

UCH-FC  
MAG-EBE  
M. 828  
C. 2

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y CONECTIVIDAD EN  
AMBIENTES FRAGMENTADOS: EL CASO DE  
ORESTIAS (TELEOSTEI; CYPRINODONTIDAE) DE LOS  
SALARES DE ASCOTAN Y CARCOTE EN EL ALTIPLANO  
CHILENO**

Tesis  
Entregada a La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología  
Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

Por

**Pamela Maritza Morales Henríquez**

**Enero, 2009**

Director de Tesis Dr.:

**Elie Poulin**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

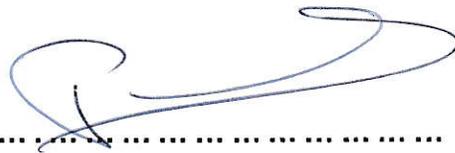
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

**PAMELA MARITZA MORALES HENRIQUEZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 11 de Diciembre de 2008.

**Director de Tesis:**

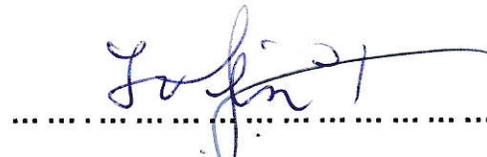
- Dr. Elie Poulin



.....

**Co-directora de Tesis:**

- Dra. Irma Vila



.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

- Dr. Alberto Veloso



.....

- Dr. Claudio Latorre



.....

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Pamela Maritza Morales Henríquez nació el 12 de Noviembre de 1982 en Santiago de Chile. Realizó toda su enseñanza básica y media en el Colegio De La Salle, La Reina. El año 2001 entró a la Pontificia Universidad Católica de Chile, obteniendo el grado de Licenciada en Ciencias Biológicas en Enero de 2006. En Marzo de ese mismo año, entró al programa de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, programa perteneciente a la Universidad de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todos aquellos que me ayudaron en la realización de esta tesis, principalmente al Dr. Elie Poulin por haberme recibido en su laboratorio durante todo este tiempo y por haberme enseñado y guiado para hacer siempre un buen trabajo. También quisiera agradecer a la Dra. Irma Vila por estar siempre dispuesta a responder mis preguntas, y a los Dres. Marco Méndez y Sergio Scott por facilitarme la filogenia del género *Orestias*. También agradezco a los Dres. Alberto Veloso y Claudio Latorre, miembros de la comisión evaluadora, por sus comentarios y sugerencias. Al Dr. Claudio Latorre también le agradezco su ayuda para comprender el aspecto paleoclimatológico en el cual se enmarca mi tesis. Agradezco a la Dra. Julie Turgeon y a todo su laboratorio por sus sugerencias, así como la colaboraron en el trabajo en terreno de los Dres. Rodrigo Palma y Gonzalo Collado.

Quisiera agradecer también a todos los integrantes (y ex-integrantes también) del Laboratorio de Ecología Molecular, mejor conocido como LEM: Angie, Claudio, Coni, Pablo, Pili, Claudia, David, María Cecilia, Christian, Leo, Benito, Denisse, Marcela, Juan Carlos, Johana, y en especial a Andrea Silva por haberme enseñado todas las técnicas moleculares que necesité. También quisiera agradecer a Poly, Ana, Juan Pedro, Sebastián, Rodrigo, Jaime, Bárbara, Lorena, Karen, Cota (muchísimas gracias por las

traducciones) por el apoyo moral incondicional. Y, por supuesto, no puedo dejar de agradecer a mi familia que siempre estuvieron apoyándome, en los buenos y malos momentos, ¡muchas gracias!

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento al Instituto de Ecología y Biodiversidad, IEB, y a la beca de Magíster del Proyecto ICM, código P05-002, que me otorgaron y que me permitió dedicarme por completo al Magíster.

## INDICE DE MATERIAS

	<b>Página</b>
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xix
Resumen	xx
Abstract	xxii
Introducción	1
Hipótesis	15
Objetivos	17
Objetivo General	17

	<b>Página</b>
Objetivos Específicos	17
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>18</b>
Sitio de muestreo	18
Extracción de ADN, amplificación y purificación de la región control del ADN mitocondrial	21
Análisis de las secuencias nucleotídicas	22
Distribución geográfica de las secuencias nucleotídicas	24
Inferencia geográfica	27
Cálculo de tiempo de divergencia	28
Test de Mantel	29
<b>Resultados</b>	<b>30</b>
Diversidad genética de los salares	31
Distribución geográfica de la diversidad genética	39
Tiempo de divergencia de los salares	46
Tamaños efectivos de las vertientes	48
Aislamiento por distancia dentro del salar de Ascotán	49
<b>Discusión</b>	<b>51</b>
Separación antigua entre los salares de Ascotán y Carcote	51
Diversidad genética de <i>Orestias</i> en los salares de Ascotán y Carcote	55

	<b>Página</b>
Inferencia demográfica	60
Conservación	62
Bibliografía	65

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b>	19
Coordenadas geográficas de las distintas vertientes muestreadas en los salares de Carcote y Ascotán.	
<b>Tabla 2.</b>	31
Tamaños muestrales de las distintas vertientes muestreadas en los salares de Carcote y Ascotán.	
<b>Tabla 3.</b>	34
Índices de diversidad genética de las distintas vertientes de los salares de Carcote y Ascotán. Además se indican estos mismos índices para cada salar y para el total de secuencias. * Las rarefacciones para comparar K de las vertientes fueron realizadas con un N = 11, mientras que las de los salares con un N = 83.	

**Tabla 4.**

41

Valores de  $F_{ST}$  entre cada par de vertientes y los valores de significancia (bajo y sobre la diagonal principal respectivamente).

**Tabla 5.**

42

Porcentaje de variación dentro y entre los grupos en que se dividió la muestra total de secuencias. Se indica el número de grupos cuyo porcentaje de variación entre grupos fue mayor (fila en color celeste).

**Tabla 6.**

44

Tabla de AMOVA después de haber realizado el análisis de SAMOVA que permitió separar la muestra en 7 grupos para maximizar la diferencia entre ellos.

**Tabla 7.**

47

Estimación de la magnitud de tiempo de divergencia de los salares de Ascotán y Carcote, obtenido a partir de distintas tasas mutacionales (Sivansundar et al., 2001; Strecker et al., 1996; Barluenga & Meyer, 2004).

**Tabla 8.**

Tamaños efectivos de cada grupo diferenciados, calculados a partir de tres índices de diversidad genética: número de haplotipos (K), número de sitios polimórficos (S) y promedio de diferencias por par de secuencias ( $\pi$ ).

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	4
Modelo general de la variación en el número de especies cuando ocurren fluctuaciones repetidas en los niveles lacustres. Durante períodos en que el nivel lacustre disminuye hay una alta tasa de extinción, mientras que cuando este nivel aumenta, también lo hace la tasa de especiación; cuando el nivel de los lagos es constante, los eventos de extinción y especiación están en equilibrio. Después de cambios reiterados en los niveles lacustres, el número de especies podría A) mantenerse constante, B) aumentar, o C) disminuir (modificado de Kornfield & Smith, 2000).	

**Figura 2.**

5

Distribución de la familia Cichlidae. A. Los representantes de India, Madagascar y Sri Lanka son los linajes más basales, mientras que los de América y África aparecen como grupos hermanos. B. El supercontinente Gondwana hace 200 millones de años atrás (modificado de Salzburger & Meyer, 2004).

**Figura 3.**

6

Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae: A) los ciprinodóntidos del Caribe, B) el género *Orestias*, que es el único que colonizó Sudamérica y C) los ciprinodóntidos de Anatolia, Turquía (modificado de Parker & Kornfield, 1995).

**Figura 4.**

10

A) Superficie alcanzada durante los últimos 120 mil años por diferentes ciclos lacustres. Es importante notar que los períodos en los que existieron paleolagos (períodos húmedos) son mucho más cortos que los períodos secos. B) Perfil Norte-Sur del Altiplano. Se indica la altitud alcanzada por los dos grandes ciclos lacustres, Ouki y Tauca (modificado de Placzek y col., 2006). C) Reconstrucción del ciclo Tauca y las cuencas que habría logrado conectar: desde el lago Poopó hasta el salar de Carcote.

**Figura 5.**

11

Vertientes del (A) salar de Ascotán y del (B) salar de Carcote.

**Figura 6.**

12

A) Las dos paleocostas presentes en el salar de Carcote están indicadas. B) Tufas o depósitos sedimentarios de calcita asociados a las paleocostas.

**Figura 7.**

20

A) Mapa del norte de Chile indicando la ubicación de los salares de Ascotán y Carcote, II Región, Chile (modificado de Risacher y col., 1999). B) Mapa del Salar de Ascotán, indicándose la ubicación y nombre de las distintas vertientes (V1, V2, etc.).

**Figura 8.**

35

Network o red de haplotipos de los salares de Carcote y Ascotán.

**Figura 9.**

37

Árbol de NJ de los haplotipos de Orestias de los salares de Ascotán y de Carcote. "ISLUGA" corresponde al outgroup, un haplotipo de *O. agasizii* del río Isluga.

**Figura 10.**

38

Árbol NJ del (A) salar de Ascotán y del (B) salar de Carcote. Estos árboles muestran más detalladamente el árbol mostrado en la Fig 8. Se observan algunos grupos cuyas frecuencias haplotípicas son similares. C) Grupo expandido del grupo en color morado mostrado en A).

**Figura 11.**

44

División de la muestra total de secuencias de las vertientes del salar de Carcote y del salar de Ascotán. En círculos naranjos se indican los 7 grupos en que se dividió la muestra y las vertientes que contiene cada uno.

**Figura 12.**

46

Interpolación de la diversidad genética distribuida en el espacio. Se indica la porción del plano que corresponde al salar de Carcote y al salar de Ascotán. Además, sobre el plano está indicada la ubicación de las vertientes dentro de cada salar.

**Figura 13.**

50

Correlación de Mantel entre la distancia geográfica (metros) que separa cada par de vertientes y la distancia genética (valores de  $F_{st}$ ). El valor del coeficiente correlación de Mantel,  $r = 0,64$ ,  $P = 0,00$ .

**Figura 14.**

52

Comparación de diversos registros paleoclimáticos de los últimos 800 mil años. A) Registro de radiación. B)  $\delta D$  obtenido a partir del EPICA Domo C (línea azul) y el  $\delta D$  obtenido a partir de Vostok (línea roja). C) Registro marino de isótopos de oxígeno sobre foraminíferos bentónicos. D) Registro de polvo obtenido a partir del EPICA Domo C. (modificado de EPICA Community Members, 2004). Se indican el período de tiempo en que existieron los paleolagos más grandes, Tauca y Ouki (barras de color naranja) y el período estimado de divergencia entre las poblaciones de *Orestias* de los salares de Ascotán y Carcote (barra azul).

**Figura 15.**

53

A) Mapa del sitio de estudio. Se observan los dos salares separados por el volcán Chiliapichina.. B) Perfil indicando una de las alturas mínimas de este cerro (corresponde a la línea roja mostrada en A).

**Figura 16.**

54

Sección del mapa geológico de la Hoja Ollagüe donde aparece el volcán Chiliapichina, que separa a los salares Ascotán y Carcote. Este volcán data del Mioceno superior-Plioceno (modificado de Ramírez & Huete, 1981)

**Figura 17.**

57

Perfil del plano del salar desde la vertiente V2 a la V10. Se observa una leve pendiente que podría explicar por qué sólo hay flujo desde el sur al norte en el salar de Ascotán.

**Figura 18.**

63

Vertiente V11 del salar de Ascotán (A) en condiciones secas (fotografía tomada por Sergio Scott) y después de ser rellenada (B).

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>mm/año</b>	Milímetros de agua caída por año
<b>km<sup>2</sup></b>	Kilómetros cuadrados
<b>g l<sup>-1</sup></b>	Gramos por litro
<b>Desv. Est.</b>	Desviación estándar
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>S</b>	Número de sitios polimórficos
<b>K</b>	Número de haplotipos
<b>H</b>	Diversidad haplotípica
<b>II</b>	Promedio de diferencias entre par de secuencias
<b>NJ</b>	Neighbor-Joining
<b>SAMOVA</b>	Spatial Analysis of MOlecular VAriance
<b>AMOVA</b>	Analysis of Molecular Variance
<b>Ne</b>	Tamaños poblacional efectivo

## RESUMEN

El género de peces *Orestias* corresponde a un ensamble monofilético, el cual contiene 44 especies distribuidas a lo largo del Altiplano. Debido al gran número de especies endémicas que coexisten en una misma área, este grupo ha sido comparado al de los cíclidos de los grandes lagos africanos. Se ha propuesto que el alto número de especies podría ser el resultado de procesos de especiación simpátrica, particularmente en el lago Titicaca, y de especiación alopátrica en el resto de las cuencas del Altiplano.

En la Región de Antofagasta, Chile, se encuentra el salar de Ascotán, cuyas vertientes orientales albergan a *Orestias ascotanensis*. Unos kilómetros más al norte, tres poblaciones de *Orestias* han sido encontradas en el salar de Carcote. Sin embargo, y a pesar de las semejanzas con los individuos del salar de Ascotan, no se ha definido todavía el estatuto taxonómico de estas poblaciones. Durante el Cuaternario, debido a las variaciones climáticas y los cambios en los niveles de agua en las cuencas altiplánicas, estas vertientes y los mismos salares pudieron haber estado unidos reiteradamente, soportando una única y gran población. Sin embargo, en la actualidad se encuentran separadas y representan un buen modelo para evaluar, a escala muy fina, los procesos de diferenciación genética que habrían dado origen a la gran diversidad específica del género *Orestias*.

El análisis de 917 pb de la región control del ADN mitocondrial de más de 350 individuos provenientes de los salares de Ascotán y Carcote permitió inferir que ambos salares no han estado conectados durante los últimos ciclos lacustres característicos del Altiplano. A nivel local, se pudo observar que cada vertiente del salar de Carcote y las más aisladas geográficamente dentro del salar de Ascotán, forman grupos genéticos únicos (“Evolutionary Significant Unit”) y se caracterizan por baja diversidad genética debido a la deriva génica intensa asociada a poblaciones pequeñas. Por el contrario, en el salar de Ascotán, las vertientes que son cercanas entre sí soportan alta diversidad genética lo que podría indicar una dinámica de tipo metapoblacional. Por lo tanto, desde el punto de vista de su conservación, las poblaciones diferenciadas de las vertientes aisladas son más susceptibles de extinguirse, y con ellas las características propias que han podido acumular desde el inicio de su aislamiento.

Las fluctuaciones de los niveles lacustres podría haber sido el mecanismo principal que permitió la diferenciación, y luego la especiación en el género *Orestias* en el Altiplano Sur.

## ABSTRACT

The fish genus *Orestias* is a monophyletic assemblage with 44 species distributed throughout the Altiplano. Because of the great number of endemic species coexisting in the same area, this group has been compared to cichlids from the African great lakes. Indeed, the high number of species could be the result of a process of sympatric speciation, particularly in Titicaca Lake, and of allopatric speciation in the rest of the basins of the Altiplano.

The Ascotán salt flat is in the Región de Antofagasta, Chile, and its eastern springs are inhabited by *Orestias ascotanensis*. A few kilometers to the north, three populations of *Orestias* have been found in Carcote salt flat. Their taxonomic status has not been defined yet, regardless of their resemblance with *O. ascotanensis*. During the Quaternary, these springs and salt flats could be repeatedly linked because of the climatic variation and changes in the water level in the altiplanic basins, maintaining a single, large population. Nowadays, however, they are separated and represent a good model to evaluate, in a very acute scale, the genetic differentiation process that would give rise to the great specific diversity of the genus *Orestias*.

The analysis of 917 pb from the mitochondrial DNA control region of more than 350 individuals from Ascotán and Carcote salt flats enabled us to conclude that both salt flats have remained disconnected during the last humid periods, characterized by the formation of great lake cycles over the Altiplano. At a local level, it was determined that each spring at Carcote and the most geographically isolated springs from Ascotán form unique genetic groups (“Evolutionary Significant Unit”) characterized by low genetic diversity due to the intense genetic drift associated with small populations. On the other hand, at Ascotán neighboring springs hold high genetic diversity which could be indicative of a metapopulation. Therefore, from the conservation point of view, the differentiated populations from the isolated springs are far more susceptible for extinction, and with them the unique characteristics they could have accumulated since the beginning of their isolation.

The lake level fluctuations could have been the main mechanism which allowed the differentiation, and then the speciation in genus *Orestias* in the Southern Altiplano.

## INTRODUCCION

El término “*flock*” (“enjambre”) se ha empleado desde comienzos del siglo XX, primero por botánicos refiriéndose a especies de plantas cercanamente relacionadas y relativamente restringidas a un área (Sargent & Peck, 1906 y MacDougal, Vail & Schull, 1907 *sensu* Greenwood, 1984). Más tarde, Regan (1922 *sensu* Greenwood, 1984), estudiando la enorme cantidad de especies de cíclidos de los lagos africanos, postuló algunos procesos evolutivos, como la “segregación habitual” o aislamiento geográfico y reproductivo, para intentar explicar el origen de estos grupos. Greenwood (1984) hizo una revisión del uso que se le ha dado a este término, concluyendo que un grupo de especies debe cumplir con tres criterios para ser considerado un “*species flock*” o “enjambre de especies”:

1. El grupo de especies debe formar un ensamble monofilético.
2. Debe estar compuesto por un gran número de especies endémicas.
3. Este ensamble debe estar circunscrito a una misma área.

Estos criterios entregan una noción del concepto sin definirlo como tal, pero permiten que sea utilizable de una manera empírica (Ribbink, 1984). A pesar de que estos criterios son algo vagos, el término “*species flock*” entrega información biológica: el

grupo incluye un número desproporcionadamente alto de especies relacionadas; al parecer los miembros del grupo son el producto de una tasa de especiación inusualmente alta, que podría ser el resultado de las respuestas evolutivas explosivas de una fauna invasora; la distribución de las especies está limitada a un área tipo isla donde todas o la mayoría de las especies son endémicas (Ribbink, 1984).

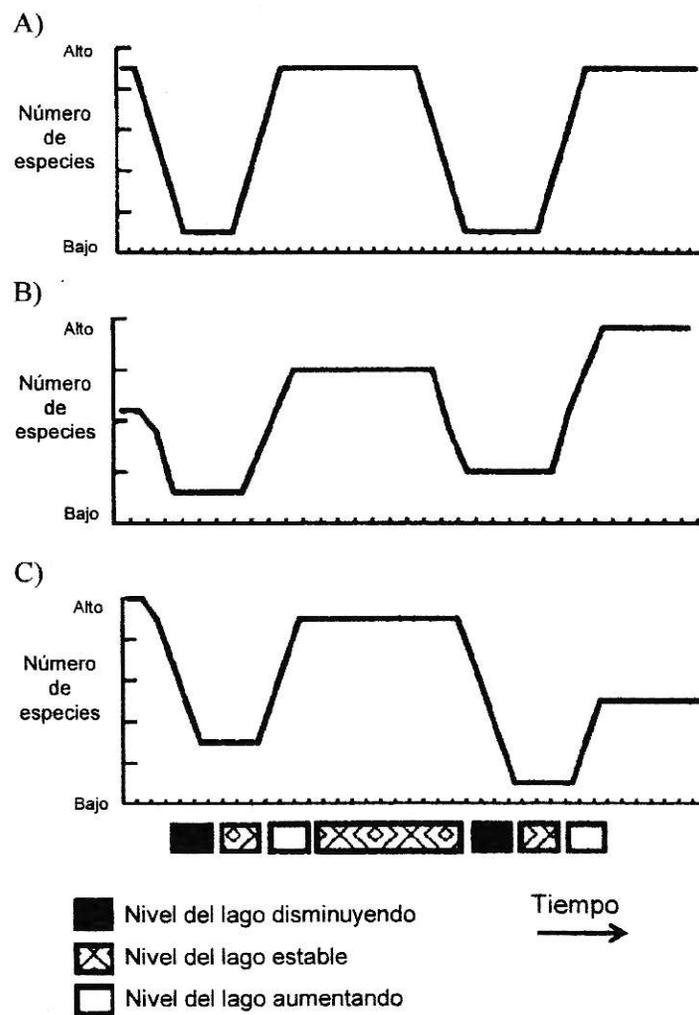
Un ejemplo de “species flock” y uno de los casos más extraordinarios de especiación son los peces de la familia Cichlidae, en especial los que habitan los lagos de África Oriental. Un claro ejemplo es el lago Victoria donde se ha llegado a estimar que existen alrededor de 500 especies de cíclidos (Turner y col., 2001). Se han postulado diversos mecanismos que explicarían la generación de esta gran diversidad de especies. La especiación alopátrica es uno de los más comunes, y tiene relación con las fluctuaciones repetidas en los niveles de los lagos (Sturmbauer y col., 2001, Verheyen y col., 2003, Joyce y col., 2005). Durante las regresiones lacustres, la tasa de extinción sería alta debido a la pérdida de hábitat, causando una disminución de la diversidad global de especies. Sin embargo, podría ocurrir diferenciación trófica en algunos de los linajes que subsisten para evitar la competencia que se generaría dentro de los refugios. Cuando aumenta el nivel lacustre, nuevos hábitats quedan disponibles, lo que aumenta las oportunidades de especiación debido al rápido crecimiento poblacional y a la disminución de la competencia. Durante los períodos lacustres relativamente estables, los eventos de especiación y extinción podrían estar en equilibrio, haciendo que la diversidad de especies no varíe (Fig. 1; Kornfield & Smith, 2000). Por lo tanto, los eventos que ocurren durante la fase seca son determinantes sobre la diversidad de

especies. Según Kornfield & Smith (2000), existen tres posibles resultados como consecuencia de las fluctuaciones lacustres reiteradas:

- a) La diversidad de especies podría mantenerse constante si los eventos de extinción durante la regresión lacustre se compensan con los eventos de especiación durante la expansión (Fig. 1A).
- b) La diversidad de especies neta podría aumentar con el aumento del nivel lacustre si dentro de los refugios surgieron regularmente nuevos linajes diferenciados tróficamente. Estos grupos diferenciados podrían pasar a formar especies nuevas una vez que colonicen los nuevos ambientes, ya que sus diferencias tanto a nivel genético como ecológico se acrecentarían hasta quedar aisladas reproductivamente (Fig. 1B).
- c) La diversidad de especies podría disminuir con un gran número de ciclos lacustres si la selección durante los ciclos lacustres bajos fuese lo suficientemente fuerte (Fig. 1C).

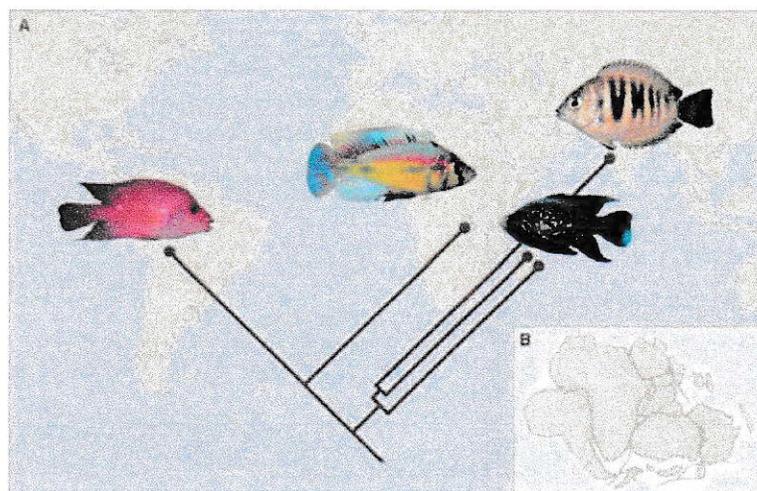
También se ha propuesto la especiación simpátrica para explicar la enorme diversidad de especies dentro de un mismo lago sin barreras físicas aparentes. La selección natural (distintas adaptaciones tróficas a ambientes diferentes, o diversas estrategias de protección de los huevos) y la selección sexual (elección de la hembra por determinados colores del macho) serían los mecanismos que conducirían esta divergencia (Kornfield

& Smith, 2000, Barluenga & Meyer, 2004, Salzburger & Meyer, 2004, Seehausen y col., 2008).



**Figura 1.** Modelo general de la variación en el número de especies cuando ocurren fluctuaciones repetidas en los niveles lacustres. Durante períodos en que el nivel lacustre disminuye hay una alta tasa de extinción, mientras que cuando este nivel aumenta, también lo hace la tasa de especiación; cuando el nivel de los lagos es constante, los eventos de extinción y especiación están en equilibrio. Después de cambios reiterados en los niveles lacustres, el número de especies podría A) mantenerse constante, B) aumentar, o C) disminuir (modificado de Kornfield & Smith, 2000).

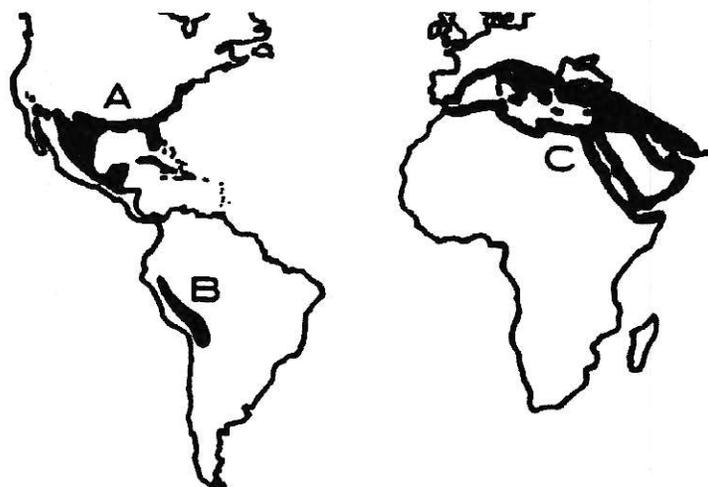
La distribución geográfica actual de los cíclidos y las relaciones filogenéticas dentro de esta familia (Fig. 2) han permitido proponer un ancestro con una distribución gondwánica (Sparks & Smith, 2004).



**Figura 2.** Distribución de la familia Cichlidae. A. Los representantes de India, Madagascar y Sri Lanka son los linajes más basales, mientras que los de América y África aparecen como grupos hermanos. B. El supercontinente Gondwana hace 200 millones de años atrás (modificado de Salzburger & Meyer, 2004).

Existe otro grupo de peces que también presentan una distribución gondwánica: los peces de la familia Cyprinodontidae, pertenecientes al grupo Percomorpha al igual que los cíclidos (Fig. 3; Parker & Kornfield, 1995). Dentro de esta familia, el único género que colonizó Sudamérica fue el género *Orestias*, hace 80 a 100 millones de años atrás. En este período, el nivel del mar alcanzó su máximo durante el Cretácico, formándose mares epicontinentales que cubrieron extensas zonas de África y Norteamérica y gran parte del norte de Sudamérica, hasta el lado este de la Cordillera de los Andes (Willis,

1910; Haq y col., 1987; Barron y col., 1989). El ancestro de *Orestias* habría ocupado las cuencas cercanas a estos nuevos hábitats costeros (Parker & Kornfield, 1995); los cambios asociados a la orogénesis continuaron, causando cambios en las cuencas y la captura de pequeños ríos, quedando aislados finalmente hace 15 millones de años atrás (Vandervoort, 1995). Esto habría sido suficiente para permitir la dispersión de estos peces hacia el Sur de lo que es hoy el lago Titicaca.



**Figura 3.** Distribución geográfica de la familia Cyprinodontidae: A) los ciprinodóntidos del Caribe, B) el género *Orestias*, que es el único que colonizó Sudamérica y C) los ciprinodóntidos de Anatolia, Turquía (modificado de Parker & Kornfield, 1995).

El género *Orestias* también ha sido descrito como un “species flocks”, ya que cumple con los requisitos necesarios para ser considerado como tal:

1. Se ha descrito como un grupo monofilético mediante caracteres morfológicos y moleculares (Parenti, 1984 b; Lüssen y col., 2003).

2. Contiene una gran cantidad de especies. En este género de peces se ha llegado a establecer 44 especies, siendo *O. piacotensis* la última especie descrita (Vila, 2006). Basándose en caracteres morfológicos, Parenti (1984 b) agrupó estas especies en cuatro complejos monofiléticos: *cuvieri* (4 especies), *mulleri* (5 especies), *gilsoni* (10 especies) y *agassizii* (25 especies). Los tres primeros grupos comprenden especies presentes en el lago Titicaca y el valle del Cuzco, mientras que al complejo *agassizii* pertenecen las especies de los lagos andinos y de los ríos de Perú, Bolivia y Chile.
  
3. Se distribuye sólo en el Altiplano, es decir dentro de un área geográfica limitada, y presenta altos niveles de endemismo (Parenti, 1984 b). Un ejemplo de esto son las cinco especies descritas sólo en Chile (*O. laucaensis*, *O. piacotensis*, *O. ascotanensis*, *O. parinacotensis* y *O. chungarensis*).

La alta especiación dentro del género *Orestias* puede ser comparada y entendida con el proceso de especiación de los cíclidos africanos. Por ejemplo, más de la mitad de las especies de *Orestias* se han descrito dentro del lago Titicaca, mientras que las restantes se distribuyen en distintas cuencas a lo largo del Altiplano, aunque dentro de cada una existe baja diversidad de especies (como ocurre con las especies chilenas; Parenti, 1984). El gran número de especies dentro del lago Titicaca pudo haber sido generado por especiación simpátrica, particularmente los complejos *mulleri* y *gilsoni*, que juntos constituyen un “species flock” de 15 especies, todas descritas sólo en este lago (Parenti, 1984 b). Las fluctuaciones en el nivel de este lago ocurridas, por lo menos, durante los

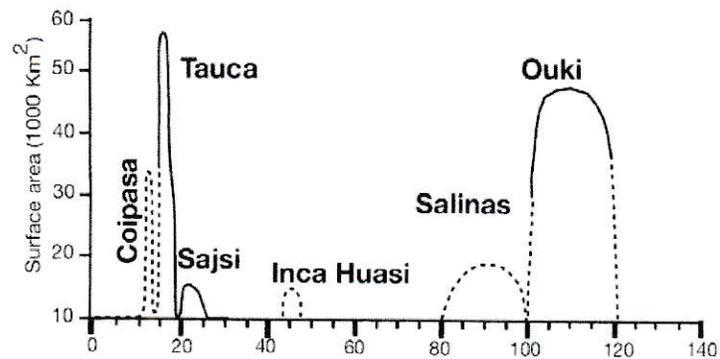
últimos 25.000 años también pudieron haber actuado sobre la diversidad específica (Mourguiart y col., 1995; Baker y col., 2001). Las especies en el resto del Altiplano pudieron haberse generado mediante alopatría debido a las fluctuaciones en los niveles lacustres y la actividad volcánica de la Cordillera de los Andes (Parker & Kornfield, 1995). Estas variaciones habrían permitido la colonización del resto de las cuencas del Altiplano, las cuales en la actualidad se encuentran aisladas geográficamente y cuyas características hidrológicas son diferentes y específicas para cada sistema (Martínez y col., 1999).

Las variaciones drásticas de los niveles de agua en el Altiplano han ocurrido durante el Pleistoceno. Períodos húmedos permitieron la existencia de paleolagos que cubrieron extensas áreas geográficas, los que han sido descritos en numerosas cronologías diferentes (Fornari y col., 2001, Fritz y col., 2004, Rigsby y col, 2005, entre otras). Una de ellas es la de Placzek y col. (2006), que estima la edad y duración de estos paleolagos o ciclos lacustres en las cuencas de los lagos Poopó, Uyuni y Copasa (Fig. 4). El ciclo más antiguo descrito es Ouki que existió hace 98-120 mil años atrás y alcanzó una cota de 3740 metros sobre el nivel del mar (msnm) y una profundidad máxima de 80 metros. Luego existieron ciclos de lagos de menor duración y profundidad: el ciclo Salinas (95-80 mil años atrás), el ciclo Inca Huasi (46 mil años atrás) y el ciclo Sajsi (24-20 mil años atrás). Ninguno de estos ciclos superó los 20 metros de profundidad. Posteriormente, hace 18-14 mil años, el ciclo Tauca alcanzó la mayor extensión geográfica y llegó a 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

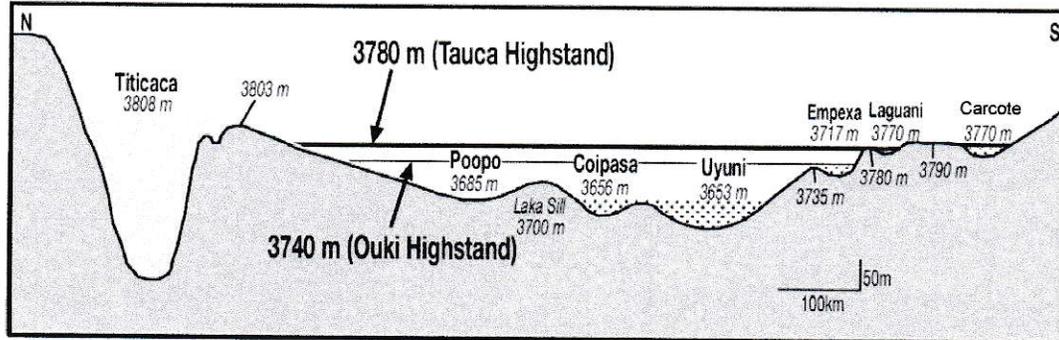
extremo sur del Altiplano, pasando por los salares de Coipasa y Uyuni (Fig. 4 B y C). Finalmente, hace 13-11 mil años, está descrito el ciclo Coipasa de menor profundidad (<55 metros) o la fase final de Tauca. Actualmente, el Altiplano está atravesando una etapa seca, lo que ha permitido la formación de numerosas cuencas evaporíticas en el extremo sur y los cuerpos de agua se han reducido a pequeñas vertientes, playas y lagos salinos (Fornari y col., 2001). Por lo tanto, y de acuerdo al modelo de Kornfield & Smith (2000), estamos en el momento en que la diferenciación de los linajes estaría ocurriendo.

En una de las cuencas endorreicas al sur del Altiplano se encuentra el salar de Ascotán (Región de Antofagasta, Chile). Está ubicado en los 21,5°S (576966-7623591 UTM Mgs84) a 3720 msnm. Las precipitaciones en esta zona son menos de 150 mm/año (Risacher y col, 1999). La mayor parte de éstas se deben al Invierno Altiplánico o Boliviano, causado por el transporte de masas de aire provenientes de la cuenca amazónica (Lenters & Cook, 1997; Zhou & Lau, 1998; Vuille, 1999). Los pequeños cuerpos de agua superficiales existentes corresponden a pequeñas lagunas (Fig 5A) localizadas en el lado este del salar (18 km<sup>2</sup> de superficie total de agua; Risacher y col, 1999). Éstas son recargadas por vertientes donde afloran aguas subterráneas provenientes de la Caldera Pastos Grandes ubicada en Bolivia a 4600 msnm. Cada una de estas vertientes está separada de las otras por superficies evaporíticas secas. El flujo superficial corre hacia la parte noroeste del salar que está a menor elevación (Keller & Soto, 1998).

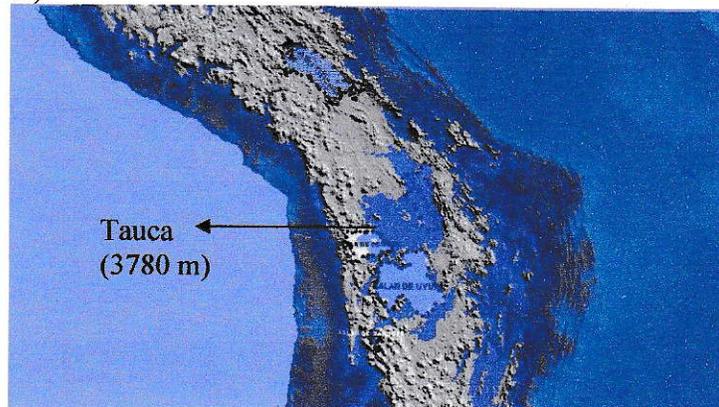
A)



B)

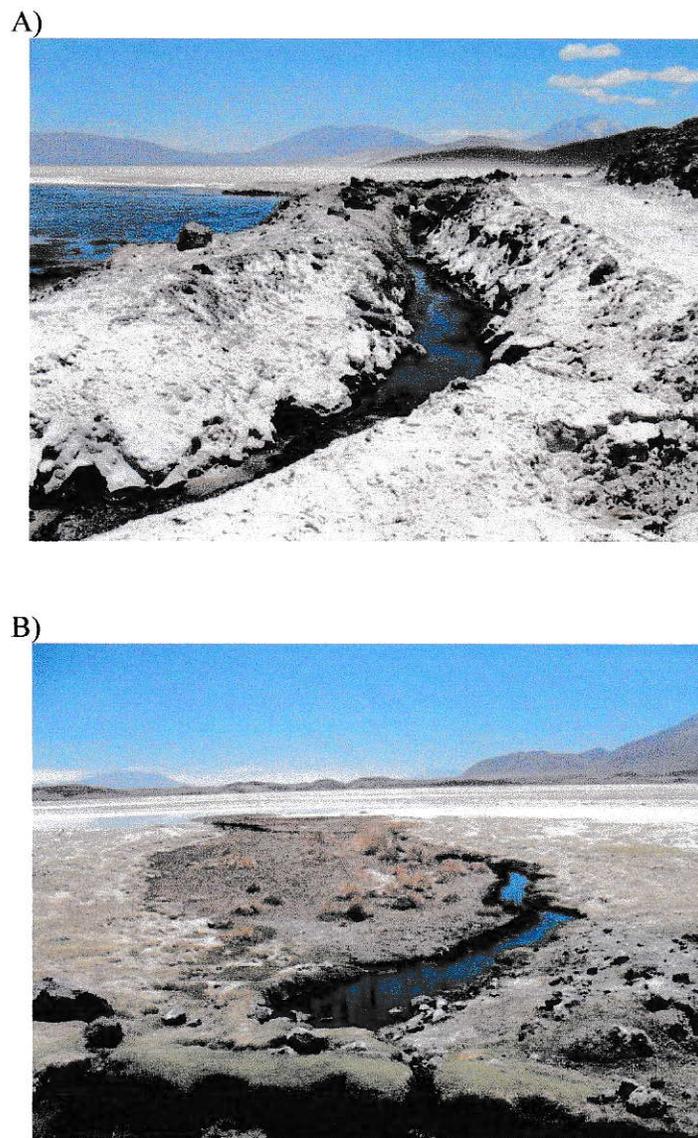


C)



**Figura 4.** A) Superficie alcanzada durante los últimos 120 mil años por diferentes ciclos lacustres. Es importante notar que los períodos en los que existieron paleolagos (fases húmedas) son mucho más cortos que los eventos secos. B) Perfil Norte-Sur del Altiplano. Se indica la altitud alcanzada por los dos grandes ciclos lacustres, Ouki y Tauca (modificado de Placzek y col., 2006). C) Reconstrucción del ciclo Tauca y las cuencas que habría logrado conectar: desde el lago Poopó hasta el salar de Carcote.

Al norte del salar de Ascotán se encuentra el salar de Carcote (570066-7646388 UTM Mgs84), donde también existen pequeñas lagunas alimentadas por vertientes (3,5 km<sup>2</sup> de superficie total de agua; Risacher y col, 1999) ubicadas en el borde norte del salar (Fig 5B).



**Figura 5.** Vertientes del (A) salar de Ascotán y del (B) salar de Carcote.

Una diferencia notable entre estos dos salares es la presencia de al menos dos paleocostas en el salar de Carcote (Fig. 6), lo que marca la conexión que habría existido entre él y otras zonas altiplánicas durante el ciclo Tauca (Placzek y col., 2006). En el salar de Ascotán no hay una paleocosta nítida, lo que puede significar que este salar no habría formado parte de este gran sistema límnico, o que pudo haber existido un ciclo que incluyó esta cuenca, pero habría sido de muy corta duración, impidiendo la formación de paleocosta. Existe una orilla fósil hacia el sur-oeste de la vertiente V10 del Salar de Ascotán que se habría originado por una flexión del plano del salar. Sin embargo, esta deformación es mucho más joven que los paleolagos datados, ya que habría ocurrido hace 11.000 años atrás (I. Vila, comunicación personal).

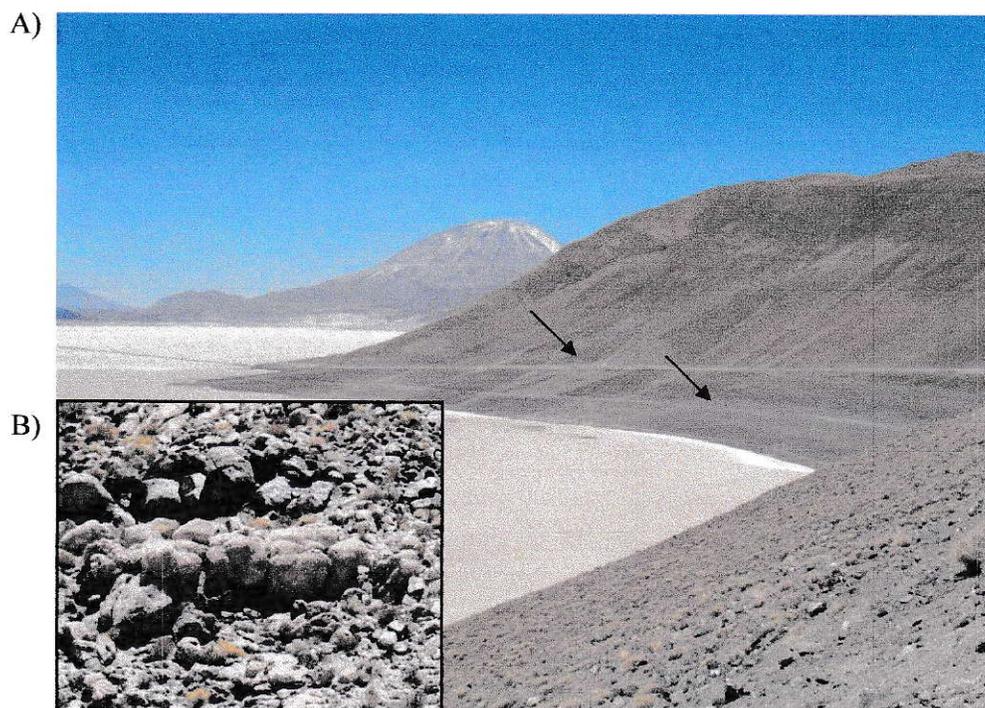


Figura 6. A) Las dos paleocostas presentes en el salar de Carcote están indicadas. B) Tufas o depósitos sedimentarios de calcita asociados a las paleocostas.

Sólo en el salar de Ascotán se ha descrito la especie *Orestias ascotanensis* Parenti (1984), de nombre común Karachi. Esta especie pertenece al complejo *agassizii* (Parenti, 1984) que ha sido descrito como un grupo monofilético mediante caracteres morfológicos (Parenti, 1984 b) y moleculares (Lüssen y col., 2003). Presenta pequeñas poblaciones en las vertientes ya descritas, las cuales no sobrepasan los cientos de individuos por vertiente (Keller & Soto, 1998). Estas poblaciones están restringidas al área cercana a la vertiente, donde la salinidad no supera los 2-4 g l<sup>-1</sup> de sólidos disueltos totales (Keller & Soto, 1998). Las lagunas del salar de Carcote también mantienen poblaciones de *Orestias* que son morfológicamente cercanas a *O. ascotanensis*, pero su estatus taxonómico aún no ha sido establecido.

Desde el punto de vista de su conservación, *Orestias ascotanensis* es una especie en peligro de extinción (Vila y col., 2007) debido a que sus poblaciones son pequeñas y su hábitat es muy restringido. Además, el hábitat de esta especie está bajo un balance hidrológico negativo (Keller & Soto, 1998), que podría acentuarse en el futuro debido al cambio climático global, y más aún con la extracción actual del agua que recarga las vertientes para ser utilizada en las actividades mineras presentes en la zona. En conjunto, estos factores contribuyen a la reducción de las vertientes, al aumento de la salinidad y, por lo tanto, a la disminución de las poblaciones (Vila y col., 2007).

En conclusión, estos salares presentan un nivel lacustre bajo y las poblaciones de *Orestias* están distribuidas en un ambiente fragmentado. De acuerdo al modelo de Kornfield & Smith (2000; Fig. 1), y desde un punto de vista genético, deberían estar

ocurriendo los procesos de diferenciación, de forma independiente dentro de cada vertiente. Según lo que ocurra en esta etapa, podríamos inferir qué es lo que ocurrirá con la diversidad de la especie: a) la variabilidad genética de las poblaciones dentro de estos salares podría mantenerse si la diferenciación generada se compensa con las extinciones que ocurren durante este nivel de agua bajo, b) la diversidad podría aumentar si algunos grupos divergen genéticamente y se mantienen en el tiempo, o c) la disminución del hábitat podría afectar significativamente a las poblaciones haciendo que la diversidad genética disminuya. Posteriormente, estos resultados podrían extrapolarse al nivel del género para comprender cómo los procesos de diferenciación, y luego de especiación, han permitido la existencia de este gran número de especies de *Orestias* en el Altiplano Sur.

## HIPOTESIS

**HIPÓTESIS GENERAL:** Las fluctuaciones reiteradas en los niveles hídricos de los cuerpos de agua del Altiplano Sur habrían permitido la diferenciación genética y la alta tasa de especiación del género *Orestias*.

**H1:** Si los paleolagos descritos no lograron conectar a los salares de Ascotán y Carcote, entonces el tiempo de divergencia superaría los 120 mil años (paleolago Ouki).

**H1a:** Si el tiempo de divergencia entre las poblaciones de los dos salares es corto, entonces debería haber existido un paleolago que logró conectarlos pero que fue de corta duración y no dejó rastro de su existencia.

**H2:** Si las vertientes dentro de los salares han estado separadas desde el final del último paleolago (14 ka), entonces éstas deberían estar estructuradas genéticamente.

**H2a:** Si no se encuentra diferenciación genética, entonces las vertientes se contactarían durante períodos de mucha precipitación.

**H3:** Si las poblaciones que ocupan las vertientes se caracterizan por bajos tamaños efectivos, entonces la diversidad genética de las poblaciones de *O. ascotanensis* debería

ser baja como consecuencia de una fuerte deriva genética.

**H3a:** Si la diversidad genética de *O. ascotanensis* es alta, entonces estaríamos en presencia de una población de gran tamaño efectivo debido a posibles conexiones entre las vertientes.

## OBJETIVOS

### **Objetivo General.**

Realizar el catastro de la diversidad genética de *Orestias* dentro de los salares de Ascotán y Carcote para comprender los procesos de diferenciación genética asociados a la fragmentación de su hábitat.

### **Objetivos Específicos.**

1. Determinar la diversidad haplotípica de *Orestias* de cada vertiente del salar de Ascotán y del salar de Carcote.
2. Evaluar la estructuración geográfica de la diversidad genética de *Orestias*.
3. Determinar la escala espacial a la que se produce la diferenciación genética en *Orestias*: entre vertientes de un mismo salar o entre salares cercanos.
4. Evaluar el estatus taxonómico de *Orestias* del Salar de Carcote.
5. Interpretar el patrón de diversidad de *Orestias* a la luz de los posibles cambios ambientales que habrían afectado la región.
6. Comprender el proceso de especiación del género *Orestias* y los posibles mecanismos que generaron su alta diversidad en el Altiplano Sur.

## MATERIALES Y METODOS

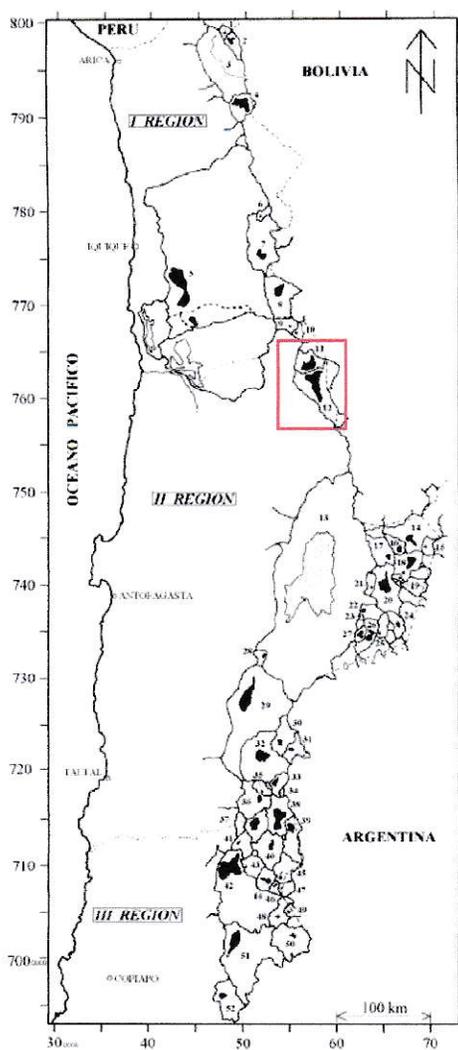
### Sitio de muestreo.

Las muestras de *Orestias* fueron obtenidas de los salares de Ascotán (*O. ascotanensis*) y de Carcote (*O. sp.*), ambos ubicados en la II Región de Antofagasta, Chile (Fig. 7; coordenadas geográficas en Tabla 1). En Mayo del año 2005 se obtuvieron muestras de dos vertientes del salar de Ascotán, V2 y V7. En Noviembre de 2005 se obtuvieron otras muestras de las vertientes V1, V3, V4, V5, V6, V8 y V12 y de una vertiente del salar de Carcote (C1). En Noviembre de 2006 se realizó una campaña de terreno en la que se pudo lograr obtener un tamaño muestral adecuado de casi todas las vertientes del salar de Ascotán y de dos vertientes más del salar de Carcote. De esta manera, contamos con muestras de la totalidad de la distribución geográfica de la especie *O. ascotanensis* (excepto de la vertiente V9 del salar de Ascotán), más individuos de *Orestias sp.* de tres vertientes del salar de Carcote. Todas las muestras fueron conservadas en alcohol al 96% y trasladadas al laboratorio.

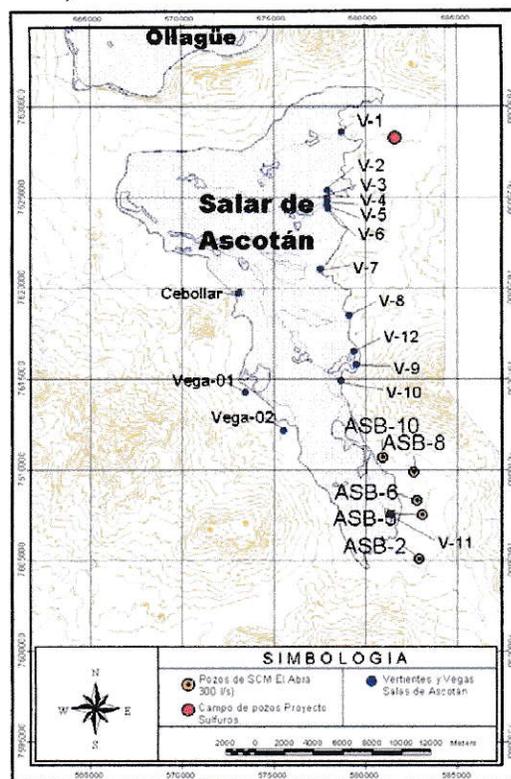
**Tabla 1.** Coordenadas geográficas de las distintas vertientes muestreadas en los salares de Carcote y Ascotán.

Salar	Vertiente	Coordenadas geográficas	
		S	W
Carcote	C1	21,28289	68,32453
	C2	21,29697	68,33575
	C3	21,33608	68,33736
Ascotán	V1	21,45056	68,25272
	V2	21,48922	68,25689
	V3	21,49106	68,25711
	V4	21,49439	68,25711
	V5	21,49644	68,25680
	V6	21,49800	68,25678
	V7	21,53408	68,26131
	V8	21,56589	68,24356
	V10	21,60972	68,25019
	V11	21,68719	68,21500
	V12	21,58719	68,24231

A)



B)



**Figura 7.** A) Mapa del norte de Chile indicando la ubicación de los salares de Ascotán y Carcote, II Región, Chile (modificado de Risacher y col., 1999). B) Mapa del Salar de Ascotán, indicándose la ubicación y nombre de las distintas vertientes (V1, V2, etc.).

### **Extracción de ADN, amplificación y purificación de la región control del ADN mitocondrial.**

Se realizaron extracciones de ADN a partir de músculo y de aletas pectorales. Se utilizaron los protocolos de extracción mediante fenol-cloroformo (Sambrook, 1989) y el método de extracción salina (Aljanabi & Martínez, 1997). Se verificó la calidad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

Luego, se amplificó la región control o D-loop del ADN mitocondrial mediante la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction). Para esto, diseñamos partidores específicos: un partidor directo (forward) de 19 nucleótidos cuya secuencia es 5' ACC CCT AAC TCC CAA AGC T 3' y un partidor inverso (reverse) de 21 nucleótidos cuya secuencia es 5' TGA TAG TAA AGT CAG GAC CAA 3'. Para esto utilizamos las zonas conservadas del ADN mitocondrial que codifican para la subunidad ribosomal 12S y para tRNA-Pro en las especies *Gambusia affinis*, *Kryptolebias marmoratus* y *Elassoma evergladei*. Las secuencias de estas especies están disponibles en GenBank y sus códigos de accesos en esta base de datos son NC 004388, NC 003290 y NC 003175, respectivamente.

Estandarizamos el protocolo de PCR para realizar reacciones de un volumen total de 25 µl, el que contenía 2,5 µl de Buffer de PCR 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,0 µl de cada partidor a 10 pm/µl, 10 ng/µl de ADN, 2,0 µl de

cada dNTP 2,5 mM, 5U Taq (Invitrogen) y 12,25 µl de agua ultra pura. Se utilizó el siguiente ciclo térmico: una primera fase de denaturación a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos compuestos por una fase de denaturación de 45 segundos a 94°C, luego una fase de apareamiento (annealing) a 68,5°C durante 1 minuto 30 segundos y una etapa de extensión de 1 minuto 30 segundos a 72°C. Finalmente, se realiza una última fase de extensión de 10 minutos. La presencia de un producto de PCR fue verificado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Luego, estos productos fueron purificados con QIAquick PCR Purification Kit. Así, logramos obtener una solución que contenía específicamente el D-loop del ADN mitocondrial.

La secuenciación de este segmento de ADN fue realizada en ambos sentidos utilizando los mismos partidores ya mencionados. Este procedimiento fue llevado a cabo con secuenciadores automáticos (ABI3730XL y ABI3700) por la compañía MacroGen Inc., en Corea del Sur ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

#### **Análisis de las secuencias nucleotídicas.**

Las secuencias obtenidas fueron revisadas, editadas y ensambladas con el programa Processor of Sequences, ProSeq (Filatov, 2002).

Se calcularon distintos índices de diversidad genética con el programa DNA Sequence Polymorphism, DnaSP (Rozas y col, 2003). Los índices que se obtuvieron son:

- Número de sitios polimórficos,  $S$ . Número de sitios que presentan diferentes nucleótidos en diferentes secuencias.
- Número de haplotipos,  $K$ . Número total de haplotipos diferentes encontrados en la muestra.
- Diversidad haplotípica,  $H$ . Indica la probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar, éstos sean diferentes. Para calcular este índice se utiliza la siguiente fórmula:

$$H = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (1)$$

En la ecuación (1),  $n$  representa el tamaño de la muestra,  $k$  es el número de haplotipos y  $p_i$  es la frecuencia relativa del haplotipo  $i$  (Tajima, 1987). Si  $H = 0$  significa que en una población todos los alelos son iguales, mientras que si  $H = 1$  todos los alelos son distintos, por lo tanto:  $0 < H < 1$ .

- Promedio de diferencias por par de secuencias,  $\pi$ . Indica el número de diferencias promedio que existe entre todos los pares de secuencias que hay en la muestra. Está dado por la siguiente relación:

$$\Pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij} \quad (2)$$

En la ecuación (2),  $n$  es el tamaño de la muestra,  $d_{ij}$  es una estimación del número de mutaciones que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ,  $k$  es el número de haplotipos,  $p_i$  es la frecuencia relativa del haplotipo  $i$  y  $p_j$  es la frecuencia relativa del haplotipo  $j$ .

Para corregir el efecto de los distintos tamaños muestrales sobre el número de haplotipos encontrados, se realizaron rarefacciones individuales con el programa PAST versión 1.75b (Hammer y col., 2001). Se realizó una comparación entre vertientes y entre salares.

### **Distribución geográfica de las secuencias nucleotídicas.**

Primero, se construyó una red de haplotipos para observar gráficamente la diversidad genética encontrada. Este procedimiento utiliza el algoritmo median-joining network en el programa NETWORK 4.1.1.1 (Bandelt y col, 1999). Este algoritmo permite trabajar con datos con multiestados, es decir, un mismo locus puede ser A, C, G, T o un estado ambiguo N. En la red que se obtiene, cada círculo representa un haplotipo diferente, el tamaño de éste corresponde a su frecuencia dentro de la muestra y la distancia que separa a uno de otro es el número de diferencias o pasos mutacionales que hay entre ellos.

Luego, con las secuencias obtenidas se contruyó un árbol con el método Neighbor-Joining (NJ) con el programa MEGA 4.0 (Tamura y col., 2007). Esta reconstrucción permite identificar aquellos grupos que poseen frecuencias haplotípicas similares. Se utilizó un haplotipo de *O. agasizii* proveniente del río Isluga.

Posteriormente, se realizó un test de  $F_{ST}$  pareado con el programa ARLEQUIN Versión 3.1 (Excoffier y col, 2005) para examinar la diferenciación entre cada par de vertientes. Este test pone a prueba la hipótesis nula de no diferenciación genética entre dos grupos de poblaciones, sobre la base de las diferencias entre pares de secuencias. El rango de este índice se extiende entre cero y uno, es decir:  $0 < F_{ST} < 1$ . Un valor de  $F_{ST} = 0$  indica que los grupos son genéticamente iguales, mientras que  $F_{ST} = 1$  indica que los grupos están completamente diferenciados. La significancia de cada índice  $F_{ST}$  pareado se obtuvo permutando 10.100 veces los haplotipos entre poblaciones entre grupos (nivel de significancia,  $\alpha = 0,05$ ).

Posteriormente, se analizó la estructuración genética global mediante un Análisis de Varianza Molecular Espacial, SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VARiance; Dupanloup y col., 2002). Este método permite encontrar estructuración basándose en los datos genéticos y geográficos disponibles, sin definir a priori los grupos. Esto lo hace al definir grupos que están diferenciados de forma máxima, es decir, cuando la proporción de varianza genética total debida a diferencias entre grupos es máxima. De este modo, se establecen las barreras genéticas que están separando a estos grupos. Las poblaciones que se asignan a cada grupo deben cumplir sólo dos condiciones: deben ser

geográficamente adyacentes y genéticamente homogéneas. Para este set de datos, SAMOVA se aplicó de la siguiente manera: el total de secuencias se dividió en distintos número de grupos, y en cada una de estas divisiones se obtuvo el valor de  $F_{CT}$  (proporción de la varianza genética total debida a las diferencias entre grupos). Se eligió como la mejor división aquella que presentara un  $F_{CT}$  mayor. En consecuencia, se eligió la estructuración genética dónde la diferenciación entre grupos es máxima. La significancia de este índice y de los otros índices de fijación ( $F_{SC}$  y  $F_{ST}$ ) se calculó permutando 1.000 veces las poblaciones sin considerar su posición geográfica.

A continuación se realizó una representación gráfica de la distribución espacial de la diversidad genética con el programa Alleles In Space, AIS (Miller, 2005). De esta forma se puede observar la estructuración genética estimada con SAMOVA. Para este programa es necesario utilizar las secuencias nucleotídicas y su ubicación geográfica expresada en grados decimales. El programa genera a través de una interpolación de la matriz un gráfico en tres dimensiones de una superficie, donde los ejes X e Y corresponden a las coordenadas geográficas (latitud y longitud, respectivamente), mientras que en el eje Z se representa la distancia genética medida como diferencias entre par de secuencias. En el eje Z se observan elevaciones y depresiones de la superficie, obtenidos a partir de una red de conectividad basada en una triangulación de Delaunay. Esto significa que se dibujan triángulos cuyos vértices son los sitios de muestreo y ninguno de estos vértices queda dentro de otro triángulo. Luego, se agrega la distancia genética en cada lado de los triángulos, las cuales indicarán la altura a la que debe elevarse la superficie dibujada: si la distancia genética es grande, entonces el plano

se elevará mucho, mientras que si dos sitios son genéticamente iguales, entonces el plano se hundirá. Como distancias genéticas se utilizaron los residuos obtenidos de la regresión lineal entre todas las distancias genéticas pareadas y las distancias geográficas.

### **Inferencia geográfica.**

Con la diversidad genética encontrada de cada grupo genéticamente diferenciado, es posible estimar sus tamaños poblacionales efectivos ( $N_e$ ). Para esto se utiliza el parámetro poblacional  $\theta$ :

$$\theta = 2Nu \quad (3)$$

En la ecuación (3),  $N$  corresponde al tamaño poblacional (en este caso, al tamaño poblacional efectivo,  $N_e$ ) y  $u$  es la tasa mutacional. Con esta fórmula es posible calcular  $N_e$ :

$$N_e = \frac{\theta}{2u} \quad (4)$$

Con el programa ARLEQUIN Versión 3.1 (Excoffier y col, 2005), se obtuvo valores de  $\theta$  a partir de distintos índices de diversidad:  $\theta(K)$ ,  $\theta(S)$  y  $\theta(\pi)$ , los cuales se basan en el número de haplotipos ( $K$ ), el número de sitios polimórficos ( $S$ ) y el promedio de diferencias entre par de secuencias ( $\pi$ ), respectivamente. El parámetro  $\theta(K)$  se obtiene resolviendo la ecuación (5):

$$E(k) = \theta \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{\theta + i} \quad (5)$$

donde  $E(k)$  es el número de haplotipos esperados y  $n$  es el tamaño de la muestra. El parámetro  $\theta(S)$  se obtiene de la fórmula (6):

$$\theta = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \quad (6)$$

Finalmente, el parámetro  $\theta(\pi)$  corresponde al promedio de diferencias entre par de secuencias,  $\pi$  (ecuación 7):

$$E(\pi) = \theta \quad (7)$$

### **Cálculo de tiempo de divergencia.**

Sobre la base de la teoría del Reloj Molecular, se utilizaron las siguientes relaciones para estimar tiempo de divergencia (ecuación 8):

$$t = \frac{\pi}{2u} \quad (8)$$

$$u = \left( \frac{\mu}{1.000.000} \right) \times n \quad (9)$$

En la ecuación (8),  $\pi$  corresponde al número promedio de diferencias entre los haplotipos de cada salar,  $u$  es el tiempo generacional (ecuación 9) obtenido a partir de  $\mu$ ,

la tasa de mutación por millón de años y  $n$  es el número de nucleótidos de la secuencia utilizada (Roger & Harpending, 1992). Se consideraron distintas tasas mutacionales calculadas en especies cercanas a la nuestra para estimar la magnitud del tiempo de divergencia de estas poblaciones.

### **Test de Mantel.**

El set de secuencias del Salar de Ascotán fue sometido a la prueba de Mantel (Mantel, 1967) para verificar si existe aislamiento por distancia, es decir, para determinar si hay menos diferencias genéticas entre sitios cercanos que entre sitios lejanos. El procedimiento fue llevado a cabo con el programa ARLEQUIN Versión 3.1 (Excoffier y col, 2005). Este test pone a prueba la significancia de la correlación de Mantel entre dos matrices de distancia, una de distancia geográfica y la otra de distancia genética, entre cada par de sitio de muestreo. La distancia geográfica corresponde al índice  $F_{ST}$  pareado entre cada par de vertientes. La significancia de la correlación entre las dos matrices se obtuvo realizando 1.000 permutaciones. Este procedimiento permite obtener una distribución nula del coeficiente de correlación al permutar las filas y las columnas de una de las matrices mientras que la otra se mantiene constante, de manera tal que los elementos de las dos matrices no están asociados de ninguna forma (hipótesis nula). En cada permutación se recalcula la correlación y se compara con el coeficiente de correlación de los datos observados (Smouse y col., 1986).

## RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de tres vertientes del Salar de Carcote y de 11 de las 12 vertientes del Salar de Ascotán. En total se pudieron recolectar 356 muestras provenientes de ambos salares, de las cuales 83 son del salar de Carcote y 273 son del salar de Ascotán. En la Tabla 2 se indican los tamaños muestrales (N) obtenidos en cada sitio. De la vertiente C1 de Carcote se muestreó en dos sitios diferentes, C1-P1 (N = 30) y C1-P2 (N = 16), para descartar la existencia algún grado de estructuración dentro de ella.

Las 356 secuencias obtenidas tuvieron un largo total de 917 pares de bases. Sin embargo, los sitios ubicados en la posición nº 444, 696 y 724 fueron eliminados de los análisis debido a su alta frecuencia de substitución en haplotipos muy distantes.

**Tabla 2.** Tamaños muestrales de las distintas vertientes muestreadas en los salares de Carcote y Ascotán.

Salar	Vertiente	Tamaño Muestral
Carcote	C1	46
	C2	26
	C3	11
Ascotán	V1	35
	V2	29
	V3	24
	V4	26
	V5	21
	V6	21
	V7	34
	V8	30
	V10	30
	V11	20
	V12	3

### Diversidad genética de los salares.

En la Tabla 3 se indican los índices de diversidad genética: el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (K), la diversidad haplotípica (H) y el promedio de diferencias entre par de secuencias ( $\pi$ ). Estos índices se calcularon para cada vertiente y para cada salar. Se aprecian diferencias entre ambos salares en cuanto a la diversidad genética: el salar de Carcote y cada vertiente de este mismo salar aparecen con menos variabilidad que el salar de Ascotán y sus vertientes. Esto se refleja en todos los índices de diversidad calculados:

- i) el número de sitios polimórficos en Carcote varía entre 0 y 11, y para el salar total son 13, mientras que en Ascotán varía entre 6 y 24, y para el salar en total son 53.
- ii) el número de haplotipos encontrado en Carcote varía entre 1 y 8, con 11 haplotipos en el salar completo, mientras que en Ascotán varía entre 3 y 16, con un total de 73 haplotipos. Ya que los distintos tamaños muestrales afectan los valores de diversidad, se realizó un remuestreo mediante rarefacción ( $n = 11$ ) para comparar la diversidad genética (en este caso K, número de haplotipos) entre los sitios (para este análisis se excluyó la vertiente 12). El número de haplotipos obtenidos es menor en las vertientes de Carcote (entre  $1,00 \pm 0,00$  y  $4,44 \pm 0,89$  haplotipos) que en Ascotán (entre  $5,13 \pm 1,04$  y  $8,71 \pm 1,06$ ). Lo mismo sucede al considerar los salares completos ( $n = 83$ ): el salar de Ascotán muestra  $36,50 \pm 3,03$ , considerando el mismo tamaño muestral de Carcote (11 haplotipos en 83 individuos).
- iii) la diversidad haplotípica fluctúa entre 0 y 0,6 en las vertientes de Carcote, con un valor igual a 0,72 para el salar total, mientras que en Ascotán estos valores se ubican entre 0,78 y 1, con un valor de 0,95 para todo el salar.
- iv) el promedio de diferencias entre par de secuencias varía entre 0 y 1,54 en las vertientes de Carcote, y es de 3,84 considerando todo el salar, mientras que

en Ascotán este índice varía entre 1,33 y 5,13, y el valor para el salar completo es de 5,47.

La menor variabilidad genética se encontró dentro del salar de Carcote, en la vertiente C2 donde se encontró un solo haplotipo. Por el contrario, la vertiente que presentó mayor diversidad es la vertiente V7 del salar de Ascotán (aunque las vertientes V2 y V6 de este mismo salar presentan valores de diversidad haplotípica levemente más altos que V7).

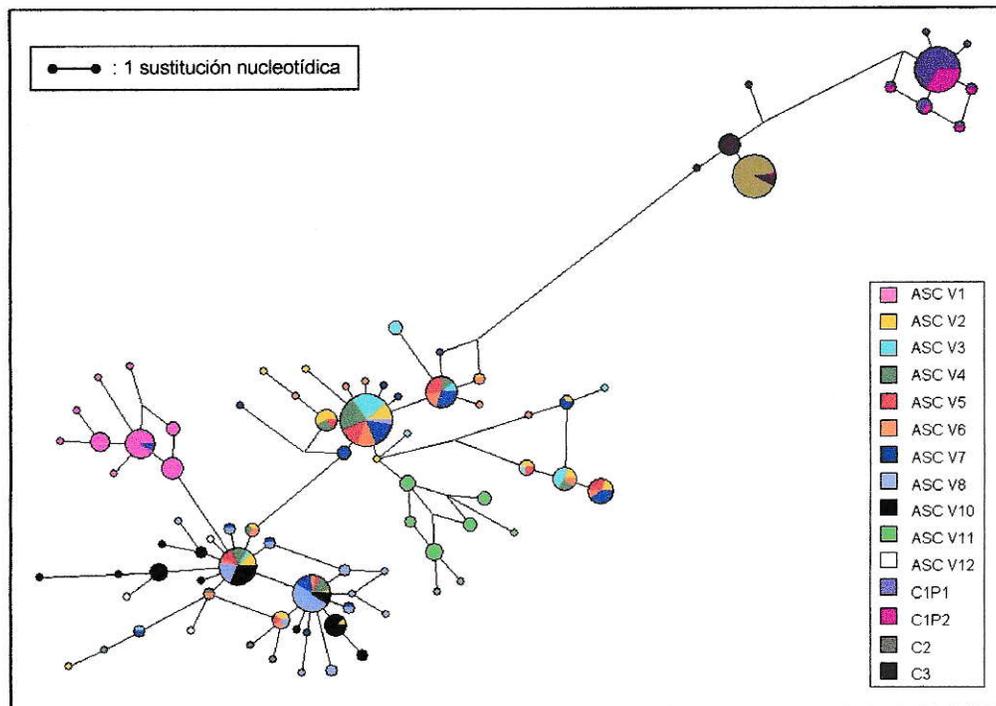
Dentro del salar de Carcote la diversidad es baja en las vertientes C1 y C3 y nula en la vertiente C2 (un solo haplotipo). Dentro de Ascotán, las vertientes V1 y V11 también presentan baja diversidad en comparación al resto de las vertientes de este salar. Desde la vertiente V2 hasta la V10 la diversidad es muy alta, principalmente la diversidad haplotípica con valores muy cercanos a 1.

**Tabla 3.** Índices de diversidad genética de las distintas vertientes de los salares de Carcote y Ascotán. Además se indican estos mismos índices para cada salar y para el total de secuencias. \* Las rarefacciones para comparar K de las vertientes fueron realizadas con un N = 11, mientras que las de los salares con un N = 83.

Salar	Vertiente	Tamaño Muestral (N)	Nº Sitios Polimórficos (S)	Nº Haplotipos (K)	Diversidad Haplotípica (H)	Promedio de diferencias por par de secuencias ( $\pi$ )	Rarefacción*: Promedio Nº de Haplotipos	Rarefacción*: Dev. Est. Nº de Haplotipos
Carcote	CIP1	30	5	7	0,46	0,62	3,59	1,04
	CIP2	16	9	6	0,54	1,54	4,44	0,89
	C1	46	11	8	0,48	0,93	3,67	1,09
	C2	26	0	1	0,00	0,00	1,00	0,00
	C3	11	4	4	0,60	0,87	4,00	0,00
Ascotán	V1	35	9	9	0,78	1,33	5,13	1,04
	V2	29	19	15	0,94	5,13	8,35	1,08
	V3	24	17	9	0,80	4,52	5,80	1,05
	V4	26	18	11	0,86	4,52	6,79	1,10
	V5	21	13	8	0,85	4,66	5,90	0,93
	V6	21	17	15	0,94	4,76	8,71	1,06
	V7	34	24	16	0,92	5,19	7,83	1,17
	V8	30	17	14	0,85	1,98	6,80	1,25
	V10	30	11	10	0,84	2,01	6,52	1,12
	V11	20	7	8	0,88	2,18	6,28	0,87
	V12	3	6	3	1,00	4,00		
	CARCOTE		83	13	11	0,72	3,84	11,00
ASCOTAN		273	53	73	0,95	5,47	36,50	3,03
TOTAL		356	65	84	0,95	8,63		

El caso de la vertiente V12 merece especial atención: se tuvo acceso a muestras de tres individuos solamente. Si bien, las tres secuencias obtenidas resultaron ser diferentes, no es posible realizar conclusiones a partir de esta alta diversidad debido al bajo N de esta vertiente.

Posteriormente, con las secuencias de ambos salares se construyó una red de haplotipos o network (Fig. 8). Los distintos colores representan el sitio de muestreo del cual proviene.



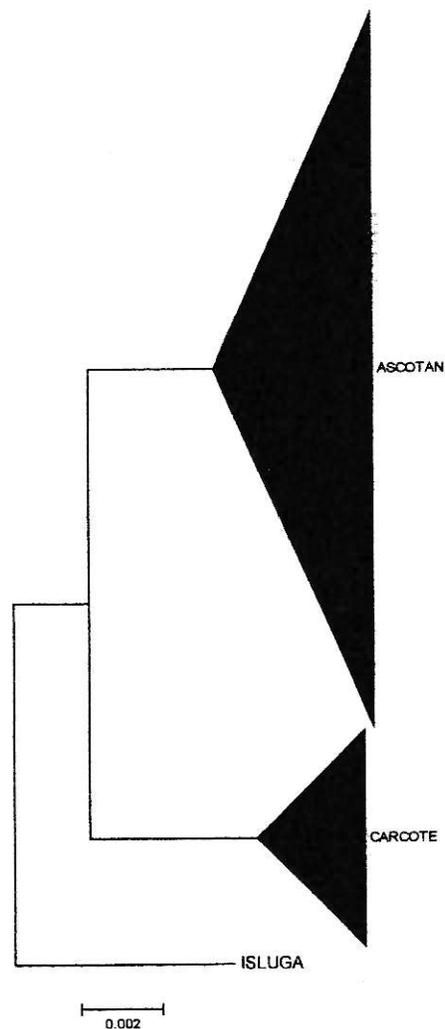
**Figura 8.** Network o red de haplotipos de los salares de Carcote y Ascotán.

Lo primero que se observa en el network es que los haplotipos provenientes del salar de Carcote (esquina superior derecha) están separados de los de Ascotán (esquina

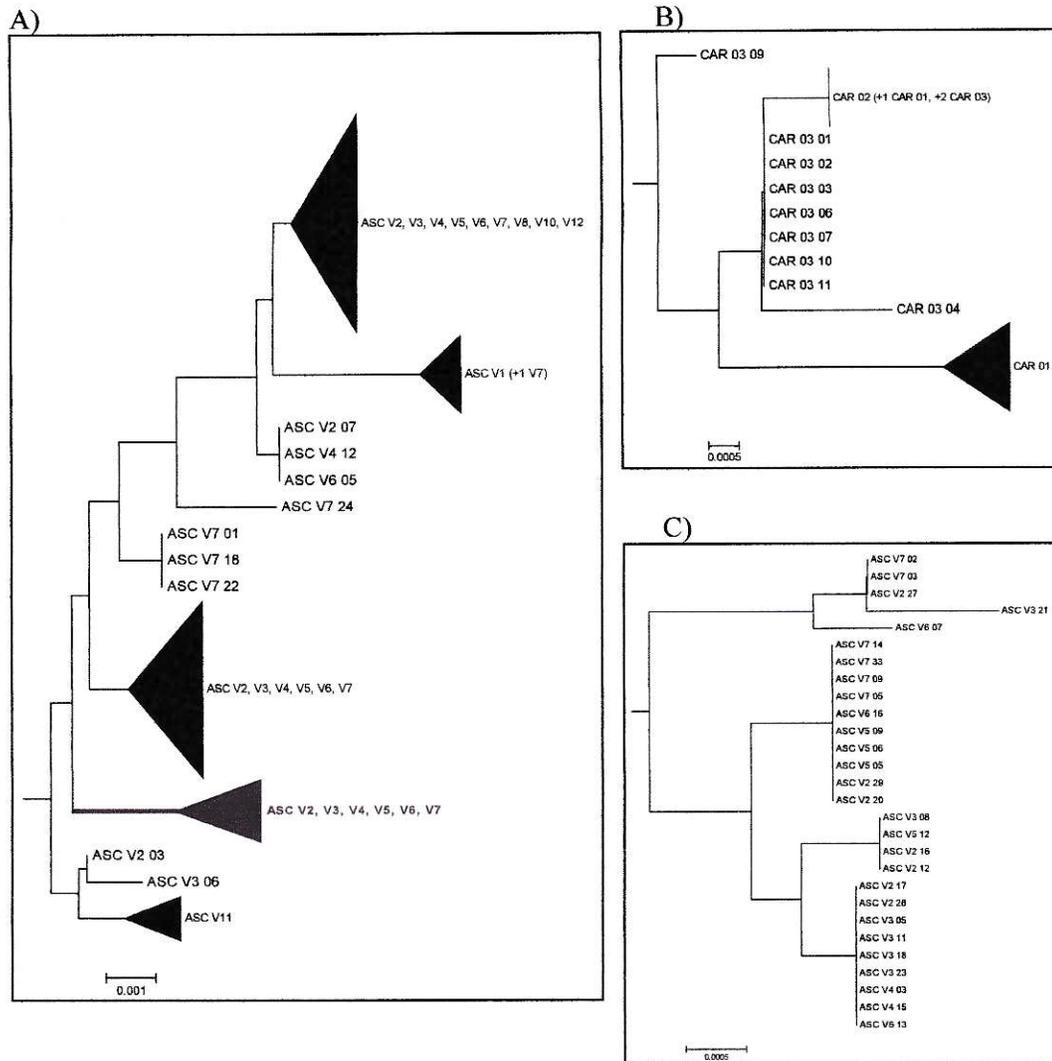
inferior izquierda) por 8 pasos mutacionales, como mínimo. Segundo, la diversidad genética entre los salares es muy diferente, siendo mucho mayor en el salar de Ascotán, que muestra una red mucho más dispersa y con más haplotipos que la red de Carcote. Tercero, dentro de cada salar es posible observar grupos de haplotipos separados que corresponden a vertientes o grupos de vertientes. En Carcote se aprecian dos grupos: el primero incluye exclusivamente haplotipos de la vertiente C1, mientras el segundo incluye un haplotipo presente en las 3 vertientes. Este haplotipo se encuentra fijado en la vertiente C2 mientras está presente en las vertientes C1 y C3 en baja frecuencia (1 individuo de 46 en C1 y 2 de 11 en C3). En Ascotán, la red aparece mucho más extendida y muchos de los haplotipos son compartidos entre diferentes vertientes. Sin embargo, los haplotipos de las vertientes V1 y V11 localizadas respectivamente en los extremos norte y sur del salar, conforman grupos individualizados de la red.

También es posible generar un dendrograma con estas secuencias para identificar grupos que tengan frecuencias alélicas similares (Allendorf & Luikart, 2007). Para esto se realizó un árbol con el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ; Fig 9). Los haplotipos del salar de Ascotán quedaron separados de los del salar de Carcote, siendo éstos los principales grupos que se encontraron. Dentro de cada salar también se encontraron algunos grupos. La Fig. 10 corresponde al detalle de cada salar de la Fig 9. En la Fig 10A) del salar de Ascotán, la vertiente V11 quedó formando un grupo monofilético. La vertiente V1 también forma un grupo, pero dentro de él incluye una secuencia de la vertiente V7. Además se observan otros grupos que incluyen muchas vertientes, como el de más arriba de la Fig 10A), que reúnen

secuencias provenientes de 9 vertientes. La Fig 10C) muestra uno de estos grupos expandidos, en el cual se observa una topología tipo peineta, la cual es característica de un árbol de haplotipos. En la Fig 10B) se observan los haplotipos del salar de Carcote, en el cual la vertiente C1 (indicada como “CAR 01”) forma un grupo monofilético. Todos los haplotipos de la vertiente C2 (indicada como “CAR 02”) quedan en un mismo grupo, más una secuencia de C1 y dos secuencias de C3.



**Figura 9.** Árbol de NJ de los haplotipos de *Orestias* de los salares de Ascotán y de Carcote. “ISLUGA” corresponde al outgroup, un haplotipo de *O. agasizii* del río Isluga.



**Figura 10.** Árbol NJ del (A) salar de Ascotán y del (B) salar de Carcote. Estos árboles muestran más detalladamente el árbol mostrado en la Fig 8. Se observan algunos grupos cuyas frecuencias haplotípicas son similares. C) Grupo expandido del grupo en color morado mostrado en A).

### **Distribución geográfica de la diversidad genética.**

Para analizar la existencia de diferencias genéticas significativas entre pares de vertientes, se realizó un test de  $F_{ST}$  pareado. En la Tabla 4, bajo la diagonal principal, se indican los valores de  $F_{ST}$  entre vertientes, y los valores de P (probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis nula) se ubicaron sobre la diagonal. Para mayor claridad se destacaron los valores significativos (color celeste). Para este análisis se eliminaron las secuencias de la vertiente V12, porque son sólo tres y cada una es un haplotipo diferente, lo que puede introducir ruido en los resultados.

Los dos sitios de muestreo dentro de la vertiente C1 no se diferencian significativamente entre ellas, por lo tanto, de ahora en adelante serán consideradas como un mismo punto de muestreo. Tanto las vertientes V1 y V11 del salar de Ascotán, como las vertientes C1, C2 y C3 del salar de Carcote se diferencian significativamente de todas las otras vertientes. Entre las vertientes V2 a la V7 no se encontraron diferencias, es decir, formarían parte de un mismo grupo genético. Hay que notar que este test detectó diferencias significativas entre las vertientes V3 y V4, sin embargo el valor de  $F_{ST}$  es bastante bajo (0,089) y no se aplicaron correcciones de Bonferroni. Además ninguna de las dos resultó ser significativamente diferente de las vertientes V2, V5, V6 y V7, por lo tanto, si no son diferentes de éstas, tampoco deberían serlo entre ellas. Las vertientes V8 y V10 también aparecieron como vertientes distintas de todas las otras vertientes del salar, pero el valor de  $F_{ST}$  entre ellas es mucho más bajo (0,119) que en el caso de las comparaciones con V1, V11, C1, C2 o C3 (>0,39).

Con este test se corroboran algunas observaciones obtenidas a partir de la red de haplotipos (Fig. 8). Cada una de las tres vertientes del salar de Carcote así como las vertientes V1 y V11 del salar de Ascotán formarían grupos genéticamente muy diferenciados. También existiría un grupo compuesto por las vertientes V2 a la V7 del salar de Ascotán. Las vertientes V8 y V10 formarían grupos separados, a pesa de los valores bajos de los  $F_{ST}$ .

**Tabla 4.** Valores de  $F_{ST}$  entre cada par de vertientes y los valores de significancia (bajo y sobre la diagonal principal respectivamente).

	ASC V1	ASC V2	ASC V3	ASC V4	ASC V5	ASC V6	ASC V7	ASC V8	ASC V10	ASC V11	CAR C1 P1	CAR C1 P2	CAR C2	CAR C3
ASC V1		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V2	0,473		0,05 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V3	0,581	0,046		0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V4	0,501	-0,001	0,089		0,40 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V5	0,526	-0,007	0,006	-0,002		0,99 ± 0,00	0,94 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V6	0,545	0,006	-0,004	0,006	-0,042		0,82 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V7	0,449	-0,004	0,037	-0,016	-0,028	-0,021		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V8	0,707	0,393	0,569	0,341	0,458	0,476	0,367		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V10	0,662	0,355	0,531	0,316	0,421	0,442	0,347	0,119		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ASC V11	0,764	0,413	0,396	0,457	0,442	0,417	0,405	0,774	0,750		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CAR 1 P1	0,935	0,812	0,853	0,840	0,848	0,847	0,805	0,910	0,893	0,926		0,52 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CAR 1 P2	0,908	0,749	0,793	0,780	0,782	0,782	0,746	0,874	0,853	0,885	-0,007		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CAR 2	0,946	0,773	0,814	0,811	0,819	0,814	0,762	0,915	0,899	0,924	0,955	0,913		0,00 ± 0,00
CAR 3	0,909	0,668	0,706	0,711	0,706	0,699	0,663	0,865	0,841	0,855	0,895	0,796	0,731	

Luego, para analizar la estructuración genética de las secuencias nucleotídicas se realizó un análisis de varianza molecular espacial, o SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance; Dupanloup et al., 2002). Este análisis permite encontrar los grupos en que se divide la muestra total, los cuales presentan la menor varianza *dentro* de cada uno, mientras que se maximiza la variación *entre* grupos. La ventaja de realizar este análisis en lugar de un AMOVA simple (Analysis of MOlecular VAriance) es que no hay que separar *a priori* la muestra, además de que incluye el factor espacial dentro del análisis. En este análisis no se consideró la vertiente V12 para eliminar el ruido que podría introducir en los resultados.

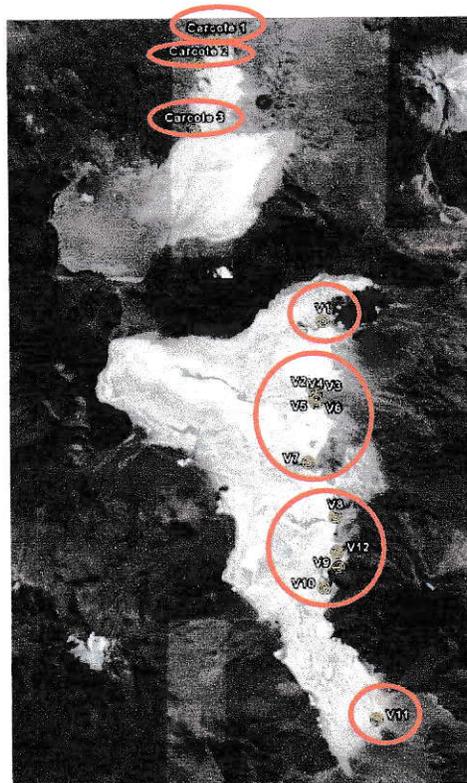
**Tabla 5.** Porcentaje de variación dentro y entre los grupos en que se dividió la muestra total de secuencias. Se indica el número de grupos cuyo porcentaje de variación *entre grupos* fue mayor (fila en color celeste).

Grupos	Porcentaje de Variación DENTRO GRUPOS	Porcentaje de Variación ENTRE GRUPOS
2	17,58i	62,07
3	17,41	60,15
4	9,74	65,23
5	11,76	60,03
6	13,31	57,24
7	1,04	69,54
8	18,25	51,00
9	0,77	68,76
10	0,29	67,96
11	0,55	67,15
12	-1,17	68,76
13	-1,19	68,60

En la Tabla 5 se indican el porcentaje de variación *entre* y *dentro* del distinto número de grupos en que se dividió la muestra. La variación *entre* grupos es máxima cuando la muestra se dividió en siete grupos (69,54%) y la variación *dentro* de grupos es una de las más bajas.

Los siete grupos en que queda separada la muestra se indica en la Fig. 11: cada una de las vertientes del salar de Carcote forma un grupo por sí sola. Dentro de Ascotán, las vertientes de los extremos norte y sur del salar, V1 y V11 respectivamente, también forman un grupo por sí solas. Pero las vertientes del centro de este salar forman dos grupos: uno contiene desde la vertiente V2 a la V7, mientras que el otro grupo reúne a las vertientes V8, V10 y V12. A diferencia del test de  $F_{ST}$  pareado, el análisis de SAMOVA no diferencia a las vertientes V8 y V10.

El valor de  $F_{CT}$  obtenido al hacer esta división es de 0,694 y es significativo (la probabilidad de obtener un valor al azar mayor o igual que el observado es igual a cero, es decir,  $P(\text{rand. value} \geq \text{obs. value}) = 0,0 \pm 0,0$ ). La tabla de AMOVA con los grupos más diferenciados obtenidos después de realizar SAMOVA se muestra en la Tabla 6.

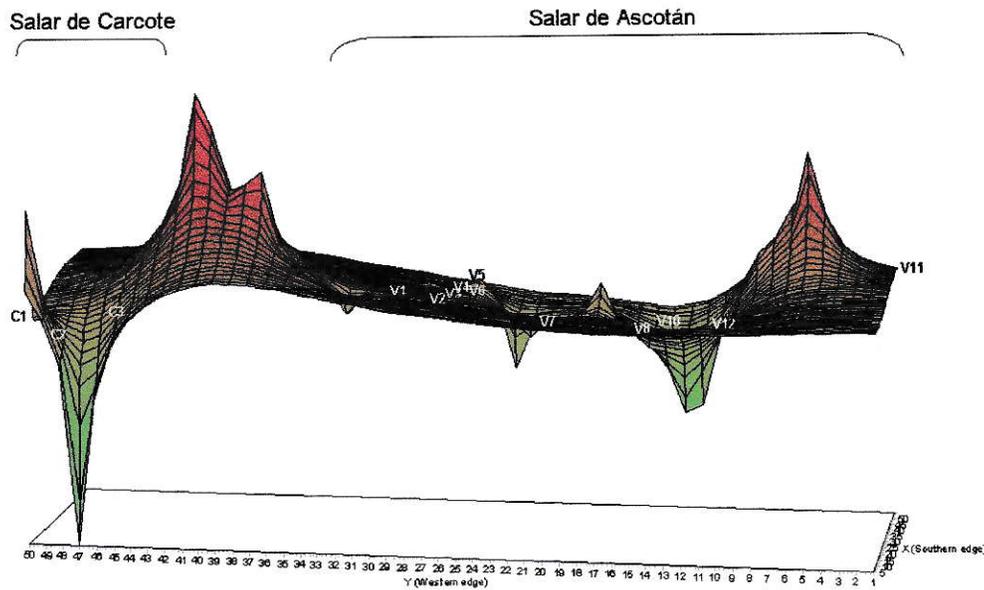


**Figura 11.** División de la muestra total de secuencias de las vertientes del salar de Carcote y del salar de Ascotán. En círculos naranjos se indican los 7 grupos en que se dividió la muestra y las vertientes que contiene cada uno.

**Tabla 6.** Tabla de AMOVA después de haber realizado el análisis de SAMOVA que permitió separar la muestra en 7 grupos para maximizar la diferencia entre ellos.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación	P (rand. value $\leq$ obs. value)
Entre grupos	6	1030,92	3,64	69,54	0,0 $\pm$ 0,0
Entre poblaciones dentro de grupos	7	21,00	0,05	1,04	0,0 $\pm$ 0,0
Entre poblaciones	339	522,43	1,54	29,41	0,0 $\pm$ 0,0
Total	352	1573,45	5,24		

De este modo, dada la diversidad genética encontrada y las diferencias entre un sitio y otro, es posible visualizar cómo esta variabilidad se distribuye en el espacio. La Fig. 12 corresponde a una interpolación de la diversidad genética, donde los ejes X e Y corresponden a las coordenadas geográficas (latitud y longitud, respectivamente), mientras que el eje Z representa la distancia genética medida como diferencias entre par de secuencias. Se observa un primer punto máximo que separa a los dos salares y refleja la gran distancia genética que existe entre ellos (tal como se refleja en la red de haplotipos, Fig. 8). Dentro del salar de Carcote, C1 queda separada de las otras dos vertientes, lo que coincide con los 6 pasos mutacionales de distancia mínima que separan a estas vertientes en la Fig. 8. Entre C2 y C3 existe una caída en el plano, lo que indica que las diferencias son muy pocas entre ellas, donde la mayor diferencia entre el haplotipo de C2 y un haplotipo de C3 son 3 pasos mutacionales solamente. Dentro del salar de Ascotán, la vertiente V1 queda separada del resto por una elevación del plano, pero ésta es pequeña, principalmente, porque hay un haplotipo compartido con V7 (lo mismo ocurre con las vertientes C2 y C3). Luego, aparece un grupo de vertientes (V2 a V6) sobre una misma elevación, pero no separadas por éste. La vertiente V7, ubicada hacia el sur de este grupo y más alejada, aparece después de una caída del plano, indicando que todas estas vertientes serían parte de un mismo grupo no diferenciado. Luego, aparece otra elevación del plano separando a este grupo de las vertientes V8, V10 y V12, las cuales estarían formando otro grupo de vertientes no diferenciadas. Estos dos grupos también aparecieron al realizar el análisis de SAMOVA (Fig. 11) Finalmente, un último punto máximo separa a la vertiente V11, que se encuentra en el extremo sur del salar.



**Figura 12.** Interpolación de la diversidad genética distribuida en el espacio. Se indica la porción del plano que corresponde al salar de Carcote y al salar de Ascotán. Además, sobre el plano está indicada la ubicación de las vertientes dentro de cada salar.

### Tiempo de divergencia de los salares.

Como ya se ha mencionado, en la red de haplotipos (Fig. 8) se observa una gran separación entre los haplotipos del salar de Ascotán y los del salar de Carcote. Sobre la base de la teoría del Reloj Molecular, a partir del promedio de diferencias entre los haplotipos de cada salar (14,528) y considerando distintas tasas mutacionales calculadas en especies cercanas a la nuestra, podemos estimar la magnitud del tiempo de divergencia de estas dos poblaciones (Tabla 7).

**Tabla 7.** Estimación de la magnitud de tiempo de divergencia de los salares de Ascotán y Carcote, obtenido a partir de distintas tasas mutacionales (Sivansundar y col., 2001; Strecker y col., 1996; Barluenga & Meyer, 2004).

Tasa de Mutación ( $\mu$ ) por Millón de años	Tiempo de Divergencia (años)
1,67%	
(D-loop <i>Prochilodus</i> ; Teleostei, pez de ríos sudamericanos)	470.000
2,8%	
(D-loop <i>Cyprinodon</i> ; Cyprinodontidae)	280.000
5,9%	
(D-loop completo de <i>Amphilophus zalius</i> , ciclido Neotropical)	134.000
7,08%	
(Región más variable del D-loop de <i>Amphilophus zalius</i> , ciclido Neotropical)	111.800

De todos los casos mostrados en la Tabla 7, el género más cercano a *Orestias* es el género *Cyprinodon*, pues ambos pertenecen a la misma familia Cyprinodontidae. En él se estimó la tasa mutacional del D-loop completo (Strecker y col., 1996), con la que se obtuvo un tiempo de divergencia cercano a los 280 mil años, una edad mucho más antigua a la edad del paleolago más antiguo datado, Ouki (Placzek y col., 2006). También se utilizó una tasa mutacional de 1,67% calculada para la región control de los peces del género *Prochilodus* que habitan ríos sudamericanos (Sivansundar y col., 2001), una tasa de 5,9% calculada en D-loop completo del ciclido neotropical *Amphilophus zalius* y una tasa mutacional de 7,08% para la parte más variable de esta misma secuencia (Barluenga & Meyer, 2004).

### Tamaños efectivos de las vertientes.

El tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) corresponde al tamaño teórico de una población de acuerdo a la diversidad genética que muestra, bajo los supuestos del modelo de Wright- Fisher.

Considerando la misma tasa mutacional de 2,8% calculada para el D-loop del género *Cyprinodon* (Strecker y col., 1996), es posible obtener los  $N_e$  para cada grupo genéticamente diferenciado a partir de los índices de diversidad,  $K$ ,  $S$  y  $\pi$  (Tabla 8).

Los tamaños efectivos calculados variaron entre 18.000 y 333.000 individuos, sin considerar la vertiente C2 de Carcote. El  $N_e$  de esta vertiente es cero, porque no se encontró diversidad genética en ella (Tabla 3). Los grupos del salar de Carcote muestran menores tamaños efectivos que los del salar de Ascotán. Los grupos que contienen más de una vertiente dentro de ellos presentan tamaños efectivos que son entre cuatro y nueve veces más abundantes que los grupos compuestos por una sola vertiente.

**Tabla 8.** Tamaños efectivos de cada grupo diferenciados, calculados a partir de tres índices de diversidad genética: número de haplotipos ( $K$ ), número de sitios polimórficos ( $S$ ) y promedio de diferencias por par de secuencias ( $\pi$ ).

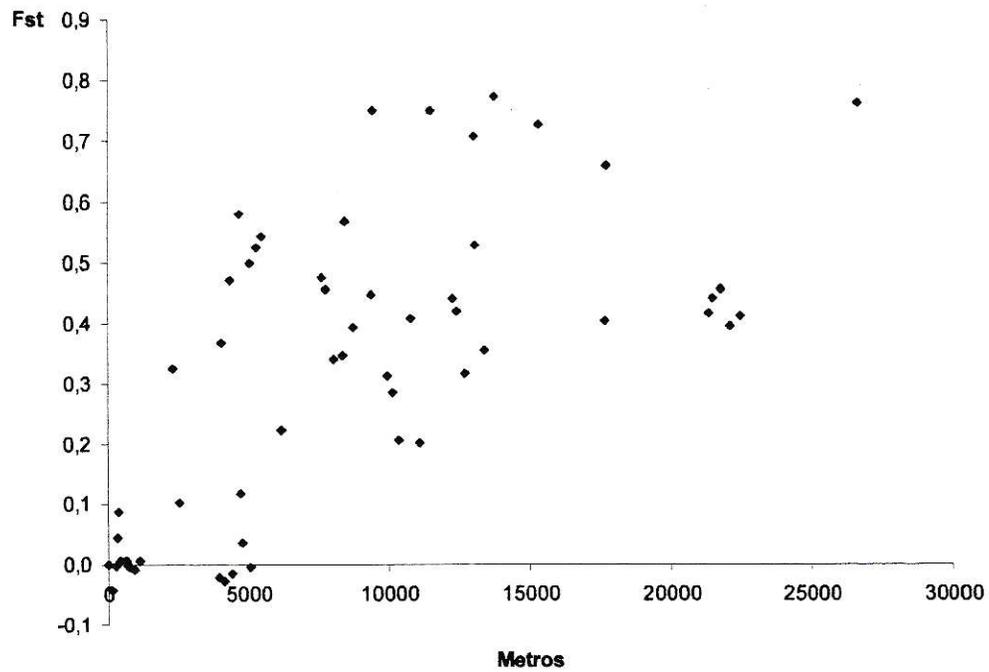
GRUPO	$N_e (\theta(K))$	$N_e (\theta(S))$	$N_e (\theta(\pi))$
C1	49.466	48.740	18.081
C2	0	0	0
C3	34.963	26.594	16.995
ASC V1	69.883	42.558	25.986
(V2 V3 V4 V5 V6 V7)	333.842	117.865	98.824
(V8 V10 V12)	312.718	119.839	57.673
ASC V11	86.463	38.423	42.534

### **Aislamiento por distancia dentro del salar de Ascotán**

La estructuración genética encontrada en el salar de Ascotán indica que las vertientes más aisladas son poblaciones diferenciadas, mientras que las vertientes cercanas pertenecen a un mismo grupo. Es por esto que se realizó un test de Mantel, cuyo objetivo es determinar si hay aislamiento por distancia. Este análisis permite poner a prueba si las vertientes más cercanas son más parecidas entre sí que las vertientes que están más alejadas siguiendo el modelo de aislamiento por distancia tipo stepping stone.

El resultado del test de Mantel entregó un coeficiente de correlación de Mantel,  $r = 0,64$ . La probabilidad de obtener ese valor de  $r$  o uno mayor, por simple azar, es:  $P(r_{\text{rand}} \geq r_{\text{obs}}) = 0,00$ . Por lo tanto, existe una relación directamente proporcional entre distancia geográfica (metros) y distancia genética (valores de  $F_{ST}$ ) (Fig. 13): a menor distancia entre vertientes, hay menos diferencias entre las secuencias nucleotídicas.

El resultado de este análisis concuerda con los obtenidos por los de SAMOVA y el test de  $F_{ST}$  pareado: las vertientes más cercanas presentan secuencias nucleotídicas más parecidas y por lo tanto no están estructuradas genéticamente, como es el caso de las vertientes del centro del salar. Por el contrario, las vertientes más aisladas presentan más diferencias genéticas y conforman grupos genéticos diferenciados. Esto último ocurre con las vertientes de los extremos norte (V1) y sur del salar (V11).

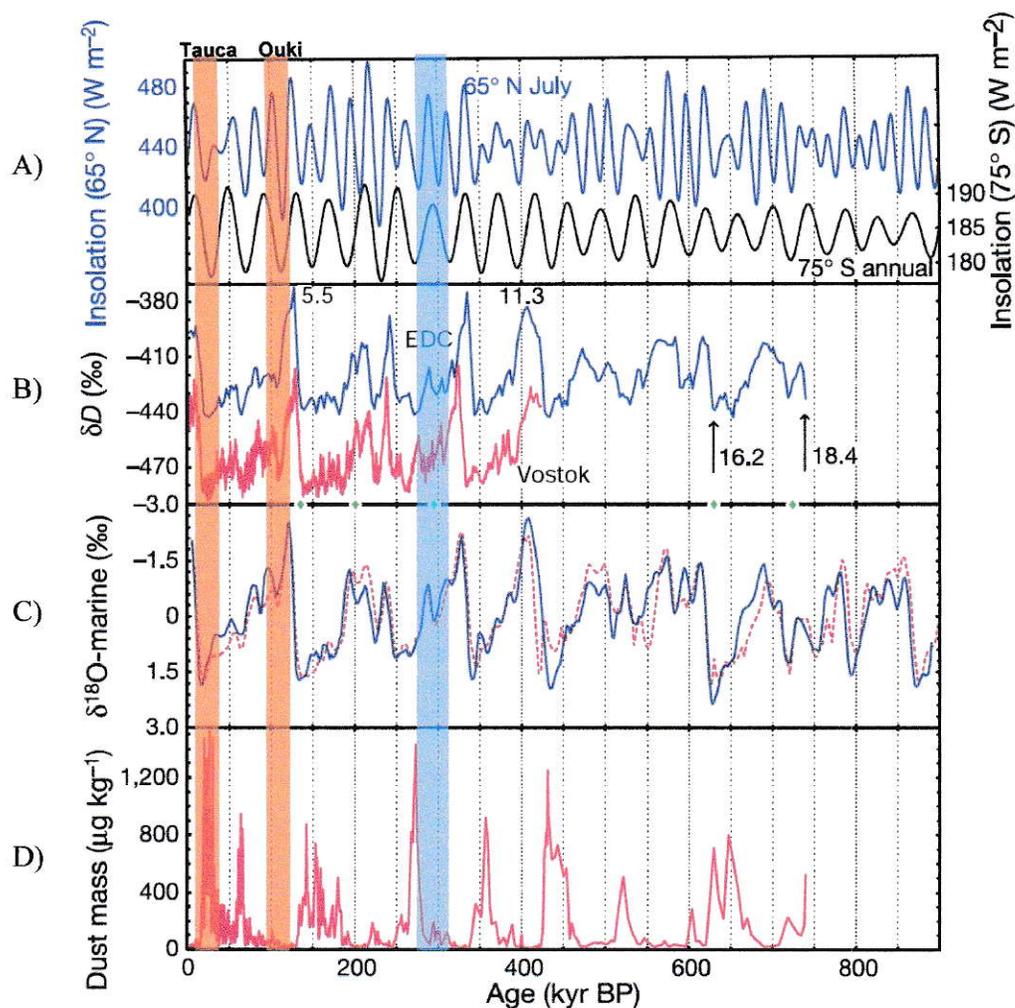


**Figura 13.** Correlación de Mantel entre la distancia geográfica (metros) que separa cada par de vertientes y la distancia genética (valores de Fst). El valor del coeficiente correlación de Mantel,  $r = 0,64$ ,  $P = 0,00$ .

## **DISCUSIÓN**

### **Separación antigua entre los salares de Ascotán y Carcote.**

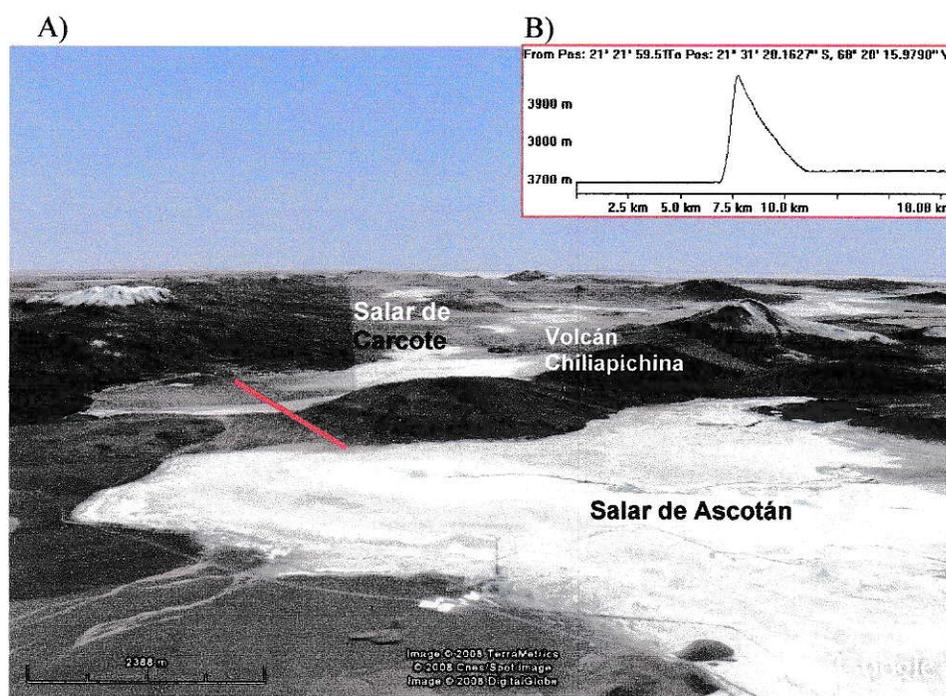
La gran distancia genética que separa a los haplotipos de cada salar (Fig. 8) indica que ha existido una barrera muy antigua al flujo génico. El tiempo de divergencia estimado de estos salares es cercano a los 280 mil años atrás. Para este período no existe registro de algún paleolago (el más antiguo es el paleolago Ouki, hace 120 mil años atrás; Placzek y col., 2006). Sin embargo, hace 300 mil años atrás estaba comenzando una transición desde una fase glacial a una interglacial (Fig. 14; EPICA Community Members, 2004), por lo tanto, es posible que hubiese existido un paleolago en la zona altiplánica conectando ambos salares, que se separaron cuando éste se secó.



**Figura 14.** Comparación de diversos registros paleoclimáticos de los últimos 800 mil años. A) Registro de radiación. B)  $\delta D$  obtenido a partir del EPICA Dome C (línea azul) y el  $\delta D$  obtenido a partir de Vostok (línea roja). C) Registro marino de isótopos de oxígeno sobre foraminíferos bentónicos. D) Registro de polvo obtenido a partir del EPICA Dome C. (modificado de EPICA Community Members, 2004). Se indican el período de tiempo en que existieron los paleolagos más grandes, Tauca y Ouki (barras de color naranja) y el período estimado de divergencia entre las poblaciones de *Orestias* de Ascotán y Carcote (barra azul).

La separación de los salares también pudo haber sido consecuencia de un cambio en la topografía de esta zona. El Altiplano es conocido por sufrir actividad volcánica y

constantes movimientos orogénicos y tectónicos, no sólo durante el levantamiento andino, sino que durante el Pleistoceno y el Holoceno también (Ramírez & Huete, 1981; Gregory-Wodzicki, 2000; Montgomery y col., 2001; Hartley, 2003; Garziona y col., 2008). El volcán Chiliapichina, ubicado entre los salares de Ascotán y Carcote (Fig. 15), tiene una edad de entre 15 a 8 millones de años, es decir, se habría originado por la actividad volcánica ocurrida durante el Mioceno Superior y Plioceno (Fig. 16). Este tiempo coincide con la formación de las cuencas endorreicas de los salares (Ramírez & Huete, 1981). Por lo tanto, el volcanismo ocurrido en esta época, pudo haber causado la separación de un lago antiguo formado, por lo menos, por las cuencas de los salares.



**Figura 15.** A) Mapa del sitio de estudio. Se observan los dos salares separados por el volcán Chiliapichina. B) Perfil indicando una de las alturas mínimas de este cerro (corresponde a la línea roja mostrada en A).

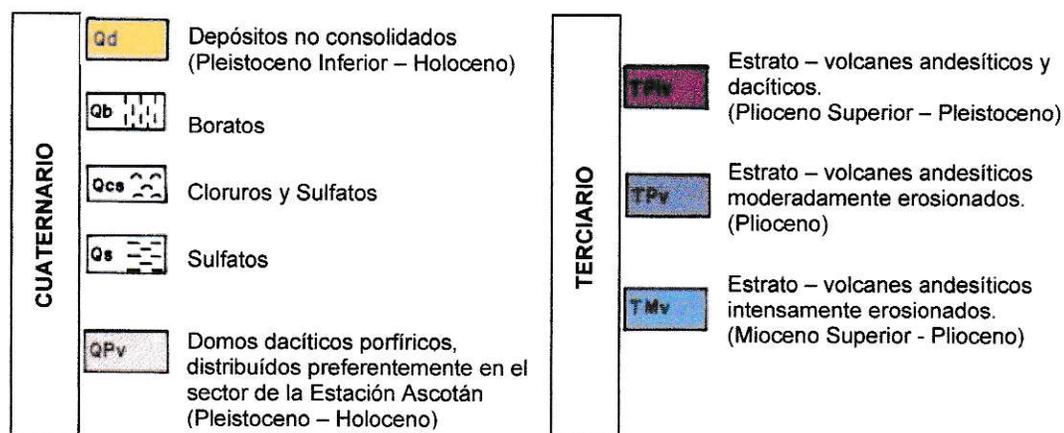
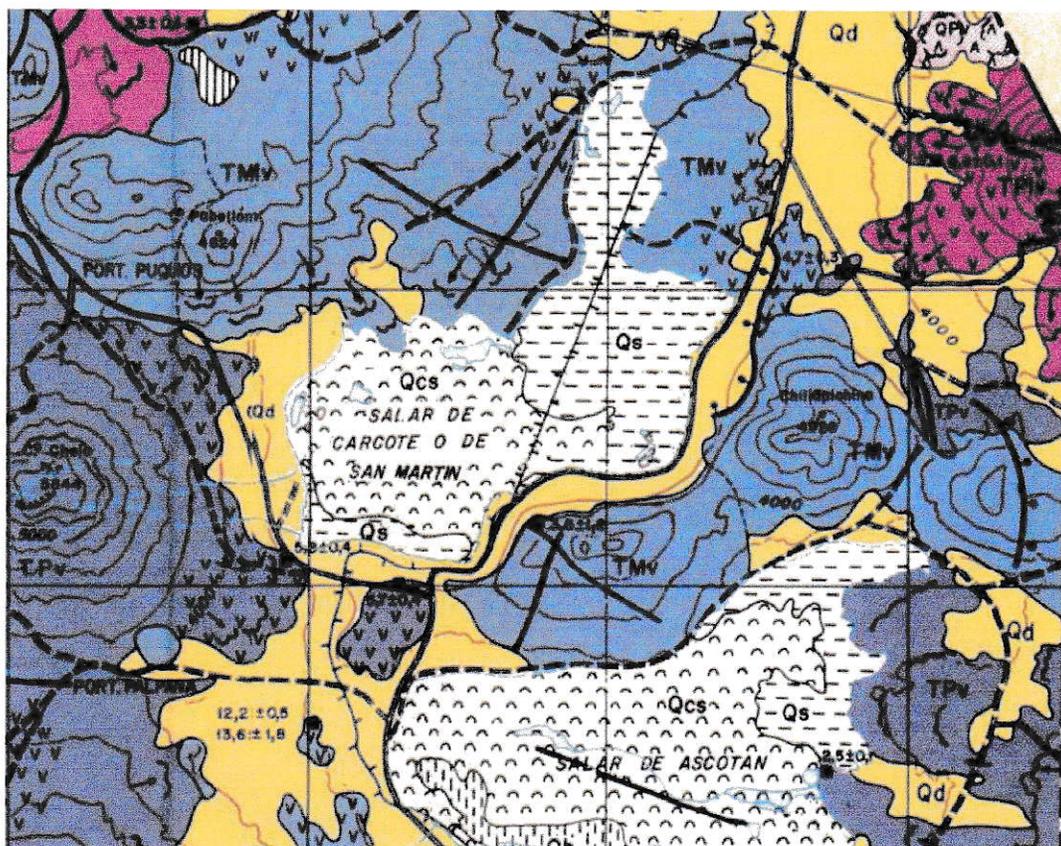


Figura 16. Sección del mapa geológico de la Hoja Ollagüe donde aparece el volcán Chiliaipichina, que separa a los salares Ascotán y Carcote. Este volcán data del Mioceno superior-Plioceno (modificado de Ramírez & Huete, 1981)

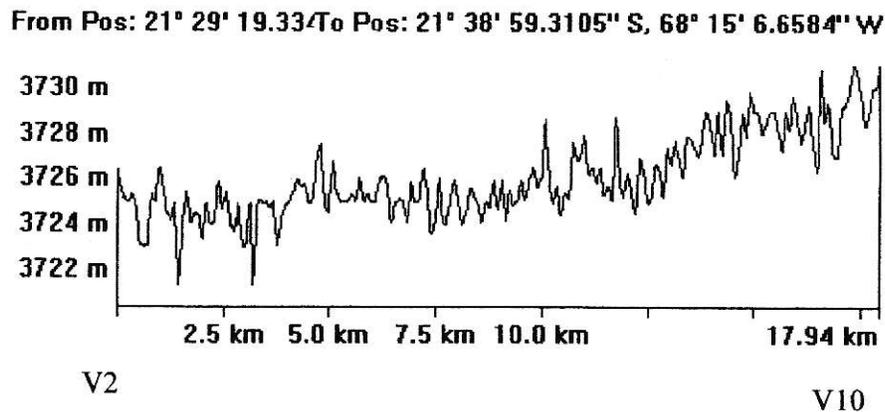
Una tercera posibilidad que podría explicar esta gran diferenciación entre salares es que la colonización de cada uno haya ocurrido de forma independiente. Actualmente, sólo se ha publicado una filogenia del género *Orestias* (Lüssen y col, 2003), pero en ésta no se incluyeron individuos del salar de Carcote. Sin embargo, una filogenia del género aún no publicada y que sí incluye muestras de ambos salares, respalda esta última opción, ya que ambos salares quedarían separados, y *Orestias* de Carcote serían más basal que *O. ascotanensis* (M. Méndez, comunicación personal).

#### **Diversidad genética de *Orestias* en los salares de Ascotán y Carcote.**

Las tres vertientes muestreadas en el salar de Carcote y las vertientes de los extremos norte y sur del salar de Ascotán forman grupos genéticamente diferenciados. La principal característica de estos grupos es que presentan una baja diversidad genética. Probablemente, estos cuerpos de agua han estado aislados desde que se secó el gran paleolago Tauca hace 11.000 años atrás (Placzek y col., 2006). Desde ese momento, los tamaños poblacionales han disminuido, eliminándose variabilidad directamente. Posteriormente, la deriva génica actuó con mayor intensidad sobre estas poblaciones pequeñas. La vertiente C2 corresponde al caso extremo en el que se fijó un solo haplotipo en la población. Éste también se encuentra en las otras vertientes de Carcote, pero se encuentra en muy baja frecuencia, lo cual es el resultado del cambio al azar de las frecuencias haplotípicas de una generación a la siguiente.

Por otra parte, la presencia de vertientes no diferenciadas genéticamente en Ascotán es un hallazgo inesperado. Éstas corresponden a las vertientes centrales del salar de Ascotán que forman dos grupos altamente diversos. Probablemente, estas vertientes entran en contacto esporádicamente, presentando una dinámica de tipo metapoblacional: cada vertiente podría ser considerada como un parche habitado por un grupo de *Orestias*, que al conectarse permiten que exista migración y flujo génico. De esta manera, en una de las vertientes podría extinguirse uno de los haplotipos, pero podría seguir existiendo en las otras. Cuando las vertientes se conecten, este haplotipo podría recolonizar la vertiente en la que se perdió.

Uno de estos grupos centrales está compuesto sólo por individuos de las vertientes V2 a la V7 (6 vertientes en total), más un individuo de la vertiente V8 que presenta el mismo haplotipo más frecuente de este grupo. El segundo haplogrupo contiene individuos desde las vertientes V2 a la V12 (9 vertientes en total). Por lo tanto, existiría un flujo unidireccional desde las vertientes del sur, V8 y V10, hacia las del norte (la vertiente V12 presenta haplotipos únicos). Este flujo podría deberse a que las vertientes del sur se encuentran a mayor altura que las del norte, como se observa en la Fig. 17, aunque esta pendiente es baja.



**Figura 17.** Perfil del plano del salar desde la vertiente V2 a la V10. Se observa una leve pendiente que podría explicar por qué sólo hay flujo desde el sur al norte en el salar de Ascotán.

Considerando los dos tipos de vertientes encontradas en este estudio, las que están aisladas y las que se conectan, el modelo de diferenciación genética que podría estar operando en estos salares es el siguiente: cuando hay un nivel de agua bajo, cada vertiente se encuentra separada y posee un pequeño grupo de peces con baja diversidad genética. Una vez que el nivel de agua aumenta, las vertientes más cercanas entre sí podrán conectarse y reunir su variabilidad en un grupo más grande, mientras que las vertientes más alejadas permanecerán aisladas y no podrán reponer la diversidad que perdieron durante la etapa seca. Cuando el nivel de agua vuelve a disminuir, el hábitat se fragmenta y la población queda nuevamente separada y reducida a pequeñas pozas. En este momento comienza la diferenciación genética, dentro de cada cuerpo de agua de forma independiente. La reducción del hábitat conlleva una disminución de las poblaciones y la pérdida de diversidad genética. Luego, la deriva génica se intensifica y las frecuencias haplotípicas cambian más drásticamente de una generación a la siguiente,

fijando algunos alelos y perdiendo otros; es así como se regresa a un estado similar al inicial. Por lo tanto, las vertientes que logran reconectarse permiten que exista flujo génico entre ellas y logran mantener una alta variabilidad genética. Por el contrario, las vertientes que permanecen aisladas se diferencian del resto y disminuyen su diversidad. Si llegasen a ocurrir nuevas mutaciones podría aumentar la diversidad, pero es muy factible que estos nuevos haplotipos se extingan rápidamente, debido a que la deriva elimina con mayor probabilidad a los de alelos de baja frecuencia.

Una posible causa de la conexión de las vertientes es el Invierno Altiplánico o Boliviano que ocurre durante los meses de verano (Diciembre a Febrero, aproximadamente). Es durante este tiempo que caen las únicas precipitaciones en todo el año. Estas lluvias podrían aumentar el nivel de agua dentro de las vertientes haciendo que se conecten efectivamente hacia el centro del salar, y la disminución de la salinidad permitiría que los individuos de *O. ascotanensis* puedan migrar de una vertiente a la otra.

Al utilizar el modelo de Kornfield & Smith (2000; Fig. 1), estos resultados permiten comprender los procesos de diferenciación y especiación que han ocurrido en el género *Orestias*: cuando el nivel lacustre de estos salares disminuyó y llegó al nivel actual, la fragmentación del hábitat causó la pérdida de muchos haplotipos. De esta manera la diversidad genética de la especie disminuyó. Las vertientes que quedaron aisladas tienen grupos que están divergiendo genéticamente, pues contienen haplotipos que no se encuentran en ningún otro lugar, lo cual es una situación similar a cuando algunos linajes generan “diferenciaciones tróficas” y divergen durante las fases secas, de acuerdo

a Kornfield & Smith (2000). Incluso durante las fases húmedas, estas vertientes se mantienen aisladas, por lo tanto, sus diferencias siguen aumentando. Si se mantuvieran así por un tiempo suficiente, podrían llegar a transformarse en especies distintas. Lo mismo pudo haber ocurrido al nivel de los salares, ya que la separación de éstos es muy antigua y ha causado que las *Orestias* del salar de Carcote conformen una unidad evolutiva diferente de la del salar de Ascotán. En el futuro podrían llegar a ser catalogadas como especies distintas, al menos considerando la definición de especie desde un punto de vista filogenético. De este modo, la fragmentación del hábitat y la aparición de barreras al flujo génico jugarían un papel fundamental en la divergencia genética de algunos grupos y, más tarde, en la generación de nuevas especies.

La diversidad genética de las vertientes que entran en contacto esporádicamente es muy alta, lo que nos permitiría afirmar que las fluctuaciones en los niveles lacustres permite la mantención de esta variabilidad. Mientras que, con la existencia de grupos divergentes aislados geográficamente, podemos predecir que la diversidad específica dentro de cada salar podría aumentar en el futuro. De esta manera, las fluctuaciones en los niveles de los lagos serían el mecanismo por el cual la diversidad de especies es tan alta en el género *Orestias* y puede ser considerado como un “species flock”: durante los ciclos lacustres altos, el ancestro de *Orestias* pudo haber colonizado distintas cuencas altiplánicas. 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. De esta manera, la especiación alopátrica sería el

mecanismo más importante en la generación de la alta diversidad del género *Orestias* en el Altiplano Sur.

### **Inferencia demográfica.**

Los altísimos tamaños poblacionales efectivos estimados (Tabla 8) superan ampliamente los tamaños reales, incluso el  $N_e$  más bajo, cerca de 17.000 individuos sólo en la vertiente C3 del salar de Carcote. Es posible que en el pasado haya existido una gran población que haya permitido la generación y mantención de gran diversidad genética. Durante las fases secas, el hábitat se fragmentó y la población disminuyó, pero la deriva no alcanzó a eliminar más variabilidad. Luego, durante un evento húmedo, las poblaciones se reconectaron, permitiendo la recuperación de la diversidad. Estos ciclos ocurrieron así sucesivamente hasta el presente, en donde la deriva ya está actuando en las vertientes aisladas, eliminando diversidad, pero en las vertientes conectadas, esta variabilidad aún se mantiene.

Una explicación alternativa para los altos  $N_e$  es que el ambiente esté acelerando la tasa mutacional. Un ejemplo de esto se ha documentado en distintas especies de hongos con historias de vida y tipos de reproducción diferentes provenientes de la ladera africana del "Evolution Canyon", en Israel. Éstos presentan una tasa mutacional mayor que las de la ladera europea, cuyo ambiente es mucho menos estresante (Lamb y col., 2008). Otro caso es el de microcrustáceos halofílicos de Norteamérica y de Australia, los que han

sufrido más eventos de inserción/delección y sustituciones nucleotídicas en comparación a las especies de agua dulce. Por lo tanto, esta tasa de mutación más alta sería consecuencia del efecto de la alta concentración de sales de los lagos que habitan sobre la estructura del ADN y de sus proteínas asociadas (Hebert y col., 2002). La radiación solar sobre el Altiplano es muy alta, hay gran variación de temperatura diaria, el ambiente es extremadamente seco, la salinidad dentro de las vertientes es muy alta (Risacher y col, 1999; Keller & Soto, 1998). Todas estas condiciones pueden provocar un aumento en la aparición de nuevas mutaciones. *O. ascotanensis* presenta cromatóforos y mucha pigmentación desde las etapas tempranas de su desarrollo (Jara y col., 1995, Vila y col., 2007), los cuales podrían ser el resultado de la adaptación a este tipo de condiciones ambientales para evitar el daño UV, tal como ocurre en otras especies (Kobelt & Linsenmair, 1986; Hebert & Emery, 1990; Morgan & Christy, 1996; Macedonia y col., 2000).

Por otra parte, los tamaños efectivos estimados a partir de los distintos índices de diversidad deberían concordar con el tamaño de una población tipo Wright-Fisher. Sin embargo, en este caso el supuesto de equilibrio mutación-deriva no se cumple, ya que la deriva génica es muy intensa en estas poblaciones pequeñas y cualquier mutación nueva tiene pocas probabilidades de fijarse en la población debido a que la deriva tiende a eliminar a los haplotipos de baja frecuencia.

### **Conservación.**

En ambos salares existen vertientes aisladas cuya variación genética única conforma un endemismo genético local y pueden ser consideradas como “unidades evolutivas significativas” o ESU (Evolutionary Significant Unit). Esto quiere decir, que son poblaciones que están reproductivamente separadas (no aisladas necesariamente) de otras poblaciones, tienen adaptaciones distintivas o diferentes y representan un legado evolutivo importante de la especie (Waples, 1991). Estas vertientes son más vulnerables a la extinción, porque, a diferencias de las vertientes conectadas, no podrían ser recolonizadas si llegasen a extinguirse, y con ello desaparecería variabilidad genética única de esta especie. Por el contrario, las vertientes que no están estructuradas han sido capaces de mantener su diversidad genética, y por lo tanto, tienen mayores probabilidades de adaptarse a cambios ambientales.

Hasta ahora, la disminución de las poblaciones de *Orestias* se debía solamente a factores ambientales. Sin embargo, el año 1996 comenzaron las actividades de la Mina El Abra, la cual obtiene el agua necesaria para sus actividades desde la cuenca del salar de Ascotán, en particular de un pozo ubicado en la vertiente 11. En el año 2005 se detectó una disminución considerable en el caudal de la vertiente V11, hasta encontrarse prácticamente seca, de acuerdo al Informe Cuatrimestral del Programa de Monitoreo del Proyecto “El Abra” (disponible en [http://www.e-seia.cl/expediente/expedientes.php?id\\_](http://www.e-seia.cl/expediente/expedientes.php?id_)

expediente=1509&idExpediente=1509#-1). Durante el año 2006, el caudal ya había sido restablecido (Fig. 18), pero, desafortunadamente, esta vertiente está aislada, por lo que ya no es posible recuperar la diversidad genética que perdió.

Por lo tanto, la extinción de una vertiente es una situación posible, y más ahora que a las condiciones ambientales se suma la efecto de la minería sobre este ecosistema.

A)



B)



**Figura 18.** Vertiente V11 del salar de Ascotán (A) en condiciones secas (fotografía tomada por Sergio Scott) y después de ser rellenada (B).

## BIBLIOGRAFIA

- Aljanabi, S.M. y Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Allendorf, F.W. y Luikart, G. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. 642 pp. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Baker, P.A. Seltzer, G.O., Fritz, S.C., Dunbar, R.B., Grove, M.J., Tapia, P.M., Cross, S.L., Rowe, H.D., y Broda, J.P. 2001. The History of South American Tropical Precipitation for the Past 25,000 Years. *Science* 291: 640-643.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. y Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barluenga, M. y Meyer, A. 2004. The Midas cichlid species complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes?. *Molecular Ecology* 13: 2061-2076.

- Barron, E.J. y Peterson, W.H. 1989. Model Simulation of the Cretaceous Ocean Circulation. *Science* 244: 684-686.
- Dupanloup, S., Schneider, S. y Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- EPICA community members. 2004. Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* 429: 623-628.
- Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- 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. *Quaternary Research* 61: 95-104.

- Garzione, C.N., Hoke, G.D., Libarkin, J.C., Withers, S., MacFadden, B., Eiler, J., Ghosh, P., y Mulch, A. 2008. Rise of the Andes. *Science* 320: 1304-1307.
- Greenwood, P.H. 1984. What *Is* a Species Flock?. En A.A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, pp. 13-19. University of Maine, Orono.
- Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112 (7): 1091-1105.
- Hammer, O., Harper, D., y Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9 pp.
- Haq, B.U., Hardenbol, J., Vail, P.R. 1987. Chronology of Fluctuating Sea Levels Since the Triassic. *Science* 235: 1156-1167.
- Hartley, A.J. 2003. Andean uplift and climate change. *Journal of the Geological Society* 160: 7-10.
- Hebert, P.D.N. y Emery, C.J. 1990. The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology* 4: 703-710.

- Hebert, P.D.N., Remigio, E.A., Colbourne, J.K., Taylor, D.J. y Wilson, C.C. 2002. Accelerated Molecular Evolution in Halophilic Crustaceans. *Evolution* 56(5): 909-926.
- Humphries, J.M. y Rush Miller, R. 1981. A Remarkable Species Flock of Pupfishes, Genus *Cyprinodon*, from Yucatan, Mexico. *Copeia* 1981 (1): 52-64.
- Jara, F., Soto, D. y Palma, R. 1995. Reproduction in Captivity of the Endangered Killifish *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Copeia* 1995 (1): 226-228.
- Johnson, T.C., Scholz, C.A., Talbot, M.R., Kelts, K., Ricketts, R.D., Ngobi, G., Beuning, K., Ssemmanda, I. y McGill, J.W. 1996. Late Pleistocene Desiccation of Lake Victoria and Rapid Evolution of Cichlid Fishes. *Science* 273: 1091-1093.
- Joyce, D.A., Lunt, D.H., Bills, R., Turner, G.F., Katongo, C., Duftner, N., Sturmbauer, C. y Seehausen, O. 2005. An extant cichlid fish radiation emerged in an extinct Pleistocene lake. *Nature* 435: 90-95.
- Keller, B. y 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.

- Kobelt, F.K. y Linsenmair, K.E. 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. I. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia* 68: 533-541.
- Kornfield, I. y Smith P.F. 2000. African Cichlid Fishes: Model Systems for Evolutionary Biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:163-96.
- Lamb, B.C., Mandaokar, S., Bahsoun, B., Grishkan, I., y Nevo, E. 2008. Differences in spontaneous mutation frequencies as a function of environmental stress in soil fungi at "Evolution Canyon," Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (15): 5792-5796.
- Lenters, J.D. y Cook, K.H. 1997. On the Origin of the Bolivian High and Related Circulation Features of the South American Climate. *Journal of the Atmospheric Sciences* 54: 656-677.
- Lowe-McConnell, R.S. 1993. Fish Faunas of the African Great Lakes: Origins, Diversity, and Vulnerability. *Conservation Biology* 7 (3): 634-643.
- Lüssen, A., Falk, T.M. y Villwock, W. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 151-160.

- Macedonia, J.M., James, S., Wittle, L.W. y Clark, D.L. 2000. Skin Pigments and Coloration in the Jamaican Radiation of *Anolis* Lizards. *Journal of Herpetology* 34 (1): 99-109.
- Mantel, N. 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* 27(1): 209-220.
- Martínez, G., Bugueño, N. y Vila, I. 1999. *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 en el Salar de Ascotán. *Noticiero Mensual del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)* 339: 7-12.
- 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.
- Montgomery, D.R., Balco, G. y Willett, S.D. 2001. Climate, tectonics, and the morphology of the Andes. *Geology* 29 (7): 579-582.
- Morgan, S.G y Christy, J.H. 1996. Survival of marine larvae under the countervailing selective pressures of photodamage and predation. *Limnology and Oceanography* 41 (3): 498-504.

- Mourguiart, P., Argollo, J., y 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.
- Parenti, L.R. 1984. A taxonomic revision of the Andean Killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 178: 107-214.
- Parenti, L.R. 1984 b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept. En A.A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, pp. 21-25. University of Maine, Orono.
- Parker, A. y Kornfield, I. 1995. Molecular perspective on evolution and zoogeography of Cyprinodontid Killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1995 (1): 8-21.
- Placzek, C., Quade, J. y 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.
- Ramírez, C.F. & Huete, C. 198. Geología de la Hoja Ollagüe. Escala 1:250.000. Carta Geológica de Chile N° 40. Instituto de Investigaciones Geológicas.

- 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. y Salazar, C. 1999. *Geoquímica de aguas en cuencas cerradas: I, II y III Regiones – Chile*. Convenio de cooperación DGA-UCN-IRD, S.I.T. N° 51, Volumen I. Síntesis.
- 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.
- Salzburger, W. y Meyer A. 2004. The species flocks of the East African cichlids fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91: 277-290.

- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2° edición, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Seehausen, O., Terai, Y., Magalhaes, I.S., Carleton, K.L., Mrosso, H.D.J., Miyagi, R., van der Sluijs, I., Schneider, M.V., Maan, M.E., Tachida, H., Imai, H., y Okada, N. 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 455: 620-627.
- Smouse, P.E., Long, J.C y Sokal, R.R. 1986. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. *Systematic Zoology* 35(4): 627-632.
- Sparks, J.S y Smith, Wm.L. 2004. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 20: 501-517.
- Sturmbauer, C. y Meyer, A. 1992. Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* 358: 578-581.

- Sturmbauer, C., Baric, S., Salzburger, W., Rüber, L. y Verheyen, E.. 2001. Lake Level Fluctuations Synchronize Genetic Divergences of Cichlid Fishes in African Lakes. *Molecular Biology and Evolution* 18(2): 144-154.
- Tamura, K., Nei, D.J., y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.
- Turner, G.F., Seehausen, O., Knight, M.E., Allender, C.J. y Robinson, R.L. 2001. How many species of cichlid fishes are there in African lakes?. *Molecular Ecology* 10: 793-806.
- Vandervoort, D.S., Jordan, T.E., Zeitler, P.K., Alonso, R.N. 1995. Chronology of internal drainage development and uplift, southern Puna plateau, Argentine central Andes. *Geology* 23 (2): 145-148.
- Verheyen, E., Salzburger, W., Snoeks, J. y Meyer, A. 2003. Origin of the Superflock of Cichlid Fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science* 300: 325-329.
- Vila, I. 2006. A New Species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia* 2006 (3): 471-476.

Vila, I., Mendez, M., Scott, S., Morales, P.M. y Poulin E. 2007. Threatened fishes of the world: *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontidae). *Environmental Biology of Fishes* 80: 491-492.

Vuille, M. 1999. Atmospheric Circulation Over the Bolivian Altiplano During Dry and Wet Periods and Extreme Phases of the Southern Oscillation. *International Journal of Climatology* 19: 1579-1600.

Waples, R.S. 1991. Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp., and the Definition of "Species" Under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review* 53 (3): 11-22.

Willis, B. 1910. Principles of Paleogeography. *Science* 31: 241-260.

Zhou, J. y Lau, K.M. Does a Monsoon Climate Exist over South America? *Journal of Climate* 11: 1020-1040.