valores de F_{ST} (Tabla 2.3). Cabe destacar que mediante el método de SAMOVA, el agrupamiento significativo arrojado por el análisis coincide con el agrupamiento de las especies nominales descritas. En este esquema, los especímenes colectados en Copapujo y Chuviri, los cuales no han sido asignados a una de las especies descritas, se asocian con *O. laucaensis*.

Mediante el Análisis de Interpolación de la Forma del Paisaje genético de las poblaciones del Parque Nacional Lauca, se exploró la distribución de la diversidad genética de las poblaciones (Figura 2.3). Se observa un primer punto máximo que separa a la subcuenca Chungará–Cotacotani del otro grupo de localidades del Lauca. Las localidades de Parinacota y Piacota muestran una pequeña caída del plano que indica pocas diferencias entre ellas. Se observa un punto máximo que separa Lauca Chuviri y Copapujo de las demás localidades y Misituni se ubica más distante en el espacio pero sin puntos altos de diferenciación con las localidades del Lauca.

2.3.1.2. Análisis demográfico

Para el índice D de Tajima, el grupo de Parinacota mostró valores negativos pero no significativos. Los demás grupos mostraron valores negativos y significativos. Para el índice de Fu todos los grupos mostraron valores negativos y significativos (Tabla 2.5).

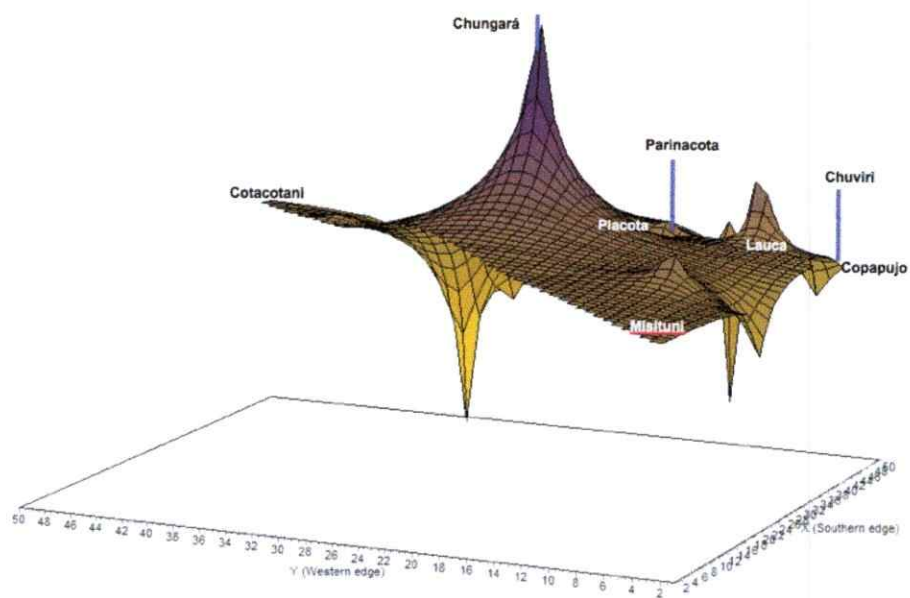


Figura 2.3. Interpolación de la forma del paisaje en relación a la diversidad genética de ADNmt.

Tabla 2.5: Índices demográficos Tajima's D, F_s de F_u , de los diferentes grupos genéticos de *Orestias* en el Parque Nacional Lauca. * $P < 0,05$ *** $P < 0.0001$. NS: No significativo. 1: Chungará. 2: Parinacota. 3: Piacota. 4: Lauca-Misituni-Chuviri-Copapujo

Grupos	Tajima's D	P	F_s (F_u)	P
1	-2.0883	*	-10.899	***
2	-0.44395	NS	-3.898	***
3	-1.86964	*	-3.404	***
4	-2.49612	***	-37.820	***

Por un lado, la forma de la distribución mismatch del grupo de Parinacota fue multimodal (Figura 2.4a), lo que podría indicar que este grupo habría alcanzado el equilibrio deriva-mutación. Por otro lado, las localidades de Chungará, Piacota y el grupo de Lauca (Lauca + Misituni + Cotacotani + Chuviri + Copapujo) muestran una distribución unimodal (Figura 2.4), lo que podría indicar la existencia de crecimiento demográfico pasado. Para Chungará los parámetros estimados bajo el modelo de crecimiento instantáneo ($\tau = 1.159$, $u = 2.8\%$), indican que la expansión habría ocurrido 23000 años atrás, con valores de $\theta = 0.00$ que revelaron el reducido tamaño efectivo inicial de la localidad (Tabla 2.6). Los parámetros del modelo para las localidades de Piacota y del grupo Lauca (Lauca-Misituni-Cotacotani-Copapujo-Chuviri) mostraron tamaños efectivos iniciales entre los 5000 y 7000 individuos respectivamente (Tabla 2.6, Figura 2.5).

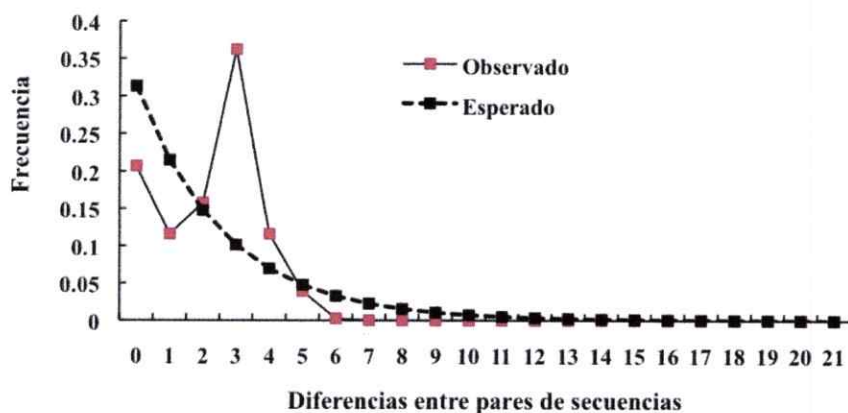


Figura 2.4. Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para Parinacota con distribución bimodal. El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia bajo los modelos de Rogers & Harpending (1992)(R&H).

Tabla 2.6. *Calculo del tamaño efectivo poblacional y el tiempo de expansión bajo los modelos de crecimiento instantáneo y exponencial de los diferentes grupos genéticos de Orestias en el PNL. Ne_i : Tamaño efectivo poblacional inicial. Ne_f : Tamaño efectivo poblacional final.*

Modelo de crecimiento instantáneo Rogers & Harpending (1992) DnaSP v.5				
Grupos	$\tau = 2ut$	Ne_i	Ne_f	Tiempo (años)
Chungará	1.159	0.00	20064205	23254.
Piacota	0.000	5176	20064205	0.00
Lauca-grupo	0.316	7203	20064205	6340.
Modelo de expansión súbita Shneider y Excoffier (1999).				
ARLEQUIN v.3.5				
Grupos	$\tau = 2ut$	Ne_i	Ne_f	Tiempo (años)
Chungará	1.67	0	193840.	33507
Piacota	3.00	5176.	2668.	60192
Lauca-grupo	0.166	12800.	24739.	3330.
Modelo de coalescencia por verosimilitud <u>Kuhner, M. K., 2006. LAMARC</u>				
v.2.1.8				
Grupos	G	Ne_i	Ne_f	Tiempo
Chungará	9787.749	64236	5910617	16500
Piacota	17585.06	1517	127535	11000
Lauca-grupo	14701.86	51294	4749321	11000
Modelo Bayesiano de coalescencia. Drummond et al 2011				
BEAST v 1.7				
Grupos		Ne_i	Ne_f	Tiempo
Chungará		100000	1000000	36000
Piacota		10000	500000	5000
Lauca-grupo		200000	1000000	10000

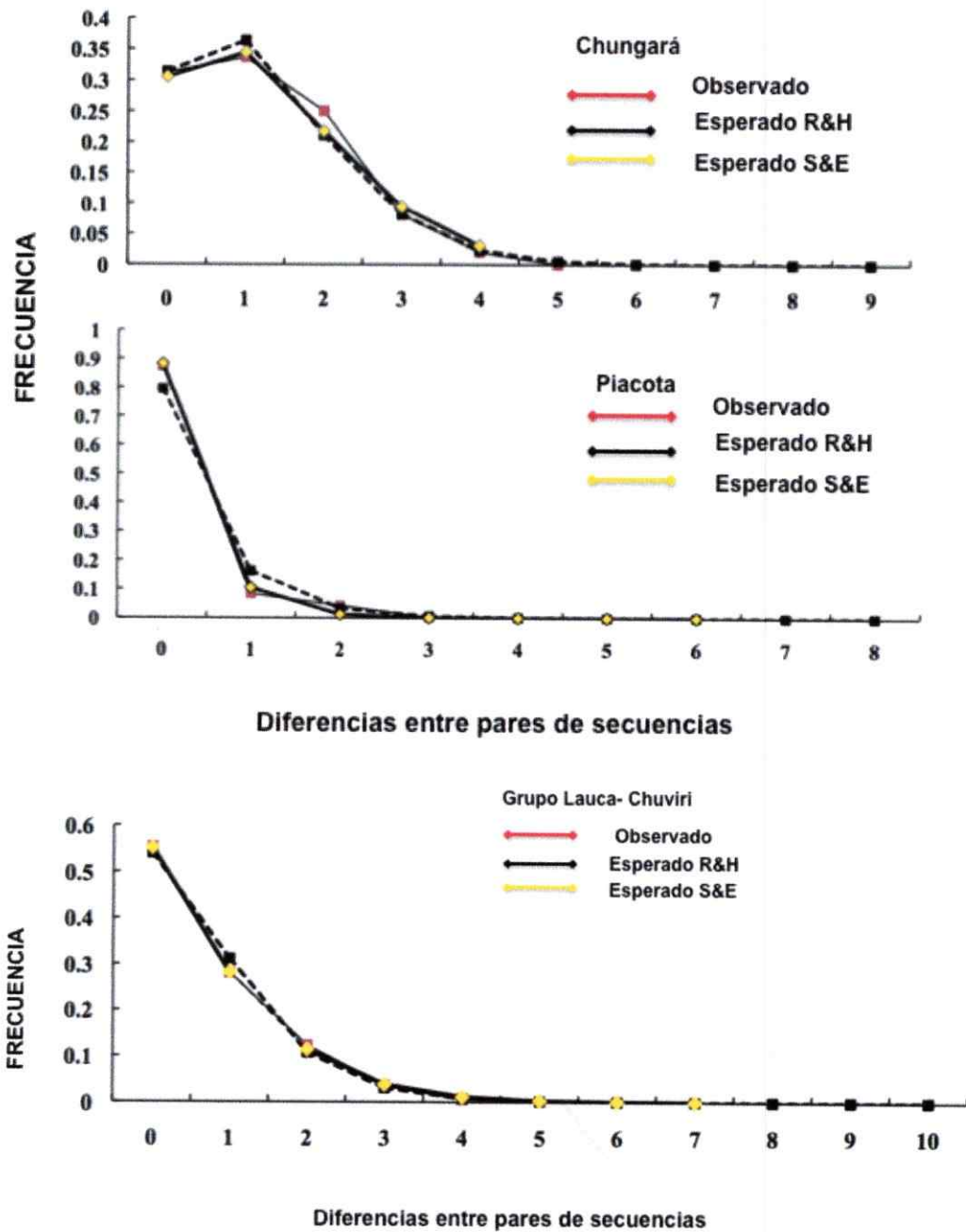
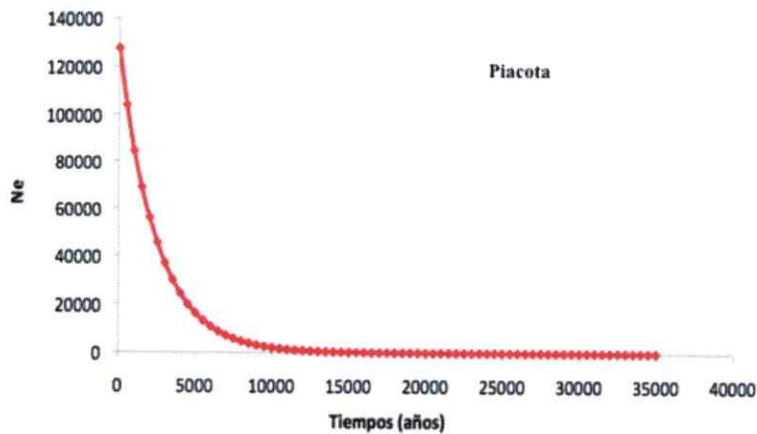
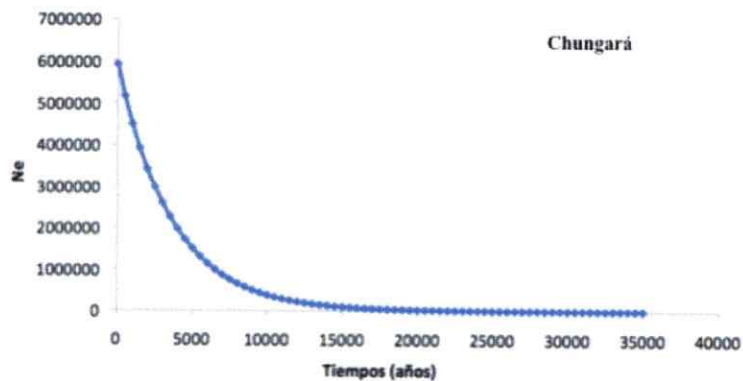


Figura 2.5. Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para los grupos genéticos con distribución unimodal. El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia bajo los modelos de Rogers & Harpending (1992)(R&H) (puntos negros) y Shneider & Excoffier (1999)(S&E) (puntos amarillos).

Asimismo, considerando un crecimiento exponencial, los valores de tasa de crecimiento g y tamaño poblacional obtenidos sobre la base del análisis de Máxima Verosimilitud (Tabla 2.6; Figura 2.6), indican nuevamente expansión en las localidades de Chungará, Piacota y el grupo Lauca. El crecimiento de estas localidades se habría iniciado hace aproximadamente 0.30 tiempos mutacionales. El tamaño efectivo (N_e) estimado para el Lago Chungará fue de aproximadamente 600000 individuos hace 16000 años. Hace 11000 mil años la localidad de Piacota habría iniciado su expansión con un tamaño efectivo de 1500 individuos y Lauca con un tamaño efectivo de aproximadamente 51000 individuos (Tabla 2.6).



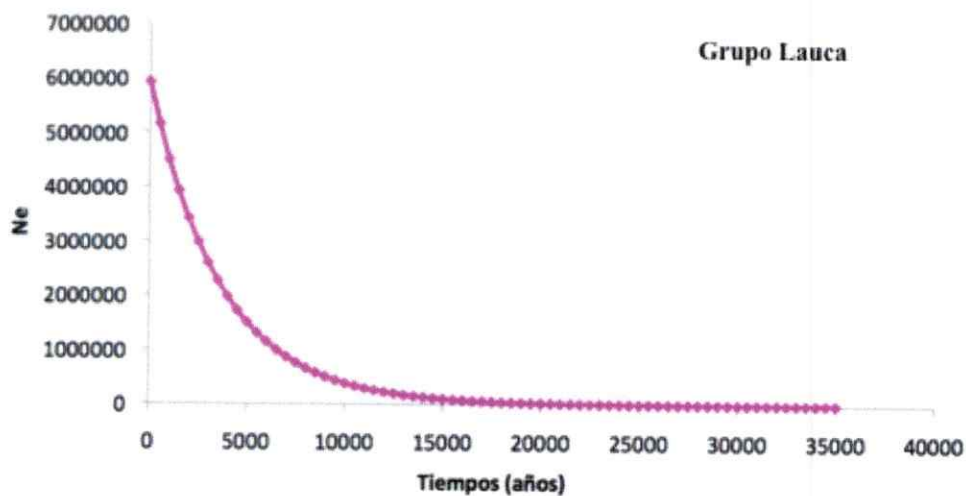


Figura 2.6. Variación del tamaño efectivo ($N_e = \theta/2$) de los grupos genéticos Chungará, Piacota, y Grupo Lauca en función del tiempo, estimada por método de Máxima Verosimilitud. El eje Y indica el tamaño efectivo y el eje X el tiempo, en años.

Los análisis de Bayesian skyline plots de cada uno de los grupos genéticos mostraron también patrones de crecimiento poblacionales así como diferencias en los tiempos de expansión. En Chungará el tiempo de expansión comenzó aproximadamente hace 46000 años atrás (HPD 95%, 36670– 55276 años) del ancestro común más reciente (TMRCA) (Tabla 2.7). El tiempo de expansión del TMRCA para Piacota fue de aproximadamente de 6800 años (HPD 95 % 5451 – 8230 años), y para el grupo de Lauca el tiempo del TMRCA fue de 26000 años (Tabla 2.7) (Fig. 2.6 a, b, c). El tamaño efectivo (N_e) estimado para el Lago Chungará fue de aproximadamente 100.000 individuos hace 36000 años. La localidad de Piacota habría iniciado su expansión con un tamaño efectivo de 1000 individuos hace aproximadamente 5000 años, y el grupo de Lauca mostró un inicio de su expansión con un tamaño efectivo

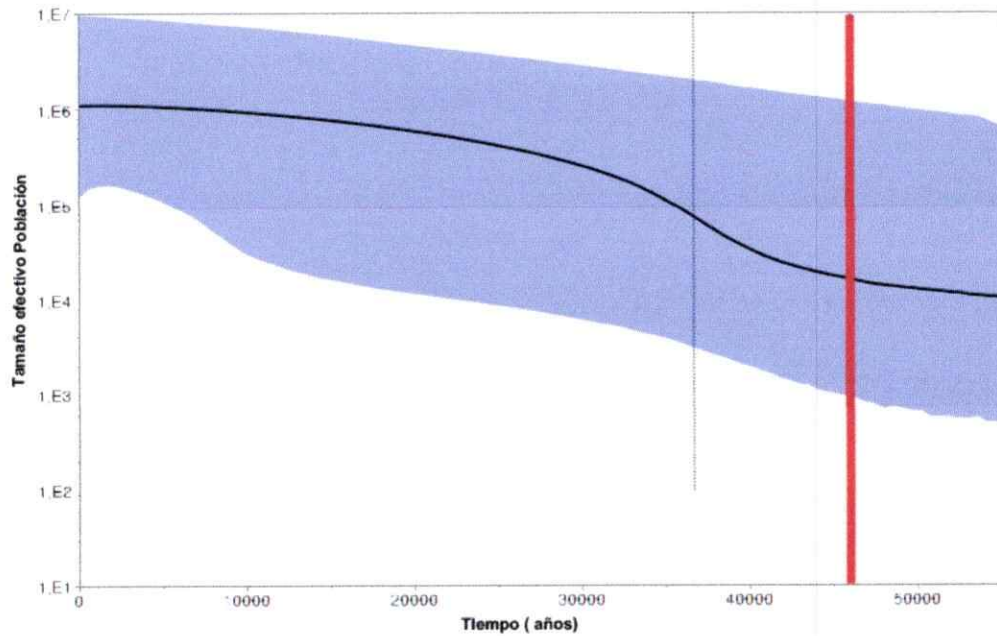
de aproximadamente 200000 individuos hace aproximadamente 10000 años (Tabla 2.6).

Tabla 2.7. Tiempo del ancestro común más reciente TMRCA mediante análisis de Bayesian skyline para los tres grupos genéticos con señal de crecimiento. 1: Chungará. 2: Lauca+Misituni+Chuviri+Copapujo. 3: Piacota

Grupo Genético	TMRCA(años) promedio	95% HPD lower	95% HPD upper
1	46008	36670	55276
2	26465	21094,	31816
3	6858	5451,	8230



A



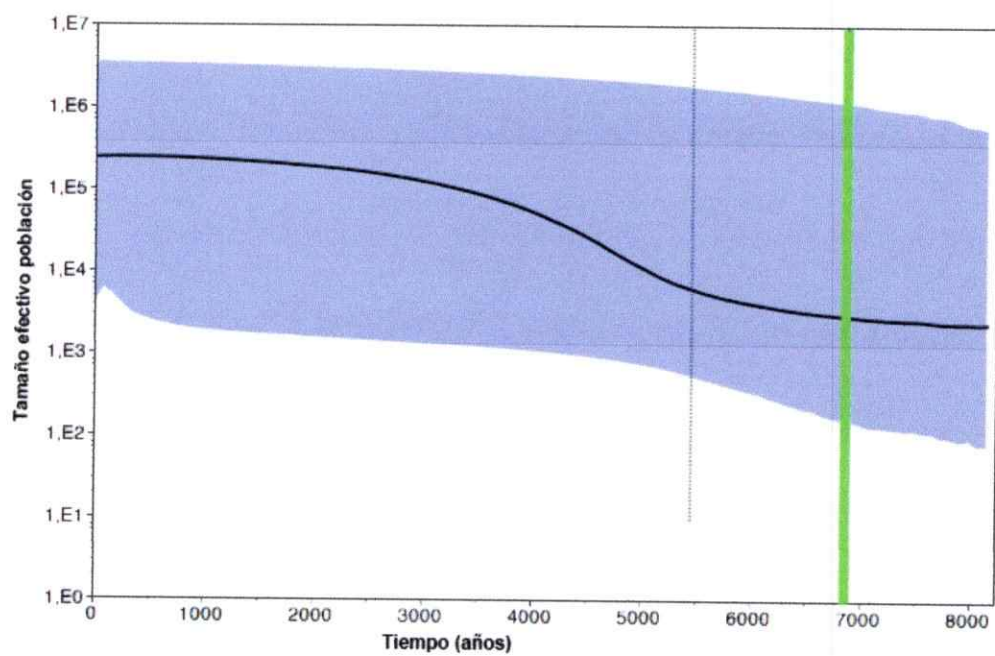
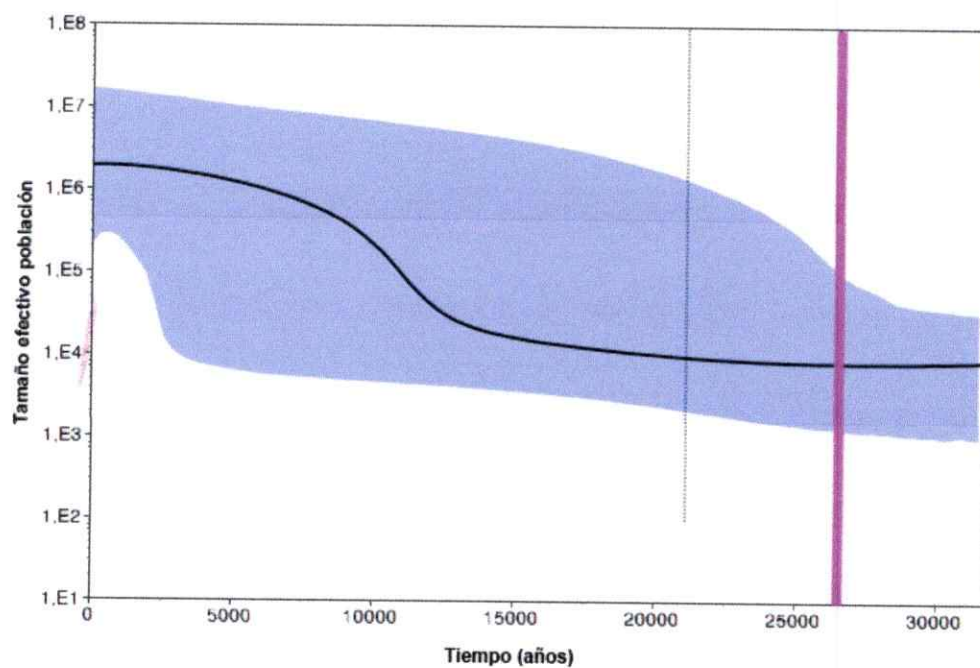
B**C**

Figura 2.7. Bayesian skyline plot. Reconstrucción del TMRCA de los grupos genéticos Chungará (A), Piacota (B) y Lauca-Misituni-Chuviri-Copapujo (C).

2.3.2. Microsatélites

Se obtuvieron genotipos multilocus en 261 individuos del total de muestras de *Orestias*, para 8 loci microsatélites de los 10 analizados. Los Loci A9a y C101 presentaron genotipificaciones poco confiables sin concordancias entre amplificaciones independientes, por lo que ninguno de los dos loci fue incluido en el análisis. Para los 8 loci microsatélites analizados, el tamaño de los alelos coincidieron con los asignados para las especies de *Orestias luteus* y *O. agassii* de Bolivia y Perú (Esquer et al 2011).

Los índices descriptivos de diversidad genética de los 8 loci microsatélites para *Orestias*, en cada localidad, se muestran en la Tabla 2.7. Para el locus C102 el número de alelos fue bajo para todas las localidades (C102: 2 a 3 alelos). El locus B104 mostró ser monomórfico (1 alelo) para las localidades de Chuviri, Copapujo y Misituni. Los loci A116, D110 y A106 fueron los que presentaron mayor número de alelos (14,15 y 15 respectivamente (Tabla 2.7). Los valores de F_{IS} variaron entre loci y entre las localidades. Las localidades correspondientes al Lauca (Cotacotani, Lauca y Misituni) mostraron desviaciones del equilibrio significativas con los seis de los ocho loci analizados (Tabla 2.8). Piacota mostró desviaciones del equilibrio con los loci A116, C102, D110 y B103. Para el resto de localidades los valores no fueron significativos.

Tabla 2.8. Medidas de diversidad genética de 8 loci microsatélites en las distintas localidades de Orestias del PNL. N= Número de individuos analizados por locus No. Alelos: Número de alelos por locus L1: Chungará. L2: Chuviri. L3: Copapujo. L4: Cotacotani. L5: Lauca. L6: Misituni. L7 : Parinacota. L8: Piacota. Hexp: Heterocigocidad F_{IS} : Índice de endogamia por permutación P: probabilidad **: <0.05. P-val: valor de P del test exacto de Equilibrio Hardy-Weinberg por iteraciones.

Locus		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
C105	N	24	11	8	26	34	42	27	40
	No Alelos	7	6	4	5	6	8	5	3
	Hexp	0,548	0,752	0,555	0,588	0,767	0,794	0,499	0,359
	F_{IS}	-0.044	0.067	0.382	0.298	0.209	0.202	0.053	0.037
	P<0.05	NS	NS	NS	**	**	**	ns	NS
	P-val	0.032	1.000	0.189	0.662	0.004	0.197	0.012	0.351
A116	N	24	14	19	41	28	40	34	48
	No Alelos	8	8	8	14	7	8	10	8
	Hexp	0,767	0,702	0,824	0,786	0,723	0,781	0,696	0,775
	F_{IS}	-0.119	-0.083	-0.123	-0.042	0.275	0.020	0.211	-0.038
	P	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	NS
	P-val	0.032	1.000	0.189	0.662	0.004	0.197	0.012	0.351
B1	N	21	14	17	35	25	32	34	29
	No Alelos	6	4	3	2	4	3	5	5
	Hexp	0,726	0,625	0,602	0,337	0,670	0,598	0,657	0,681
	F_{IS}	-0.224	0.347	-0.045	0.081	-0.296	0.283	0.075	-0.046
	P	NS	**	NS	NS	**	**	NS	NS
	P-val	0.189	0.064	0.744	0.633	0.082	0.048	0.659	0.838

B104	N	23	14	19	45	33	42	33	35
	No Alelos	5	1	1	4	1	4	5	3
	Hexp	0,513	0,000	0,000	0,147	0,000	0,092	0,475	0,056
	F _{IS}	0.006	Na	na	0.105	na	0.236	-0.133	-0.007
	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	P-val	0.0014	Na	na	0.2268	na	0.0688	0.2321	1
D110	N	24	14	19	42	30	37	32	42
	No Alelos	13	4	6	15	13	14	16	6
	Hexp	0,883	0,311	0,438	0,641	0,884	0,862	0,803	0,675
	F _{IS}	-0.112	0.119	-0.055	0.305	-0.038	0.073	0.159	-0.223
	P	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	**
	P-val	0.144	0.051	0.272	0.000	0.834	0.124	0.003	0.480
C102	N	22	12	16	37	31	41	32	30
	No Alelos	2	2	2	3	2	2	2	3
	Hexp	0,087	0,278	0,219	0,385	0,225	0,267	0,285	0,516
	F _{IS}	1.000	-0.158	-0.111	0.170	-0.132	0.007	0.464	0.938
	P	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**
	P-val	0.025	1.000	1.000	0.129	1.000	1.000	0.028	0.000
B103	N	24	13	15	42	28	42	25	48
	No Alelos	2	3	2	4	2	3	5	4
	Hexp	0,469	0,145	0,320	0,323	0,035	0,092	0,318	0,061
	F _{IS}	0.132	-0.023	-0.217	-0.093	0.000	-0.028	0.138	0.329
	P	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**
	P-val	0.667	1.000	1.000	0.531		1.000	0.091	0.035
A106	N	22	10	8	41	29	38	32	45
	No Alelos	9	7	8	15	7	11	11	8
	Hexp	0,801	0,795	0,797	0,875	0,797	0,818	0,829	0,658

	F_{IS}	0,058	-0,208	-0,032	-0,019	-0,107	-0,016	-0,002	-0,272
	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
	P-val	0,110	0,095	0,959	0,050	0,445	0,337	0,326	0,001
Heterocigocidad promedio		0,634	0,453	0,496	0,467	0,520	0,493	0,521	0,462

Se evaluó la diferenciación genética entre pares de poblaciones de *Orestias*, mediante un test de F_{ST} pareado. Todas las comparaciones entre localidades fueron significativas con las excepciones de Chuviri/Copapujo y Lauca/Misituni. En general, los niveles de significancia fueron robustos a la corrección de Bonferroni, salvo para las comparaciones entre Cotacotani con Chuviri y Copapujo. (Tabla 2.9).

*Tabla 2.9. Medidas de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintas poblaciones de Orestias basado en la información de 8 loci microsatélites. Arriba de la diagonal se muestra la significancia ***= $P<0,0001$. **= $P<0,01$. NS= no significativo*

<i>FST</i>	Chungará	Chuviri	Copapujo	Cotacotani	Lauca	Misituni	Parinacota	Piacota
Chungará		***	***	***	***	***	***	***
Chuviri	0.15434		NS	NS	***	***	***	***
Copapujo	0.15285	0.00826		**	***	***	***	***
Cotacotani	0.16906	0.0326	0.02221		***	***	***	***
Lauca	0.09261	0.0975	0.11751	0.12753		NS	***	***
Misituni	0.10249	0.078	0.08711	0.08042	0.00911		***	***
Parinacota	0.11766	0.07297	0.10694	0.08887	0.08734	0.07164		***
Piacota	0.22205	0.21408	0.25058	0.20922	0.13100	0.12813	0.09148	

Se realizó una exploración visual graficando los componentes principales (PCA) de

los índices F_{ST} . Se observa que las localidades de Lauca y Misituni se agrupan entre ellas así como las localidades de Copapujo, Chuviri y Cotacotani. Mientras que las localidades de Chungará, Piacota y Parinacota están más separadas del resto de las localidades, similar a los resultados de los F_{ST} pareados (Figura 2.8).

En el análisis de estructura poblacional el mejor valor de ΔK fue de 3 grupos o clusters ($\Delta K = 3$), sin embargo, el valor más bajo de LnP fue de 4 grupos o clusters. Con base en LnP , se determinó la estructura poblacional en 4 grupos correspondientes a Chungará (rojo), Piacota (azul), Lauca + Misituni (verde), Chuviri+Copapujo+ Cotacotani (amarillo) y Parinacota (varios colores) (Figura 2.9. Figura 2.10 a, b). Chungará y Piacota son los grupos mejor definidos en el análisis. Las localidades del río Lauca (Lauca + Misituni) se agrupan en un cluster. Cotacotani muestra un agrupamiento con Chuviri y Copapujo similar a los resultados de los F_{ST} y Parinacota muestra individuos de los diferentes grupos (Tabla 2.9).

Los análisis de cuellos de botella mediante el test de Wilconxon bajo el modelo IAM y el modelo SMM revelaron un déficit de heterocigotos en todas las localidades. Lo que muestra una señal de crecimiento poblacional reciente. (Tabla 2.10.).

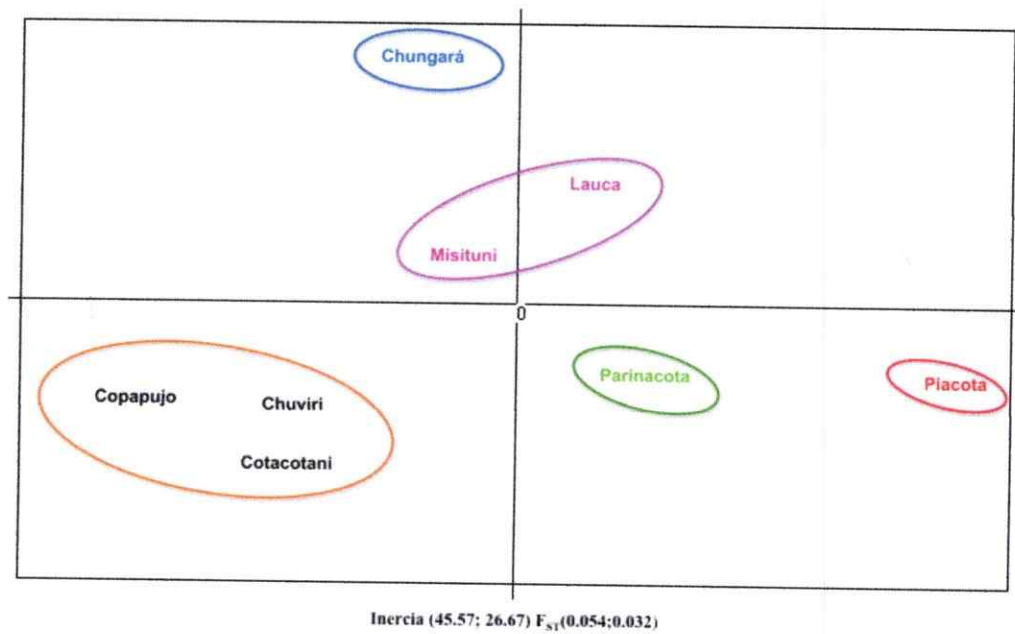


Figura 2.9. Análisis de componentes principales (PCA) para las distintas poblaciones de *Orestias* con 8 loci microsatélites.

Figura 2.9. Resultados de estructuración genética y asignación a clusters del programa Structure basado en la información de 8 loci microsatélites. Cada línea vertical representa un individuo. Los individuos están agrupados de acuerdo a su localización de origen. Los clusters genéticos están codificados con 5 colores distintos y la fracción de color para cada individuo representa la probabilidad de asignación al cluster de ese color.

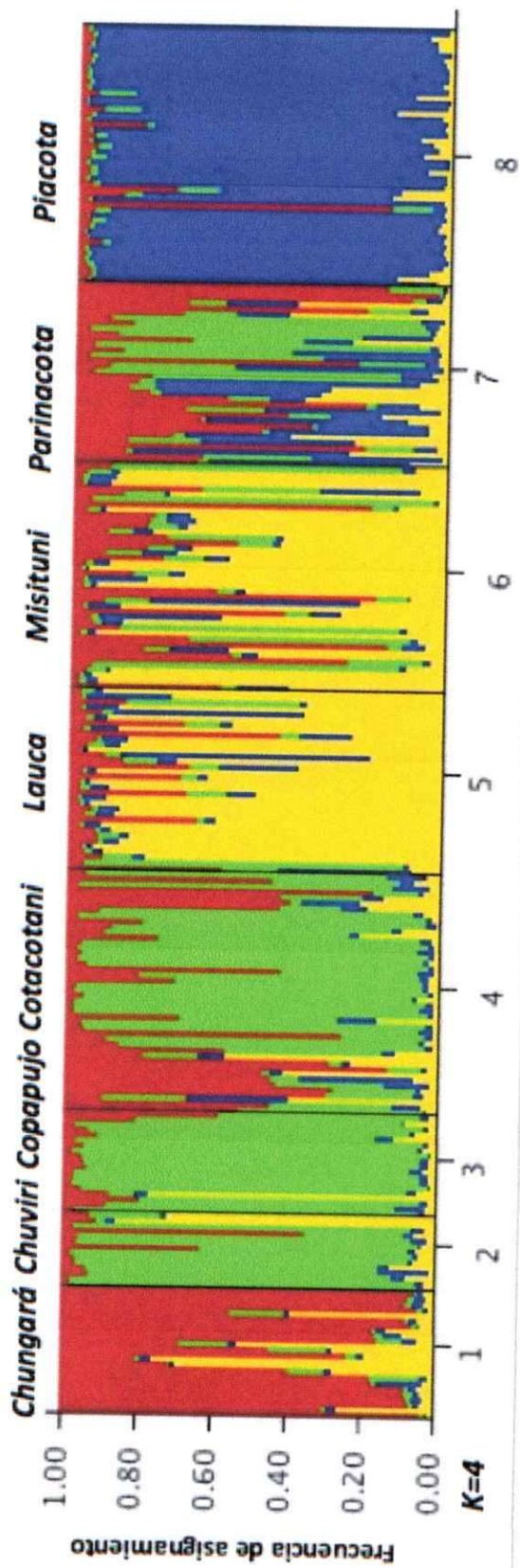
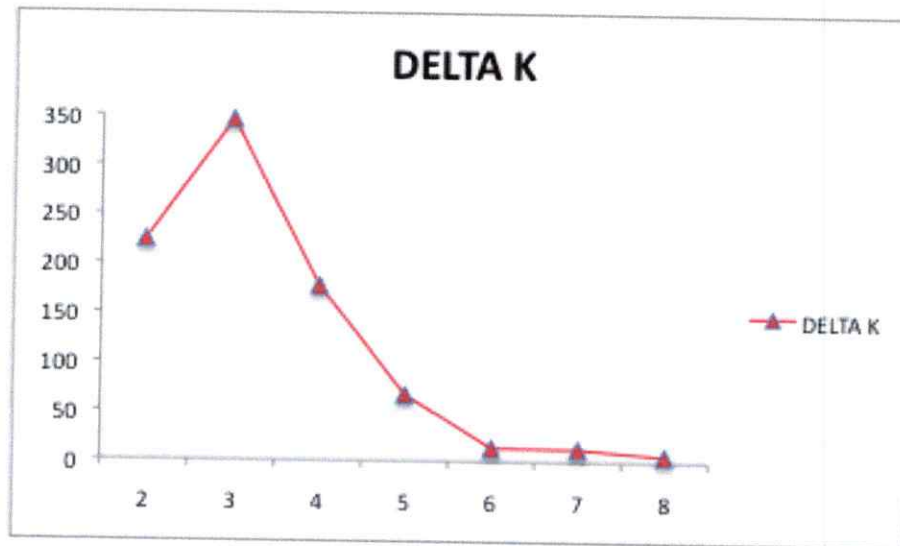


Figura 2.10 a y b Resultados de $\Delta K(a)$ y $\ln(P)(b)$ de los asignamientos de clusters en el programa Structure basado en la información de 8 loci microsatélites.

A



B

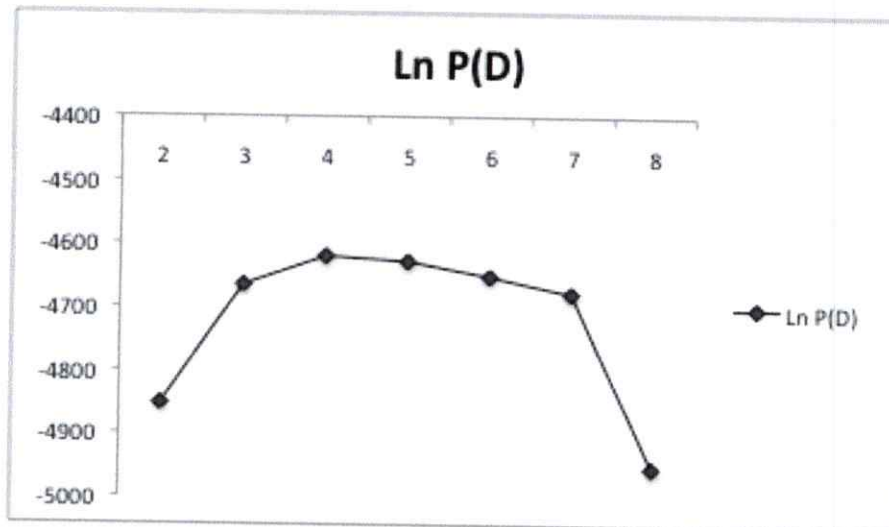


Tabla 2.10. Resultados de los análisis de cuello de botella de las diferentes localidades y los ocho loci microsatélites. Se muestra el valor de probabilidad de los Modelos: IAM (infinite allele model) y SMM (step mutation model).

	I.A.M	S.M.M
Chungará	0.48845	0.07765
Chuviri	0.63191	0.33289
Copapujo	0.41902	0.34949
Cotacotani	0.51002	0.01211
Lauca	0.09600	0.62512
Misituni	0.22149	0.23217
Parinacota	0.23248	0.01201
Piacota	0.49707	0.05292

El análisis discriminante de los diferentes grupos genéticos de Orestias con base en los marcadores microsatélites, mostraron un alto porcentaje de correcta clasificación de los individuos. (Tabla 2.11)

Tabla 2.11. Resultados del análisis discriminante de diferentes grupos genéticos de Orestias. Negrita: porcentaje de asignación en cada especie (); Número de individuos clasificados

	N	GRUPOS GENÉTICOS			
		Chungará	Parinacota	Piacota	Lauca-Chuviri
Chungará	24	96% (23)	0	0	4%(1)
Parinacota	34	3%(1)	65%(22)	6%(2)	26%(9)
Piacota	48	0%	2%(1)	96% (46)	2%(1)
Lauca-Chuviri	158	1%(1)	1%(1)	5%(8)	94%(148)

2.4. DISCUSIÓN

Los procesos de especiación están relacionados con el aumento de la diferenciación genética entre las poblaciones, que conllevaría a una reducción del flujo génico (Mayr 1963; Gavrilets 2004). En Alopatria, los eventos vicariantes como por ejemplo la formación de barreras físicas favorecerían la estructuración poblacional y con el tiempo la divergencia (Nossil 2008). En los sistemas acuáticos del Parque Nacional Lauca (PNL) como son los lagos, lagunas, bofedales y ríos la separación de las poblaciones son producto de separación de ambientes por procesos volcánicos y climáticos, que a nivel genético se evidenció con los índices de diferenciación genética entre las localidades, los cuales fueron altos, significativos y similares entre los marcadores mitocondriales y microsátélites.

En el río Lauca se tomaron cuatro puntos de muestreo, dos a lo largo del río (Lauca y Misituni), un punto que incluye las lagunas de Cotacotani y un punto que corresponde a un afluente del mismo río (Ancuta-Chureaque). Los índices de diferenciación Φ_{ST} y F_{ST} entre las localidades del río (Lauca y Misituni) y la localidad de Cotacotani mostraron valores bajos, lo que sugiere la existencia de una conexión de la laguna con el río, conformando así el grupo genético Lauca (Lauca-Cotacotani-Misituni). De acuerdo a Risarcher et al 1999, estas poblaciones estarían conectadas físicamente por un exutorio entre las lagunas de Cotacotani y el río Lauca, permitiendo la migración entre los dos sistemas (Peña 2010).

La localidad de Ancuta-Chureaque, reveló una clara divergencia de las localidades del Lauca con ocho pasos mutacionales, lo que podría plantearse como una unidad evolutiva diferente. Esta alta diferencia podría explicarse por que la localidad hace parte del río Chusjavidá, el cual se une al río Lauca cuando éste se desvía hacia Bolivia. Al analizar la localidad de Ancuta-Chureaque, aunque mostró solo dos haplotipos, presentó relación con las localidades pertenecientes a Bolivia (Río Mogachi y Laguna Macaya), que se observa como una red dispersa (Figura 2.11). En este caso, la colonización de la localidad de Ancuta-Chureaque habría sucedido desde los ríos Bolivianos hacia el oeste del altiplano. Estas poblaciones habrían permanecido aisladas reduciendo su diversidad.

Dentro de las localidades del PNL, los índices Φ_{ST} , F_{ST} y las inferencias demográficas realizadas con diferentes aproximaciones (Tabla 2.6) muestran la existencia de varios grupos genéticos, los cuales experimentaron cambios en su tamaño poblacional y que corresponden a las localidades de Chungará, Piacota, Parinacota y Lauca (Lauca, Misituni, Copapujo-Chuviri). La diferenciación de estos grupos coincide con los eventos vicariantes que formaron los sistemas acuáticos producto de las variaciones del río Lauca, los cambios climáticos y el colapso volcánico del Parinacota que originó el lago Chungará, las lagunas de Cotacotani y la laguna de Piacota (Sáez et al 2007, Giralt et al 2008).

Las localidades de Chungará y Piacota muestran mayor diferenciación con respecto a las otras localidades del PNL. Es importante destacar que el Lago Chungará se caracteriza por ser un sistema aislado dentro del PNL, que fue producto de la

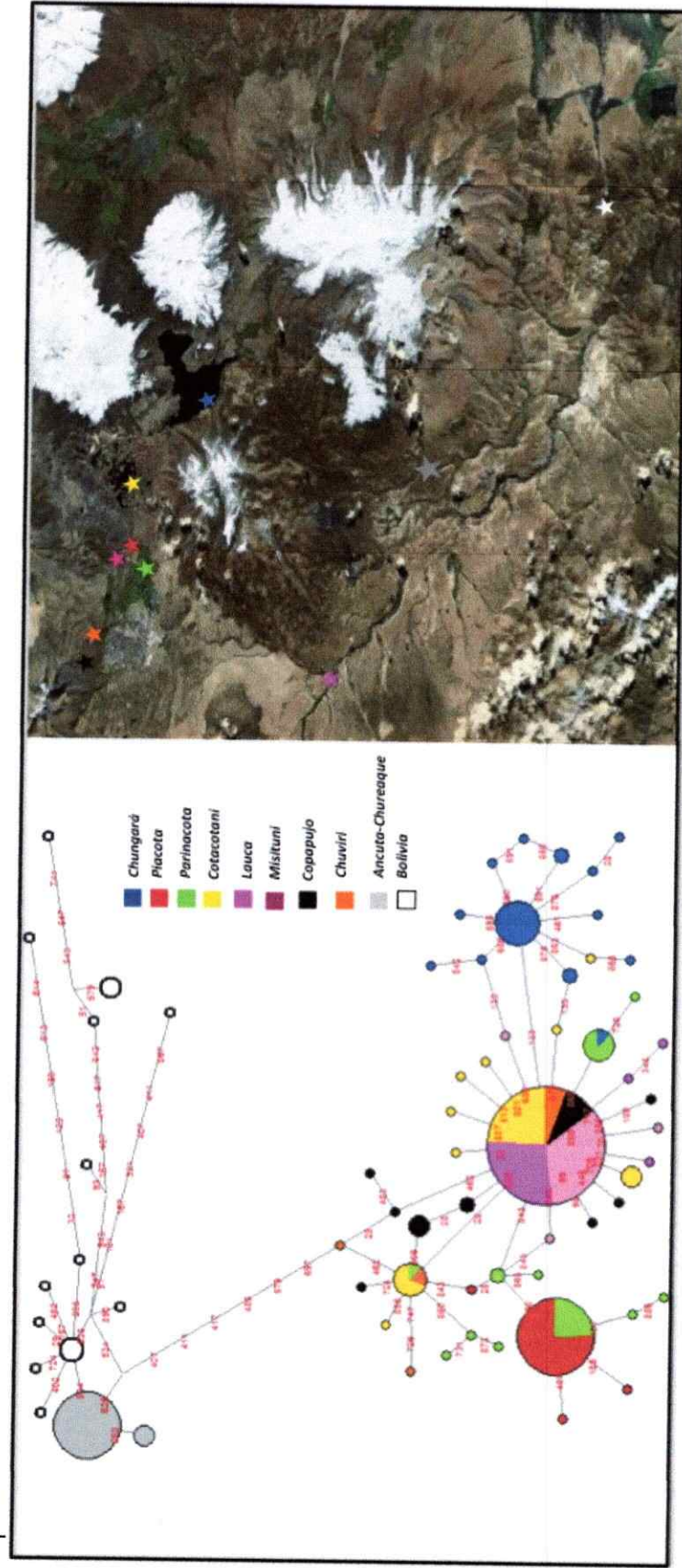
fragmentación del hábitat con el colapso volcánico del Parinacota hace 12500 años, separando la cuenca del Lauca de la del Chungará (Sáez et al, 2007, Moreno et al 2009), esto causó una drástica pérdida de haplotipos y alelos en las poblaciones. Al mantenerse aisladas las cuencas, la diferenciación genética entre ellas aumentó produciendo nuevos haplotipos, lo que se evidencia en la alta diversidad genética de Chungará con respecto a las otras localidades.

En la localidad de Chungará, los modelos demográficos no son congruentes con los tiempos de expansión. Con una tasa de divergencia de 2,8% (Strecker et al., 1996, Morales et al, 2011) para el D-loop, específica para el género *Cyprinodon* que pertenece a la misma familia Ciprinodontidae que *Orestias*, se obtuvo un tiempo de expansión fue entre los 30000- 20000 años atrás para Chungará que corresponde a este crecimiento poblacional más antiguo.

En los sistemas acuáticos del Parque Nacional Lauca (PNL), las barreras físicas fueron producto del colapso volcánico del Parinacota alrededor de 12.500 años atrás, variaciones climáticas como el aumento de la aridez y alta actividad volcánica entre los 8000-4000 años atrás (Clavero et al 2002; Clavero et al 2004 Sáez et al 2007, Giralt et al 2008). Sin embargo, las fechas de inicio de expansión de su población (30000 - 10000 y 3000 años AP), calculadas en base a la tasa de 2.8% cambios/sitio/millón de años, claramente sobreestiman la fecha de dicho suceso. Esta incongruencia podría deberse a que la tasa de sustitución utilizada no es adecuada para ser aplicada en el estudio de eventos tan recientes como los eventos vicariantes como las catástrofes volcánicas y variaciones climáticas en PNL, debido a la

dependencia temporal que han mostrado las tasas de sustitución (Ho et al 2005, Ho & Larson 2006, Ho et al 2007, González-Wevar et al 2011). Para muchos grupos ya se ha demostrado que, a mayor antigüedad del evento evolutivo, menor es el valor de la tasa calibrada (Ho et al 2005; Burrige et al 2008). Por lo tanto, y dado que podemos extrapolar la edad geológica del colapso volcánico, lo más apropiado es estimar una tasa de mutación para el género *Orestias* en el PNL, calibrando sobre la base de la fecha citada. Obtenemos entonces una tasa de 3.6% según el modelo crecimiento exponencial y 9% según el modelo crecimiento bayesiano.

Figura 2.10. Red de haplotipos para las poblaciones de Orestias del PNL, Ancuta y Río Mogachi laguna Macaya Bolivia. Cada círculo corresponde a un haplotipo distinto, el tamaño del círculo corresponde a su frecuencia y los colores corresponden a las poblaciones estudiadas. En el mapa se ubican con color las localidades estudiadas.



Por otro lado, en la localidad de Piacota se evidenció tamaños efectivos iniciales más bajos que los demás grupos genéticos, además de una baja diversidad genética. Esta baja diversidad de Piacota podría estar relacionada con el aislamiento de la laguna, que se intensificó en el tiempo de mayor aridez que presentó la región (8000 años) y que actualmente depende de las variaciones de los regímenes de precipitación. A diferencia del Lago Chungará, la laguna de Piacota es un sistema hídrico aislado y de pequeño tamaño, lo que restringe los tamaños poblacionales de *Orestias* en esta localidad. Como resultado, el tamaño de la laguna habría permitido que la deriva génica actuara con mayor intensidad reteniendo menos haplotipos nuevos.

Un caso similar a las localidades del río Lauca, se observó entre las localidades de Copapujo y Chuviri, donde se muestra una baja diferenciación que estaría relacionada con la existencia de flujo génico entre ellas. Esta conexión entre las localidades podría ser causada por las variaciones de los periodos de humedad del altiplano y el nivel de precipitaciones, actualmente, el Invierno Altiplánico. Durante este tiempo cae la mayor precipitación de todo el año, por lo tanto estas lluvias podrían aumentar el nivel de agua de los sistemas haciendo que por su cercanía geográfica se conecten, permitiendo que los individuos puedan migrar de un sistema al otro por pequeños afluentes entre ellos. Un ejemplo similar son las poblaciones de *Orestias ascotanensis* en el salar de Ascotán, las cuales no presentaron diferenciación genética. Estas vertientes entran en contacto esporádicamente, de esta manera cada vertiente se consideró como un parche habitado, que al conectarse permiten que exista migración y flujo génico.(Morales 2009; Morales et al 2011).

Los cambios que ha tenido la zona del Altiplano en particular la región del Parque Nacional Lauca, habrían tenido un impacto sobre la fauna íctica generando una drástica pérdida de diversidad genética (Hernández et al 2008, Moreno et al 2009). Las poblaciones remanentes habrían comenzado a recuperarse y expandirse, entre los diferentes ambientes lo que se observó en la red de haplotipos con un patrón de crecimiento poblacional (Figura 2.3) de las localidades de PNL, a excepción de *O. parinacotensis* en el bofedal de Parinacota que mostró una red de haplotipos más dispersa. Esta localidad se caracteriza por compartir haplotipos con las localidades de Chungará, Piacota, Cotacotani y Chuviri, lo que se puede interpretar como una población relictica que conservaría la diversidad previa a los eventos vicariantes del Holoceno. Esta señal podría explicarse por un posible efecto fundador de ésta población en los demás sistemas del PNL. Esto sugiere que las especies nominales de *Orestias* del PNL habrían surgido de las poblaciones de Parinacota.

Por otro lado, al observar el análisis de la estructura genética de las localidades muestreadas y la asignación de los individuos a los diferentes grupos genéticos basado en la información de ocho loci microsatélites con el programa Structure, vemos que los individuos de Parinacota revelan una especie de mezcla entre los diferentes grupos genéticos del PNL. Este patrón sugiere una colonización reciente de los individuos de las diferentes localidades hacia el bofedal de Parinacota. Después de gran colapso volcánico, el cambio drástico de clima en esta zona, además de ser uno de los puntos más bajos del sistema, habría facilitado la llegada de individuos de las diferentes localidades a Parinacota (Moreno et al 2009).

Hace 12000 años atrás, el colapso del volcán Parinacota cambió la cuenca del Lauca lo que significó en una primera instancia la pérdida de hábitats provocando extinciones locales que redujeron drásticamente el tamaño y el rango de distribución de la población de *Orestias*. Posteriormente, la formación de las nuevas cuencas Chungará y Cotacotani permitió que los individuos que sobrevivieron iniciaran su expansión a estos nuevos sistemas. El aumento de la aridez entre los 8000- 6000 años en la región mantuvo las barreras entre las cuencas y aisló sistemas mas pequeños como la Laguna de Piacota del bodedal de Parinacota.

Por lo tanto, los resultados de la estructuración genética e inferencia demográfica sustenta que el aislamiento de las cuatro especies nominales del género *Orestias* en los sistemas hídricos diferentes (Parenti 1984b, Vila & Pinto 1986, Vila et al 2010) se dio mediante procesos alopátricos. Los análisis de asignamiento, mostraron un alto porcentaje de correcta clasificación, esto soporta los 4 grupos genéticos obtenidos.

Por lo tanto el escenario propuesto con base en los resultado genéticos es en primer lugar, la separación de las cuencas Chungará del Lauca; esta separación se ha mantenido durante el tiempo observándose mayores diferencias entre el grupo Chungará y los demás grupos genéticos. Los eventos más recientes del cambio del clima y las continuas erupciones volcánicas produjeron eventos vicariantes dentro de la cuenca del Lauca, formando nuevos sistemas acuáticos como es el Bofedal de Parinacota, la laguna de Piacota, las lagunas de Cotacotani y el río Lauca. La laguna de Piacota se vio afectada por la aridez del Holoceno medio, separándose del bofedal de Parinacota, formando un nuevo grupo genético.

En cuanto a las localidades del río Lauca se esperaría que mantuviera la diversidad ancestral, sin embargo nuestros resultados muestran un grupo genético con haplotipos nuevos, lo que podría explicarse porque en las erupciones volcánicas los ríos arrastran escombros, cambian sus condiciones fisicoquímicas y cambian su curso que afectaría las poblaciones de los peces que lo habitan. Por otro lado, los ambientes como los bofedales conservarían mayor diversidad por su baja circulación de agua que mantiene los hábitats para las poblaciones de los peces a pesar de cambios abruptos en el paisaje.

Sin embargo, el tiempo de separación entre las diferentes localidades, se habría producido en una escala reciente, las especies nominales de *Orestias* en el PNL, aún no han acumulado mutaciones suficientes para una divergencia entre ellas.

Agradecimientos:

A los Doctores Marco Méndez académico de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Michel Sallaberry, Sergio Scott por su apoyo en las salidas a terreno y colecta de los individuos. A Philippe Gaubert y Yareli Esquer del Museo de Historia Natural de Paris, por su colaboración en la genotipificación de microsátélites. A Marcela Espinoza por su colaboración en la extracción de ADN de los individuos colectados Proyecto Fondecyt 2010: 1080390. 2011: 1110243 y al Instituto de Ecología y Biodiversidad de Chile IEB por su apoyo financiero.

LITERATURA CITADA CAPITULO I Y II

- Aljanabi SM & I Martínez 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22): 4692-4693.
- Accituno P.1997. Aspectos generales del clima en el altiplano sudamericano. En: *El Altiplano, ciencia y conciencia en los Andes. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos, 19 al 21 de octubre de 1993. Arica, Chile.* pp. 63-70.
- Allmendinger R.W., Jordan T.E., Kay S.M., Isacks B.L. 1997. The evolution of the Alti- plano-Puna plateau of the Central Andes: *Annual Reviews of Earth and Planetary Science*, v. 25, p. 139-174.
- Arratia G. 1982 *Peces del Altiplano de Chile*. In: Veloso, A. & Bustos, E. (eds), *El Hombre y los Ecosistemas de Montaña. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay*, pp 93-133.
- Barluenga M., Stolting K. N., Salzburger W., Muschick M. & Meyer A. 2006. Sympatric speciation in Nicaraguan Crater Lake cichlid fish. *Nature* 439, 719-723.

- Bandelt, H.-J., Forster, P. y Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barrett R.D.H., Schluter D. 2007. Adaptation from standing genetic variation. *Trends Ecol Evol*, 23: 38-44.
- Barron, E.J. & Peterson, W.H. 1989. Model Simulation of the Cretaceous Ocean Circulation. *Science* 244: 684-686.
- Bezault E., Mwaiko S., & Seehausen O. 2011. Population genomic tests of models of adaptive radiation in Lake Victoria region Cichlid Fish. *Evolution* 65-12: 3381–3397.
- Burbrink F.T & Pyron R.A. 2009 How does ecological opportunity influence rates of speciation, extinction, and morphological diversification in new world ratsnakes (tribe Lampropeltini)? *Evolution* 64-4: 934–943.
- Burridge C P., Craw D., Fletcher D., Waters Jo M. 2008. Geological dates and molecular rates: fish DNA sheds light on time dependency. *Molecular Biology and Evolution*. 25(4):624–633.
- Bolnick, D.I. & Fitzpatrick, B.M. 2007. Sympatric speciation: models and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 459–487.

Clavero J.E. Sparks R.S.J. Huppert H.E. Dade W.B. 2002. Geological constraints on the emplacement mechanism of the Parinacota debris avalanche, northern Chile. Bull. Volcanol. 64:40–54.

Clavero J E. R. Sparks S. J. Polanco E. Pringle M .S. 2004. Evolution of Parinacota volcano, central Andes, northern Chile. Revista Geológica de Chile, Vol. 31, No. 2, p. 317-347.

Collado G.A 2010. Relaciones filogenéticas y biogeografía histórica de los caracloes de agua dulce del género *Biomphalaria* Preston, 1910 (Mollusca: Planorbidae) en el altiplano sur. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Costa, W.J. 2003. *Family Cyprinodontidae (Pupfishes)*. In: Reis, R.E, Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. (eds), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs. Porto Alegre. Brazil, pp 549-554.

Coyne J.A & Orr H.A. 2004. *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer.

Danley P. D. & Kocher T. D. 2001. Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. Molecular Ecology: 10, 1075–1086.

DeJong, R.J., Morgan, J. A. T., Paraense, L., Pointier J.P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P. F. K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Brémond, P., Canese, A. P., de Souza, C. P.,

Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R. N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N. J. S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J. N., Sene, M., Vela'squez, L. E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B. V., Mkoji, G. M. & Loker, E. S. 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 2225–2239.

Dejoux, C. & A. Iltis, 1991. El Lago Titicaca. Síntesis del conocimiento limnológico actual. ORSTOM. HISBOL.584 pp. La Paz. Bolivia.

Doebeli M. & Dieckmann U. 2000. Evolutionary Branching and Sympatric Speciation Caused by Different Types of Ecological Interactions. *Am. Nat.* 2000. Vol. 156, pp. S77–S101

de Queiroz, K., D. A. Good. 1997. Phenetic clustering in biology: A critique. *Q. Rev. Biol.* 72:3–30.

De Queiroz K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation *Syst. Biol.* 56(6):879–886.

Drummond AJ & Rambaut A 2007 BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214–222.

- Drummond AJ, A Rambaut, B Shapiro & OG Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185–1192.
- Dupanloup I, S Schneider, L Excoffier 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571–2581.
- Elmer, K R., T.K Lehtonen, A.F. Kautt, C. Harrod & A. Meyer, 2010 a. Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times *BioMedCentral Biology* 8:60.
- Elmer, K.R., S. Fan, H. M. Gunter, J. C. Jones, S. Boekhoff, S. Kuraku & A. Meyer, 2010b. Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology* 19: 197–211(Suppl.1).
- Esquer-Garrigos Y., Lambourdière Josie., Ibañez C., Gaubert P. 2011. Characterization of ten polymorphic microsatellite loci in the Andean pupfish *Orestias agassizii*, with cross-amplification in the sympatric *O. luteus*. *Conservation Genet Resour.:* 3:17–19.
- Evanno G., Reganut S. & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620

- Excoffier, L. & Lischer H.E. L.. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Filatov D.A. 2002. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2:621-624.
- Fornari M., Risacher F. y Féraud G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 172: 269-282.
- Fritz, S.C., Baker, P.A., Lowenstein, T.K., Seltzer, G.O., Rigsby, C.A., Dwyer, G.S., Tapia, P.M., Arnold, K.K., Ku, T.L., y Luo, S. 2004. Hydrologic variation during the last 170,000 years in the southern hemisphere tropics of South America.
- Ferrito V., Mannino M.C., Pappalardo A.M., Tirano C. 2007. Morphological variation among populations of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Teleostei, Cyprinodontidae) from the Mediterranean. *J. Fish Biol.* 70, 1-20.
- Gavrilets, S. 2003. Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 57: 2197-2215.
- Gavrilets, S. 2004. *Fitness Landscapes and the Origin of Species*. Princeton

University Press, Princeton.

Gerking, S.D., 1994. Feeding ecology of fish. Academic Press. Incorporated, San Diego.

Giralt S. Moreno A. Bao R. Sáez A. Prego R. Valero-Garcés B. Pueyo J. González-Sampériz P. Taberner C. 2008. A statistical approach to disentangle environmental forcings in a lacustrine record: the Lago Chungará case (Chilean Altiplano). *J Paleolimnol.*40(1): 195-215.

González-Wevar C.A., David B., Poulin E. 2011. Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. *Deep-Sea Research II* 58: 220–229.

Hatfield, T. & Schluter D. 1999. Ecological speciation in sticklebacks: environment dependent hybrid fitness. *Evolution* 53:866– 873.

Hammer, Ø., D.A.T. Harper & P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

Harmon L. J., Schulte II J. A., Larson A., Losos J. B. 2003. Tempo and mode of evolutionary radiation in Iguanian lizards. *Science* 301:961–964.

Ho, S. Y. W., and G. Larson. 2006. Molecular clocks: When times area-changin'.
Trends Genet. 22:79–83.

Ho S.Y.W., Shapiro B., Phyllips M.J., Cooper A., Drummond, A.J. 2007. Evidence
for time dependency of molecular rate estimates. Systematic Biology 56, 517–
522.Ho et al 2005.

Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2005. Time dependency of
molecular rate estimated and systematic overestimation of recent divergence
times. Molecular Biology and Evolution 22, 1561–1568.

Hudson AG, Vonlanthen P, Müller R, Seehausen O. 2007. Review: the geography of
speciation and adaptive radiation in coregonines. Arch Hydrobiol Spec Issues
Advanc. Limnol. 60:111-146.

Hulbert S.H. & C. Chang. 1984 Ancient Ice Islands in Salt Lakes of the Central
Andes. Science

Hulsey C. D., Mims M. C., Parnell N. F., Streebman J. T. 2010. Comparative rates of
lower jaw diversification in cichlid adaptive radiations. J.Evol. Biol. 23:1456–
1467.

Hoerner M. E.2011.Testing for differences in rates of speciation, extinction, and
morphological evolution in four tribes of cichlids endemic to lake tanganyika,

east Africa. *Evolution* 65-12: 3398-3412.

Jarne P, Delay B 1991. Populations genetics of freshwa- ter snails. *Tree* 6: 383-386.

Johnson S.G. 2005. Age, phylogeography and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrghus churinceanus*. *Mol Ecol* 14(8):2299-311.

Johns G.C, Avise J.C.1998. Test for ancient species flocks based on molecular phylogenetic appraisals of *Sebastes rockfishes* and other marine fishes. *Evolution* 52:1135-1146.

Joyce D.A. Lunt D. H., Bills R., Turner G. F., Katongo C., Duftner N., Sturmbauer C. Seehausen O. An extant cichlid fish radiation emerged in an extinct Pleistocene lake. *Nature* :Vol 435: 90-95.

Kornfield I. P. Smith (2000) African Cichlid Fishes: Model Systems for Evolutionary *Biology* .Annu. Rev. Ecol. Syst. 31:163-96.

Kocher T. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature*: Vol 5: 288-298.

Kuhner M.K. 2006. LAMARC 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768-770

- Langerhans R. B., Gifford M. E., Joseph E. O. 2007. Ecological speciation in *Gambusia* fishes. *Evolution* 61-9: 2056–2074
- Lauzanne, L., 1982. Les *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) du Petit lac Titicaca. (The *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) of small lake Titicaca. In French. *Revue. D' Hydrobiologie. Tropical.* 15, 39–70.
- Liu H. P., Hershler R. Clift K. 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail. *Molecular Ecology*, 12, 2771–2782.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lussen A; Falk Thomas M, Villwock Wolfgang 2003 Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:151–160.
- Maldonado E., N. Hubert, P. Sagnesk & B. De Mérona, 2009. Morphology–diet relationships in four killifishes (Teleostei, Cyprinodontidae, *Orestias*) from Lake Titicaca. *Journal of Fish Biology* 74, 502–520.

- Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts Mayr 1963.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Márquez-García M., Vila I., Hinojosa L F. Méndez M.A., Carvajal J L. Sabando M.C., 2009. Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano. *Limnologica* 39 314–318.
- Martínez, G., Bugueño N. & I. Vila. 1999. *Orestias ascotanensis* Parenti 1984 en el Salar de Ascotán. *Noticiario Mensual del Museo Nacional de Historia Natural, Chile*, 339: 7-12.
- Mehner T., Pohlmann K., Elkin C., Monaghan M.T., Nitz B., Freyhof Jörg. 2010. Genetic population structure of sympatric and allopatric populations of Baltic ciscoes (*Coregonus albula* complex, Teleostei, Coregonidae) *BMC Evolutionary Biology* 10:85
- Meyer A., Kocher T. D., Basasibwaki P. & Wilson, A. C. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial-DNA Sequences. *Nature* 347: 550–553.
- Miller M.P. 2005. *Alleles In Space: computer software for the joint analysis of*

interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.

Miller M.P.; Haig, S.M.; Wagner R.S. 2006. Phylogeography and Spatial Genetic Structure of the Southern Torrent Salamander: Implications for Conservation and Management. *Journal of Heredity* 97: 561-570.

Moreno A. Santoro C. M. Latorre C. 2009. Climate change and human occupation in the northernmost Chilean Altiplano over the last ca. 11 500 cal. a BP. *Journal of Quaternary Science* 24(4) 373-382.

Mourguiart P., Argollo J., Wirrmann D. 1995. Evolución Paleohidrológica de la Cuenca del Lago Titicaca Durante el Holoceno. *Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines* 24 (3): 573-583.

Morales P. 2009. Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: el caso de *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) de los salares de Ascotán y Carcote en el altiplano chileno. Tesis de magister. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Morales P., I. Vila & Poulin E.. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán saltpan of the Altiplano *Conservation Genetics*, 12:1639-1643.

Niemeyer H. y Cereceda P.1984. Geografía de Chile. Hidrografía. Instituto

Geográfico Militar. Tomo VIII. Pp.29-60.

Nosil P., and T. E. Reimchen. 2005. Ecological opportunity and levels of morphological variance within freshwater stickleback populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 86:297–308.

Nossil P. 2008. Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*. 17(9): 2103-2106.

Nagl, S. et al. 2000. The origin and age of haplochromine fishes in Lake Victoria, East Africa. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 1049–1061.

Oosterhout C.V., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*: 4, 535–538.

Parenti L. 1984a. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (*Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae*). *Ibid*, 178:107-214.

Parenti L. 1984b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept, In: Echelle, A.A. & Kornfield, I. (eds), *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. of Maine Press, Orono, Maine, 85-92.

Parker A. & Kornfield, I. 1995. Molecular perspective on evolution and

zoogeography of Cyprinodontid Killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1995 (1): 8-21.

Perfectti F. 2003. Capítulo 18: Especiación: modos y mecanismos. En *Evolución: la base de la biología*. Manuel Soler (editor), Proyecto Sur de Ediciones, S.A.L.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM 1999 BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502–503.

Piry S, Alapetite A, Cornuet, J.-M., Paetkau D, Baudouin, L., Estoup, A. 2004 GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.

Placzek C., Quade, J. & Patchet, P.J. 2006. Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *Geological Society of America Bulletin* 5/6: 515–532.

Placzek C. Quade J, Rech J A. Patchett P.J. Pérez de Arce C 2009 Geochemistry, chronology and stratigraphy of Neogene tuffs of the Central Andean region. *Quaternary Geochronology* 4:22–36.

Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5. Available at

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>

Ribbink, A.J. 1984. Is the Species Flock Concept Tenable? En A.A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, pp. 21-25. University of Maine, Orono.

Rigsby C.A., Platt Bradbury J., Baker, P.A., Rollins, S.M., y Warren, M.R. 2005. Late Quaternary palaeolakes, rivers, and wetlands on the Bolivian Altiplano and their palaeoclimatic implications. *Journal of Quaternary Science* 20(7-8): 671-691.

Risacher, F., Alonso H. & Salazar C. (2003). The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews*, 63, 249-293.

Rogers, A.R. y Harpending H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Ruiz V., Marchant M. 2004 *Ictiofauna de aguas continentales chilenas*. Universidad de Concepción. Departamento de Zoología.

- Rundle H, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, **8**, 336–352.
- Rüber L., Verheyen E., Sturmbauer C. & Meyer A. 1998. Evolution on Islands. Grant, P.ed. (Oxford Univ. Press, Oxford). Pp. 225–240. 15. Huysseune, A.,
- Rüber L. Verheyen E. §, Meyer A. 1999. Replicated evolution of trophic specializations in an endemic cichlid fish lineage from Lake Tanganyika. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 10230–10235.
- Salzburger, W., Mack, T., Verheyen, E., y Meyer, A. 2005. Out of Tanganyika: Genesis, explosive speciation, key-innovations and phylogeography of the haplochromine cichlid fishes. *BCM Evolutionary Biology*, **5**: 17-32.
- Saez A., Valero-Garces B. L., Moreno A., Bao R., Pueyo J. J., Gonzalez-Samperiz P., Giralt S., Taberner C., Herrera C., Gibert R. O. 2007. Lacustrine sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungara' (Northern Chile) *Sedimentology* **54**, 1191 1222
- Schaefer K. M. 1991. Geographic Variation in Morphometric Characters and Gill-Raker Counts of Yellowfin Tuna *Thunnus albacares* from the Pacific Ocean. *Fishery Bulletin*, U.S. **89**:289-297 (1991).
- Shneider S, Excoffier L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the

distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among Sites:
application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.

Sturmbauer & Meyer 1992. Genetic divergence, speciation and morphological stasis
in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* Vol 358 :578-581

Sidlauskas B. 2007. Testing for unequal rates of morphological diversification in the
absence of a detailed phylogeny: a case study from Characiform fishes.
Evolution 61:299–316.

Schluter D. 1996. Ecological speciation in postglacial fishes. *Phil. Trans R Soc B*,
351: 807-814.

Schluter D. 2000. Introduction to the Symposium: Species Interactions and Adaptive
Radiation *The American Naturalist*. vol. 156, supplement

Scott.S. 2010. Sistemática y Filogenia de *Orestias* del complejo *agassizii*
(Teleostei: Cyprinodontidae) en la Puna. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias.
Universidad de Chile.

Soler 2003. Evolución: la base de la biología. Manuel Soler (editor), Proyecto Sur de
Ediciones, S.A.L.

Strecker U., Meyer C.G., Sturmbauer C. & Wilkens H. 1996. Genetic divergence and
speciation in an extremely young species flock in Mexico formed by the genus

Cyprinodon (cyprinodontidae, teleostei). *Mol. Phyl. Evol.*, 6: 143-149.

Sturmbauer C. 1998. Explosive speciation in cichlid fishes of the African Great Lakes: a dynamic model of adaptive radiation. *J. Fish Biol.* 53:18-36

Thorpe, R.S., 1976. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. *Biol. Rev.* 51, 407-452.

Vila & Pinto 1986. *Revue d'hydrobiologie tropicale*. A new species of killifish (pises: Cyprinodontidae) from the chilean altiplano.

Vila, I. 2006. A new species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia*, 3:471-476.

Vila I, Scott S, P Iturra, Mendez M, 2010, Kariological and morphological analysis of divergence among species of the killifish genus *orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern Altiplano origin and Phylogenetic Interrrelationships of Teleost. (J.S Nelson HP Schltsse & H Wilson, eds) pp 471-489.

Vila I., Scott S., Mendez M. A., Valenzuela F, Iturra P. & Poulin E. 2011. *Orestias gloriae*, a new species of cyprinodontid fish from saltpan spring of the southern high Andes (Teleostei: Cyprinodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 22, No. 4, pp. 345-353.

Villwock, W. Sienknecht, U. 1995 Intraspezifische Variabilität im Genus *Orestias Valenciennes 1839* (Teleostei: Cyprinodontidae) und zum Problem der Artidentität. – Mitt. Hamburg. Zool. Mus. Inst. 92: 381-398.

Verheyen E., Rüber L., Snoeks J. & Meyer, A. 1996. Mitochondrial Phylogeography of Rock-Dwelling Cichlid Fishes Reveals Evolutionary Influence of Historical Lake Level Fluctuations of Lake Tanganyika, Africa *Phil. Trans. R. Soc. London B* 351, 797–805.

Weir B. S. & Cockerham C. C. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

CAPITULO III

Trophic differentiation of *Orestias*: (Teleostei: Cyprinodontidae) in the Chilean

Altiplano

ARTICULO ENVIADO A LA REVISTA HIDROBIOLOGÍA

CLAUDIA J GUERRERO ^{1,3}, ELIE POULIN ^{1,3} & IRMA VILA ^{2*}.

¹Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago

²Laboratorio de Limnología, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago

³ Instituto de Ecología y Biodiversidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago

*Corresponding author: limnolog@uchile.cl, 56-2-9787314, FAX 2727363

ABSTRACT

Fishes exhibit a wide diversity of feeding behaviors, sometimes associated with specific morphologies, which may reflect adaptations to exploit the resources depending upon where they live. In isolated aquatic systems, fish provide a good model to study relationships between trophic and environmental variations. The present study evaluates, by analysis of stomach contents, the trophic differentiation of five species of *Orestias* in different sites of the Parinacota Region (Southwest Altiplano) where they are distributed. 177 stomachs were analyzed of *Orestias chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis* and *Orestias. sp.* For

the analysis we used quantitative descriptors of frequency of occurrence and number of prey items. We analyzed the richness and abundance of prey by species and location using an analysis of correspondence. The diet of *Orestias* consisted of zooplankton and macroinvertebrates associated to macrophytes, Cladocera (*Chydorus*, *Daphnia*, *Alonella*), Ostracoda (*Cyprinotus*), Amphipoda (*Hyaella*), Mollusca (*Biomphalaria*) and Insecta (*Chironomus*). *O. chungarensis* had the highest dietary diversity (1.72) followed *O. laucaensis* (1.45), and *O. parinacotensis* (1.33). In general, the diet of *Orestias* species in the southwestern region of the Altiplano is characterized by a low richness of prey items and by an opportunist foraging strategy with a low niche trophic overlap between them. This strategy could help explain the diversity of living of *Orestias* in rivers, wetlands and lakes, and hence the high speciation of the species in the southern highlands.

Key words: high Andes, *killifish*, feeding, opportunism

INTRODUCTION

Fish show a wide diversity of feeding behaviors related to their morphology, which is reflected in diverse adaptations for resource exploitation that depend upon the places they inhabit (Earl et al. 2011). Some species may even increase their feeding habits and use new resources (Gerking 1994). One well-studied group is the cichlids of African lakes; these fishes present buccal characteristics that have been associated with speciation processes related to fluctuations of lake water levels, predation, complexity of the habitat and trophic polymorphism (Galis 1998, Kornfield & Smith 2000). Cichlid fishes exhibit morphotypes with specialized buccal structures for crushing, chewing and filtering (Husley et al. 2005, Husley 2006) that are related to their prey, which include insects, algae, zooplankton and some eggs of smaller fish (Turner, 2007).

In South America, the genus *Orestias* is a group of fish of biogeographical interest due to its endemism and adaptation to high Andean systems. More than 40 nominal species are distributed from Lake Lacsha in northern Perú to the Salar de Ascotán in Chile (9°S to 22°S), (Arratia 1982, Parenti 1984a, 1984b, Vila & Pinto 1986, Northcote 2000, Costa 2003, Vila 2006, Vila et al 2011). Currently, 24 species of this genus inhabit Lake Titicaca and form an important part of the trophic network (Lauzanne 1982, Maldonado et al 2009). Pelagic, littoral and benthic species have been described from this lake, with specialized morphotypes for filtering, crushing and chewing. The pelagic species such as *O. pentlandii* Valenciennes, 1846, *O. ispi* Lauzanne, 1981 and *O. forgeti* Lauzanne, 1981 exhibit principally crushing buccal

structures and have a diet of zooplankton, including crustaceans, copepods and cladocera. In contrast, perimacrophyte species such as *O. luteus* Valenciennes, 1846, *O. olivaceus* Garman, 1895 and *O. jussiei* Valenciennes, 1846 have buccal structures associated with phytoplankton, zooplankton, insects and snails living on macrophytes. Benthic species such as *O. mulleri* Valenciennes, 1846 and *O. crawford* Tchernavin, 1944 crush amphipods and benthonic snails. *Orestias albus* Valenciennes, 1846 is a specialist, which consumes fish (Lauzanne 1982). *Orestias agassii* Valenciennes 1846 has a wide diet spectrum depending upon locality; it consumes algae, macrophytes and larvae of insects and mollusks (Lauzanne 1982, Dejoux & Iltis 1991). It has been suggested that these differences in feeding are related to processes of sympatric speciation of these species due to the bathymetric distribution of resources in this deep lake (Maldonado et al. 2009).

In contrast to the *Orestias* species that live in Lake Titicaca, species that inhabit the Southern Altiplano are characterized by reduced geographic distributions, limited to one wetland, generating a marked local endemism. This particular distribution has been traditionally interpreted as the result of alternance of wet and dry periods in the Altiplano as well as an intense volcanic activity (Clavero et al 2004; Saez et al, 2007; Giralt et al 2008). Such events would have generated multiple processes of population fragmentation, leading to reiterative allopatric speciation in this genus (Arratia 1982, Vila & Pinto 1986, Vila 2006, Scott, 2010, Collado et al 2011).

Several studies have evaluated the influence of resource partitioning in fishes to explain the magnitude of niche overlap. Ross (1986) found that the first resource that

is fractionated is food, followed by habitat. (Navia et al 2007, Scharnweber et al 2011) In sympatry, the species of fish that coexist in lakes have shown dietary specialization associated with interspecific competition leading to reduced trophic niche, and therefore generates a restricted dietary breadth (Ruber & Adams 2001, Elmer et al 2010 a). On the other hand, for those species in allopatry it has been observed that the dietary strategy is extended in the absence of interspecific competition. (Scharnweber et al, 2011). For species of *Orestias* in the southwest Altiplano, we would thus expect a broad trophic niche associated with a generalist dietary strategy, in relation to available resources.

In the region of Parinacota (Lauca National Park) four species have been described in an area of not more than 10 km², inhabiting unconnected lakes, lagoons, cushion bogs and the river. In this area, the partial collapse of the Parinacota volcano (12.5 Kya) and the following volcanic activity blocked the river Lauca, shaping the current aquatic systems such as Chungará Lake, Cotacotani and Piacota lagoons (Clavero et al 2004; Sáez et al 2007, Giralt et al 2008). This habitat fragmentation would have therefore isolated populations of the freshwater *Orestias* originally living in the Lauca River. Morphological systematic studies have lead to the description of *Orestias chungarensis* Vila & Pinto 1986 in Lake Chungará, *O. piacotensis* Vila 1996 in the Piacota Lagoon; *O. parinacotensis* Arratia 1982 in the Parinacota cushion bog and *O. laucaensis* Arratia 1982 in the Cotacotani lagoons and the Lauca river.

Differences in the hydrological, physical and chemical characteristics between the systems they inhabit, together with variation in macrophyte abundance and their

location in the habitat may determine variation in food resources and therefore in diet associated with diversification of this genus (Lauzanne 1982; Dejoux & Iltis 1991, Gerking 1994; Maldonado et al 2009). Despite these differences, there is little information published on the diet of these species (Arratia 1982; Vila 2006). The objective of this study was to evaluate this possible differentiation using a dietary analysis of these species in relation to trophic niche and feeding strategy.

MATERIALS AND METHODS

In November 2008 we captured by manual fishing 177 specimens of *Orestias* belonging to different species in Lake Chungará (*O. chungarensis*, n=20), Parinacota cushion bog (*O. parinacotensis*, n=28), Lauca River (*O. laucaensis*, n=20), Misituni cushion bog (*O. laucaensis*, n=19), Piacota (*O. piacotensis*, n=34) and Cotacotani lagoons (*O. laucaensis*, n=20). Additionally, in June 2010 we captured 20 specimens of *Orestias* sp. from the Copapujo cushion bog and 16 *Orestias* Sp. from the Chuviri cushion bog (Table 3.1). All captures were made between 11:00 and 15:00, since it is known that these fish are daytime feeders.

Table 3. 1. Geographic position and watershed of localities sampled of Orestias of the Southwest Altiplano

Locality	Altitude (meters)	Coordinates	Type of system
Chungará	4578	18° 23' S, 69°18'W	Lake
Cotacotani	4539	18° 20' S, 69° 23' W	Lagoon
Lauca	4426	18° 38'S, 69° 34'W	River
Misituni	4281	18° 38'S, 69° 35'W	Cushion bog
Parinacota	4410	18° 20'S, 69° 27'W	Cushion bog
Piacota	4418	18° 20'S, 69° 26'W	Lagoon
Copapujo	4425	18° 16'S, 69° 30'W	Cushion bog
Chuviri	4426	18° 16'S, 69° 33'W	Cushion bog

Specimens were preserved in 95% ethanol and maintained in the Laboratorio de Ecología Molecular of the Universidad de Chile until analysis. The standard length in mm of each individual was measured; lengths were compared among different localities using one-way analysis of variance (Zar 1984). We also performed a correlation analysis among the variables standard length, prey abundance and prey richness to evaluate possible associations, which might alter results of comparisons among species.

Stomach contents were analyzed under a stereoscopic microscope, identifying and quantifying taxa at the genus level using several taxonomic keys (Dejoux & Iltis 1991, Figueroa 2003, Molina and Vila 2006). For diet description we used the quantitative descriptors (%N) and (%F) of Hyslop (1980). The former is numeric; it represents the percentage of a given prey item relative to all prey items in the sample.

$$\%F = (N_{ip} / N_{tip}) \times 100$$

Where N_{ip} is the number of individuals of a prey species and N_{tip} is the total number of items of all prey species.

Hyslop's frequency method %N is the percentage a given prey item appeared in stomachs with contents. $\%N = (\text{Number of stomachs with prey item} / \text{number of stomachs with contents}) \times 100$.

Trophic amplitude was measured using the richness (number of prey species), diversity (calculated using the Brillouin index), relative abundance (proportion

number of items prey in total stomachs with prey) and dominance in each population. The dominance measure ranges from near 0 when all prey items are present in equal numbers to close to 1 when only one prey species is present.

Brillouin's (1951) diversity index (HB) was calculated for each stomach content. When the randomness of a sample cannot be guaranteed, for example due to the form of capture, the Brillouin index (HB), is used to measure the diversity of a particular data set. In this case, HB uses the following equation:

$$HB = \frac{\ln(n!) - \sum_i \ln(n_i!)}{n}$$

where n is the total number of individuals and n_i is the number of individuals of the i th species. (Hamer et al 2001, Magurran 2004).

The dominance was measured as $D = 1 - \text{Simpson index}$. The Simpson index is one of the most meaningful and robust diversity measures available. In essence it captures the variance of the species abundance distribution. Thus, when expressed as the complement ($1 - D$), the value of the measure will rise as the assemblage becomes more even. We used the following equation (Hammer et al 2001; Magurran 2004):

$$D = \sum_i \left(\frac{n_i}{n} \right)^2$$

where n_i is the number of individuals of taxon i .

To determine diet type, we calculated the standardized measure of niche breadth of Levins (Bst). This index is independent of the number of resources available or

recognized; its value fluctuates between 0 for a specialized diet (stenophagous) and 1 for a euryphagous or generalized diet (Colwell & Futuyma 1971).

$$Bst = \frac{[1/S(p_i)^2] - 1}{N-1}$$

where p_i is the relative frequency with which any species uses prey resource i and N is the total number of prey species analyzed (Colwell & Futuyma 1971).

The numerical abundance dietary matrix of prey items was constructed to calculate diet overlap between *Orestias* species by using Pianka's index (1974) as follows:

$$O_{jk} = \frac{\sum_i^n p_{ij} p_{ik}}{\sqrt{\sum_i^n p_{ij}^2 \sum_i^n p_{ik}^2}}$$

where O_{jk} = Pianka measure of niche overlap between species j and species k ; and P_{ij} and P_{ik} = proportions of predator j and k with prey i in their stomachs. Diet overlap increases as the Pianka index increases and overlap is generally considered to be biologically significant when the value exceeds 0.60 (Pianka 1974, Zares & Rand 1971, Navia et al 2007). To evaluate if niche overlap was influenced by the habitat type (Lake, cushion bog and river), we performed a randomization test to compare inter and intra overlap values with a distribution of expected values based on 10,000 simulations under a null model, using Rndom project 1.0 program (Jadwiszczak, 2002). In the same way, we tested whether the populations of *O. laucensis* from Cotacotani Lagoon and Lauca River (Lauca and Misituni) exhibited higher overlap

values compared with other species.

To estimate the composition of the diet, we performed a Detrended Correspondence Analysis DCA, (Hill & Gauch 1980). This method depicts simultaneously the samples and their prey in a reduced multivariate space. Prey species, which were found only once in the whole sample were excluded from the analysis, because the DCA is sensitive to species that occur only in a few stomach contents, which modify the scores of the ordination (Jongman et al., 1995). We performed an analysis of variance to compare DCA scores between species. The composition of the stomach contents was represented through scoring prey items in the axis of the ordination. All the ordinations were performed with abundance matrices using Statistica 7.0 software.

RESULTS

Of the 183 specimens analyzed, 97% (177) had food in their digestive tracts. The standard length of the fish varied from 18 mm (*O. piacotensis*) to 63 mm (*O. sp* Chuviri) and was different among localities (ANOVA $F_{(7,143)} = 12.13$ $P < 0.001$); the principal differences were between the species *O. laucaensis* (Lauca and Misituni) and *Orestias sp.* (Chuviri and Copapujo) with *O. parinacotensis*, *O. piacotensis* and *O. chungarensis* (Tukey test, $P < 0.001$). However, no direct relation was found between prey abundance and richness with body size (Abundance: $R^2 = 0.0784$, $P = 0.33$ Richness: $R^2 = -0.027$ and $P = 0.73$); thus we were able to compare the diets of the species in the different sites without correcting for standard length.

In general the diet (%F) of the species of the genus *Orestias* was composed of 19 macroinvertebrates associated with macrophytes, together with components of the zooplankton; the most frequent were Cladocera, (*Chydorus*, *Daphnia* and *Alonella*), Ostracoda (*Cyprinotus*), Amphipoda (*Hyalella*), Mollusca (*Biomphalaria*) and Insecta (*Chironomus*), (Table 2). Diets showed considerable similarities and differences of prey items among species. *Orestias piacotensis* fed principally on the genus *Chydorus* (78.4%); *O. chungarensis* included *Nauplius* (40.2%), *O. laucaensis* fed on *Biomphalaria* (65% in Cotacotani) and *Orestias sp* in Chuviri on *Hyallela* (54.1%)! However some species showed similarity in prey, such as larvae and adults of the genus *Chironomus* that were important prey for *O. parinacotensis* (47.2%), *O. laucaensis* (20.8% in Cotacotani and 33.4% in Misituni) and *Orestias sp* in Chuviri (21.3%). The Ostracoda *Cyprinotus* were consumed preferentially by *O.*

chungarensis (25.6%) and *Orestias sp* in Copapujo (47.1%) (Table 3. 2).

In terms of the numbers of prey consumed (%F) there were differences among species; *Chydorus* were the most important prey for *O. piacotensis* (70.5%), *Chironomus* for *Orestias parinacotensis* (78.5%) and *Alonella* (60%) for *O. chungarensis*. For all localities of *O. laucaensis* the most abundant prey was *Biomphalaria* (50% Cotacotani, 78.9% Lauca, 68.4% Misituni) and for *Orestias sp* was *Hyaella* (56.2% Chuviri and 60% Copapujo) (Table 3.2).

The mean richness ranged between 5 to 7 prey species for all *Orestias* species except *O. chungarensis*, which exhibited the greatest prey richness (13) (Table 3.3). In terms of relative abundance *Orestias sp.* of Copapujo had the largest number of prey per stomach (40.75), followed by *O. chungarensis* (28.95), *O. piacotensis* (21.88). The lowest relative abundances were found for *Orestias sp.* in Chuviri (3.81) (Table 3.3).

Diet diversity was more variable: *O. chungarensis* had the greatest diversity (1.72), followed by *O. laucaensis* from Misituni (1.45) and *O. parinacotensis* (1.33), while *O. piacotensis* had the lowest diversity (0.78)(Table 3.3).

Niche breadth indexed indicated a general tendency to a specialist-type diet ($Bst < 0.5$) in all populations, except for the *O. laucaensis* population from Misituni, which showed a generalist dietary strategy ($Bst = 0.6$, Table 3.3).

The dietary overlap ranged between 0.01 (Chungará-Lauca) and 0.72 (Parinacota-

Misituni). Overlap values calculated between samples from the same aquatic system did not differ significantly from the values calculated randomly ($P=0.64$). Similarly, samples of *O. laucaensis* from Cotacotani, Lauca and Misituni did not show higher overlap values compared to other species ($P=0.11$)(Table 3.4).

Table 3.2. Frequency of occurrence (% F) and number (% N) of prey items that contribute to the diet of the species of *Orestias* in Southwest

Atiplano localities. In bold are the most important prey taxa (> 20%) (M=macroinvertebrates, Z=Zooplankton O=others).

Localities Prey	Piacota		Parinacota		Chungará		Cotacotani		Lauca		Misituni		Chuviri		Copapujo	
	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N
<i>Chironomus (M)</i>	41,18	3,90	78,57	47,25	30,00	2,59	45,00	20,87	47,37	7,41	84,21	33,47	43,75	21,31	35,00	2,09
<i>Biomphalaria (M)</i>	5,88	0,27	46,43	17,39	5,00	0,17	50,00	65,22	78,95	15,12	68,42	24,19				
<i>Hyalella (M)</i>	26,47	2,28	64,29	18,84	40,00	6,56	15,00	6,96					56,25	54,10	60,00	13,87
<i>Notonecta (M)</i>													6,25	3,28		
<i>Adesioaps (M)</i>																
<i>Cyprinotus (M)</i>	26,47	3,63	3,57	0,29	50,00	25,56	5,00	1,74	36,84	8,02	15,79	6,45	6,25	1,64	50,00	47,12
<i>Elmes (M)</i>			14,29	1,16												
<i>Leucotichia (M)</i>			25,00	13,91												
<i>Ancylus (M)</i>					15,00	1,55			10,53	1,23	5,26	0,81				
<i>Nauplius (Z)</i>			25,00	40,24												
<i>Alonella (Z)</i>	2,94	0,27	60,00	10,36	15,00	5,22			36,84	25,40			6,25	3,28	55,00	36,93
<i>Chydorus (Z)</i>	70,59	78,49	15,00	1,04					5,26	0,31	5,26	9,68	6,25	6,25	13,11	
<i>Bosmina (Z)</i>																
<i>Diatylops (Z)</i>					5,00	4,15										
<i>Daphnia (Z)</i>	35,29	11,16	5,00	0,35					31,58	66,98						
<i>Harpacticoida (Z)</i>			5,00	1,90												
<i>Boeckella (Z)</i>			20,00	4,32									12,50	3,28		
<i>Orestias eggs (O)</i>			3,57	1,16					5,26	0,93						
<i>Algae (O)</i>			5,00	1,21												
Total prey	744		345		579		115		324		248		61		815	
Total stomach with prey	34		28		20		20		20		19		16		20	
N	37		29		20		22		20		19		16		20	

Table 3.3. Richness (Rich), relative abundance (A.R), diversity (HB), niche breadth (Bst), Dominance (D) in stomach of different species of *Orestias* in Southwest Atiplano.

	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>	<i>Orestias</i>
	<i>piacotensis</i>	<i>parinacotensis</i>	<i>chungarensis</i>	<i>laucaensis</i>	<i>laucaensis</i>	<i>laucaensis</i>	<i>sp</i>	<i>sp</i>
	Piacota	Parinacota	Chungará	Cotacotani	Lauca	Misituni	Chuviri	Copapujo
	(n=34)	(n=28)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=19)	(n=16)	(n=20)
Rich	7	7	13	5	7	6	5	6
A.R	21.88	12.32	28.95	5.75	17.05	13.05	3.81	40.75
Bst	0.10	0.37	0.25	0.27	0.18	0.60	0.45	0.33
HB	0.78	1.33	1.72	0.95	1.03	1.45	1.19	1.07
D	0.63	0.31	0.25	0.48	0.48	0.25	0.36	0.38



Table 3. 4.Niche overlap of *Orestias* in Southwest Altiplano.

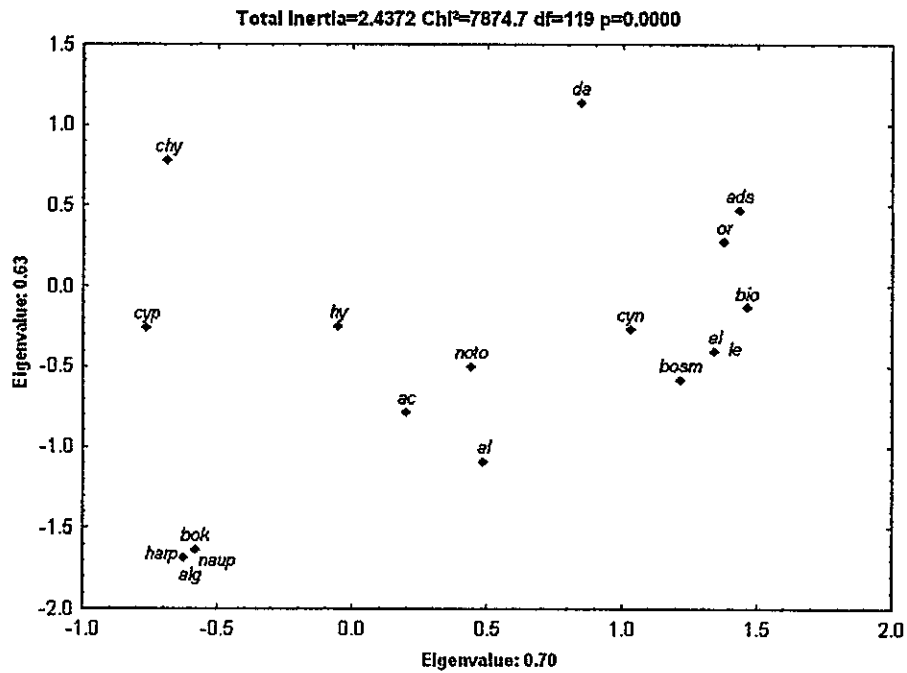
	Piacota	Parinacota	Chungará	Cotacotani	Lauca	Misituni	Chuviri
Piacota	-						
Parinacota	0,053	-					
Chungará	0,052	0,093	-				
Cotacotani	0,022	0,587	0,061	-			
Lauca	0,141	0,159	0,014	0,238	-		
Misituni	0,036	0,723	0,143	0,700	0,193	-	
Chuviri	0,099	0,609	0,158	0,199	0,039	0,281	-
Copapujo	0,636	0,109	0,438	0,052	0,004	0,023	0,270

The first four eigenvalues from the DCA of the 19 prey taxa and the 177 individuals of *Orestias* for the five species in the 8 localities were $l_1=0.85$, $l_2=0.81$, $l_3=0.71$, $l_4=0.70$. The first two composition gradients explained 55.1% of the dietary variation. This ordination revealed a significant association between predators and prey ($c^2_{119}=7874.7$, $p<0.001$), indicating that individuals of the different species of *Orestias* of the studied localities feed on different prey.

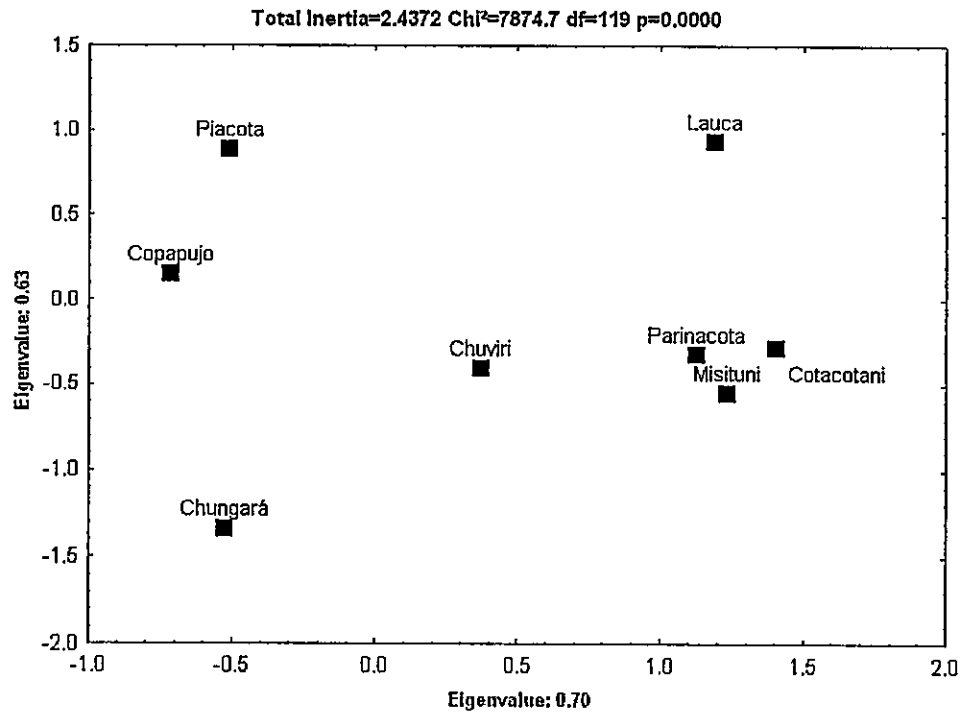
In the dimensional graphs some prey species are situated in the extremes of the first axis of the composition gradient and others in the extreme of the second axis (Figure 3.1a). Simultaneous display of the composition of *Orestias* from the eight localities (Figure 3.1b) revealed more association between Parinacota, Misituni and Cotacotani. In the localities of Chungará, Piacota and Lauca there was a significant association among the prey items in greater frequency (>20%).

Figure 3. 1 Bi-plot ordination of Detrended Correspondence Analysis showing the position of prey (a) and *Orestias* species (b) in a reduced space. Diamond: abbreviation: nomenclature prey: *Chy*: Chydorus. *Da*: Daphnia. *Hy*: Hyallela. *Cyn*: Chironomus. *Bio*: Biomphalaria. *Cyp*: Cyprinotus. *Al*: Alonella. *Le*: Leucotichia. *El*: Elmes. *Or*: *Orestias* egg. *Ac*. Acylus. *Bok*: Boeckella. *Harp*: Harpacticoida. *Naupl*: Nauplius. *Alg*: Algae. *Noto*: Notonecta. *Dia*: Diacyclops. *Ads*: Adesioiups. *Bosm*. Bosmina

A.



B.



DISCUSSION

The results indicate that the diet of *Orestias* in the southwest Altiplano is composed mainly of zooplankton and the macroinvertebrate fauna associated with macrophytes. 19 different prey items were identified in the stomachs of 177 *Orestias* collected in eight sampling sites. However, prey richness per locality varied between five and seven, except in the case of *O. chungarensis* (Richness = 13). This low richness was generally associated with low niche breadth and low prey diversity, indicating a foraging strategy where consuming the resources available in the different environments. This feeding strategy may be associated mainly with the reduced size and shallow depth of these environments, which have few species always associated with the vegetation of the shores or banks (Dorador et al. 2003, Márquez et al. 2009, Riveros et al. in press). The higher number of prey species of *O. chungarensis* is related to an important increase of zooplankton species in its diet (%N > 60). This may be due to the fact that *O. chungarensis* lives in a large lake that allows the development of a rich and varied zooplankton community (Márquez-García et al 2009). In general, our results show that the trophic niches measured in the sampling sites are narrow and the niche overlap is low among the sites analyzed, both among populations of the same species (*O. laucaensis*) and among species.

The reduction in niche width and decrease in niche overlap among species have been observed in cases of sympatric co-existence of taxa closely related phylogenetically. It has been suggested that the partition of trophic resources may avoid the phenomenon of competitive exclusion and in some cases accompany the process of

sympatric speciation (Schluter 2001). This explanation was proposed earlier for cichlid fish in Africa and Nicaragua (Ruber & Adams 2001, Elmer et al 2010a, Elmer et al 2010b) and also for *Orestias* in Lake Titicaca (Lauzanne 1982) which have different feeding habits (pelagic, benthonic and littoral) in the water column. Another example is the perch of the genus *Lepomis*, which restrict their trophic niche, changing from a diet of mollusks to plankton only when they share their habitat temporarily (Schanweber et al 2010). In the case of in the southwest Altiplano, and in particularly in our study area, each nominal species lives in a separate watershed with no possibility of contact with others. In this situation, in which species are generated by allopatric processes, a restricted niche width and low niche overlap cannot be explained by competitive phenomena. On the contrary, we would have expected that each species would have a wide trophic niche and thus high overlap in diet.

The low niche overlaps observed among different species and sampling localities may be linked to the different habitats where the *Orestias* samples were collected, which have different communities of macroinvertebrates and zooplankton. However, no differences in niche overlap were found among environments (lake, cushion bog and river), thus the differences among diets does not appear to be a function of the characteristics of the habitat. Alternatively, the differences among diets may be associated with a specialization of each species as a consequence of its isolation in different watersheds. However, the *O. laucaensis* from three localities did not show greater niche overlap among themselves than they did with other species. Thus the width of the trophic niche does not appear to be a characteristic of the species, but

rather of individual populations.

Finally, the variation in species richness, niche breadth and overlap observed among the studied populations of *Orestias* may reflect an opportunist trophic strategy of these species, reflecting the environmental supply at the moment, consuming the prey species which are most abundant. The variation in the availability of food in aquatic environments stimulates the organisms which live in them to develop life strategies which allow them to survive trophic changes, especially in situations with extreme climatic conditions such as the high altitude of the Altiplano (Schlüter 2000; Habets et al 2006).

In the present case, in spite of the fact that the principal trophic indicators indicated a specialist-type diet for the species of *Orestias*, they appear to have a more generalist strategy from the point of view that they are consuming the resources available in their different environments. This trophic strategy could explain the capacity for colonization which the genus possesses, which is demonstrated by its wide distribution in different Altiplano systems such as large lakes, cushion bogs, rivers, lagoons and salt pans. Each of these aquatic systems will have a different trophic composition, associated with the physicochemical composition of the area.

Studies of buccal morphology in *Orestias* show the existence of possible trophic specialization. In Lake Titicaca, *Orestias* species have chewing and crushing buccal structures associated with a trophic niche reduced to littoral, pelagic and benthic zones, with dietary specialization within the water column (Lauzanne 1982,

Maldonado et al 2009). Although this study has not demonstrated dietary differences due to habit type or taxonomic unit, buccal differences have also been described among the species of the southwest Altiplano. *Orestias chungarensis* has crushing buccal structures, *O. parinacotensis* and *O. laucaensis* have chewing structures and *O. piacotensis* has filtrating structures (Arratia 1982, Vila & Pinto 1986, Vila 2006). These differences cannot be explained by dietary specialization, since the restricted amplitude is more associated with an opportunistic strategy of the species in each environment than with a buccal adaptation to a food type present in the aquatic system.

The dietary differentiation which the species of *Orestias* of the southwest Altiplano allows the suggestion that their opportunist strategy is associated with a capacity to colonize new environments and adapt to the availability of local resources, which would later lead to a differentiation in their buccal morphology.

LITERATURE CITED CHAPTER III

- Arratia, G, 1982. Peces del Altiplano de Chile. In: Veloso, A. & Bustos, E. (eds), El Hombre y los Ecosistemas de Montaña. 93-133. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay.
- Clavero, J.E., S. J. Sparks, E. Polanco & M. Pringle, 2004. Evolution of Parinacota volcano, Central Andes, Northern Chile. *Revista Geológica de Chile* 31: 317-347.
- Colwell, R. & D. J. Futuyma, 1971. On the measurement of niche breadth and overlap. *Ecology* 52:567-572.
- Costa, W.J., 2003. Family Cyprinodontidae (Pupfishes). In: Reis, R.E, Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. (eds), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. 549-554. Edipucrs. Porto Alegre. Brazil.
- Dejoux, C. & A. Iltis, 1991. El Lago Titicaca. Síntesis del conocimiento limnológico actual. ORSTOM. HISBOL.584 pp. La Paz. Bolivia.
- Dorador C., R. Pardo & I. Vila, 2003. Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 15-22.

- Earl, A., J. Fowler & S Dittmann, 2011. Temporal variation in feeding behaviour and trophic ecology of the temperate hemiramphid, *Hyporhamphus melanochir*. *Environmental Biology of Fishes*. 90:71–83.
- Elmer, K R., T.K Lehtonen, A.F. Kautt, C. Harrod & A. Meyer, 2010 a. Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times *BioMedCentral Biology* 8:60.
- Elmer, K.R., S. Fan, H. M. Gunter, J. C. Jones, S. Boekhoff, S. Kuraku & A. Meyer, 2010b. Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology* 19: 197–211(Suppl.1).
- Figueroa, R., C.Valdovinos, E. Araya & O. Parra, 2003. Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad del agua de ríos del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76:275-285.
- Galis, F. & J. Metz, 1998. Why are there so many cichlid species?. *Trends in Ecology & Evolution*.13:1–2.
- Gerking, S.D., 1994. Feeding ecology of fish. Academic Press. Incorporated, San Diego.
- Giralt, S., A. Moreno, R. Bao, A. Sáez, R. Prego, B. Valero-Garcés, J. Pueyo, P. González-Sampériz & C. Taberner, 2008. A statistical approach to disentangle

- environmental forcings in a lacustrine record: the Lago Chungará case (Chilean Altiplano). *Journal of Paleolimnology*.40 (1): 195-215.
- Habets, M., D. Rozen, R. Hoekstra, & J. de Visser, 2006. The effect of population structure on the adaptive radiation of microbial populations evolving in spatially structured environments. *Ecology Letters* 9: 1041–1048.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper & P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Hill & Gauch, 1980. Detrended correspondence analysis: an improved ordination technique *Vegetatio*. vol. 42: 47-58.
- Hyslop, J, 1980. Stomach contents analysis: a review of methods and their application. *Journal. Fish Biology.*, 17:411-429.
- Jadwiszczak. P., 2002. Rndom Project 1.0 Statistical Analysis Software.
- Jongman, R.H.G, C.J.F Ter Braaka & O.F.R. Van Tongeren, 1995. Data analysis in communities and landscape ecology. Cambridge University Press, New York.
- Kornfield, I & P. Smith, 2000. African Cichlid Fishes: Model Systems for Evolutionary Biology. *Annual Review of Ecology And Systematics*. 31:163–96.

- Lauzanne, L., 1982. Les *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) du Petit lac Titicaca. (The *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) of small lake Titicaca. Revue. D'Hydrobiologie. Tropical. 15,39–70.
- Magurran, A., 2004. Measuring biological diversity. Blackwell Science Ltd. USA
- Maldonado E., N. Hubert, P. Sagnes & B. De Mérona, 2009. Morphology–diet relationships in four killifishes (Teleostei, Cyprinodontidae, *Orestias*) from Lake Titicaca. Journal of Fish Biology 74, 502–520.
- Márquez-García, M., I. Vila, L. F. Hinojosa, M.A. Méndez, J. L. Carvajal & M.C. Sabando, 2009. Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano. Limnologica 39 314–318.
- Molina, X. & I. Vila. 2006. Manual de evaluación de la calidad del agua. CENMA. Universidad de Chile. 93 pp.
- Navia, A.F., P. A Mejía-Falla, A. Giraldo, 2007. Feeding ecology of elasmobranch fishes in coastal waters of the Colombian Eastern Tropical Pacific. BioMedCentral Ecology: 7:8.
- Northcote, G.G., 2000. Ecological interactions among an Orestiid (Pisces: Cyprinodontidae) species flock in the littoral zone of Lake Titicaca. In: A.

Rossiter, and H. Kawanabe (eds). Advances in Ecological research: Ancient lakes Biodiversity, Ecology and Evolution: 339-120 Academic Press, N.Y.

Parenti L.,1984a. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae. Bulletin of the American Museum of Natural History, 178: 107-214.

Parenti, L., 1984b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept, En: Echelle, A.A. & Kornfield, I. (eds), 85-92. Evolution of Fish Species Flocks. Univ. of Maine Press, Orono, Maine,

Pianka, E. R., 1974. Niche overlap and diffuse competition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. 71: 2141-2145

Riveros, J., M. Mendez & I. Vila, 2010. Trophic niche of *Orestias agassii* (Cuvier & Valenciennes, 1846) in the streams system of Salar de Huasco (20°05's; 68°15'w). Gayana in press.

Ruber & Adams, 2001 Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. Journal of Evolutionary Biology. 14: 325-332.

Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. Trends in Ecology and Evolution 16,372-380.

Scharnweber, K. M. Plath, K. O. Winemiller, M. Tobler, 2011. Dietary niche overlap in sympatric asexual and sexual livebearing fishes *Poecilia spp.* *Journal of Fish Biology* 79, 1760–1773.

Turner, G.F., 2007. Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*. Vol. 17 (19): R827-R831.

Sáez, A, B .Valero-Garcés, A. Moreno, R. Bao, J. Pueyo, P. González-Sampériz, S Giralt, C. Taberner, C. Herrera & Gibert R., 2007. Lacustrine sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungará (northern Chile). *Sedimentology* 54:1191-1222.

Vila, I. & M. Pinto, 1986. A new species of killifish (pisces: Cyprinodontidae) from the chilean altiplano. *Revue d'hydrobiologie tropicale*. 19 (3/4): 233-239.

Vila, I., 2006. A new species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia*. 3:471-476.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Second edition. Prentice-Hall, Inc. New York.

Zares, T.M. & A.S. Rand, 1971. Competition in tropical stream fishes: support for the competitive exclusion principle. *Ecology* 52:336-342.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Christian Ibañez for help in data analysis, and Marco Mendez, Michel Sallaberry and Sergio Scott for their assistance in field trips and collection of individuals. This study was financed by Fondecyt Projects 1080390 and 1110243. To the Instituto de Ecología y Biodiversidad, and the Comisión Nacional Científica y Tecnológica D-20107004 Fellowship for Doctoral Studies in Chile 2007-2011.

CAPITULO IV
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL GÉNERO ORESTIAS DEL
ALTIPLANO SUR OESTE CHILE

4.1. INTRODUCCIÓN

Desde Darwin, el estudio de los ambientes aislados (islas) y de las poblaciones que los habitan ha contribuido mucho al desarrollo de las teorías Evolutivas y Ecológicas (Losos & Ricklefs 2009). En muchos aspectos, los lagos son el equivalente acuático de las islas por su pequeño tamaño, los límites bien definidos, la biota simplificada y el aislamiento geográfico. Además, en muchos casos, el conocimiento de la historia geológica hace de estos sitios buenos modelos para estudiar la diversificación de los taxa que los habitan (Savolainen et al 2006, , Losos & Ricklefs 2009).

El aislamiento que presentan estos sistemas acuáticos permite que ciertos linajes colonizadores puedan evolucionar rápidamente *in situ*. En efecto, los lagos han sido sistemas que han permitido estudiar procesos de especiación simpátrica en especial en peces (Kocher 2004, Salzburger et al 2004, Elmer et al 2010 a y b, Kai et al 2011) ya que permiten analizar las variaciones tróficas y morfológicas de los linajes que faciliten la divergencia aún compartiendo un mismo lugar.

Por otro lado, los ambientes acuáticos fragmentados (lagos, salares, ríos endorreicos) también pueden ser laboratorios naturales que permiten evidenciar procesos de especiación alopátrica, debido a que esta separación potenciaría la división de las

poblaciones (Jarne y Delay, 1991, DeJong et al 2003). En especies de agua dulce se han propuesto que varios factores (e.g., hábitat, demográficos, rasgos de historia de vida, reproductivos) pueden explicar la diversidad de especies y la diferenciación que ocurre dentro y entre las poblaciones (Liu et al 2003, Collado 2010).

Entre los grupos de organismos acuáticos bien estudiados con respecto a su aislamiento son los peces de la familia *Cichlidae*. En los grandes lagos Africanos estos peces habrían colonizado y especiado rápidamente. Estas radiaciones se habrían terminado con la formación de una gran cantidad de especies con características morfológicas diferentes dentro de un mismo lugar. (Rüber et al 1999, Kocher 2004, Elmer et al 2011). En linajes antiguos, ciertos caracteres han permitido caracterizar varios complejos de especies, mientras poblaciones en estado incipiente de especiación pueden no presentar variación morfológica entre ellas, pero si variación genética, ejemplo son el caso de cíclidos de linajes diferentes pero con fenotipos similares (Johns & Avise 1998 Losos et al 2009, Kocher 2004, Kai & Nakabo 2002, Kai et al 2011).

En Suramérica, los sistemas hídricos del Altiplano suroeste, representan un buen modelo de hábitats aislados ya que corresponden a remanentes de lagos y ríos Pleistocénicos (Saez et al 2007, Moreno et al 2009). Actualmente los sistemas están aislados entre ellos y con una marcada diferenciación en su composición química (Keller & Soto, 1998; Risacher et al. 2003; Placzek et al, 2009) que han limitado el tipo y rango de distribución de la biota (Marquez et al 2009). La ictiofauna endémica que habita los sistemas acuáticos del Altiplano pertenecen a dos géneros: *Orestias* y

Trichomycterus (bagres). *Orestias* Valenciennes, 1839 se caracteriza por ser un ensamble de especies endémicas de los sistemas lacustres y lóticos que son geográficamente restringidos a cuencas endorreicas (Lauzanne 1982, Parenti 1984a). Parenti 1984, identificó diferentes complejos basados en variaciones morfológicas dentro del lago Titicaca. En contraste, solo especies del complejo *agassii* se encuentran fuera del lago Titicaca, caracterizadas por variaciones morfológicas que han sido la base de su taxonomía (Arratia 1982, Parenti 1984, Lussen 2003, Vila et al, 2010).

En poblaciones aisladas, como son las especies de *Orestias* del Parque Nacional Lauca (Arratia 1982, Parenti 1984b Vila et al 2010), las variaciones morfológicas estarían relacionadas con los procesos vicariantes a los que habrían sido sometidas, mostrando diferencias entre ellas (de Queiroz & Good, 1997). Ejemplo de esto, son las diferencias en la boca, *O. laucaensis* y *O. parinacotensis* presentan la boca en posición terminal e inclinación posteroventral (Arratia 1982). Por el contrario *O. piacotensis* y *O. chungarensis* presentan la boca levemente protráctil ubicada ligeramente hacia arriba (Vila & Pinto, 1986, Vila 2006). Estas diferencias bucales podrían relacionarse con las variaciones en el recurso que presentan los diferentes sistemas en donde habitan que le permitieron evolucionar en morfotipos diferentes (Arratia, 1982, Parenti 1984, Ruiz et al, 2004, Vila et al 2010, Scott 2010).

Sin embargo, se ha observado que estas especies presentan variaciones morfológicas en los estados ontogénicos que puede generar equivocaciones al definir especies (Villwock & Sienknecht 1995), además que algunas de estas especies comparten

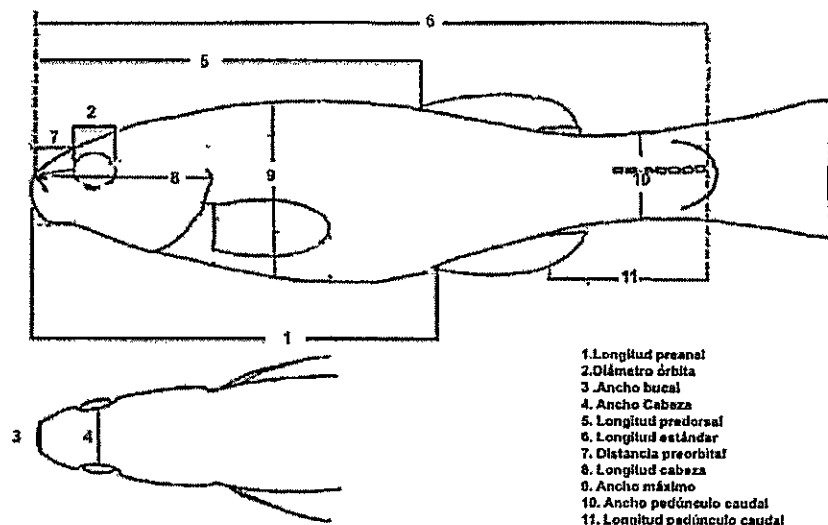
características diagnósticas (Arratia 1982). Esta baja variación morfológica es característica de especies en estado incipiente de especiación, debido a que el tiempo de separación es muy corto, algunos caracteres no han llegado a diferenciarse totalmente y por lo tanto se observan características similares entre los diferentes morfotipos (Arratia 1982, Parenti 1984, Lussen et al 2003, Kocher 2004, Elmer et al 2010 Vila et al 2010).

Debido a que las variaciones morfológicas de las diferentes especies nominales de *Orestias* en el PNL, podrían ser producto de los efectos alopátricos sucedidos en la zona en un tiempo geológico reciente (12500 años). El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológicamente lo individuos de las diferentes localidades y asignarlos a las especies nominales de *Orestias* del PNL, basado en las medidas morfométricas y merísticas. Se espera que las características morfológicas presenten variación entre especies de acuerdo al ambiente donde viven.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

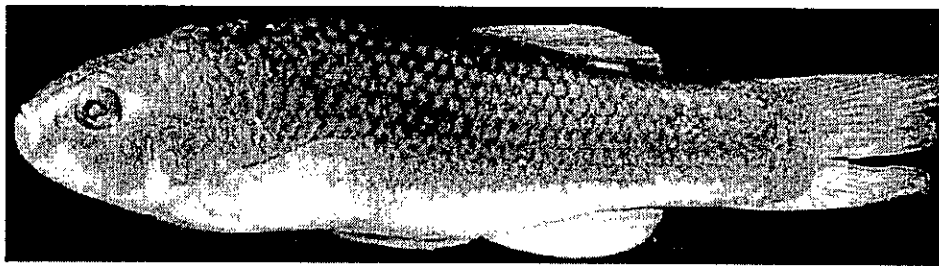
Se capturaron por pesca manual 145 especímenes adultos de *Orestias* pertenecientes a diferentes especies en el Bofedal de Parinacota (*O. parinacotesis* N=21: 17 machos y 4 hembras), en el Lago Chungará (*O. chungarensis* N= 15: 7 machos y 8 hembras), en la laguna de Piacota (*O. piacotensis* N=31: 25 machos y 6 hembras) en los bofedales de Copapujo- Chuviri (*Orestias sp* N= 38: 25 machos y 13 hembras), en río Lauca y las lagunas de Cotacotani (*O. laucaensis* N= 26: 21 machos y 25 hembras) y en el bofedal de Ancuta (*O.sp* N=14: 6 machos y 8 hembras). Debido a que el género *Orestias* presenta dimorfismo sexual, donde las hembras son mas grandes que los machos y además el número de hembras colectadas por localidad fue bajo, en comparación con los machos; los análisis morfológicos se hicieron solo con los machos colectados.

Para este estudio, 11 mediciones lineales fueron realizadas para cada individuo mediante un calibrador digital. Las variables morfológicas medidas fueron: la longitud predorsal (LP), longitud preanal (LPA), longitud de la cabeza (LC), altura de la cabeza (HC), altura máxima (HM), longitud del pedúnculo caudal (LPC), altura del pedúnculo caudal(HPC), diámetro de la orbita ocular(DO), ancho bucal (HB) y distancia preorbital (DPO) (Figura 4.1). Para los análisis merísticos se realizaron recuento de las escamas de la línea lateral (EL), número de rayos en las aletas dorsal (RD), aleta anal (RA), aleta pectoral (RP) y aleta caudal (RC) (Lauzzane 1982). Todas las medidas fueron realizadas por el mismo investigador .



1. Longitud preanal
2. Diámetro órbita
3. Ancho bucal
4. Ancho Cabeza
5. Longitud predorsal
6. Longitud estándar
7. Distancia preorbital
8. Longitud cabeza
9. Ancho máximo
10. Ancho pedúnculo caudal
11. Longitud pedúnculo caudal

a.



b.

Figura 4.1. a. Mediciones morfológicas analizadas en las especies de Orestias. b. Ejemplar de Orestias del complejo agassii (Modificado de Lauzzane 1982).

Para remover el efecto del tamaño, los caracteres morfológicos fueron estandarizados de acuerdo a la ecuación alométrica de Thorpe (1976).

$$\hat{Y}_i = \log_{10} Y_i - \left[\beta \left(\log_{10} X_i - \log_{10} \bar{X} \right) \right]$$

Donde \hat{Y}_i es la medida logarítmica ajustada de cada *ith* individuo.

Y_i es la variables sin ajustar del *ith* individuo

β = es el coeficiente de regresión de Y y X

X_i = es la longitud estándar de cada *ith* individuo

\bar{X} = es la longitud estándar promedio por especie.

El coeficiente β fue evaluado mediante un análisis de regresión lineal simple entre la longitud estándar (LS) y cada variable morfológica (Thorpe 1976, Shaefer 1991, Ferrito et al. 2007, Konan et al. 2010).

Para cada medida morfométrica y merística se estimaron los estadísticos descriptivos (promedio, desviación estándar, máximos y mínimos, y coeficiente de variación (CV%) .

Para evaluar la existencia de diferencias morfológicas entre especies nominales, se realizó un Análisis Discriminante (DA) sobre el conjunto de individuos analizados. Las variables discriminatorias fueron probadas con diversos test de significancia (lambda Wilkis, traza de Pillai y Roy). Para el análisis, cada individuo fue asignado a una especie nominal, de acuerdo a las descripciones de Parenti 1984a, Arratia 1982, Vila & Pinto 1986 y Vila 2006. Se calculó la matriz de asignamiento por cada especie para evaluar la certeza del análisis discriminante. Y se graficaron las raíces canónicas con mayor contribución a la varianza.

4.3. RESULTADOS

101 machos individuos fueron analizados, clasificados por especie nominal y localidad. La longitud estándar entre los machos de las especies osciló entre 34 (SD:5.10) mm para *Orestias sp* de la localidad de Ancuta y 25 mm (SD:2.57) para *O. chungarensis* del Lago Chungará. La mayor variación en la longitud estándar (valor mínimo 18 mm y máximo 42 mm) la presentó *O. parinacotensis* del bofedal de Parinacota. Y la menor fue con los individuos del Lago Chungará (*O. chungarensis*) (Tabla 1)..

*Tabla 4.1. Estadísticos descriptivos de la Longitud estándar en las diferentes especies de Orestias. *: O. sp localidad Copapujo-Chuviri. S.D: Desviación estándar. N: Número de individuos.*

Especies	Machos				
	Promedio	Mínimo	Máximo	S.D	N
<i>O. laucaensis</i>	32,23	23,80	39,57	4,41	21
<i>O. parinacotensis</i>	30,96	18,70	42,80	8,09	17
<i>O. piacotensis</i>	26,45	16,00	36,00	4,22	25
<i>O. chungarensis</i>	24,99	22,00	29,60	2,57	7
<i>O. sp *</i>	32,61	19,54	42,13	5,91	25
<i>O. sp Ancuta</i>	34,36	26,92	38,61	5,10	6

En la tabla 4.2 se muestran los valores promedio de las variables merísticas para cada

especie nominal. Los valores H (*Kruskal-Wallis test*: (5,N=101) fueron significativos en todas las variables. En las comparaciones múltiples entre las diferentes especies nominales y cada variable merística, se obtuvo que *Orestias sp* de Copapujo-Chuviri fue significativamente diferente en todas las mediciones merísticas con las demás especies nominales. Con respecto a los radios caudales se observó diferencias entre *O. parinacotensis* del bófedal de Parinacota con *O. laucaensis*, *O. sp* de Copapujo-Chuviri y *O. sp* de Ancuta.

En las medidas morfológicas en las cinco especies nominales analizadas, el mayor coeficiente de variación lo presentó la variable distancia preorbital (DPO) de *O. parinacotensis* (CV= 45,18%) y el menor (CV=10.1%) la variable ancho bucal (HB) para *Orestias sp.* de Ancuta.

En el análisis discriminante, de las 11 variables morfológicas analizadas, 5 fueron significativas para diferenciar entre las especies (Tabla 4.3). Estas son: el ancho de la cabeza ($\lambda=0,086$;F=4,26;p<0.001), el ancho bucal ($\lambda=0,089$;F=4,94;p<0.001), la longitud preanal ($\lambda=0,011$;F=9,52;p<0.0001), el ancho del pedúnculo caudal ($\lambda=0,091$;F=5,38;p<0.0001), la distancia de la órbita ($\lambda=0,0878$;F=4,60;p<0.001) (Tabla 4.3).

Tabla 4.2. Valores promedio de las variables merísticas en la especies nominales de *Orestias* con su valor *H* asociado (Kruskal-Wallis test: (5,N=101). *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

Medidas Merísticas	<i>Orestias. laucaensis</i>	<i>Orestias. parinacotensis</i>	<i>Orestias. piacotensis</i>	<i>Orestias. chungarensis</i>	<i>Orestias. sp Chuviri-Copapujo</i>	<i>Orestias. sp Ancuta</i>	H
	N=21	N=17	N=25	N=7	N=25	N=6	
Radios dorsal	13.05(1.47)	13.00(1.77)	13.44(2.45)	12.14(1.77)	11.68(1.18)	13.17(0.41)	18.77**
Radios pectoral	14.29(1.10)	15.47(1.33)	14.28(1.90)	13.57(1.62)	13.28(1.49)	13.83(0.41)	21.56***
Radio anal	13.24(1.55)	13.88(1.69)	13.88(1.76)	14.43(2.70)	12.72(1.43)	14.00(0.00)	12.93*
Radio caudal	24.10(4.09)	29.00(2.26)	25.96(2.26)	24.71(2.63)	24.56(2.57)	22.17(0.41)	37.10***
Escamas lateral	26.86(6.97)	30.12(3.84)	27.32(5.21)	26.57(3.05)	25.44(5.24)	33.17(0.98)	17.04**

Tabla 4.3. Funciones discriminantes para las variables morfométricas de las especies nominales de *Orestias*, en el PNL., LPA: longitud preanal, LC: longitud de la cabeza, HC: ancho de la cabeza, HPC: ancho del pedúnculo caudal ,DO: distancia de la órbita HB: ancho bucal.

Variables	Wilks'Lambda	F		
		(-6,99)	P	Tolerancia
LPA	0,11	9,52	***	0,82
LC	0,09	5,89	***	0,62
HC	0,09	4,26	***	0,60
HPC	0,09	5,38	***	0,64
DO	0,09	4,60	***	0,57
HB	0,09	4,94	***	0,56

***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$

En el análisis de asignamiento de los individuos de las diferentes localidades, los grupos mejor definidos fueron *Orestias sp* de Copapujo – Chuviri (88%). Seguido por *O. laucaensis* (76%), *Orestias piacotensis* (72%) y *Orestias parinacotensis* (71%) (Tabla 4.3). Por el contrario, *O. sp* de Ancuta se asignaron el 67% de los individuos para *O. laucaensis* y el 33% a *O. sp* de Copapujo – Chuviri (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Resultados del análisis discriminante de los caracteres morfológicos de las especies de *Orestias*. (): Número de individuos clasificados y su respectivo porcentaje de asignación en cada especie.

	N	<i>Orestias laucaensis</i>	<i>Orestias parinacotensis</i>	<i>Orestias piacotensis</i>	<i>Orestias chungarensis</i>	<i>Orestias sp Copapujo y Chuviri</i>	<i>Orestias sp Ancuta</i>
<i>Orestias laucaensis</i>	21	76% (16)	0	4,7% (1)	0	19% (4)	0
<i>Orestias parinacotensis</i>	17	0	71% (12)	0	11% (2)	18% (3)	0
<i>Orestias piacotensis</i>	25	16% (4)	4% (1)	72% (18)	0	8% (2)	0
<i>Orestias chungarensis</i>	7	0	0	42,9% (3)	14% (1)	42,9% (3)	0
<i>Orestias sp Copapujo y Chuviri</i>	25	4% (1)	0	4% (1)	4% (1)	88% (22)	0
<i>Orestias sp Ancuta</i>	6	66,7% (4)	0	0	0	33,3% (2)	0%

El análisis de asignamiento de los diferentes individuos de acuerdo a los grupos genéticos fueron asignados correctamente los individuos al grupo Lauca, Parinacota y Piacota. Por el contrario Chungará presento asignamiento a Lauca y Piacota (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Resultados del análisis discriminante de los caracteres morfológicos con respecto a los grupos genéticos. (): Número de individuos clasificados y su respectivo porcentaje de asignación en cada grupo.

	N Machos	Lauca	Parinacota	Piacota	Chungará
Lauca	46	93% (43)	0	4%(2)	2%(1)
Parinacota	17	18%(3)	71% (12)	0	11%(2)
Piacota	25	24%(6)	4%(1)	72% (18)	
Chungará	7	42,9%(3)	0	42,9%(3)	14%(1)

Las dos primeras raíces canónicas constituyen el 90% de la varianza total (71% y 19%). La primera raíz canónica estuvo determinada por la longitud preanal (0,56), longitud de la cabeza (0,37) y ancho del pedúnculo caudal (0,36) ($\lambda_1 = 0,37$; $\chi^2 = 101,76$; $gl=25$; $p<0.0001$). Para la segunda raíz canónica ($\lambda_2 = 0,74$; $\chi^2 = 29,97$; $gl=16$; $p<0.01$) las variables que la definieron fueron: ancho bucal (-0,87), longitud de la cabeza (0,69) y longitud preanal (-0,55). La ordenación de los individuos con las dos raíces canónicas (Figura 4.2) ubicó a *O. parinacotensis* como un grupo separado del resto de las especies. Y *Orestias. sp* de la localidad de Ancuta mostró sobrelapamiento con las otras especies.

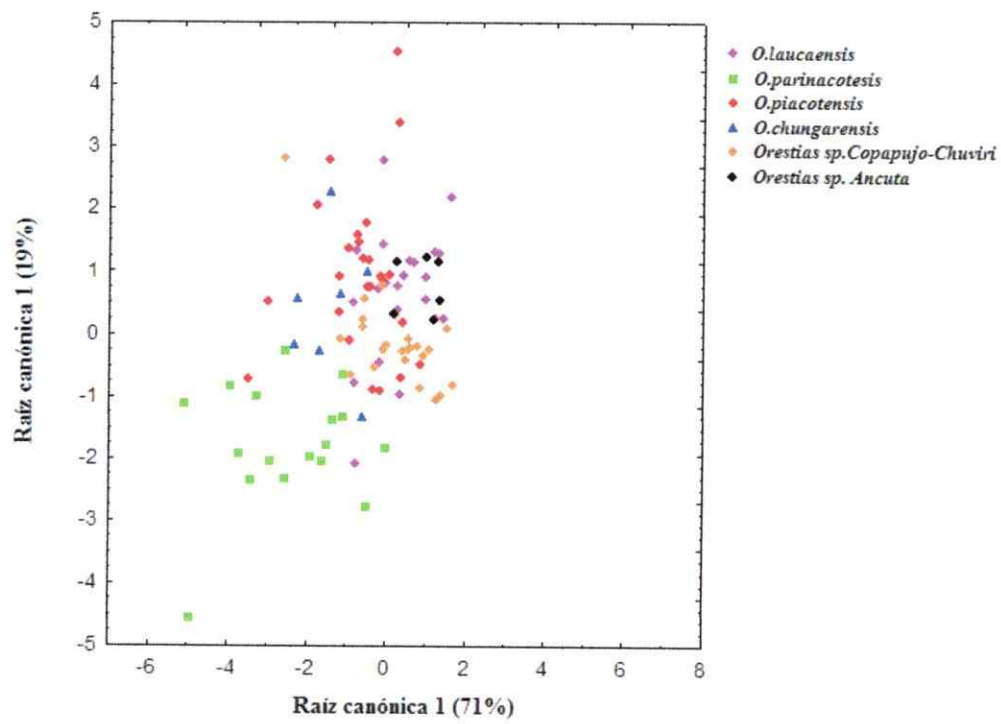


Figura 4.2. Bi-plot de las dos raíces canónicas más importantes del análisis discriminante para los machos de las diferentes especies de *Orestias*.

4.4. DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que entre las especies nominales del Parque Nacional Lauca, las características de variación están centradas en la cabeza, (distancia preorbital y ancho bucal). Esta variación podría ser dependiente del ambiente, el cual ofrece un tipo de recurso que podría facilitar la adaptación por medio del cambio en la estructura de la cabeza. Se ha descrito que especies de *Orestias* que viven en bofedales se caracterizan por tener estructuras bucales de tipo trituradora de litoral con dieta asociada las macrófitas de borde costero (Arratia 1982; Vila & Pinto 1986; Vila 2006). Casos similares se presentan en los cíclidos Cyprichromini en la Lago Tanganyika, en África; esta tribu presenta una baja variación en la morfología en comparación con las otras tribus de los cíclidos, que estaría en relación al tipo de dieta planctotrófica que presenta (Hoerner 2011).

Para las especies del PNL, *Orestias. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis* presentan un alto porcentaje de correcta clasificación, lo que significa que las características morfológicas son coincidentes con las descripciones de Arratia 1982, Parenti 1984 y Vila & Pinto 1986. *Orestias. chungarensis* se observa una baja clasificación de los individuos a esta especie nominal, lo que puede deberse al bajo número de ejemplares analizados. Aunque para la mayoría de las especies nominales los caracteres discriminantes no son diagnósticos para las especies (Arratia 1982, Scott 2010). De acuerdo con Arratia (1984) las descripciones morfológicas pueden tener solapamiento entre las medidas y por lo tanto generar errores en la

clasificación (Arratia, 1982; Parenti 1984; Vila & Pinto 1986; Vila 2006).

Para *O. sp* tanto para la localidad de Ancuta se presenta una baja correcta clasificación, lo que podría deberse en primer lugar a que el número de individuos analizados es bajo (6), además es importante aclarar que la localidad de Ancuta es un afluente del río Lauca y posiblemente esta población presenta fenotipos parecidos a *O. laucaensis*. Sin embargo, análisis moleculares muestran una separación entre *O. sp* y *O. laucaensis* de ocho pasos mutacionales que constituyen a Ancuta como una unidad evolutiva diferente, relacionado con el proceso de colonización de los ríos y lagos Bolivianos hacia el este del Altiplano. (Capítulo 2). En este caso, las variables morfológicas no habrían cambiado entre las localidades cercanas, ya que estos dos lugares (Lauca y Ancuta) presentan características ecológicas similares que permite que ciertos caracteres morfológicos sean similares. Así mismo, en los cíclidos se han observado características morfológicas similares que corresponden a linajes diferentes y que están relacionados con los diferentes procesos de colonización de los Lagos de África (Danley & Kocher 2001, Kocher 2004, Elmer et al 2010).

En peces, se ha argumentado que la diversificación morfológica puede darse en escalas de tiempo cortas, gatillado por los cambios en los nichos ecológicos (Schluter 1996; Elmer et al 2010). En la región del altiplano suroeste, los sistemas hídricos se caracterizan por ser lagos pequeños, ríos de baja profundidad y bofedales con variaciones en sus niveles de agua dependiendo de la precipitación (Sáez et al 2007, Giralt et al 2008, Placzek et al 2009), que representan cambios ecológicos mayores en su nicho para la especie ancestral que colonizo esta zona proveniente del Lago

Titicaca (Lüssen et al 2003, Barret et al 2007, Elmer et al 2010). Diversos autores han relacionado los cambios de hábitat con los diversos patrones de radiación y mecanismos de especiación (Kornfield & Smith 2000, Elmer et al 2010). Los repetidos cambios en los niveles de los lagos pueden crear nuevas oportunidades de aislamiento en alopatría que podrían favorecer diferencias en la forma del cuerpo en diferentes poblaciones, (Sturmbauer 1998, Kornfield & Smith 2000, Kocher 2004). Esta separación permitiría el inicio de la diferenciación morfológica entre *Orestias chungarensis*, *O. parinacotensis* y *O. laucaensis*, en donde ciertas características permiten discriminar las especies entre ellas, pero el tiempo de separación es muy corto para que estas diferencias se manifiesten en caracteres diagnósticos para las especies.

Agradecimientos:

Dr. Christian Ibáñez del Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad de Chile por su asesoría estadística y análisis tróficos. A Los Doctores Marco Méndez académico de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Michel Sallaberry, Sergio Scott por su apoyo en las salidas a terreno y colecta de los individuos. Proyecto Fondecyt 2010: 1080390-2011: 1110243 y al Instituto de Ecología y Biodiversidad de Chile IEB por su apoyo financiero.

LITERATURA CITADA CAPITULO IV

Arratia G. 1982 *Peces del Altiplano de Chile*. In: Veloso, A. & Bustos, E. (eds), El Hombre y los Ecosistemas de Montaña. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay, pp 93-133.

Barrett R.D.H., Schluter D. 2007. Adaptation from standing genetic variation. *Trends Ecol Evol*, 23: 38-44.

Collado G.A 2010. Relaciones filogenéticas y biogeografía histórica de los caracloes de agua dulce del genero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Mollusca: Planorbidae) en el altiplano sur. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Danley P. D., & Kocher T. D. Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Mol. Ecol.* 10,1075–1086

DeJong, R.J., Morgan, J. A. T., Paraense, L., Pointier J.P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P. F. K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Brémond, P., Canese, A. P., de Souza, C. P., Dominguez, C., File, S. Gutierrez, A., Incani, R. N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N. J. S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J. N., Sene, M., Vela'squez, L. E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B. V., Mkoji, G. M. & Loker, E. S. 2001. Evolutionary relationships and biogeography of

Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 2225–2239.

de Queiroz, K., D. A. Good. 1997. Phenetic clustering in biology: A critique. *Q. Rev. Biol.* 72:3–30.

Elmer K. R., Lehtonen T. K., Kautt A.F., Harrod C.,Meye A. 2010. Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times *.BMC Biology* 2010, 8:60

Ferrito V., Mannino M.C., Pappalardo A.M., Tirano C. 2007. Morphological variation among populations of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Teleostei, Cyprinodontidae) from the Mediterranean. *J. Fish Biol.* 70, 1–20.

Giriat S. Moreno A. Bao R. Sáez A. Prego R. Valero-Garcés B. Pueyo J. González-Sampériz P. Taberner C. 2008. *A statistical approach to disentangle environmental forcings in a lacustrine record: the Lago Chungará case (Chilean Altiplano).* *J Paleolimnol.*40(1): 195-215.

Hoerner M. E.2011. Testing for differences in rates of speciation, extinction, and morphological evolution in four tribes of cichlids endemic to lake tanganyika, east Africa. *Evolution* 65-12: 3398–3412.

Jarne P, Delay B 1991. Populations genetics of freshwa- ter snails. Tree 6: 383-386.

Johns G.C, Avise J.C.1998. Test for ancient species flocks based on molecular phylogenetic appraisals of *Sebastes rockfishes* and other marine fishes. Evolution 52:1135–1146.

Kai Y., Nakayama K., Nakabo T. 2011. Genetic and morphological divergence within the *Sebastes pachycephalus* complex (Scorpaeniformes: Scorpaenidae). Ichthyol. Res. 58:333–343.

Keller B., Soto D. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 71, 147–156.

Kocher T. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. Nature :Vol 5: 288-298.

Konan K. M., Adépo-Gourène A. B., Ouattara A., Nyiny W.D., Gourène G. 2010 Morphometric variation among male populations of freshwater shrimp *Macrobrachium vollenhovenii* Herklots, 1851 from Côte d'Ivoire Rivers. Fisheries Research 103 1–8.

Kornfield I. P. Smith (2000) African Cichlid Fishes: Model Systems for Evolutionary

Biology .Annu. Rev. Ecol. Syst. 31:163–96.

Lauzanne, L., 1982. Les *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) du Petit lac Titicaca. (The *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) of small lake Titicaca. In French). *Revue. D' Hydrobiologie. Tropical.* 15, 39–70.

Liu H. P., Hershler R. Clift K. 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail. *Molecular Ecology*, 12, 2771–2782.

Losos JB, Ricklefs RE: **Adaptation and diversification on islands.** *Nature* 2009, 457: 830-836.

Lüssen A; Falk Thomas M, Villwock Wolfgang. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:151–160.

Márquez-García M, Vila I, Hinojosa L F. Méndez M.A. Carvajal J L. Sabando M.C. 2009 *Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano* *Limnologica* 39: 314–318.

Moreno A. Santoro C. M. Latorre C. 2009. Climate change and human occupation in the northernmost Chilean Altiplano over the last ca. 11 500 cal. a BP. *Journal of*

Parenti L. 1984a. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (*Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae*). *Ibid*, 178:107-214.

Parenti L. 1984b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept, In: Echelle, A.A. & Kornfield, I. (eds), *Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. of Maine Press, Orono, Maine, 85-92.

Placzek C. Quade J, Rech J A. Patchett P.J. Pérez de Arce C 2009 Geochemistry, chronology and stratigraphy of Neogene tuffs of the Central Andean region. *Quaternary Geochronology* 4:22–36.

Risacher, F., Alonso, H. & Salazar, C. (2003). The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews*, 63, 249–293.

Ruiz V., Marchant M. 2004 Ictiofauna de aguas continentales chilenas. Universidad de Concepción. Departamento de Zoología.

Rülber L. Verheyen E. §, Meyer A. 1999. Replicated evolution of trophic specializations in an endemic cichlid fish lineage from Lake Tanganyika. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 10230–10235.

Saez A., Valero-Garces B. L., Moreno A., Bao R., Pueyo J. J., Gonzalez-Samperiz P., Giralt S., Taberner C., Herrera C., Gibert R. O. 2007. Lacustrine

sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungara' (Northern Chile) *Sedimentology* 54, 1191-1222

Salzburger W., & Meyer A. 2004. The species' flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Denkschr. Schweiz. Akad. Natwiss.* 91:277-290

Savolainen V., Anstett M. C., Lexer C., Hutton I., Clarkson J.J., Norup M.V., Powell M. P., Springate D., Salamin. & Baker W.J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*. Vol 44: 210-213.

Schaefer K. M. 1991. Geographic Variation in Morphometric Characters and Gill-Raker Counts of Yellowfin Tuna *Thunnus albacares* from the Pacific Ocean. *Fishery Bulletin, U.S.* 89:289-297 (1991).

Scott.S. 2010. Sistemática y Filogenia de *Orestias* del complejo *agassizii* (Teleostei: Cyprinodontidae) en la Puna. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Thorpe, R.S., 1976. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. *Biol. Rev.* 51, 407-452.

Vila & Pinto 1986. A new species of killifish (pises: Cyprinodontidae) from the Chilean altiplano *Revue d'hydrobiologie tropicale*: 19 (3-4): 233-239.

Vila, I. 2006. A new species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia*, 3:471-476.

Vila I, Scott S, P-Iturra, Mendez M, 2010. Kariological and morphological analysis of divergence among species of the killifish genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern Altiplano origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleost. (J.S Nelson HP Schltse & H Wilson, eds) pp 471-489.

Villwock, W. Sienknecht, U. 1995 Intraspezifische Variabilität im Genus *Orestias Valenciennes 1839* (Teleostei: Cyprinodontidae) und zum Problem der Artidentität. – *Mitt. Hamburg. Zool. Mus. Inst.* 92: 381-398.

CAPITULO V

DISCUSION GENERAL

La especiación es un proceso complejo que integra múltiples componentes, como son los ecológicos, ambientales, morfológicos, genéticos, etc., los cuales interactúan de manera no lineal (Gravilets 2003). En la especiación, los procesos ecológicos son importantes puesto que las especies incipientes aparecen en diferentes ambientes o utilizan diferentes recursos (Schluter 2000, Wiens 2004). En este contexto, la influencia en la partición de los recursos, en particular en los peces, podría explicar la magnitud del solapamiento de nicho; se ha encontrado que el primer recurso que es fraccionado es la comida seguido por el hábitat (Wiens 2004, Navia et al 2007, Scharnweber et al 2011).

En alopatría los nuevos ambientes estarían relacionados con los eventos vicariantes, en este caso las condiciones ambientales han sido variadas con respecto al nicho ecológico ancestral, refiriéndose a las condiciones abióticas y bióticas en las cuales las especies son capaces de sobrevivir, reproducirse y mantener un número poblacional viable (Brow & Lomolino 1998, Wiens 2004), lo que potenciaría la división de las poblaciones (Jarne y Delay, 1991, Brow & Lomolino 1998, DeJong et al 2003, Wiens 2004). En este caso, los individuos mostrarían una estrategia trófica generalista por la ausencia de competencia interespecífica (Scharnweber et al, 2011), además de un amplio nicho trófico en función a la disponibilidad del recurso. Igualmente, ésta pérdida de conexiones entre los diferentes ambientes, favorecería el

mantenimiento de ciertas características morfológicas adaptadas al ambiente restringido en que viven. Esta baja variación se ha evidenciado en grupos de especies de cíclidos con características morfológicas similares que pertenecen a linajes separados que habrían colonizado los lagos Africanos en diferentes tiempos (Elmer et al 2010).

Por el contrario, en Simpatría, las condiciones de competencia promueve la escogencia diferencial del recurso, lo cual se evidencia en una especialización dietaria y un nicho trófico reducido de las poblaciones en proceso de divergencia. Estudios en diversos grupos de organismos en particular en peces, han mostrado que la separación de las poblaciones estaría relacionada con variaciones en salinidad y temperatura en los diferentes hábitats acuáticos. En los cíclidos se ha observado que las variaciones en el recurso facilitó la separación de las poblaciones dentro del mismo lago, mediante la formación de características morfológicas que permitieron la adaptación a nuevos hábitats. Otro caso similar es el género *Ictiobus* (peces búfalo) en Norteamérica, cuyas variaciones morfológicas estarían relacionadas con el hábitat donde se encuentran (ríos o lagos) formando nuevas especies (Bart et al 2010).

En este contexto, nuestros resultados mostraron que a nivel ecológico (análisis trófico), las diferentes especies nominales de *Orestias* no presentarían una diferenciación ecológica como tal, sino más bien un tipo de separación que se reflejó en un bajo solapamiento de nicho entre las diferentes localidades, que podría estar ligado a los diferentes ambientes donde habitan. Aunque las diferencias entre la

amplitud de nicho podrían estar asociado con una especialización trófica de cada especie nominal, los resultados de *O. laucaensis* de las tres localidades muestreadas, no mostraron solapamiento entre ellas ni con las otras especies; por lo tanto, esta amplitud trófica no estaría relacionada con una especialización sino mas bien con una estrategia trófica en relación a la disponibilidad del recurso. Esta estrategia ecológica puede ser la explicación de la capacidad de colonización del género en diferentes ambientes, como son los bofedales, ríos, lagunas y lagos que presenta el Parque Nacional Lauca (PNL), los cuales presentan composición trófica diferente asociada a los factores abióticos (físicoquímicos) de cada sistema.

Por otro lado, a nivel morfológico, las especies nominales no muestran una clara separación para que sean características diagnósticas entre ellas. Esta baja variación puede explicarse porque el tiempo de separación es muy corto (12.500 años) para que estas diferencias se manifiesten como caracteres diagnósticos para la especies. Se ha observado en diversos estudios que las variaciones morfológicas estarían relacionadas con Simpatría, donde los cambios morfológicos ayudarían a colonizar nuevos hábitats (Kocher 2004, Elmer et al 2010). Por el contrario, en alopatría la tendencia sería a mantener ciertos caracteres debido a que no hay una fuerte presión selectiva o competencia. En nuestro caso se observa que la baja diferenciación morfológica que presentan las especies nominales estaría relacionada con el mantenimiento de ciertos caracteres morfológicos que favorecerían la amplia capacidad trófica que tiene este grupo para adaptarse a diferentes ambientes (lagos, bofedales, ríos).

En un contexto genético, los procesos de especiación estarían relacionados con la diferenciación genética entre las poblaciones. En Alopatria, las barreras físicas favorecerán la estructuración poblacional y con el tiempo la especiación. Nuestros resultados mostraron índices de diferenciación genética altos, significativos y similares entre los marcadores mitocondriales y nucleares en todas las localidades del PNL. Dentro de las localidades del PNL los resultados mostraron la existencia de varios grupos genéticos que coinciden con las fragmentación de los sistemas acuáticos por el los eventos volcánicos y climáticos, originando sistemas cerrados como el lago Chungará, la laguna de Piacota y las lagunas de Cotacotani (Sáez et al 2007, Giralt et al 2008).

Los cambios que ha tenido el PNL, habría impactado sobre la fauna ictica fragmentando las poblaciones y por lo tanto generando una drástica pérdida de diversidad genética. (Morales et al 2011). Una vez que las poblaciones son separadas, estas comienzan a expandirse y generar nuevos haplotipos. Estos eventos demográficos se aprecian en las redes de haplotipos y se detectan a través de análisis de inferencia demográfica, donde los grupos genéticos Chungará, Piacota, Lauca y Chuviri-Copapujo muestran señales de expansión.

A pesar que las localidades muestran señales de expansión, la pérdida de diversidad genética asociada al los eventos vicariantes del Pleistoceno-Holoceno, afectó de manera diferencial los diferentes sistemas que se formaron. En primer lugar, la formación de la subcuenca Chungará (12000 años atrás) producto del colapso volcánico del Parínacota, aisló el lago Chungará de la cuenca Lauca y esta

separación se mantuvo con los diversos eventos volcánicos y climáticos de la zona que permitió que nuevos haplotipos se generaran y el área del lago permitió que los tamaños poblacionales aumentaran con nuevos haplotipos, que se reflejó en una diversidad genética alta. Por otro lado, el sistema cerrado de la laguna de Piacota habría estado afectado por la aridez del Holoceno medio (8000-4000 años atrás) que separó la laguna del bofedal de Parinacota. El pequeño tamaño de la laguna habría restringido los tamaños poblacionales de *Orestias* y por lo tanto la deriva actuaría con mayor intensidad reteniendo menor número de haplotipos nuevos.

En el río Lauca se esperaría una población con haplotipos ancestrales, sin embargo, se observó que presenta una población en crecimiento. Durante los procesos volcánicos (12000- 4000 años) el río Lauca pudo verse afectado por cambiar su química y además trasladar escombros de las erupciones, lo que habría generado un cuello de botella en las poblaciones. Al retornar los periodos de humedad, nuevos cauces fueron formados dentro del río generando nuevas conexiones que se observaron con el bajo solapamiento de nicho trófico, constituyen un grupo genético separado de los grupos Chungará y Piacota. Esto significa que el mantenimiento de la conectividad habría evitado la diferenciación de las poblaciones manteniendo como una sola población a la especie nominal *O. laucaensis* aunque se encuentre en diferentes sistemas como es la laguna de Cotacotani y el río Lauca. De manera similar se observó en los bofedales de Copapujo y Chuviri cuya conexión estaría relacionada con las variaciones en el clima que nuevamente habrían conectado estas localidades permitiendo el flujo entre ellas.

En el caso de la localidad de Ancuta-Chureaque, las diferentes aproximaciones (genética y morfológica) dieron resultados contrastantes. En primer lugar, las características morfológicas de esta localidad fueron similares a las localidades del río Lauca. En un principio se podría pensar que esta similitud de las características morfológicas estaría en relación a que Ancuta hace parte de los afluentes que llegan al río Lauca, y por lo tanto las características ecológicas serían similares que favorecerían el mantenimiento de los caracteres morfológicos. Sin embargo, a nivel genético se observó que esta localidad presenta una amplia divergencia con las localidades del Lauca, planteándola como una unidad evolutiva diferente. En este caso, se observó que Ancuta presenta relación con las localidades de Bolivia, y no con las de Lauca. Por lo tanto, la colonización fue desde Bolivia hacia el este del Altiplano. De manera similar a los que se observa en los cíclidos del Lago Victoria, donde grupos de especies presentan características morfológicas similares, las localidades de Ancuta y Lauca habrían sido colonizadas por linajes diferentes que por la similitud de los ambientes convergen en una morfología similar.

La localidad de Parinacota muestra una señal poblacional diferente al resto de las localidades. Parinacota mostró con el marcador mitocondrial, una red dispersa que comparte haplotipos con la mayoría de las localidades del PNL. Y a nivel morfológico mostró una leve diferencia con las otras especies nominales. Esto se podría explicar mediante el escenario de una población relicto de la población inicial que conservó la diversidad previa a los eventos vicariantes del PNL. Estos resultados plantean el escenario de un posible efecto fundador de esta población de Parinacota en los demás sistemas acuáticos. Este escenario se podría explicar porque los

bofedales son sistemas acuáticos que circula de manera lenta el agua, manteniendo su nivel a pesar de los cambios en el régimen de precipitación, lo que favorecería a las poblaciones de peces.

Por otro lado, mediante los marcadores microsátélites, Parinacota también puede interpretarse como un punto de mezcla de los diferentes grupos genéticos del PNL, que podría explicarse por la posición geográfica en donde se encuentra el bofedal con respecto a las demás localidades, siendo el punto más bajo del sistema, lo que facilitaría la llegada de individuos de las diferentes localidades en las épocas de inundación, permitiendo un flujo asimétrico hacia el bofedal de los diferentes sistemas acuáticos. Estos cambios en el flujo de agua entre los diferentes ambientes plantea la posibilidad de que la localidad de Parinacota sea una población reservorio, en este caso, de la diversidad genética actual.

En relación a la cronología de los eventos vicariantes en el Parque Nacional Lauca, podemos determinar que la separación de las poblaciones de *Orestias* se dieron de manera gradual. En primer lugar, el colapso volcánico de Parinacota (12.500 años atrás) habría iniciado la separación de las poblaciones de la cuenca del paleorío Lauca en Chungará, Cotacotani y Lauca. Posteriormente a finales del Pleistoceno, los episodios de humedad habrían facilitado la llegada de individuos a la subcuenca del Chungará, es entonces donde se presenta una primera separación de *Orestias laucaensis* (Lauca) y *Orestias chungarensis* (Chungará). Los procesos volcánicos del Holoceno (8.000-4.000 años atrás) mantienen las poblaciones separadas que se refleja en poblaciones en crecimiento. Durante esta época también se presenta un cambio drástico en el clima con el episodio de aridez (7.000-6.000 años atrás) donde

las conexiones entre los ríos, bofedales y lagunas se ven afectados. Este es el caso de la laguna de Piacota se separa del bodefal de Parinacota posiblemente por la disminución de agua entre ellas y además la erupción volcánica del Ajata, dejando a la laguna de Piacota como una población aislada de *Orestias piacotensis*. Finalmente, el retorno de los periodos de humedad después de los 4.000 años atrás permitió la reconexión de la lagunas de Cotacotani, con el río Lauca que se evidencia con la presencia de *Orestias laucaensis* en dos sistemas diferentes pero como un solo grupo genético, trófico y morfológico.

Teniendo en cuenta la cronología de los procesos vicariantes del PNL, y mediante las tres aproximaciones podemos concluir que las localidades analizadas del Parque Nacional Lauca, no son unidades evolutivas separadas pero si son grupos en procesos de diferenciación. Por lo tanto las especies nominales de *Orestias* no se ajustarían a los criterios filogenéticos, morfológicos y ecológicos. Lo que restaría por analizar es el criterio biológico donde se deberían realizar experimentos de cruces entre las diferentes especies nominales y analizar sus descendientes viables, lo que definiría si son especies biológicas validas.

LITERATURA CITADA

Brown, J. H., and M. V. Lomolino. 1998. Biogeography. 2d ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Bart H.L. Jr., Clements M. D., Blanton R. E., Piller K. R., Hurley D. L. 2010. Discordant molecular and morphological evolution in buffalofishes (Actinopterygii: Catostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56 : 808–820

Doebeli M. & Dieckmann U. 2000. Evolutionary Branching and Sympatric Speciation Caused by Different Types of Ecological Interactions. *Am. Nat.* 2000. Vol. 156, pp. S77–S101

Elmer, K R., T.K Lehtonen, A.F. Kautt, C. Harrod & A. Meyer, 2010 . Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times *BioMedCentral Biology* 8:60.

Gavrilets, S. 2003. Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 57: 2197–2215.

Giralt S., Taberner C., Herrera C., Gibert R. O. 2007. Lacustrine sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungara' (Northern Chile) *Sedimentology* 54, 1191 1222.

- Giralt S. Moreno A. Bao R. Sáez A. Prego R. Valero-Garcés B. Pueyo J. González-Sampériz P. Taberner C. 2008. A statistical approach to disentangle environmental forcings in a lacustrine record: the Lago Chungará case (Chilean Altiplano). *J Paleolimnol.* 40(1): 195-215.
- Kozak K. H. Wiens J. J. 2010. Accelerated rates of climatic-niche evolution underlie rapid species diversification. *Ecology Letters*, 13: 1378–1389.
- Kocher T. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature* :Vol 5: 288-298.
- Morales, P., I. Vila & E. Poulin. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano Conservation Genetics, 12:1639-1643.
- Navia, A.F., P. A Mejía-Falla, A. Giraldo, 2007. Feeding ecology of elasmobranch fishes in coastal waters of the Colombian Eastern Tropical Pacific. *BioMedCentral Ecology*: 7:8.
- Rundle H, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8, 336–352.
- Saez A., Valero-Garces B. L., Moreno A., Bao R., Pueyo J. J., Gonzalez-Samperiz P., Giralt S., Taberner C., Herrera C., Gibert R. O. 2007. Lacustrine

sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungara' (Northern Chile) *Sedimentology* 54, 1191-1222

Scharnweber, K. M. Plath, K. O. Winemiller, M. Tobler, 2011. Dietary niche overlap in sympatric asexual and sexual livebearing fishes *Poecilia spp.* *Journal of Fish Biology* 79, 1760-1773.

Schluter D. 2000. Introduction to the Symposium: Species Interactions and Adaptive Radiation *The American Naturalist* . vol. 156, supplement .

Wiens J. J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58(1) : 193-197