

UCH-FC
MAG-B
C957
C.1



**VARIACIÓN GENÉTICA Y MORFOLÓGICA EN
POBLACIONES DE *Orestias ascotanensis*,
PARENTI 1984, EN EL SALAR DE ASCOTÁN, NORTE
DE CHILE.**

Tesis .
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por
Franco Alfredo Cruz Jofré

Enero 2014

Director de Tesis:
Dr. Marco Méndez

Codirector de Tesis:
Dra. Irma Vila

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

FRANCO ALFREDO CRUZ JOFRÉ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 21 de enero de 2014.

Director de Tesis:

- Dr. Marco Méndez

Co-directora de Tesis:

- Dra. Irma Vila

Comisión de Evaluación de la Tesis

- Dr. David Véliz

- Dra. Alejandra González



*“Yo no sé lo que es el destino,
caminando fui lo que fui...”*

S. Rodríguez



RESUMEN BIOGRÁFICO

Mi nombre Franco Alfredo Cruz Jofré, nací el 11 de junio de 1980 en Santiago de Chile. Realicé mi educación media en el Liceo de Aplicación A N°9, Santiago (1994-1997), entre el año 1998 y 2001 cursé la carrera de Técnico Pecuario en el Centro de Formación Técnica PROPAM, posterior a esto ingresé a la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad Santo Tomás, donde obtuve el grado académico de Licenciado y Título profesional de Médico Veterinario. He sido ayudante, profesor invitado y profesor guía de pregrado para la carrera de Medicina Veterinaria. Mi foco de investigación ha sido la ecología de poblaciones, filogeografía y morfología, en diversos taxa de vertebrados (Cetáceos, aves rapaces, aves marinas y peces del Altiplano). En marzo de 2011, ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, trabajando en el Laboratorio de Genética y Evolución.

AGRADECIMIENTOS

Quiero entregar mis más sinceros agradecimientos a todos quienes hicieron posible el cumplimiento de esta meta, a mis profesores, Marco Méndez e Irma Vila, por sus enseñanzas, su apoyo y la confianza depositada en mí.

A mi familia, Carolina mi amor y complemento, quien no me abandona a pesar que la arrastro a cada una de mis locuras, a mi hija Catalina, quien me empuja cada día a ser mejor, a Martina la más reciente luz de mi vida, sin ellas mi vida no estaría completa. A mis padres Alfredo, Alicia y Rebeca y mis hermanos Jaime y Lichy, también a Raul, Irene y Cesar, por su cariño y apoyo.

A Pamela Morales, Gonzalo Collado, Moisés Valladares, Hugo Salinas, Pablo Fibla, Michel Sallaberry, David Véliz, Claudia Guerrero y Álvaro Zúñiga, por su ayuda con el trabajo de terreno y sugerencias en la realización de los análisis. A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias: Carolina Gallardo, Claudio Correa, Luis Pastenes, Dayana Vásquez y Camilo Valdivieso. Que con sus comentarios y ayuda, contribuyeron a la realización de este trabajo. Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto Fondecyt Regular 2011 N°10803390. "The genus *Orestias* (Teleostei; Cipriodontidae) in systems of the Lauca national park, Southwestern Altiplano, early differentiation? an integrated approach", y del Proyecto ECOS-CONICYT N°C10B02, Chile-Francia. "Phylogenetic relationships of genus *Orestias* (Teleostei, Cyprinodontidae) and speciation process in the Altiplano". Los

análisis fueron realizados en el laboratorio de Genética y Evolución (Dr. Marco Méndez) y en el laboratorio de Limnología (Dra. Irma Vila). Este trabajo conto con la autorización de la Subsecretaria de Pesca, Chile, Resolución Exenta # 1042, y con. Resolución Exenta # 2231.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
Hipótesis	9
Hipótesis	9
Predicciones	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Organismo en estudio	11
Descripción del área de estudio y toma de muestras	12
Área de estudio	12
Toma de muestras	14
Determinación de sexos	15
Caracterización genética	15
Análisis de DNA	15
Amplificación de Microsatélites	16

Análisis de estructuración genética entre poblaciones	17
Tasas de migración actual entre vertientes	18
Análisis Morfométricos	19
Mantel test	21
Modelo de elevación digital del salar	21
RESULTADOS	22
Análisis Microsatélites	22
Estructura genética poblacional y asignamiento de individuos	26
Geneland	29
Patrones de migración entre vertientes	31
Análisis morfológicos entre localidades	33
Análisis morfológicos entre grupos genéticos	37
Mantel test	40
Modelo de elevación digital (DEM)	40
Genética y Geografía	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50

TABLAS

Tabla 1	Coordenadas geográficas y número de individuos de cada localidad (vertiente).....	14
Tabla 2.	Loci de microsatélites analizados. Se indica el rango de tamaños descritos (Esquer <i>et al.</i> 2011) y el rango de tamaño observado en <i>O. ascotanensis</i> en el presente estudio. (pb): pares de bases nucleotídicas.	22
Tabla 3	Coordenadas de las localidades, número de individuos muestreados, y parámetros de variación genética determinadas del análisis de 8 loci de Microsatélites.	23
Tabla 4	Matriz de diferenciación genética, F_{ST} y D_{ST}	25
Tabla 5	Tasas de migración estimada con microsatélites, la primera columna corresponde a la localidad de origen, siguientes columnas localidad receptora de individuos, en negrita se muestran los valores superiores a 0,1.....	32
Tabla 6.	Diferenciación morfológica entre localidades. Distancia de Mahalanobis (todas las distancias fueron significativas, $p < 0,05$, 10.000 permutaciones). Tamaño muestral entre paréntesis.	34

Tabla 7 Análisis de función discriminante entre localidades. Análisis corregido por tamaño de muestra.	35
Tabla 8 Comparación entre localidades, MANOVA NP, Permutaciones: 9.999. Distancia Euclideana, p- value corrección de Bonferroni, valores significativos en negrita.	36
Tabla 9 Análisis de función discriminante entre 4 grupos (grupos genéticos). Análisis corregido por tamaño de muestra.	39

FIGURAS

Figura 1 Estimaciones de los ciclos de paleolagos durante el último máximo glacial A) altitud máxima de cada evento. Cuencas ocupadas y nivel de agua en los ciclos de los paleolagos B) Coipasa C) Tauca (Modificado de Placzek <i>et al.</i> 2011)	3
Figura 2 Extensión del Paleolago Tauca durante el último máximo glacial (Modificado de Blard <i>et al.</i> 2011).	4
Figura 3 Paleo-productividad durante el último máximo glacial (Extraída de Latorre <i>et al.</i> 2002).....	5
Figura 4 Median joining network de los Haplotipos del salar de Ascotán (Extraído desde Morales <i>et al.</i> 2011).	7
Figura 5 Individuos de <i>Orestias ascotanensis</i>	11

Figura 6 Mapa del Área de Estudio. Se muestran las vertientes numeradas (V), y en azul los cuerpos de agua dentro del salar.....	13
Figura 7 Zona de muestreo de individuos, Vertiente 5.....	13
Figura 8 Landmarks (puntos negros): (1) inicio de mandíbula; (2) centro del ojo; (3) base del istmo; (4) inicio del opérculo; (5) y (6) inserción de la aleta pectoral; (7) y (8) inicio y término de la aleta anal, (9) y (10) inserción aleta caudal; (11) y (12) inicio y término de la aleta dorsal; (13) inicio pre maxila; (14) unión sub mandibular; (15) dorso de la cabeza. Abajo detalle de landmarks (3) y (14).....	20
Figura 9 Tres primeros ejes del análisis factorial de correspondencia (AFC) basado en la variación alélica en cada localidad	26
Figura 10 Arriba: promedio de LnP (D); y Abajo: ΔK por cada valor de K analizado, derecha. Índices según Evanno <i>et al.</i> 2005, calculados en STRUCTURE harvester. (Earl & von Holdt 2012).....	27
Figura 11 STRUCTURE, plot basado en 8 loci de Microsatélites en K= 2, K= 3, K= 4 & K= 7. Cada individuos es representado por una línea vertical dividida en segmentos de colores que representan los grupos o clusters (K), el eje Y muestra el porcentaje de pertenencia a cada clusters.....	29

Figura 12 Mapas de probabilidad posterior para 4 clústers (Geneland), basado en datos de 202 individuos y 8 loci de Microsatélites. Cada localidad es representada por un círculo.	30
Figura 13 Análisis de variables canónicas, comparación por localidad. Las circunferencias representan elipses de equiprobabilidad de 0,95....	33
Figura 14 Dendrograma UPGMA construido con las distancias de Mahalanobis entre localidades, obtenidas desde el Análisis de Variables Canónicas (CVA). En color los grupos genéticos.....	37
Figura 15 Análisis de variables canónicas de la comparación morfométrica entre grupos (K= 4, obtenidos de los análisis de microsatélites y secuencias de la región control del mtDNA). Las circunferencias representan elipses de equiprobabilidad de 0,95.....	38
Figura 16 Modelo de elevación digital (DEM), se muestra la posición de las vertientes en el salar, los cuerpos de agua existentes y zonas de cambio altitudinal (líneas segmentadas).	41
Figura 17 Perfil altitudinal Norte-Sur dentro del salar de Ascotán, la línea segmentada muestra nivel máximo del lago 11.000 años AP. Abajo: Plot STRUCTURE con K= 4 poblaciones.	42

RESUMEN

Orestias ascotanensis Parenti 1984, es un pez de la familia *Cyprinodontidae* (Orden Cyprinodontiformes) de distribución acotada al salar de Ascotán en el Altiplano de Chile, habita en 12 vertientes (V) con distinto grado de aislamiento entre ellas. Por medio del análisis de un marcador mitocondrial (fragmento de la Región Control) en 11 vertientes, se ha observado una alta diferenciación genética en las vertientes V1 y V11, y una diferenciación genética baja en los grupos de la porción central del salar (Morales *et al.* 2011). Basado en la evidencia anterior, este trabajo tiene como objetivo profundizar el conocimiento de la estructuración genética en esta especie, evaluándola por medio de microsatélites (8 loci), marcadores más variables que puedan evidenciar una diferenciación reciente entre poblaciones. Adicionalmente se evaluó si la variación genética observada se refleja en variación morfológica en la especie, complementando los análisis genéticos con análisis de diferenciación morfológica a través de técnicas de morfometría geométrica. El análisis de estructuración genética con microsatélites (STRUCTURE) sugiere 4 valores de clusters probables ($K= 2, 3, 4$ y 7), donde es posible reconocer 4 grupos bien diferenciados genéticamente (GENELAND), lo que es concordante

con los índices F_{ST} y D_{ST} entre localidades y la información entregada por la Región Control (mtDNA). Para la zona central del salar, los análisis morfométricos desarrollados muestran la existencia de dos grupos bien diferenciados: uno conformado por individuos de las vertientes V2 a la V7, y otro formado por individuos de las vertientes V8 a la V10 (incluyendo V12). Los análisis realizados sugieren que existiría una asociación entre la estructuración genética (microsatelites y región control) y la diferenciación morfológica en esta especie, las que estarían determinadas por el aislamiento físico de las poblaciones, este aislamiento esta dado por una combinación entre distancia geográfica, disminución del nivel de agua y las diferencias de altitud entre las vertientes dentro del salar.

ABSTRACT

Orestias ascotanensis Parenti 1984 is a species fish that belong to the *Cyprinodontidae* family (Order: Cyprinodontiformes). It has a restricted distribution to the Ascotán salt-pan, located in the Chilean Altiplano, and inhabits in 12 springs (V), which have different degrees of geographic isolation. By analyzing the populations from 11 of these springs with a mitochondrial marker (a fragment of the control region), it was observed a high genetic differentiation in the spring V1 and V11, and low genetic differentiation in the groups of the central portion of the salt-pan (Morales *et al.* 2011). Based on this evidence, this work aims to go through the knowledge of the genetic structure in this species in depth, by using microsatellite (8 loci), more variable markers that are able to show recent differentiation. In this case, the genetic structure was reanalyzed. Further, it was assessed whether the observed genetic variation was reflected in morphological variation, by complementing genetic analysis with morphological differentiation analysis through geometric morphometrics techniques. The analysis of genetic structure (STRUCTURE) suggested four clusters probable values ($K = 2, 3, 4$ y 7), but it is possible to recognize at least 4 genetically distinct groups (GENELAND), which is consistent with pairwise F_{ST} & pairwise

D_{ST} indices between localities and also with the information provided by the control region (mtDNA). For the populations from the central area of the salt-pan, the performed morphometric analyzes showed two distinct groups, one composed of the springs V2 to V7 and the other one containing the springs from V8 to V10 (including V12). These results suggest that there would be an association between genetic structure (microsatellites and control region) and morphological differentiation in *O. ascotanensis*, which would be determined by the physical isolation of the populations. This isolation could be given by a combination of geographical distance, decreased water level and the altitude differences between the springs of the salt-pan.

INTRODUCCIÓN

Los eventos tectónicos y volcánicos pueden producir la separación y el cambio de curso en diversos cuerpos de agua, fragmentando y generando nuevos ambientes, estos cambios pueden causar procesos de diferenciación en organismos acuáticos, lo que puede ocurrir a nivel poblacional y entre especies (Elmer *et al.* 2010). Los procesos de diferenciación también pueden estar influenciados por variaciones en los niveles de agua como consecuencia de cambios climáticos. Kornfield & Smith (2000) propusieron un modelo de diferenciación donde la disminución de los niveles de agua generaría una alta tasa de extinción por pérdida de hábitat, reduciendo la diversidad global de poblaciones y/o especies. Sin embargo, los individuos que sobreviven en estos hábitats remanentes, competirían fuertemente a causa de los recursos limitados, generando segregación de nicho. Al aumentar el nivel lacustre, se generarían nuevos ambientes disponibles, que al ser colonizados por estas poblaciones favorecería la divergencia y provocaría rápidas tasas de diferenciación.

El Altiplano de Sudamérica (14°-22° S) es una gran cuenca elevada de aproximadamente 200.000 km², está ubicada entre dos cordones montañosos de los Andes centrales sobre los 3.800 m s.n.m. En la actualidad se caracteriza por periodos muy secos durante la mayor parte del año, pero este régimen climático ha variado notablemente durante el Cuaternario, con la formación y desaparición de glaciares (Smith *et al.* 2005; Licciardi *et al.* 2009), y extensos lagos (Fornari *et al.* 2001; Fritz *et al.* 2004; Rigsby *et al.* 2005; Placzek *et al.* 2006). Los cambios geológicos y ambientales ocurridos durante el Pleistoceno han generado una marcada modificación del paisaje, lo que se relacionaría con los procesos de extinción y especiación observados en este sistema. Esto ha provocado que la biodiversidad en el Altiplano sea única, ejemplo de esto son los caracoles del género *Biomphalaria* (Collado *et al.* 2011, Collado & Méndez 2013), los sapos del género *Telmatobius* (Sáez 2012) y los peces del género *Orestias* (Vila *et al.* 2013, Esquer Garrigos *et al.* 2013), en los cuales se ve una gran diversidad de especies y variabilidad entre poblaciones a lo largo de esta región geográfica.

Durante el último máximo glacial (UMG), entre 16,2 y 10,5 miles de años antes del presente (ka AP), el desierto de Atacama y Altiplano en el Norte de Chile (22°-24°S) poseían condiciones de mayor humedad, con altas precipitaciones (>150 mm/año) (Latorre *et al.* 2002). Durante este periodo húmedo se han descrito la ocurrencia de paleolagos de distinta extensión en las cuencas del altiplano, el paleolago Michín datado hace 17 ka AP, con un nivel

de agua en la cota 3.800 m s.n.m. en el Altiplano Suroeste (Keller & Soto 1998), un segundo periodo húmedo conocido por el paleolago Tauca ocurrido entre 16 y 14 ka AP y posiblemente otro periodo post-Tauca denominado Coipasa, entre 12 y 11 ka AP (Placzek *et al.* 2006, 2011. Figura 1), ambos con niveles sobre los 3.700 m s.n.m. habrían abarcado las sub-cuencas del lago Poopó, el salar de Uyuni, y parte de la cordillera de Chile (20°- 22°S). Los paleolagos Tauca y Coipasa habrían conectado gran parte del Altiplano, en el sector suroeste que corresponde al Altiplano chileno, estos paleolagos habrían inundado hasta la cuenca del salar de Carcote (21°20'S; 68°20'O), no abarcando la cuenca de Ascotán por el Sur (Keller & Soto 1998, Placzek *et al.* 2006, 2011, Blard *et al.* 2011. Figura 2).

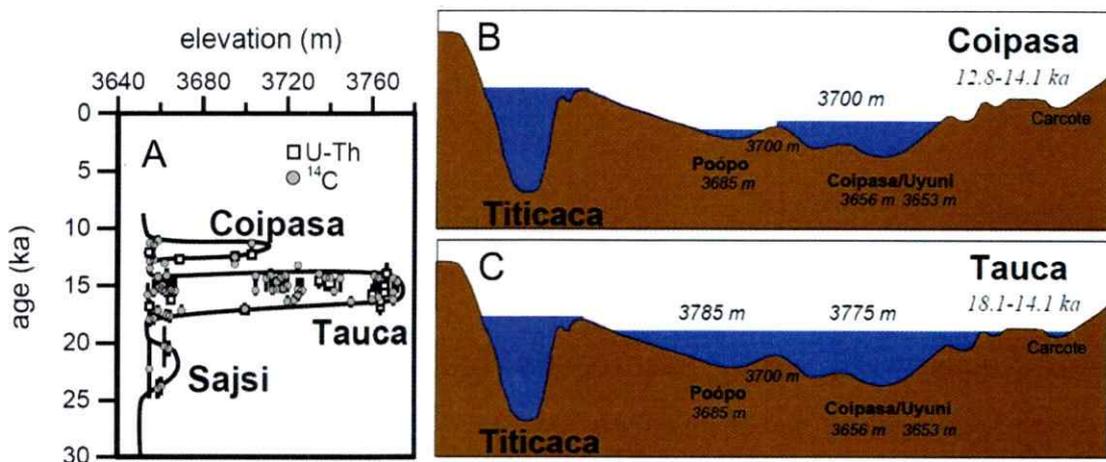


Figura 1 Estimaciones de los ciclos de paleolagos durante el último máximo glacial A) altitud máxima de cada evento. Cuencas ocupadas y nivel de agua en los ciclos de los paleolagos B) Coipasa C) Tauca (Modificado de Placzek *et al.* 2011)

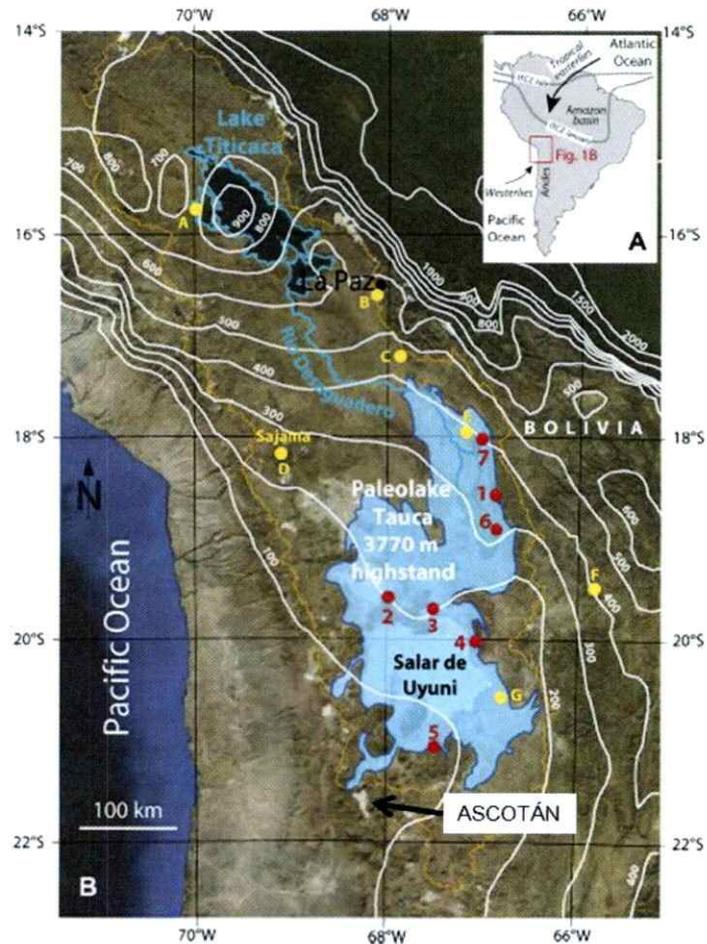


Figura 2 Extensión del Paleolago Tauca durante el último máximo glacial (Modificado de Blard *et al.* 2011).

Posterior a estos eventos, durante el Holoceno, los lagos del Altiplano habrían desaparecido rápidamente hace cerca de 8,5 ka AP, dando paso a un periodo de hiperaridez, identificados por la disminución en la cobertura vegetal y productividad del área, que se prolonga hasta la actualidad (Latorre *et al.* 2002, Figura 3).

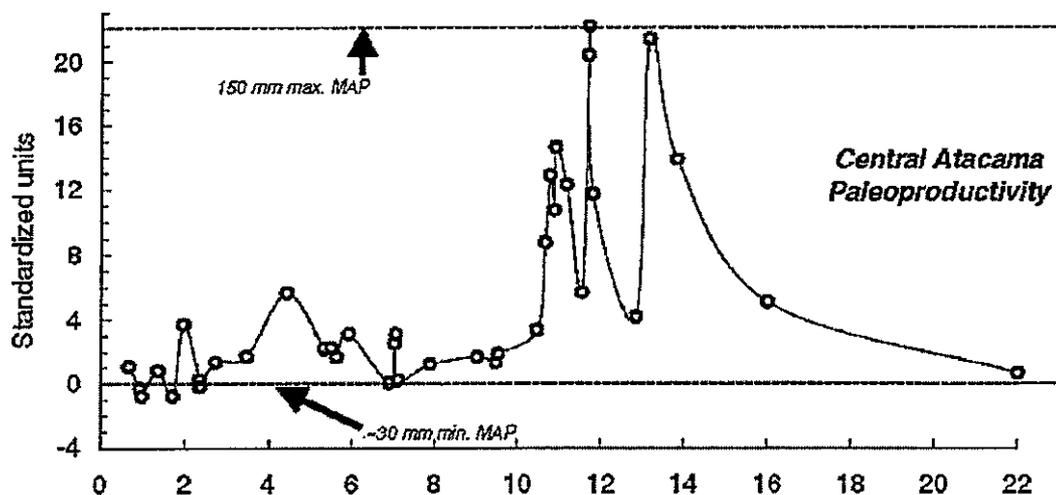


Figura 3 Paleo-productividad durante el último máximo glacial (Extraída de Latorre *et al* 2002)

En el extremo sur del Altiplano se encuentran el salar de Ascotán ($21^{\circ}29'S$; $68^{\circ}15'O$; Fig. 1A y Tabla 1), en él se ha descrito a *Orestias ascotanensis*, Parenti 1984. Es una especie de pez de la familia *Cyprinodontidae* bien caracterizada en base a rasgos morfológicos, cariotípicos y genéticos (Arratia 1982, Martínez *et al.* 1999; Parenti, 1984; Vila *et al.* 2010, 2013). Se distribuye exclusivamente en este salar, en un área geográfica reducida, habita particularmente doce vertientes ubicadas en el margen oriental del salar, en pequeños afluentes aislados, en una superficie de agua total de 18 km² (Risacher *et al.* 2003). La reducida distribución geográfica y la intervención del hábitat (Vila *et al.* 2007a) determinó que en el año 2008 esta sea clasificada como a una especie En Peligro a nivel nacional (DS 25/2008 MINSEGPRES).

Recientemente, se ha descrito la estructuración genética de *O. ascotanensis*, analizando un fragmento de la Región Control del ADN mitocondrial (Morales et al. 2011). Estos autores mostraron que las poblaciones de las vertientes más aisladas geográficamente (V1 y V11), forman grupos genéticos únicos, clasificados como "Evolutionary Significant Unit" (Waples, 1998), caracterizados por endemismo genético local (ver Figura 4). Estos autores postularon que estas vertientes probablemente se conectaron por última vez al resto, durante el último periodo húmedo, 11.000 años atrás (Fornari et al. 2001; Fritz et al. 2004; Placzek et al. 2006). Este aislamiento geográfico, sumado a procesos de deriva génica asociada a pequeñas poblaciones, habría generado haplotipos únicos en estas poblaciones. Por el contrario, las vertientes cercanas entre sí, presentaron una alta diversidad genética, que comparten entre ellas, lo que indicaría flujo génico entre las poblaciones y una dinámica de tipo metapoblacional (Morales et al. 2011).

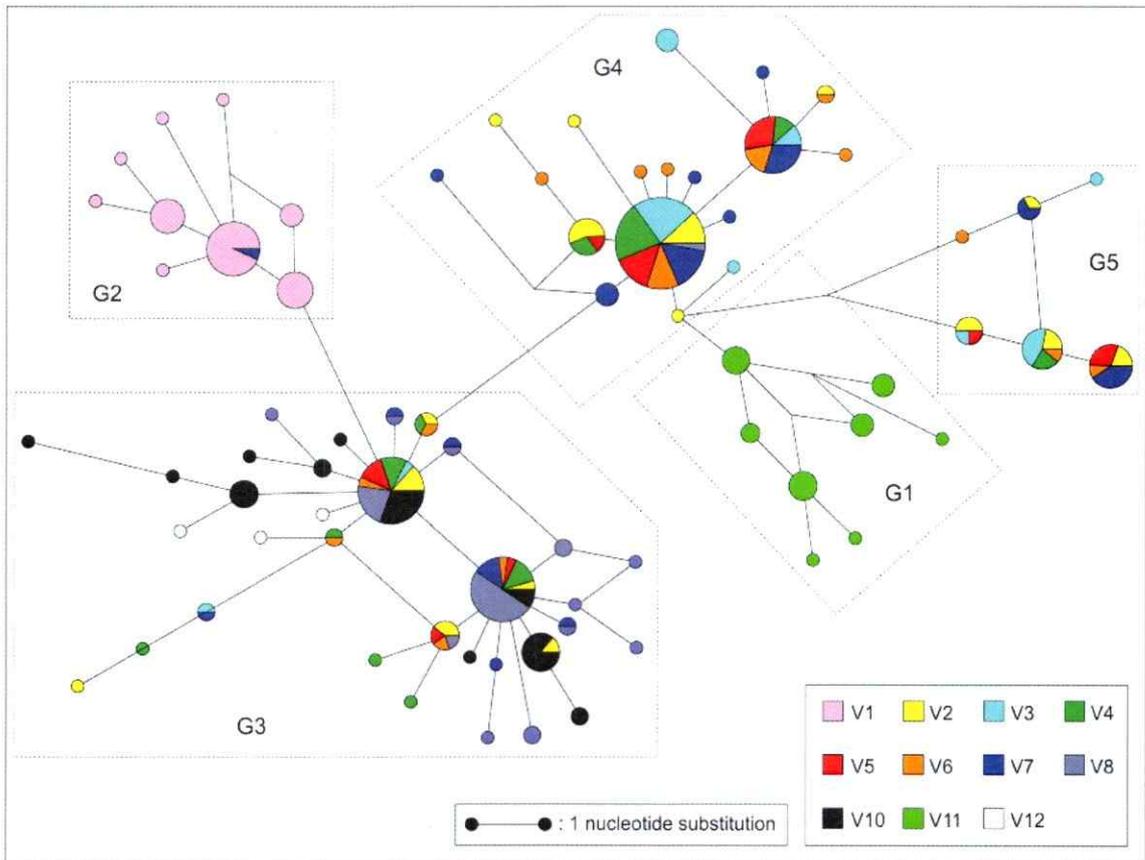


Figura 4 Median joining network de los Haplotipos del salar de Ascotán (Extraído desde Morales *et al.* 2011).

Esta dinámica podría darse por conexiones temporales entre las poblaciones de las distintas vertientes, que ocurrirían debido a eventos intensos del “Invierno Altiplánico”, que se produce durante el verano austral (diciembre a marzo). En esta época, los niveles de agua en las cuencas hidrográficas aumentarían, generando corredores que permitirían la dispersión entre distintos sectores y un potencial flujo génico entre poblaciones aisladas. Sin embargo, ya que estos autores utilizaron un marcador cuya tasa de mutación permite evaluar estructuración genética en eventos pasados (plio-pleistocénicos), la variación

que pudo haberse generado en el pasado más reciente y en la actualidad no ha sido evaluada. El presente trabajo busca estudiar la estructuración con un marcador biparental más variable como son los microsatélites y compararla con la información existente descrita por Morales *et al.* (2011). Por otra parte, dado que la divergencia genética de las poblaciones podría estar reflejándose también en una divergencia morfológica, se evaluó la diversidad morfológica mediante análisis de morfometría geométrica y se comparó con los patrones de estructuración genética y distribución geográfica, en *O. ascotanensis*. Debido a que el patrón de eventos repetidos de aislamiento y conexión entre localidades del salar de Ascotán, es una muestra de las variaciones ocurridas en el Altiplano, este sistema podría explicar a pequeña escala los patrones de distribución de la biodiversidad, y más específicamente, los procesos de diferenciación ocurridos con las especies del género *Orestias*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Considerando: a) la alta estructuración genética observada en *Orestias ascotanensis* en el salar de Ascotán (Región Control, Morales *et al.* 2011); b) la evidencia de un cambio climático drástico ocurrido en el Altiplano posterior al último máximo glacial (20 ka AP), que implicó la disminución de los niveles de agua y la fragmentación de los ambientes dentro del salar de Ascotán, la que se ha mantenido hasta la actualidad. Se postula la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La divergencia poblacional de *Orestias ascotanensis* estará altamente asociada a la geografía del salar, encontrando mayores diferencias morfológicas y genéticas en aquellas poblaciones que se encuentran aisladas geográficamente.

Predicciones

- 1) Las poblaciones ubicadas en los extremos del salar, presentarán diferencias genéticas mayores a las observadas entre las poblaciones del centro del salar.
- 2) Las poblaciones ubicadas en los extremos del salar presentarán diferencias morfológicas mayores a las observadas entre las poblaciones del centro del salar.

Objetivo general

Evaluar en *Orestias ascotanensis* la existencia de diferencias morfológicas y genéticas, en función de la procedencia geográfica dentro del salar de Ascotán.

Objetivos específicos

- Caracterizar los grupos de *Orestias ascotanensis* de cada vertiente del salar de Ascotán, mediante el análisis de nueve loci de Microsatélites del ADN nuclear.
- Caracterizar morfológicamente los grupos de *O. ascotanensis* provenientes de cada vertiente mediante morfometría geométrica.
- Comparar las características morfológicas con la información genética, obtenida entre distintos grupos de peces del salar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo en estudio

Orestias ascotanensis, es un pez pequeño y robusto, de cuerpo fusiforme. Los juveniles son de color moteado, los adultos de color marrón oscuro con amarillo pálido o crema en la zona ventral, esta coloración se intensifica en machos y hembras de mayor tamaño. Las hembras tienen hileras laterales de escamas más completas que los machos. La zona ventral y la base de las aletas pectorales, dorsales y anales no presentan escamas, la aleta caudal es truncada, la mandíbula inferior se proyecta hacia arriba (Arratia 1982; Parenti 1984; Martínez *et al.* 1999). Presenta dimorfismo sexual siendo las hembras de mayor tamaño que los machos (Jara *et al.* 1995) (Figura 5). Se alimenta de insectos acuáticos y anfípodos del periphyton (Vila *et al.* 2007b).



Figura 5 Individuos de *Orestias ascotanensis*.

La edad máxima observada en condiciones de laboratorio es de 3 a 4 años, los tamaños observados a esta edad superan los 60 a 70 mm de Largo estándar (LS), La reproducción es iterativa y la madurez sexual se alcanza al primer año de edad, cuando los individuos alcanzan de a 30 a 50mm de largo máximo (LM). Los huevos miden entre 1,8 a 2mm de diámetro y poseen gran cantidad de filamentos con los cuales se adhieren a la vegetación (Irma Vila comunicación personal).

Descripción del área de estudio y toma de muestras

Área de estudio

El salar de Ascotán se encuentra en una de las cuencas endorreica al sur del Altiplano (Región de Antofagasta, Chile), ubicado en los 21°33'S a 3.720 m s.n.m. Esta es una zona de bajas precipitaciones (menos de 150 mm/año) (Risacher *et al.* 2003), aportadas principalmente por el "Invierno Altiplánico", que corresponden a nubes provenientes de la cuenca amazónica (Vuille, 1999). El salar presenta pequeñas lagunas, con una superficie total de agua de 18 km² (Risacher *et al.* 1999). Las lagunas son recargadas por vertientes donde afloran aguas subterráneas, ubicadas en la porción oriental del salar, cada vertiente está separada de las otras por superficies evaporíticas secas, se han identificado al menos 12 vertientes con presencia de peces (ver Figura 6 y Figura 7).

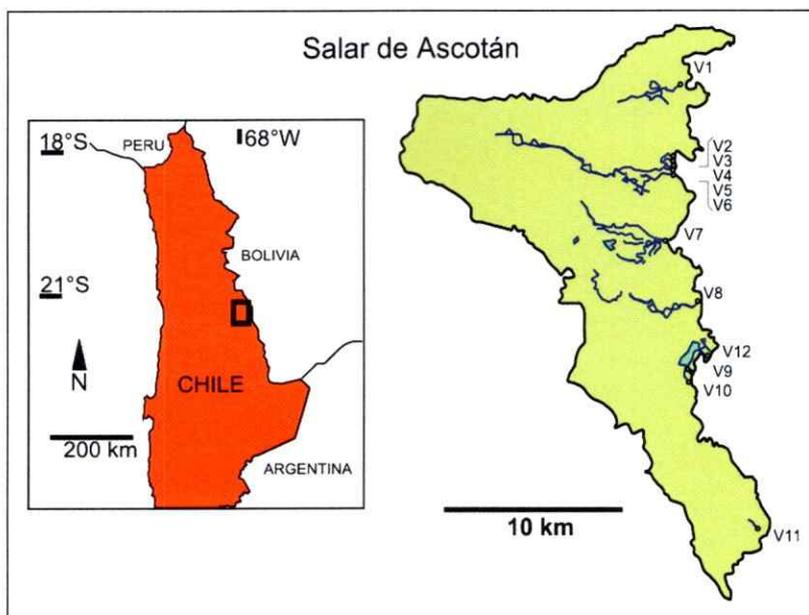


Figura 6 Mapa del Área de Estudio. Se muestran las vertientes numeradas (V), y en azul los cuerpos de agua dentro del salar.



Figura 7 Zona de muestreo de individuos, Vertiente 5.



Toma de muestras

En cada una de estas vertientes se muestrearon individuos de *O. ascotanensis* (Tabla 1), estos fueron recolectados durante la temporada 2005-2006, para los análisis genéticos, lo que se complementó con muestreos en diciembre de 2011, abril y noviembre de 2012, abarcando el rango completo de distribución de la especie. Se analizaron 204 individuos en total (ver detalles en Tabla 1). Los animales fueron capturados con redes de nylon. La eutanasia se realizó por inmersión utilizando una sobredosis de metilsulfonato de tricaina (MS-222), en dosis $>0,002\%$ (Neiffer & Stamper 2009). Posteriormente, se extrajo tejido de aletas pectorales y/o musculo que fueron conservados en etanol 96% para los análisis genéticos, los individuos para los análisis morfométricos fueron fijados en formalina al 3,7%.

Tabla 1 Coordenadas geográficas y número de individuos de cada localidad (vertiente)

Localidad	Coordenadas geográficas		Altitud m s.n.m.	n Microsatélites	n Morfología
V1	21°27'02.0''S	68°15'09.8''O	3733	17	8
V2	21°29'21.2''S	68°15'24.8''O	3732	13	31
V3	21°29'27.8''S	68°15'25.6''O	3734	23	19
V4	21°29'39.8''S	68°15'25.6''O	3730	19	24
V5	21°29'47.2''S	68°15'24.5''O	3729	20	16
V6	21°29'52.8''S	68°15'24.4''O	3732	19	23
V7	21°32'02.7''S	68°15'40.7''O	3731	12	27
V8	21°33'57.2''S	68°14'36.8''O	3738	11	12
V9	21°36'11.7''S	68°15'01.4''O	3735	14	19
V10	21°36'35.0''S	68°15'00.7''O	3738	29	7
V11	21°41'13.9''S	68°12'54.0''O	3740	18	13
V12	21°35'13.9''S	68°14'32.3''O	3735	7	5
Total				202	204

Determinación de sexos

La determinación del sexo de los individuos se realizó por medio de la observación de características sexuales externas, como coloración de los flancos (Jara *et al.* 1995), tamaños y formas corporales (abdomen y características de la cabeza), y observación directa de los órganos sexuales.

Caracterización genética

Análisis de DNA

El ADN total fue obtenido desde muestras de piel y músculo usando el método de extracción salina, modificado de Alajanabi & Martínez (1997). Este método consiste en homogenizar el tejido en un buffer con sal estéril (0,4M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0) y SDS al 20%, adicionando proteinasa K (400 µg/ml concentración final). Las muestras se incuban a 55 - 56° C (de 1 a 12 horas), posteriormente se agrega H₂O saturada de NaCl (6 M), se mezcla y centrifuga rescatando el sobrenadante, posteriormente se agrega Isopropanolol, se mezcla e incuba la muestra a -20° C por 1 hora, se centrifuga por 20 minutos y se lava el pellet con ethanol (70%), se seca y finalmente el ADN extraído se resuspende en H₂O estéril.

Amplificación de Microsatélites

Se amplificaron 9 loci de Microsatélites utilizando los partidores descritos por Esquer *et al.* (2011). Las reacciones de amplificación se realizaron en 10 μ l de volumen total y contenían: 50 ng de ADN, 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen, Brasil); 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, Brasil); 0,1 mg/ml BSA (New England Biolabs); 1X buffer de PCR (20mM Tris-Cl pH 8,4; 50mM KCl; Invitrogen, Brasil); 0,2 μ M de cada partidore; 0,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil). Las condiciones de termociclación son las mismas usadas por Esquer *et al.* (2011). La presencia de producto de PCR fue verificada en un gel Agarosa al 1%. El tamaño de los alelos amplificados se determina mediante electroforesis microcapilar en un secuenciador de ADN automático (ABI prism 377 - Applied Biosystems); los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen Inc. en Corea del Sur (www.macrogen.com). El análisis de fragmentos se realizó en el software GENEMARKER 1.85 (SoftGenetics) y se compararon los alelos de las especies chilenas con muestras control procedentes de ejemplares de Bolivia (Esquer *et al.* 2011) y de Chile (Guerrero, 2013) para todos los loci. Posteriormente se revisó el exceso de homocigotos o heterocigotos para corregir alelos con peaks grandes y presencia de stutters que generan errores de lectura y detectar la presencia de alelos nulos para cada loci con el programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004).

Análisis de estructuración genética entre poblaciones

En la caracterización genética se obtuvo la diversidad genética expresada como número promedio de alelos y diversidad alélica en la población. Además, se obtuvo el valor de la Heterocigosidad observada a partir del recuento de genotipos, y se evaluó posibles desviaciones del equilibrio de Hardy–Weinberg (EHW) (Tabla 3).

Se analizó el grado de estructuración genética entre pares de poblaciones calculando los índices F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) en el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.* 2004) y el índice D_{ST} (Jost, 2008) en el programa SMOGD (Crawford 2010). Para graficar las diferencias entre las poblaciones se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) en GENETIX 4.05.

El número de grupos genéticos (K) fue evaluado utilizando los genotipos de los individuos, por medio de un análisis bayesiano implementado en STRUCTURE V 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). Se analizaron de 1 a 12 grupos, realizando 20 diferentes corridas de 1.000.000 iteraciones de MCMC; se quemaron las primeras 100.000; estos parámetros fueron calculados para cada valor de K, bajo el modelo no aditivo (No Admixture model), frecuencias alélicas correlacionadas entre grupos (clusters) y localidad de muestreo como información previa (locprior setting), modelo sugerido para especies con distribuciones poblacionales discretas (Pritchard *et al.* 2000).

El número más probable de poblaciones, K , fue determinado usando el valor del logaritmo de la verosimilitud de los datos observados, $\ln P(D)$ y la tasa de cambio de segundo orden del logaritmo de la verosimilitud de los datos en corridas diferentes de K (ΔK) descrito en Evanno *et al.* (2005).

Adicionalmente se infirieron clusters o grupos de individuos con el programa GENELAND 3.13 (Guillot *et al.* 2005) en R 3.0.2 (Ihaka & Gentleman 1996), que utiliza un algoritmo MCMC bayesiano para armar conglomerados de muestras sobre la base de la información tanto genética y geográfica. El análisis fue realizado para las 12 localidades. Se realizaron tres corridas independientes usando 5.000.000 MCMC de iteraciones, con una frecuencia de muestreo de 1.000 y un periodo de burn-in de 250. Un primer análisis fue realizado entre un $K_{\min}= 1$ y un $K_{\max}= 12$ clusters. Un segundo análisis considerando los dos valores de K más probables, obtenidos del primer análisis ($K_{\min}= 4$ y $K_{\max}= 5$).

Tasas de migración actual entre vertientes

Se utilizó el programa BAYESASS V1.3 (Wilson & Rannala 2003), para obtener una estimación de la magnitud y dirección de flujo génico actual (dos últimas generaciones) entre poblaciones, el programa utiliza el algoritmo MCMC para estimar la distribución de probabilidad posterior de migrantes entre poblaciones, asumiendo equilibrio genético (EHW). Para cada linaje se realizaron 3.000.000 de generaciones de cadenas de MCMC (quemando 900.000), con una frecuencia de muestreo de 2.000.

Análisis Morfométricos

En los análisis morfológicos se utilizaron solamente hembras (n= 204), para eliminar la variación causada por el dimorfismo sexual descrito en la especie (Parenti 1984) y debido al escaso número de machos recolectados (n= 50). Los individuos utilizados correspondieron a hembras adultas de un rango de tamaño entre 50 a 100mm de largo máximo (LM), la madurez sexual fue determinada por observación directa de las gónadas.

Cada individuo fue fotografiado en vista lateral izquierda con una cámara digital de alta resolución (Nikon Coolpix 5400). Se identificaron 15 landmarks o puntos anatómicamente homólogos para analizar la forma del cuerpo (Figura 8) con el programa TPS.DIG2 v2.16 (Rohlf 2010). Las coordenadas de los especímenes fueron alineadas (trasladadas, rotadas y escaladas) usando el método generalizado de superposición de Procrustes, por mínimos cuadrados, eliminando la información de tamaño y posición de las coordenadas (de manera de evaluar sólo el efecto de la forma). Se compararon las características morfológicas por localidad y por grupos genéticos (siguiendo a Morales et al. 2011 y la información del análisis de microsatélites). Para esto se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Variables Canónicas (CVA), incluidos en el programa MORPHO J (Klingenberg 2011). En la Tabla 1 se muestra el número de individuos utilizados en estos análisis.

Se realizó una comparación entre vertientes y grupos genéticos (MG) con un análisis de función discriminante en el programa SYSTAT (SYSTAT, 2004),

utilizando los scores del análisis de componentes principales (PCA) como variables. Adicionalmente, se realizaron comparaciones mediante un análisis multivariado de la varianza (MANOVA no paramétrico) implementado en el programa PAST 2.16 (Hammer *et al.* 2001) (Material Suplementario). Además se realizó un análisis de ordenamiento por distancias de Mahalanobis, con el algoritmo de grupos pareados (UPGMA), incluido en el programa STATISTICA 7 (Statsoft Inc. 2001).

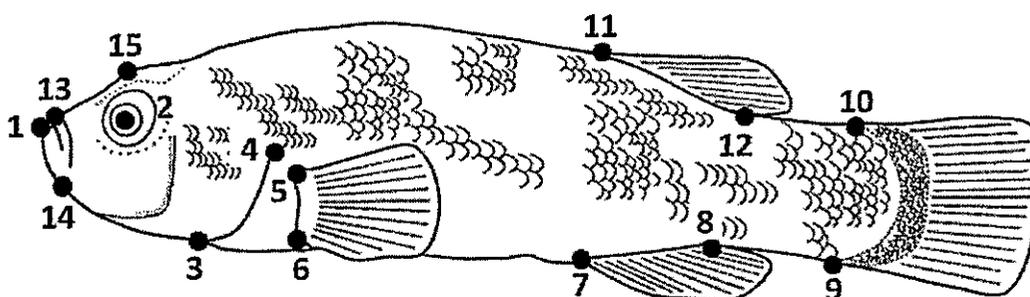


Figura 8 Landmarks (puntos negros): (1) inicio de mandíbula; (2) centro del ojo; (3) base del istmo; (4) inicio del opérculo; (5) y (6) inserción de la aleta pectoral; (7) y (8) inicio y término de la aleta anal, (9) y (10) inserción aleta caudal; (11) y (12) inicio y término de la aleta dorsal; (13) inicio pre maxila; (14) unión sub mandibular; (15) dorso de la cabeza.

Abajo detalle de landmarks (3) y (14)

Mantel test

El programa XLSTAT 4.05 (Addinsoft 2013) fue utilizado para determinar la existencia de relaciones significativas usando matrices de distancias pareadas entre localidades con 10.000 iteraciones. En este análisis se utilizó (a) una matriz de distancia morfológica (Distancia de Mahalanobis); (b) dos matrices de distancia genética, F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) y D_{ST} (Jost 2008) obtenidas del análisis de Microsatélites, y (c) una matriz de distancia geográfica (distancia lineal entre vertientes).

Modelo de elevación digital del salar

La fragmentación de los ambientes acuáticos puede ocurrir por efecto de barreras geográficas, estas impedirían el flujo de agua entre distintos sectores y con ello el movimiento de peces u otros organismos acuáticos. Se utilizó un modelo digital de elevación (DEM) para evaluar el la existencia de posibles barreras entre poblaciones dentro del salar). Para esto se analizó una imagen satelital (satélite ASTER GDEM, <http://gdex.cr.usgs.gov/gdex/>), la cual presenta datos de la altitud superficial. Mediante herramientas del sistema de información geográfica (SIG), se reclasificó la información en rangos de altitud, utilizando el programa IDRISI KILIMANJARO (Eastman 2003). se identificaron zonas bajas (altitudes entre 3.700 y 3.721 m s.n.m.), zonas medias (altitud 3.722 y 3.731 m s.n.m.) y zonas altas (altitudes entre 3.732 y 3.750 m s.n.m.)

RESULTADOS

Análisis Microsatélites

Se obtuvieron genotipos de 202 individuos de las 12 localidades, se utilizaron 8 loci de 9 Microsatélites analizados, el locus B104 mostró presencia de alelos nulos en 7 de las 12 localidades analizadas y fue excluido de los análisis posteriores. Para los 8 loci microsatélites utilizados, el rango de tamaño de los alelos coincidieron con los descritos por Esquer *et al.* 2011 (en *Orestias lutea* y *O. agassii* de Bolivia y Perú) (Tabla 2)

Tabla 2. Loci de microsatélites analizados. Se indica el rango de tamaños descritos (Esquer *et al.* 2011) y el rango de tamaño observado en *O. ascotanensis* en el presente estudio. (pb): pares de bases nucleotídicas.

Locus	Temperatura de Annealing (°C)	Rango de tamaño descritos (pb)		Rango de tamaño observado (pb)
		<i>O. agassii</i>	<i>O. lutea</i>	<i>O. ascotanensis</i>
A9a	58	244 - 266	234 - 260	235 - 267
A106	60	256 - 317	263 - 313	275 - 335
A116	54	300 - 392	288 - 334	301 - 372
B1	58	171 - 181	171 - 177	172 - 176
B103	51	193 - 215	195 - 217	192 - 224
B104	64	141 - 169	141 - 157	151 - 165
C102	63	225 - 273	233 - 281	221 - 237
C105	58	292 - 262	200 - 248	196 - 224
D110	59	232 - 350	244 - 314	238 - 358

En la Tabla 3 se indican los valores de diversidad genética por localidad, se observa que la V1 y V11 presentan los menores valores de Heterocigosidad observada (H_o).

Tabla 3 Coordenadas de las localidades, número de individuos muestreados, y parámetros de variación genética determinadas del análisis de 8 loci de Microsatélites.

Sitio de muestreo	N	N alelos	H_o	H_E	F_{IS}
V1	17	6.13 (2-13)	0.4692	0.5134	0.11873
V2	13	6.38 (2-13)	0.6988	0.6770	0.01103
V3	23	7.38 (3-17)	0.6496	0.6334	0.00082
V4	19	6.63 (2-16)	0.5866	0.6434	0.11607*
V5	20	7.38 (2-17)	0.6104	0.6566	0.09775
V6	19	6.63 (2-12)	0.5640	0.6256	0.14019
V7	12	6.50 (2-15)	0.6989	0.5981	-0.12588
V8	11	6.00 (1-16)	0.5477	0.5831	0.10942
V9	14	5.38 (2-11)	0.5089	0.552	0.11982
V10	29	7.38 (2-15)	0.5535	0.5697	0.0476
V11	18	4.75 (1-11)	0.4469	0.4448	0.02501
V12	7	4.13 (1-6)	0.5536	0.5570	0.08510
Total	202		0.5729	0.6567	0.13021

N alelos: promedio del número de alelos en los 8 loci (rango en los loci en paréntesis); F_{IS} valores no mostraron desviación significativa del EHW, con 10.000 permutaciones ($p < 0.01$); * $p < 0.01$, significativo solo en 2 de 8 loci.



Se evaluó la diferenciación genética entre pares de localidades de *Orestias ascotanensis*, mediante un test de F_{ST} pareado. La mayoría de las comparaciones entre localidades fueron significativas, solo las vertientes V2, V3, V4, V5, V6 y los pares V8-V6, V8-V10 y V9-V12, no presentaron diferencias significativas (Tabla 4). Los índices F_{ST} y D_{ST} presentaron una alta correlación

entre sus valores (Pearson $r = 0,8784$, $p < 0,01$). En la Figura 9 (análisis de correspondencia factorial, AFC), se distinguen claramente 4 grupos de localidades.

Tabla 4 Matriz de diferenciación genética, F_{ST} y D_{ST} .

D_{ST}/F_{ST}	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V1	—	0,12*	0,147*	0,145*	0,139*	0,109*	0,127*	0,035*	0,13*	0,091*	0,199*	0,134*
V2	0,112	—	0,0036	0,004	-0,0098	-0,003	0,031**	0,053**	0,11*	0,074*	0,128*	0,103*
V3	0,15	0,0019	—	0,0054	-0,0063	0,000	0,039**	0,06*	0,123*	0,066*	0,129*	0,117*
V4	0,193	0,003	0,0018	—	0,0043	-0,00998	0,036**	0,05**	0,121*	0,067*	0,147*	0,106
V5	0,176	-0,003	-0,008	0,002	—	-0,0013	0,038**	0,049**	0,118*	0,063*	0,113*	0,11*
V6	0,129	-0,0003	-0,001	-0,009	-0,007	—	0,023**	0,02	0,111*	0,031**	0,089*	0,097*
V7	0,127	0,023	0,052	0,037	0,059	0,005	—	0,069**	0,127*	0,095*	0,147*	0,12*
V8	0,039	0,06	0,048	0,056	0,066	0,005	0,041	—	0,066*	0,0074	0,107*	0,078**
V9	0,175	0,076	0,121	0,128	0,155	0,0611	0,076	0,0186	—	0,069*	0,236*	0,0066
V10	0,075	0,089	0,0434	0,0670	0,072	0,005	0,134	0,0105	0,039	—	0,11*	0,081*
V11	0,16	0,179	0,179	0,2455	0,154	0,128	0,232	0,1015	0,229	0,1401	—	0,226*
V12	0,194	0,1509	0,165	0,184	0,172	0,082	0,189	0,049	0,0095	0,064	0,139	—

F_{ST} valores sobre la diagonal; D_{ST} valores bajo la diagonal. Valores significativos en negrita.

*Significancia al 5%, corrección de Bonferroni.

** Significancia al 5%, p-value no corregido ($p < 0,05$), 10.000 permutaciones.

52 de 66 comparaciones pareadas entre localidades fueron significativas.



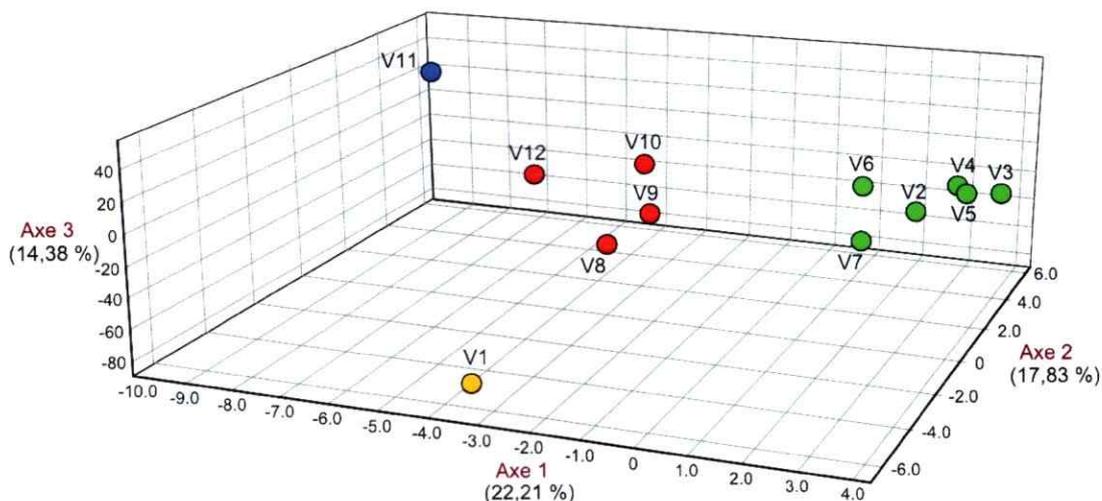


Figura 9 Tres primeros ejes del análisis factorial de correspondencia (AFC) basado en la variación alélica en cada localidad

Estructura genética poblacional y asignamiento de individuos

El análisis de STRUCTURE, presentó altos valores del logaritmo de la verosimilitud de los datos observados [$\ln P(D)$], entre $K=4$ y $K=7$ poblaciones. Adicionalmente se calculó el ΔK , para sucesivos valores de K (entre 1 y 12 clusters), lo que revela múltiples peaks para la estimación del K óptimo, dos de ellos presentan altos valores de ΔK , en $K=2$ ($\Delta K=59,36$) y $K=4$ ($\Delta K=48,82$), sin embargo aparece un tercer valor elevado en $K=3$ ($\Delta K=11,4$) y un peak en $K=7$ ($\Delta K=7,27$), los otros valores de ΔK presentaron valores inferiores a 1 (Figura 10).

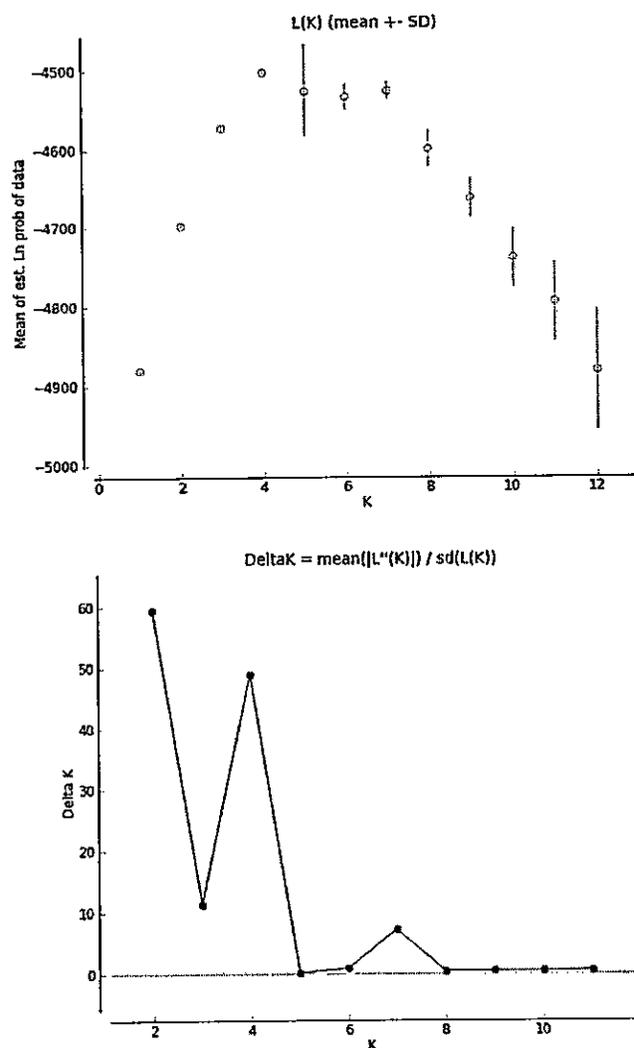


Figura 10 Arriba: promedio de LnP (D); y Abajo: ΔK por cada valor de K analizado, derecha. Índices según Evanno *et al.* 2005, calculados en STRUCTURE harvester. (Earl & von Holdt 2012)

Con la información de los ΔK , se presentan los plots de clasificación individual con los ordenamientos en clusters en $K=2$, $K=3$; $K=4$ y $K=7$, que corresponden a los mayores valores de ΔK . En estos plots es posible distinguir

el ordenamiento de las localidades en clusters, que corresponden al número de poblaciones (K), en K= 2, se observa la diferenciación de las vertientes en el salar, el primer grupo identificable es el conformado por V2, V3, V4, V5, V6 y V7, las que se separan claramente de las otras vertientes; en K= 3 se separa la V11 como una unidad independiente; en K= 4 es posible distinguir V1 y V11 como unidades independientes y dos grupos de localidades V2 a V7 y el grupo formado por V8, V12, V9 y V10, que corresponden a localidades ubicadas en el centro del salar; por último en K= 7 se observa unidades bien diferenciadas V1, V11, V10 y V12-V9, un grupo de localidades V2 a V6 y en las vertientes V7 y V8 se observa un baja clasificación de individuos en esas unidades (Figura 11).

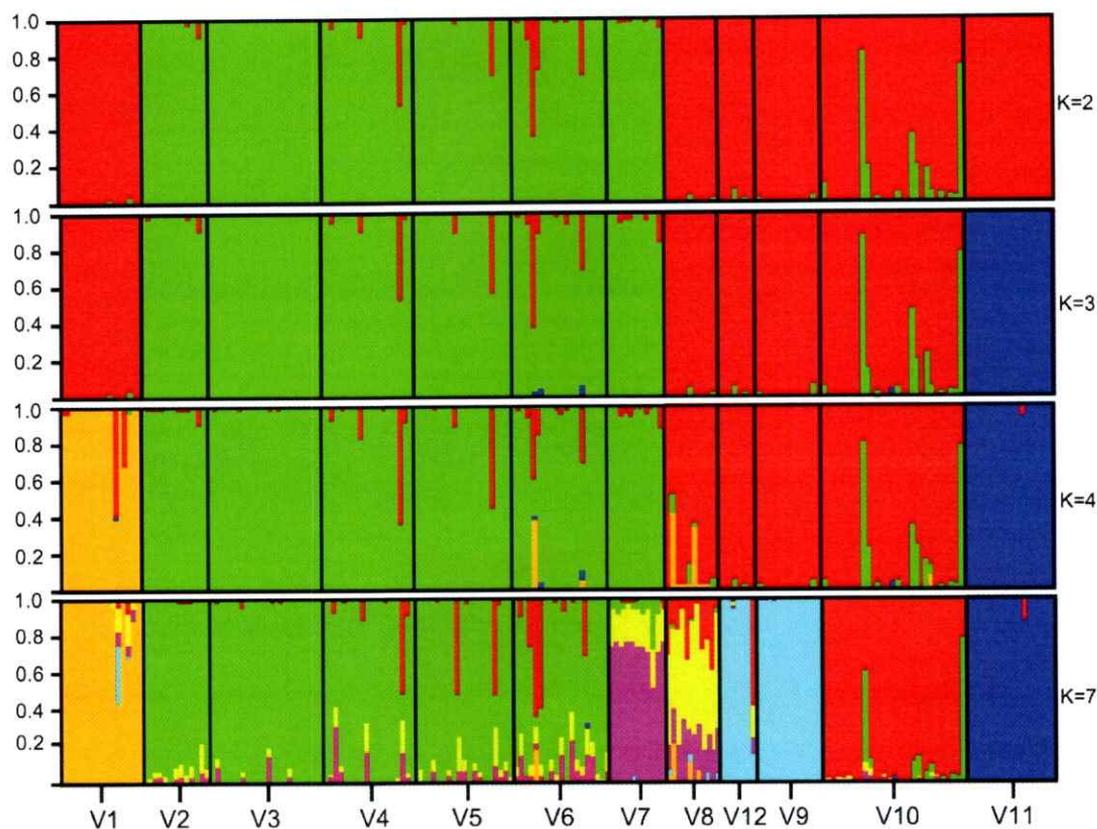


Figura 11 STRUCTURE, plot basado en 8 loci de Microsatélites en K= 2, K= 3, K= 4 & K= 7. Cada individuos es representado por una línea vertical dividida en segmentos de colores que representan los grupos o clusters (K), el eje Y muestra el porcentaje de pertenencia a cada clusters.

Geneland

En el análisis de estructuración utilizando GENELAND se identificaron 4 clúster o poblaciones. La agrupación obtenida es igual a la que resultó con STRUCTURE para K= 4, en ambos análisis (máximo de poblaciones posibles K= 12 y en el análisis entre K= 4 y K= 5) (Figura 12). La varianza explicada por este ordenamiento fue de un 58%.

Map of posterior probability

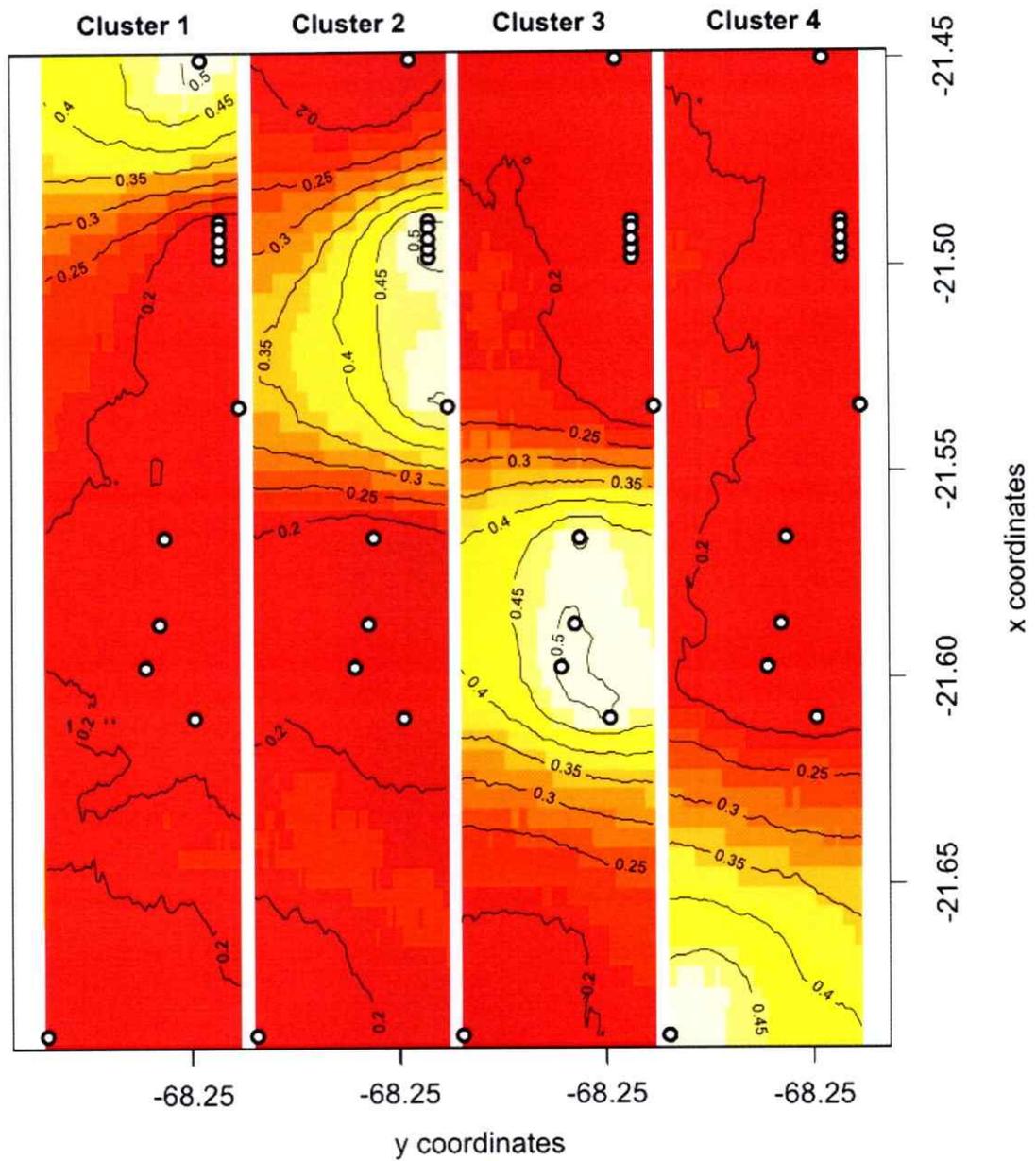


Figura 12 Mapas de probabilidad posterior para 4 clústers (Geneland), basado en datos de 202 individuos y 8 loci de Microsatélites. Cada localidad es representada por un círculo.

Patrones de migración entre vertientes

En la Tabla 5 se muestran las tasas de migración recientes (dos últimas generaciones). La mayoría de estas tasas fueron inferiores a 0,01. Esto indicaría flujo bajo de individuos entre las vertientes y que la mayor proporción de individuos en cada localidad tendría un origen local (tasas de origen $> 0,6$). Sin embargo, la vertiente V3 presentó tasas de migración importantes hacia las vertientes V2, V3, V4, V5, V6 y V7 (entre 0,1987 y 0,2465). Lo mismo ocurrió con la vertiente V10, que estaría actuando como fuente de individuos para las vertientes V8, V9 y V12 (tasas de migración entre 0,1028 y 0,2394).

Tabla 5 Tasas de migración estimada con microsatélites, la primera columna corresponde a la localidad de origen, siguientes columnas localidad receptora de individuos, en negrita se muestran los valores superiores a 0,1.

desdelhacia	ASCV1	ASCV2	ASCV3	ASCV4	ASCV5	ASCV6	ASCV7	ASCV8	ASCV9	ASCV10	ASCV11	ASCV12
ASCV1	0,6844	0,0082	0,0015	0,0048	0,0050	0,0063	0,0091	0,0081	0,0071	0,0023	0,0014	0,0141
ASCV2	0,0062	0,6913	0,0019	0,0048	0,0052	0,0062	0,0083	0,0069	0,0073	0,0025	0,0016	0,0134
ASCV3	0,0070	0,2174	0,9789	0,2435	0,2465	0,2176	0,1987	0,0253	0,0077	0,0261	0,0016	0,0176
ASCV4	0,0063	0,0087	0,0017	0,6825	0,0049	0,0059	0,0081	0,0080	0,0069	0,0022	0,0017	0,0140
ASCV5	0,0062	0,0078	0,0020	0,0051	0,6826	0,0065	0,0090	0,0074	0,0070	0,0026	0,0017	0,0129
ASCV6	0,0052	0,0077	0,0020	0,0049	0,0050	0,6833	0,0084	0,0077	0,0081	0,0032	0,0016	0,0144
ASCV7	0,0063	0,0084	0,0018	0,0048	0,0050	0,0061	0,6927	0,0099	0,0079	0,0032	0,0015	0,0144
ASCV8	0,2542	0,0109	0,0026	0,0060	0,0062	0,0153	0,0117	0,7962	0,0080	0,0040	0,0013	0,0196
ASCV9	0,0056	0,0084	0,0017	0,0049	0,0049	0,0055	0,0086	0,0073	0,6872	0,0025	0,0015	0,0140
ASCV10	0,0068	0,0146	0,0023	0,0280	0,0233	0,0298	0,0224	0,1028	0,2394	0,9359	0,0022	0,1458
ASCV11	0,0059	0,0095	0,0018	0,0058	0,0063	0,0116	0,0139	0,0138	0,0064	0,0131	0,9822	0,0148
ASCV12	0,0060	0,0071	0,0018	0,0050	0,0051	0,0059	0,0090	0,0068	0,0071	0,0023	0,0017	0,7049
Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Análisis morfológicos entre localidades

El análisis de variables canónicas permitió evaluar las diferencias entre localidades, en la Figura 13 se grafican los dos primeros ejes canónicos que explican el 49,53% de la varianza total entre localidades. En la Tabla 6 se indica la distancia de Mahalanobis entre localidades. Las dos primeras variables canónicas graficadas, permiten diferenciar claramente los individuos de las vertientes V8-V9-V10-V12, que muestran los mayores valores de distancias de Mahalanobis al ser comparados con las otras localidades. Las menores distancias morfológicas (Distancia de Mahalanobis) se observaron entre las vertientes V2, V3, V4, V5, V6 y V7, las distancias calculadas fueron estadísticamente significativas entre todas las localidades.

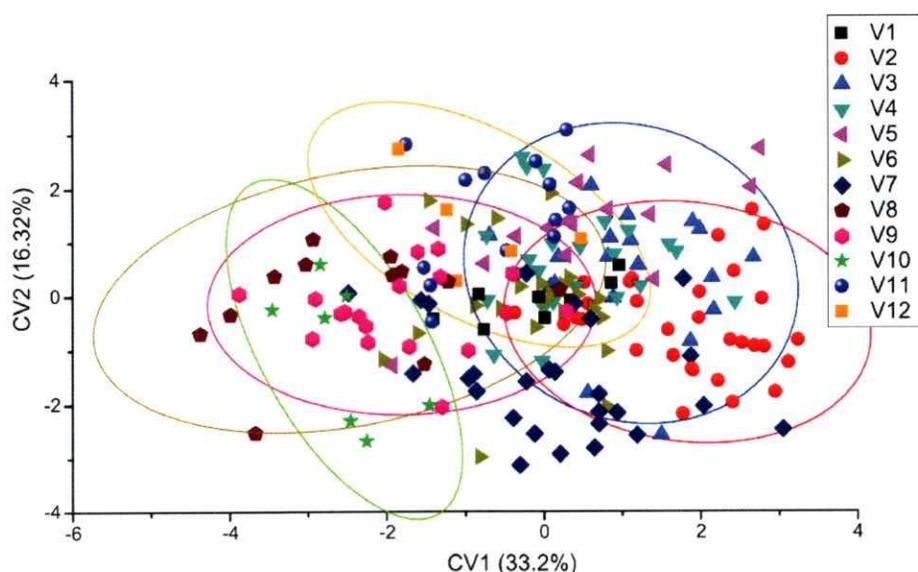


Figura 13 Análisis de variables canónicas, comparación por localidad. Las circunferencias representan elipses de equiprobabilidad de 0,95.

Tabla 6. Diferenciación morfológica entre localidades. Distancia de Mahalanobis (todas las distancias fueron significativas, $p < 0,05$, 10.000 permutaciones). Tamaño muestral entre paréntesis.

Localidad (n)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V1 (8)	-											
V2 (31)	3,835	-										
V3 (19)	3,537	2,219	-									
V4 (24)	2,809	2,425	1,89	-								
V5 (16)	3,946	2,799	2,558	2,34	-							
V6 (23)	3,309	2,809	2,304	2,224	2,55	-						
V7 (27)	3,869	2,649	2,952	2,89	3,225	2,354	-					
V8 (12)	4,569	4,528	4,133	3,532	3,967	3,083	3,669	-				
V9 (19)	3,394	3,867	3,491	2,741	3,396	2,442	3,039	2,225	-			
V10 (7)	4,626	5,15	4,72	4,313	4,771	4,302	4,247	3,496	3,412	-		
V11 (13)	4,215	3,721	2,879	2,549	2,534	2,843	3,429	3,397	3,09	4,5	-	
V12 (5)	5,642	5,08	5,403	4,77	3,958	4,663	4,651	4,876	4,614	6,109	4,53	-

Al realizar las comparaciones por medio de un análisis de función discriminante entre localidades, la clasificación de los individuos en cada vertiente fue de 39%, los individuos con el menor valor de clasificación fueron los de la vertiente V4 (21%) y el mayor valor clasificación fueron los individuos de la V12 con 60% (Jackknife, Wilks' lambda= 0,024 F aprox.= 2,687 g.l.= 286, 1,727 $p < 0,01$) ver Tabla 7.

Tabla 7 Análisis de función discriminante entre localidades. Análisis corregido por tamaño de muestra.

Localidad	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	% clasificación correcta
V1	3	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	38
V2	0	15	3	5	2	5	1	0	0	0	0	0	48
V3	0	4	5	6	0	3	1	0	0	0	0	0	26
V4	1	2	5	5	1	1	2	0	2	0	4	1	21
V5	0	2	2	0	7	0	0	0	2	1	1	1	44
V6	1	1	2	2	2	8	4	1	1	0	1	0	35
V7	1	3	1	0	1	3	13	0	3	1	0	1	48
V8	0	0	0	1	0	1	1	5	4	0	0	0	42
V9	0	0	0	1	1	3	1	4	8	0	1	0	42
V10	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	0	29
V11	0	0	0	2	3	2	1	0	0	0	5	0	38
V12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	60
Total	7	28	18	24	17	27	25	12	22	5	13	6	39

Al realizar las comparaciones por medio de un análisis MANOVA-NP con los scores de los componentes principales (PCA) por individuo como variables, se observaron 13 de 66 comparaciones entre localidades presentaron diferencias significativas (Total suma de cuadrados: 0,5853, suma de cuadrados

dentro del grupo: 0,471; F: 4,239; $p < 0,01$, Corrección de Bonferroni), sin embargo en este análisis no fue posible observar un patrón claro de diferenciación entre vertiente. (ver Tabla 8).

Tabla 8 Comparación entre localidades, MANOVA NP, Permutaciones: 9.999. Distancia Euclídeana, p- value corrección de Bonferroni, valores significativos en negrita.

Localidad	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V1	-											
V2	0,0066	-										
V3	0,2112	1	-									
V4	1	0,1188	1	-								
V5	0,2838	0,3762	1	1	-							
V6	0,2112	0,0066	0,198	1	0,3234	-						
V7	0,0066	1	1	0,0396	0,0132	0,0132	-					
V8	0,0198	0,0132	0,5346	0,3168	0,0396	1	0,1452	-				
V9	0,1518	0,0066	0,0594	0,1056	0,0198	1	0,0066	1	-			
V10	0,2178	0,363	1	1	0,4752	1	1	1	1	-		
V11	0,0792	0,1386	1	1	1	1	0,2178	1	1	1	-	
V12	0,1386	1	1	1	1	0,066	0,2112	0,0198	0,0066	0,1914	1	-

En el dendrograma UPGMA, se observa que los individuos de *O. ascotanensis* de las localidades V2-V3-V4-V5-V6-V7 ubicadas en la porción norte del salar, se agrupan formando un conglomerado, las diferencias observadas entre ellas (distancias morfológicas), son menores a las diferencias encontradas al compararlas con las otras localidades, con estas vertientes se agrupan V1 y V11 pero con mayores distancias morfológicas, además se puede observar un segundo grupo morfológico conformado por las vertientes V8-V9-V10 (ver Figura 14).

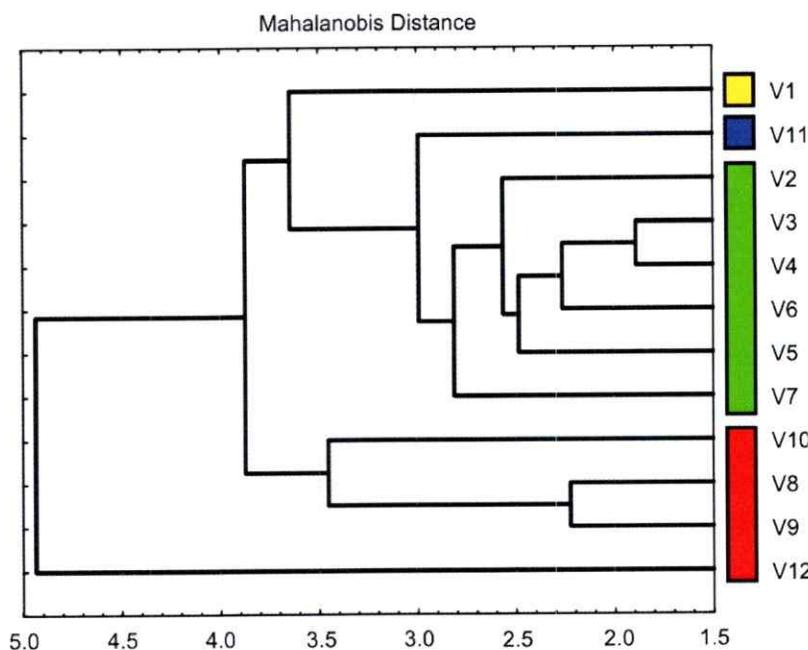


Figura 14 Dendrograma UPGMA construido con las distancias de Mahalanobis entre localidades, obtenidas desde el Análisis de Variables Canónicas (CVA). En color los grupos genéticos.

Análisis morfológicos entre grupos genéticos

Al reagrupar los individuos por la información obtenida de los marcadores moleculares (Microsatélites y Región Control), en la Figura 15, se observan las dos primeras variables que explican el 85,37%, en este se observa que los grupos 2 (V2-V7) y 3 (V8-V10) se distinguen claramente entre sí principalmente en el eje CV1, en este los individuos del grupos MG2, presentan una cabeza más alta, la posición del ojo es más dorsal en la cabeza, el opérculo es más corto y las aletas pectorales están más ventrales que lo que se observa en

promedio en los individuos del grupos MG3, mientras que los grupos 1 (V1) y 4 (V11) superponen la distribución de sus individuos en el espacio morfométrico. Por otra parte, MG1 (V1) y MG4 (V11) superpusieron la distribución de sus individuos en el espacio morfométrico (Figura 15) con los otros grupos. Sin embargo el grupo MG1 presentó un pedúnculo caudal más alargado, el ojo en una posición media y las aletas pectorales más cerca de la cabeza que el promedio de los otros grupos (eje CV2).

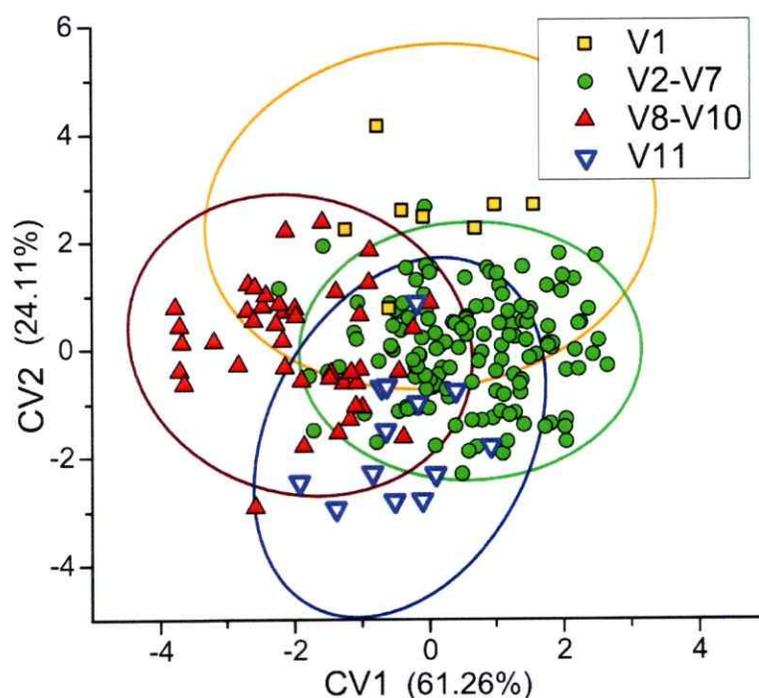


Figura 15 Análisis de variables canónicas de la comparación morfométrica entre grupos (K= 4, obtenidos de los análisis de microsatélites y secuencias de la región control del mtDNA). Las circunferencias representan elipses de equiprobabilidad de 0,95.

En los análisis discriminantes, los porcentajes de clasificación fueron mayores a los observados al comparar entre localidades, para los grupos ordenados con la información de microsatélites y de la región control ($K=4$), los valores de clasificación correcta se ubicaron entre un 46 y un 68% (total 65%) (Jackknife Wilks' $\lambda=0,273$ F aprox.= 3,656 g.l.= 78, 524 $p<0,01$) ver tabla 5. De los grupos obtenidos de los FST calculados con los Microsatélites ($K=6$), se obtuvieron dos grupos con altos porcentajes de clasificación, el grupo 4 formado por V8-V10 presentó un 63% de clasificación correcta y el valor más alto de clasificación correspondió al grupo 2, conformado por las vertientes V2-V3-V4-V5-V6, con un 88% de clasificación correcta, este ordenamiento entregó en total de un 67% de clasificación correcta (Wilks' $\lambda=0,135$; F aprox.= 3,303 g.l.= 130, 857 $p<0,01$) (ver Tabla 9)

Tabla 9 Análisis de función discriminante entre 4 grupos (grupos genéticos). Análisis corregido por tamaño de muestra.

	MG 1	MG 2	MG 3	MG 4	%correct
MG 1(V1)	3	4	1	0	38
MG 2 (V2-V7)	1	124	10	5	89
MG 3 (V8-V10)	0	16	26	1	60
MG 4 (V11)	0	7	2	4	31
Total	4	151	39	10	77

Mantel test

Se observó evidencias de aislamiento por distancia (Microsatélites F_{ST} Mantel test: $r= 0,6133$ $p < 0,01$). Al comparar las matrices de distancia genética (F_{ST}) con la distancia morfológica (Distancia de Mahalanobis), la correlación fue baja, pero significativa ($r= 0,317$ $p < 0,05$). No se encontraron evidencia de asociación entre las matrices de distancias morfológicas y geográficas (Mantel test: $r= 0,2622$ $p= 0,1288$).

Modelo de elevación digital (DEM)

El modelo de altitud del salar de Ascotán, permite reconocer que la porción sur del salar presenta las mayores altitudes (> 3.730 m s.n.m.) en esta porción está ubicada la vertiente V11, el patrón altitudinal muestra una pendiente que disminuye gradualmente de sur a norte en el salar, sin embargo el extremo norte donde está ubicada al vertiente V1 presenta altitudes superiores a 3.730 m s.n.m. la zona más baja del salar se encuentra en el noreste y corresponde a una gran superficie que cuenta con algunos cuerpos de agua en la actualidad (Figura 16).

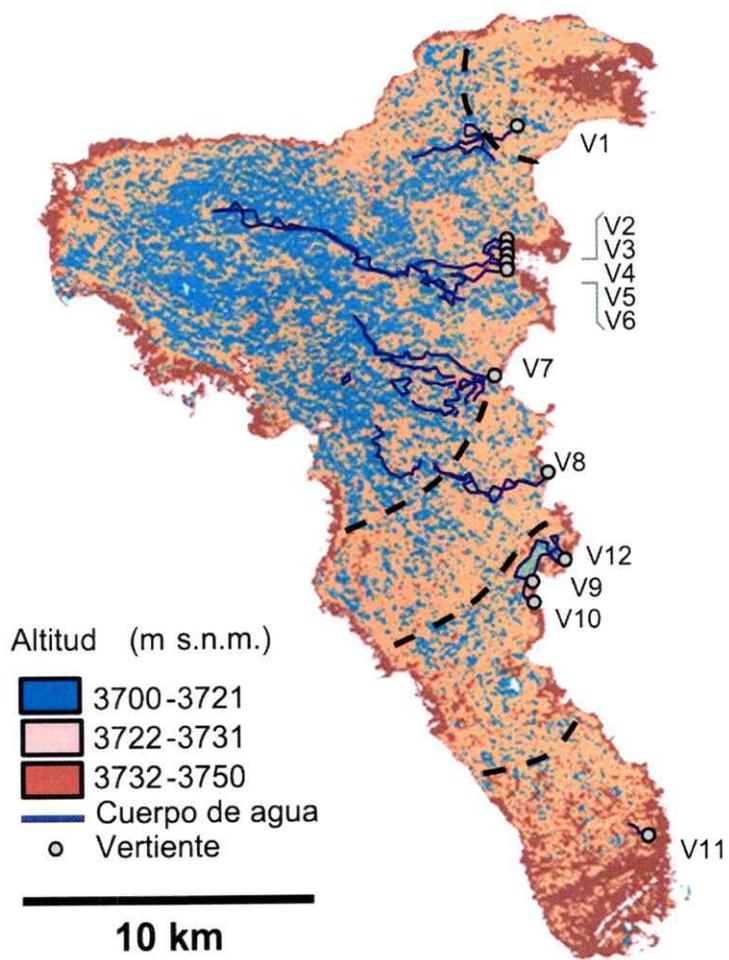


Figura 16 Modelo de elevación digital (DEM), se muestra la posición de las vertientes en el salar, los cuerpos de agua existentes y zonas de cambio altitudinal (líneas segmentadas).

Genética y Geografía

El análisis genético está altamente asociado a la geografía encontrada en el salar, en la Figura 17, se observa que las poblaciones encontradas con el análisis de estructuración (STRUCTURE K=4) se corresponden con la distribución espacial de las vertientes (Distancia geográfica y altitud), observándose potenciales barreras a la conexión entre vertientes y con ellas barreras al flujo de individuos.

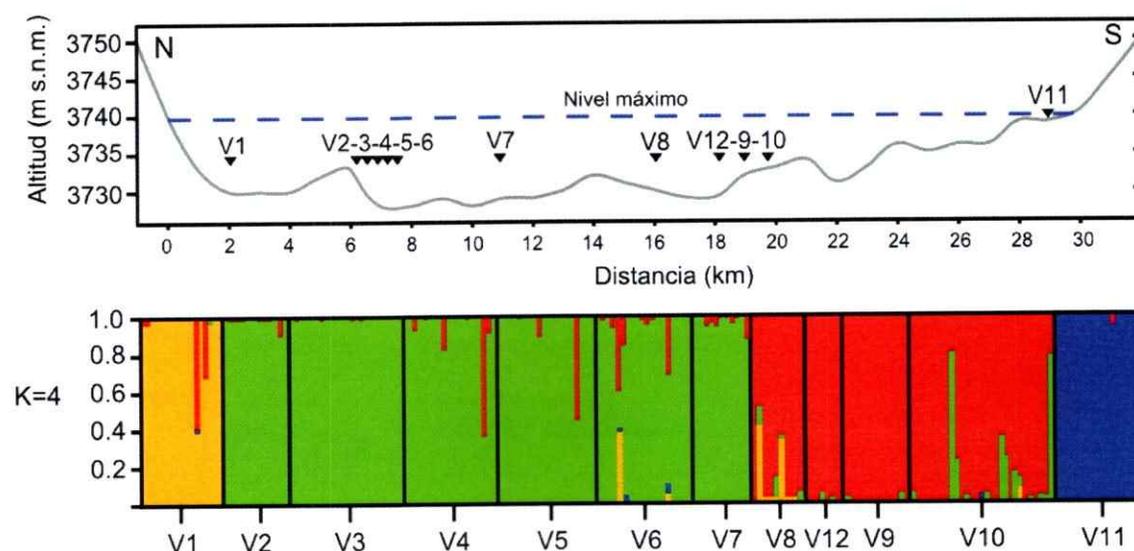


Figura 17 Perfil altitudinal Norte-Sur dentro del salar de Ascotán, la línea segmentada muestra nivel máximo del lago 11.000 años AP. Abajo: Plot STRUCTURE con K= 4 poblaciones.

DISCUSIÓN

Los resultados de la diversidad genética (microsatélites) en *Orestias ascotanensis* fueron variables dependiendo de las localidades. Las vertientes del centro del salar (V2 a V10) mostraron mayor diversidad genética (H_O y H_E), seguidas de las vertientes V1 y V11, esto es similar a lo registrado con el marcador mitocondrial (Morales *et al.* 2011). Las diferencias que muestran estas localidades se pueden explicar principalmente por el aislamiento geográfico, ya que las vertientes V1 y V11 se encuentran en los extremos del salar de Ascotán, a gran distancia geográfica de las otras vertientes y a mayor altitud (m s.n.m.).

Los análisis genéticos utilizando 8 loci de microsatélites, permiten establecer grupos de localidades claramente diferenciables, con los índices de F_{ST} y D_{ST} y con el análisis factorial de correspondencia (AFC), es posible identificar entre 4 y 6 grupos dentro del salar, las vertientes V1 y V11 cada una como una unidad bien diferenciada, un grupo de localidades (V2, V3, V4, V5 y V6) como una sola unidad genética, los que se corresponde con la distribución geográfica, ya que todas estas vertientes están ubicadas en una distancia máxima no superior a 1,1 km, y eventualmente podrían conectarse manteniendo una diversidad genética en común. Además se identifica un grupo conformado por las vertientes V9, V12 y V10, que presentan una condición similar al grupo anterior (distancia lineal máxima 2,2 km), y otras vertientes V7 y

V8 que están separadas geográficamente, pero que no presentan grandes diferenciaciones genéticas con otros grupos, lo que sugiere conexiones esporádicas en el pasado reciente (posterior al UMG).

Los modelos de estructuración poblacional también entregan valores similares en el número de clusters o grupos, $K=4$ parece ser el valor más probable (ΔK STRUCTURE, GENELAND), considerando variables geográficas, morfológicas y genéticas (Microsatélites), lo que concuerda con lo presentado por Morales *et al.* 2011, sin embargo al clasificar en $K=7$, es posible distinguir a la vertiente V10, como un grupo adicional y las vertientes V7 y V8 como un grupo que podría presentar algún tipo de flujo génico entre ellas, causado por un posible contacto de sus individuos.

Desde este análisis también se infiere el proceso de diferenciación de las poblaciones, así el área del salar estaba ocupada por un lago que abarcaba todas las vertientes hasta la cota 3.740 m s.n.m., esto habría ocurrido durante el último máximo glacial, este grupo inicial se fraccionó abruptamente producto de la disminución del nivel del agua de aproximadamente 20 m de profundidad (Figura 16 y Figura 17), lo que generó que las poblaciones de las vertientes V2, V3, V4, V5, V6 y V7, quedaran separadas del resto de las localidades, este grupo se habría distribuido en un remanente ubicado en el centro noroeste del actual salar, que corresponde a la porción más baja (Altitudes inferiores a 3.720 m s.n.m.) y mantendrían la diversidad genética de la gran población inicial hasta

la actualidad (Morales *et al.* 2011). Las vertientes V1 y V11 fueron los remanentes más pequeños y aislados, producto de la posición geográfica (se ubican en los extremos del salar en altitudes mayores a 3.730 m s.n.m.) lo que ha impedido que se conecten a otras localidades, generando la acumulación de diferencias genéticas producto de la deriva génica. Esto concuerda con lo observado por Morales *et al.* 2011, que señala que las vertientes V1 y V11 son unidades evolutivas significativas (ESU), que presentan las mayores diferencias genéticas (Región Control), al igual que lo observado con Microsatélites (mayores valores de F_{ST} y D_{ST}).

Los 4 grupos más distinguibles corresponden a V1, V2-V7, V8-V10 y V11. Por último los valores de ΔK encontrados en $K=7$, sugieren la separación de algunas localidades como la V10 (claramente diferenciable en este análisis) y las vertientes V7 y V8, que comienzan a diferenciarse de los grupos centrales del salar, posiblemente por la distancia geográfica que impediría el flujo de individuos en eventos de lluvias estacionales del invierno altiplánico. Las similitudes genéticas y morfológicas entre las vertientes V2, V3, V4, V5, V6 y en el grupo centro sur conformado por V12 y V9, podrían ser mantenidas por mezclas causadas por aumentos estacionales en los niveles del agua. Esta dinámica de metapoblación estaría reafirmada por las tasas de migración asimétricas observadas entre estos grupos, así las vertiente V3 y V10 se

comportarían como poblaciones fuente, las que aportarían individuos a los dos grupos centrales vertientes.

Los resultados morfológicos obtenidos con la forma del cuerpo, muestra pequeñas diferencias entre los peces de las diversas vertientes (CVA, análisis discriminantes y MANOVA NP), estas se reflejan principalmente entre los individuos provenientes desde el centro del salar, formado por las localidades V2, V3, V5, V7, V8, V9 y V10. Las diferencias se acentúan al reordenar los individuos en relación a los resultados genéticos (Microsatélites), los porcentajes de clasificación correcta aumentan (77%) al reordenar en K= 4 grupos (STRUCTURE, GENELAND), destacándose el grupo MG2 (V2 a V7) con un 89% de clasificación correcta (AFD) y el grupo MG3 con un 60% de clasificación correcta. Las distancias de Mahalanobis en el análisis de ordenamiento (UPGMA), también permiten identificar al menos 4 grupos morfológicos, lo que es consistente con la información geográfica (distancias geográficas) y genética (Microsatélites y Región Control).

De la Barra *et al.* (2009), encontró diferencias entre poblaciones de *O. agassii* de la puna meridional de Bolivia, estas se observaban principalmente en el ancho de la cabeza, del opérculo, del cuerpo y en el alto del cuerpo y del pedúnculo caudal, y estarían relacionadas con los ambientes donde habitan, ya que peces provenientes de lagunas, presentan cabezas de mayor tamaño y cuerpos más robustos que los individuos de río y bofedal. La diferenciación

morfológica en este caso estaría modulada por los ambientes contrastantes donde habita la especie, lo que no ocurre en el caso de *O. ascotanensis*, donde los ambientes entre las vertientes son similares entre sí y presentan cierta estabilidad estacional en temperatura del agua (cerca a 22°C) y fauna bentónica presente en ellas (Márquez-García *et al.* 2009).

Es destacable que las diferencias morfológicas encontradas en las poblaciones de *O. ascotanensis* dentro del salar de Ascotán, se presentan en una pequeña escala geográfica y en ambientes locales similares, lo que estaría asociado al grado de aislamiento entre las localidades, separadas durante no más de 11.000 años (Morales *et al.* 2011).

El mecanismo de diferenciación presente en este salar es principalmente alopátrico, y estaría determinado por fragmentación y barreras geográficas dentro del salar. Este mecanismo ha sido observado en otros organismos dentro del salar, así caracoles del género *Biomphalaria* presentan una estructuración similar a lo encontrado por este estudio reconociendo al menos tres grupos genéticos uno formado por individuos de las vertiente V2 a V8, otro con individuos V9 y V10 y el último conformado solo con individuos de la vertiente V11 (Collado & Méndez 2013). Otra evidencia ha sido observada en poblaciones del género *Orestias* en el Parque Nacional Lauca, en ese caso las poblaciones presentes en distintos cuerpos de agua presentan claras diferencias genéticas, la separación entre estas poblaciones y/o especies

posiblemente se originó con el colapso del volcán Parinacota ocurrido 8 ka AP (Vila et al 2013), sin embargo existen evidencias de flujo génico entre algunas de estas poblaciones principalmente en el Bofedal de Parinacota que está en una altitud menor al resto de los cuerpos de agua, lo que favorecería la migración de individuos en eventos de invierno altiplánico (Guerrero 2012)

El mecanismo de diferenciación alopátrica parece ser el más frecuente en especies acuáticas, ejemplos de esto han sido documentados en peces del género *Goodea* (White & Turner BJ 1984), *Gambusia* (Schug et al 1998), *Aphanius* (Maltagliati et al. 2003, Tigano et al. 2006), *Oncorhynchus* (Taylor et al 2010) y *Xiphophorus* (Tatarenkov et al. 2010), uno de los casos más similares a los observado en *Orestias ascotanensis* en el salar de Ascotan, es lo observado con peces del género *Cyprinodon* en el desierto de Nevada, que muestra diferencias significativas y estructuración genética entre poblaciones separadas por pocos km de distancia, y que se habrían comenzado a diferenciarse, por fragmentación de los hábitat ocurrida posterior al UMG (10 a 20 ka AP), además algunas poblaciones que compartirían diversidad genética por conexiones esporádicas entre las localidades (Duvernell & Turner 1998). El modelo de diferenciación poblacional observado en *Orestias ascotanensis*, es comparable al proceso de diferenciación ocurrido con el género *Orestias* en el Altiplano. Durante el Pleistoceno, ciclos entre periodos húmedos y secos generaron drásticas variaciones en los niveles de agua en la cuenca del

Altiplano, se han descrito sucesivos paleolagos que cubrieron extensas zonas (Fornari *et al.* 2001, Fritz *et al.* 2004, Rigsby *et al.* 2005) y que permitían algún grado de conexión entre grupos de *Orestias* que habitaban en ellos. Durante periodos secos los niveles disminuían aislando poblaciones, lo que favorecía el proceso de diferenciación morfológica y genética.

En este contexto y con la información obtenida del presente estudio en poblaciones de *O. ascotanensis*, se puede inferir en términos generales que las primeras poblaciones/especies en diversificar pudieron ser las de los remanentes más altos en el Altiplano, ubicadas en los bordes de los paleolagos, es esperable que esos grupos acumulen grandes diferencias genéticas y morfológicas causadas por el tiempo que han permanecido aisladas, incluso durante los periodos más húmedos, similar a lo ocurrido con las poblaciones V1 y V11 en el salar de Ascotán.

Por otra parte las poblaciones/especies que habitan cuerpos de agua en localidades bajas (dentro del Altiplano) podrían presentar alta diversidad genética y morfológica, causadas por conexiones más recientes entre grupos, ocurridas en periodos húmedos históricos y/o por actuales condiciones ambientales como las que ocurren durante el Invierno Altiplánico, esto es similar a lo ocurrido en las vertientes del centro del salar de Ascotán (V2 a V7 y V8 a V10).

CONCLUSIONES

Orestias ascotanus presenta cuatro poblaciones que se diferencian en análisis genéticos (Microsatélites) y morfológicos (Morfometría Geométrica), las que concuerdan con los análisis de la Región Control (Morales *et al.* 2011), este patrón se explica por aislamiento geográfico (Altitud y distancia entre vertientes) y fluctuaciones históricas en los niveles del agua.

Las poblaciones que presentaron mayores diferencias genéticas, no mostraron una alta diferenciación morfológica, posiblemente por la rápida tasa de cambio a nivel molecular causada por deriva génica en pequeñas poblaciones.

Las similitudes morfológicas encontradas pueden ser producto de similitudes ambientales entre vertientes y/o por estar en una etapa inicial de diferenciación.

Esta distribución geográfica y las características de la especie corresponden a un excelente modelo para explicar a fina escala el proceso de diferenciación inicial entre poblaciones, principalmente del género *Orestias* en el Altiplano de Sudamérica.

REFERENCIAS

- Alajanabi S.A. & I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of highquality genomic ADN for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4692-4693.
- Arratia, G. 1982. Peces del altiplano chileno. En: *El hombre y los ecosistemas de montaña. Volumen I* (Eds. Veloso, A. & E. Bustos) pp. 93-133. Oficina regional de ciencia y tecnología de la Unesco para America Latina y el Caribe. Montevideo Uruguay.
- Blard, P.H., Sylvestre F., Tripathi A.K., Claude C., Causse C., Coudrain A., Condom T., Seidel J.L., Vimeux F., Moreau C., Dumoulin J.P. & J. Lavé. 2011. Lake highstands on the Altiplano (Tropical Andes) contemporaneous with Heinrich and the Younger Dryas: new insights from ^{14}C , U-Th dating and $\delta^{18}\text{O}$ of Carbonates. *Quaternary Science Reviews* 30: 3973 - 3989.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & F. Bonhomme. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

- Collado, G., Vila I. & M.A. Méndez. 2011. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. *Zoologica Scripta* 40: 613-622.
- Collado, G. & MA. Méndez. 2013. Phylogenetic relationships and taxonomy of Altiplano populations of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae): inference from a multilocus approach *Zoological Journal of the Linnean Society* 165: 795–808.
- Crawford, N.G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10: 556-557.
- Decreto Supremo 51/2008. Ministerio Secretaria General de la Presidencia. Tercer Proceso de Clasificación de Especies.
- Earl, D.A. & B.M. Von Holdt. 2012. Structure Harvester: A website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361.
- Eastman, JR. 2003. IDRISI Kilimanjaro guide to GIS and image processing. Massachusetts, US, Clark University. 324 p.
- Elmer, K.R., Fan S., Gunter H.M., Jones J.C., Boekhoff S., Kuraku S. & A. Meyer 2010. Rapid evolution and selection inferred from the

transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology* 19(1):197-211.

Esquer-Garrigos Y. Lambourdière J. Ibañez C. & P. Gaubert. 2011. Characterization of ten polymorphic microsatellite loci in the Andean pupfish *Orestias agassizii*, with cross-amplification in the sympatric *O. luteus*. *Conservation Genetics Resources* 3 (1):17-19.

Esquer-Garrigos, Y., Hugueny B., Koerner K., Ibañez C., Bonillo C., Pruvost P., Causse R., Cruaud C. & P. Gaubert. 2013. Non-invasive ancient ADN protocol for fluid-preserved specimens and phylogenetic systematics of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Zootaxa* 3640 (3): 373–394.

Evanno, G.; Regnaut S. & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-2620.

Fornari, M., F. Risacher & G. Feraud. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.* 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., & Luo, S. 2004: Hydrologic variation during the last 170,000 years in the Southern hemisphere tropics of South America. *Quaternary Research* 61: 95–104.

- Guerrero, M.J. 2013. Diferenciación genética y ecológica en el complejo *Agassizii* del género *Orestias* en las cuencas de la Puna del noreste de Chile. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Guillot, G., Estoup A., Mortier F. & J. Cosson. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261–1280.
- Hammer O., Harper D. & P Ryan. 2001. PAST: paleontological statistics software for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 1-9.
- Ihaka, R. & R. Gentleman. (1996). "R: A language for data analysis & graphics". *Journal of Computational & Graphical Statistics* 5: 299-314.
- Jara, F. Soto D. & R. Palma. 1995. Reproduction in captivity of the endangered killifish *Orestias ascotanensis*, (Teleostei: Cyprinodontidae). *Copeia* 1995: 226–228.
- Jost, L. 2008. *Gst* and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17: 4015- 4026.
- Keller, B. & D. Soto. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Pisces: Cyprinodontidae) at Salar de Ascotan, Northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71:147-156.

- Klingenberg, C.P. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometric. *Molecular Ecology Resources* 11: 353–35
- Kornfield, I. & P.F. Smith. 2000. African Cichlid Fishes: Model Systems for Evolutionary Biology. *Annual Review of Ecology & Systematics* 31:163-96.
- Latorre, C., J.L. Betancourt, K.A. Rylander & J. Quade. 2002. Vegetation invasions into absolute desert: A 45,000 yr rodent midden record from the Calama-Salar de Atacama basins, northern Chile (lat 22°-24° S). *Geological Society of America Bulletin* 114: 349-366.
- Licciardi, J.M. Schaefer J.M. Taggart J.R. & D.C. Lund. 2009. Holocene glacier fluctuations in the Peruvian Andes indicate Northern climate linkages. *Science* 325:1677–1679.
- Maltagliati F., Domenici P., Fosch C.F., Cossu P., Casu M. & A. Castelli. 2003 Small-scale morphological and genetic differentiation in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a coastal brackish-water pond and an adjacent pool in northern Sardinia. *Oceanologica Acta* 26: 111–119.
- Martínez, G. Bugueño N. & I. Vila. 1999. *Orestias ascotanensis* en el Salar de Ascotán. *Not. Mens. Mus. Nac. Hist. Nat.* 339:7–12.

- Márquez-García, M. Vila I. Hinojosa L.F. Méndez MA. Carvajal J.L. & M.C. Sabando. 2009. Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano. *Limnologica* 39: 314-318
- Morales, P. Vila I. & E. Poulin. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conservation Genetics* 12: 1639–1643..
- Neiffer, D.L. & M.A. Stamper. 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal* 50: 343-360.
- 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.
- Placzek, C. Quade, J. & P.J. Patchet. 2006. Geochronology & stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *Geological Society of America Bulletin* 5/6: 515–532.
- Placzek, C.J., Quade, J. & P.J. Patchett. 2011. Isotopic tracers of paleohydrologic change in large lakes of the Bolivian Altiplano *Quaternary Research*, 75 : 231–244.

- Pritchard, J. K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rigsby, C.A., J.P. Bradbury, P.A. Baker, S.M. Rollins & M.R. Warren 2005. Late Quaternary palaeolakes, rivers, & wetlands on the Bolivian Altiplano and their palaeoclimatic implications. *Journal of Quaternary Science* 20(7-8):671-691.
- Risacher, F., Alonso H. & 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.
- Risacher, F., Alonso H. & C. Salazar. 2003. The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews* 63:249–293.
- Rohlf, F. J. 2010. TpsDig v2.16. Department of Ecology & Evolution, State Univ. New York, Stony Brook, NJ.
- Sáez, P. 2012. Relaciones evolutivas de las especies del género *Telmatobius* (Anura: Telmatobiidae) en el altiplano sur chileno. Tesis de Magister, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Schug M.D., Downhower J.F., Brown L.P., Sears D.B. & A.P. Fuerst. 1998. Isolation and genetic diversity of *Gambusia hubbsi* (mosquitofish)

populations in blue holes on Andros Island, Bahamas. *Heredity* 80: 336–346.

Smith, J.A. Finkel R.C. Farber D.L. Rodbell D.T. & G.O. Seltzer. 2005. Moraine preservation and boulder erosion in the tropical Andes: interpreting old surface exposure ages in glaciated valleys. *Journal of Quaternary Science* 20:735–758.

StatSoft, Inc. (2001). *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa, OK: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>.

Tigano C., Canapa A., Ferrito V., Barucca M., Arcidiacono I., Deidun A., Schembri P.J. & E. Olmo. 2006. A study of osteological and molecular differences in populations of *Aphanius fasciatus* Nardo 1827, from the central Mediterranean (Teleostei, Cyprinodontidae). *Marine Biology* 149: 1539–1550.

Taylor, E.B., Tamke P., Keeley E.R. & E.A. Parkinson. 2010. Conservation prioritization in widespread species: the use of genetic and morphological data to assess population distinctiveness in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from British Columbia, Canada

- Tatarenkov, A. Healey C.I.M. & J.C. Avise. 2010. Microgeographic population structure of green swordtail fish: genetic differentiation despite abundant migration. *Molecular Ecology* 19: 257–268
- Van Oosterhout, C., Hutchinson W.F., Willis D.P.M. & P. Shipley. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vila, I., Méndez M., Scott S., Morales P.M. & E. Poulin. 2007a. Threatened fishes of the world: *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontidae). *Environmental Biology of Fishes* 80:491–492.
- Vila, I. Pardo R. & S. Scott. 2007b. Freshwater fishes of the Altiplano. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 10: 201-211.
- Vila, I. Scott S., Lam N., Iturra P. & M.A. Méndez 2010. Karyological and morphological analysis of divergence among species of the killifish genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the southern Altiplano. In: Nelson J.S., Schultze H.P. & Wilson M.V.H. (eds) *Origin and phylogenetic interrelationships of Teleosts*: 471-479. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany.
- Vila, I., Morales P., Scott S., Poulin E., Véliz D., Harrod C. & M.A. Méndez. 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias*

- (Teleostei; Cyprinodontidae) in the Southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology*, 82, 927–943.
- 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. 1998. Evolutionarily significant units, distinct population segments, and the endangered species act: Reply to Pennock & Dimmick. *Conservation Biology*, 12:718-721.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wilson, G. & B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes, *Genetics*, 163 (2003), pp. 1177–1191.
- White, M.M. & B.J. Turner. 1984. Microgeographic differentiation in a stream population of *Goodea atripinnis* (Goodeidae) from the Mexican Plateau. *Environmental Biology of Fishes*, 10, 123–127.