



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ECOLÓGICAS

**DESCIFRANDO LA HISTORIA EVOLUTIVA DE LAS POBLACIONES DE
ORESTIAS AGASSII VALENCIENNES, 1846 (CYPRINODONTIDAE) EN
PERÚ, BOLIVIA Y 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:

ALEJANDRA ANDREA FABRES CONTRERAS

Director de Tesis:

Dr. David Véliz

Santiago de Chile Noviembre, 2022

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

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

ALEJANDRA ANDREA FABRES CONTRERAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director/a de Tesis:

Dr. David Véliz

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Elie Poulin

Dr. Miguel Allende

*“When a person can’t find a deep sense of meaning,
they distract themselves with pleasure.”*

-Viktor Frankl (1905-1997)

Resumen Biográfico



Soy Alejandra A. Fabres Contreras, nací el 25 de septiembre de 1989 en Caracas, Venezuela. A los ocho años migré con mi familia a California, Estados Unidos. En el 2004, migramos a Santiago de Chile, lugar donde he logrado terminar mis estudios de secundaria y estudiar en la Universidad. En el 2009 entre a estudiar Ciencias Biológicas en la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde básicamente me enamoré de la carrera. Tras mi licenciatura, empecé a trabajar como técnica en el laboratorio del Dr. Marco Méndez, lugar donde realicé mi Magister en Ciencias Biológicas.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por confiar en mí y en mis capacidades. Siempre fueron un pilar importante, entregándome todas las libertades para explorar, equivocarme y aprender. Sin su apoyo nunca hubiera conocido la ciencia.

Estoy muy agradecida de mi estadía en el Laboratorio de Genética y Evolución, donde tuve la oportunidad de aprender tanto del mundo académico, como del mundo laboral. También en estos ocho años, conocí a muchas personas con las cuales he colaborado, armado proyectos y me han apoyado tanto con críticas constructivas, como emocionalmente.

Finalmente agradezco al proyecto FONDECYT 1200419 y a los fondos SRF de la Systematics Associations.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES E HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Muestreo.....	18
Extracción, amplificación y edición de secuencias de DNA.....	23
Análisis filogenéticos.....	25
Tiempo de divergencia.....	27
Diversidad genética y red de haplotipos.....	28
Análisis de estructuración poblacional.....	29
RESULTADOS.....	30
Secuencias.....	30
Construcción filogenética.....	31
Diversidad genética y red de haplotipos de las poblaciones de <i>O. agassii</i>	38
Tiempo de divergencia.....	45

Diversidad genética y red de haplotipos.....	45
Análisis de estructuración poblacional.....	46
DISCUSIÓN.....	50
Evidencias filogenéticas.....	50
Evidencia genética de poblaciones.....	52
Tiempos de divergencias.....	55
Red de haplotipos.....	56
Estructuración poblacional.....	56
CONCLUSIÓN.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades muestreadas de <i>Orestias agassii</i> distribuidas en Perú (PE), Bolivia (BO) y Chile (CL).....	19-21
Tabla 2. Marcadores moleculares utilizados.....	24
Tabla 3. Índices de diversidad genética.....	39
Tabla 4. Altura de cada localidad estudiada	43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de la familia Cyprinodontidae. A) Eurasia; B) África; C) Norte América; D) Sudamérica; E) Caribe (extraída de Parker y Kornfield, 1995).....6
- Figura 2.** Filogenia molecular de los complejos del género *Orestias*. Esta filogenia incluye morfo tipos de las especies. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo. El único complejo que no se representa es el *mulleri* (extraído de Esquer-Garrigos y col., 2013).....7
- Figura 3.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) con genes mitocondriales de *Orestias* en Chile. (Extraído de Vila y col., 2013).....8
- Figura 4.** Análisis de variables canónicas (CVA) de la comparación entre localidades de *Orestias agassii* de Perú, Bolivia y Chile. * corresponde a los sintipos de *O. agassii* (Extraído de Cruz-Jofré y col., 2014).....9

Figura 5. Perfil longitudinal de la cuenca endorreica del Altiplano. Se observan las principales características del altiplano, a) la altura de los cuerpos de agua, b) el gradiente altitudinal, y c) la altura de los paleólago de mayor extensión (extraída de Placzek y col., 2006).....14

Figura 6. Reconstrucción histórica de los paleo lagos según los depósitos en las paleo costas. Se observa que el paleólago Tauca fue el más extenso y más reciente, mientras el paleólago Ouki fue el más extenso, pero más antiguo (extraída de Placzek y col., 2006).....14

Figura 7. Mapa de las localidades muestreadas de *Orestias agassii* distribuidas en Perú, Bolivia y Chile.....22

Figura 8. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop*, *cytb* y *glyt*. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha. A) Filogenia reconstruida con los genes *dloop-cytb-glyt*, con los largos de ramas modificados. B) Filogenia reconstruida con los genes *dloop-cytb-glyt*, sin el largo de rama modificado.....33

Figura 9. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha. A) árbol IB con el gen *cytb*; B) árbol IB con los genes *dloop-cytb*.....34

Figura 10. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con el gen *dloop*. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha.....35

Figura 11. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop-cytb-glyt*. Linaje A corresponde al linaje de la cuenca del Urubamba, Cuzco. El linaje B corresponde a las poblaciones de *O. agassii* de la cuenca del Titicaca36

Figura 12. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop-cytb-glyt*. El sub-linaje C corresponde al “grupo TPDS” con individuos que habitan bajos los 3800 m.s.n.m.....37

Figura 13. Red de haplotipos con marcador *dloop* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile.....40

Figura 14. Red de haplotipos con marcador *cytb* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile.....41

Figura 15. Mapa de las localidades muestreadas de *Orestias agassii* distribuidas en Perú, Bolivia y Chile. La extensión del paleólago Tauca se muestra en azul.....42

Figura 16. Red de haplotipos con marcador *dloop* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile. Los colores indican rango de altura en la cual están ubicadas las localidades.....44

Figura 17. Árbol IB bajo el modelo de reloj estricto de *Orestias agassii*. El valor arriba de los nodos indica el tiempo de divergencia entre los linajes. Las barras indican los intervalos del 95% de la alta densidad posterior (HPD).....47

Figura 18. Red de haplotipos de los individuos pertenecientes al sub-linaje C, “grupo TPDS”41

Figura 19. Análisis bayesiano de detección de número de clusters genéticos implementados en el programa STRUCTURE para las poblaciones del *Orestias agassii* del linaje C. Cada individuo esta representado por una barra y los colores corresponden a la probabilidad de asignación a un cluster. El análisis indica $K = 2$ como el número más probable de clusters. El color morado claro corresponde al cluster asignado como “Isluga abajo” y el morado oscuro al cluster asignado como sistema TPDS.....49

Tabla de Símbolos

m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
TPDS	Lago Titicaca, Lago Poopó, Río Desaguadero y Salares de Coipasa y Uyuni
Lat	Latitud
<i>dloop</i>	Región control
<i>cytb</i>	Citocromo b oxidasa
<i>glyt</i>	glycosyltransferase
<i>nd2</i>	NADH deshidrogenasa 2
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
ng	nanogramos
U	Unidades
dNTP	Trifosfato de nucleósido
HCL	Ácido clorhídrico
KCL	Cloruro de potasio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
DNA	Ácido desoxirribonucleico

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Seg	segundos
°C	grados celcius
mtDNA	DNA mitocondrial
ncDNA	DNA nuclear
cf.	Confer
spp.	Especie en plural
lnL	Logaritmo natural
MP	Máxima parsimonia
ML	Máxima verosimilitud
BI	Inferencia Bayesiana
BIC	Criterio de Información Bayesiano
TBR	Tree – Bisection – Reconnection
ESS	Tamaño de Muestra Estimado
PSRF	Factor Potencial de Reducción Escalado
ILD	Partition Homogeneity
ISS	Index of Substitution Saturation
ISSc	Critical Index of Substitution Saturation
HPD	Alta densidad posterior
S	Número de sitios polimórficos
K	Número de haplotipos
H	Diversidad haplotípica
\bar{d}	Promedio de diferencias por par de secuencias

Resumen

El género *Orestias* (Cyprinodontinae: Tribu Orestiini) habita los cuerpos de agua altiplánicos de Perú, Bolivia y Chile de Sudamérica. Las especies de este género se agrupan en cinco complejos de especies, según su morfología y relaciones evolutivas: *cuvieri*, *mulleri*, *gilsoni*, *lutea* y *agassii*. De éstos, el complejo *agassii* es el más diverso, con 22 especies descritas. La especie tipo de este complejo corresponde a *Orestias agassii* Valenciennes en 1846, descrita para la localidad tipo Corocoro, Bolivia. Esta especie está descrita en 100 localidades en Perú, Bolivia y Chile, teniendo una amplia distribución (Lat: -13°S – -23°S). La topología actual de esta zona es constituida por cuatro sistemas hidrológicos principales que presentan una conexión actual (Lago Titicaca, Lago Poopó, Salar de Coipasa y Salar de Uyuni). Asimismo, estos sistemas han estado históricamente conectados a través de paleolagos durante el cuaternario. Este estudio se enfoca en aclarar la sistemática de las entidades nominadas como *Orestias agassii* incluyendo la mayor cantidad de localidades posibles de su distribución. Para ello, se realizó un enfoque molecular utilizando los genes mitocondriales de la región control y citocromo b oxidasa, y el gen nuclear *glycosyltransferase*. Los principales resultados muestran que distribución de *O. agassii sensu stricto* se limita a la cuenca del Lago Titicaca, y que las poblaciones dentro de la cuenca

están estructuradas según el gradiente altitudinal y aislamiento geográfico de la cuenca. Por otro lado, las poblaciones de *Orestias agassii* están bajo un proceso de divergencia impuesto por la topología de la cuenca del Titicaca y los cambios hídricos, destacando la importancia de estos cambios que conllevan a la estructuración poblacional.

Abstract

The genus *Orestias* (Cyprinodontinae: Tribe Orestiini) inhabit the bodies of water of the Altiplano of Peru, Bolivia and Chile, in South America. The species of this genus form five species complexes, according to their morphology and evolutionary relationship: *cuvieri*, *mulleri*, *gilsoni*, *lutea*, and *agassii*. From these, the *agassii* complex is the most diverse, including 22 species. The type species of this complex corresponds to *Orestias agassii* Valenciennes 1846, described for the type locality of Corocoro, Bolivia. Additionally, this species is described in 100 localities from Peru, Bolivia and Chile, having a widespread distribution (Lat: -13°S – -23°S). The current topology of the Altiplano is fragmented into four main hydrological systems that are interconnected with each other (Lake Titicaca, Lake Poopó, Coipasa saltpan, and Uyuni saltpan). These systems have been historically connected through various paleolakes during the Quaternary. This study focuses on clarifying the systematic of *Orestias agassii* including as many localities as possible. For this, we performed a molecular approach using mitochondrial genes *d-loop* and cytochrome *b* oxidase, and the nuclear gene glycosyltransferase. The main result shows that the distribution of *O. agassii* is limited to the Titicaca Basin and that the populations are structured by altitude gradients and geographic isolation of the basin. Therefore, the populations of *O.*

agassii are under a divergence process forced by the topology of the Titicaca basin and the hydrological changes, highlighting the importance of these changes that drive species and population structure .

Introducción

Los sistemas límnicos del Altiplano de los Andes de Sudamérica, son habitados por dos ordenes de peces de agua dulce, Cyprinodontiformes y Siluriformes (Eigenmann y Allen, 1942; Parenti, 1984 a). La familia Cyprinodontidae pertenece al orden Cyprinodontiformes, tiene una distribución cosmopolita, y está presente en Eurasia, África, Norte América, Sudamérica y el Caribe (Parker y Kornfield, 1995) (Figura 1). Esta familia, incluye dos subfamilias, la subfamilia de los Cubanichthyinae, compuesta por un único género, *Cubanichthys*, que se distribuye en Cuba y Jamaica; y la subfamilia de Cyprinodontinae, la cual incluye a 16 géneros que se distribuyen en tres grupos. Uno presente en la región Centro del Caribe, otro en Anatolia (Mediterráneo y Arabia), y otro en Sudamérica (Parker y Kornfield, 1995). Los géneros que se distribuyen en Sudamérica, habitan en los Andes a lo largo de Perú, Bolivia y Chile, y corresponden a la ictiofauna dominante en esta área. Incluye a dos géneros, *Orestias* Valenciennes, 1839 y *Pseudorestias* Arratia, Vila, Lam, Guerrero y Quezada-Romegialli, 2017. El género *Orestias* fue descrito por Valenciennes en 1839, y su nombre significa hadas de las montañas, nombre seleccionado para destacar que estos peces habitan en las altas montañas de América (Valenciennes, 1846), a diferencia de los otros géneros del orden Cyprinodontiformes. El límite norte de la distribución

del género *Orestias* corresponde a la provincia de Ancash, Perú (10°S, 78°W), y el límite sur es el Salar de Chalviri, Bolivia (22°S, 68°W) (Parenti, 1984 b). Las especies de este género se reconocen por dos sinapomorfías: la ausencia de la aleta pélvica, y un patrón único de escamación y poros en la cabeza (Parenti, 1984 a). Las primeras nueve especies del género fueron descritas por Valenciennes en 1846, y recolectadas por Pentland (Dejoux y Ittis, 1992). Desde su primera descripción, las especies del género *Orestias* han sido estudiadas por varios autores. Tchernavin (1944), realiza una revisión general de todo el material descrito a la fecha, este autor reconoce 20 especies en total, las cuales divide en cuatro grupos según la forma del cuerpo. Posteriormente, Lynne Parenti (1984 a) realiza una revisión completa de todas las especies descritas del género a la fecha, con el foco de evidenciar las relaciones evolutivas usando caracteres morfológicos entre *Orestias* y los ciprínidos de Anatolia y el resto de la subfamilia Cyprinodontinae (Parenti, 1984 a). Parenti reconoce 43 especies, las cuales agrupa en cuatro complejos según sus similitudes morfológicas. Estos complejos los determino según los grupos previamente propuestos por Tchernavin en 1944. Parenti, reconoce al complejo *cuvieri*, y le asigna cuatro especies; al complejo *agassii* al cual le asigna 24 especies; al complejo *mulleri* con cinco especies, y al complejo *gilsoni* con diez especies (Parenti, 1984 a). Actualmente, se reconocen 46 especies del género *Orestias* (de la Barra y col., 2009; Esmaeili y col., 2018, de la Barra y col., 2020), de las cuales 22 habitan exclusivamente en el Lago Titicaca (Parenti, 1984 b; Esmaeili y col., 2018; de la Barra y col., 2020). Esquer-Garrigos y col., (2013), incorporan componentes de la genética molecular, y

proponen agrupar a las especies del género en cinco complejos, los complejos *cuvieri*, *mulleri* y *gilsoni* permanecen con el mismo número de especies, mientras que 22 de las especies del complejo *agassii* se mantienen dentro de este complejo, y otras cinco especies son asignadas a un nuevo complejo llamado *lutea* (Parker y Kornfield, 1995; Lüssen y col., 2003; Esquer-Garrigos y col., 2013; Takahashi y Moreno, 2015) (Figura 2).

De los cinco complejos del género *Orestias*, el complejo *agassii* es el más diverso, en cuanto a número de especies y tipos morfológicos (Takahashi y Moreno, 2015; Esmaeili y col., 2018; de la Barra y col., 2020). Además, es el complejo que cubre una mayor área de distribución, desde Junín, Perú, hasta el Salar de Chalviri, Bolivia. La especie tipo del complejo *agassii*, es *Orestias agassii* Valenciennes en 1846, descrita para la localidad tipo de Corocoro, Bolivia. En su descripción, conjuntamente, se señala la presencia de variantes en el lago Chincheros, Cuzco, cuenca del Urubamba. El nombre específico de *Orestias agassii*, se asigna en honor al Naturalista Jean Louis Rodolphe Agassiz (1807-1873) (Valenciennes, 1846). En cuanto a su nomenclatura, existe una confusión, y puede ser encontrada escrita como *O. agassizii*, *O. agassisii*, u *O. agassii*. Al respecto, se ha propuesto que la forma correcta de nominar a esta especie es *Orestias agassii* (Parenti, 1984 a, Cruz-Jofré y col., 2013). Desde 1942 hasta el 2013, varios autores han recolectado a *Orestias agassii* en 100 localidades, en los sistemas límnicos de la cordillera de los Andes, dentro de la cuenca del Titicaca y el valle de Cuzco (Evermann y Radcliffe, 1909; Tchernavin, 1944, Parenti, 1984 a, Parenti, 1984 b, Vila, 2006, De la Barra y col., 2009; Esquer-

Garrigos y col., 2013). En Chile, esta especie ha sido la más estudiada y emblemática, debido a que fue la primera especie de *Orestias* recolectada en el país, en la localidad del Salar de Ascotán (Eigenmann 1920; Eigenmann 1927). Posteriormente, la ictióloga Gloria Arratia (1981) recolectó muestras de *Orestias* en el Río Lauca, Bofedal de Parinacota, Salar de Ascotán y Lago Chungará y las reconoció como *O. agassii* (Arratia 1981). La distribución *O. agassii* fue reevaluada y *O. agassii* del río Lauca fue descrita como *O. laucaensis* (Arratia 1982), las del Bofedal de Parinacota como *O. parinacotensis* (Arratia 1982), a las del Salar de Ascotán como *O. ascotanensis* (Parenti 1984 a), y a las del Lago Chungará como *O. chungarensis* (Pinto y Vila, 1986). Actualmente, en Chile existen siete especies de *Orestias*, 1) *O. ascotanensis*, descrita para el Salar de Ascotán; 2) *O. gloriae*, descrita para el Salar de Carcote; 3) *O. chungarensis*, descrita para el lago Chungará 4) *O. laucaensis*, descrita para el río Lauca, Laguna de Cotacotani y Misituni; 5) *O. parinacotensis*, descrita para el Bofedal de Parinacota 6) *O. piacotensis* descritas para la laguna Piacota, todas descritas para localidades dentro del Parque Nacional Lauca; y 7) *O. agassii*, descrita para el Río Isluga, Río Collacagua y el Salar del Huasco (Vila y col., 1999). En general, éstas habitan las lagunas del norte de Chile en las Regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta (Esmaeili y col., 2018; de la Barra y col., 2020), y han sido asignadas morfológicamente al complejo *agassii* (Vila y col., 2010; Takahashi y Moreno, 2015). Las relaciones evolutivas de las especies del complejo *agassii* de Chile han sido estudiadas mediante los marcadores mitocondriales región control, *nd2* y *cytb* (Vila y col., 2013). Estos resultados

sugieren que las poblaciones asignadas a *O. agassii* son polifiléticas (Vila y col., 2013). En particular las unidades adscritas a *O. agassii* pertenecen a tres linajes independientes, un linaje para las poblaciones de *O. agassii* del Río Isluga, otro para las del Río Collacagua y otro para las poblaciones del Salar de Huasco. El linaje representado por la población del Río Collacagua, se posiciona como grupo hermano de la población del Salar de Huasco y el linaje de la población del Río Isluga se posiciona como grupo hermano de todas las *Orestias* descritas para los sistemas límnicos en Chile (Figura 3). Por otro lado, Cruz-Jofré y col. (2014) realizan una comparación morfológica entre las poblaciones de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile. Sus resultados agrupan a la población de *O. agassii* del Río Isluga con los sintipos de *O. agassii* provenientes del Lago Poopó, Sur de Bolivia. Sugiriendo que las poblaciones del Río Isluga y Lago Poopó corresponden a la misma morfo-especie, a diferencia de las poblaciones del Salar del Huasco las cuales quedan aisladas (Figura 4).

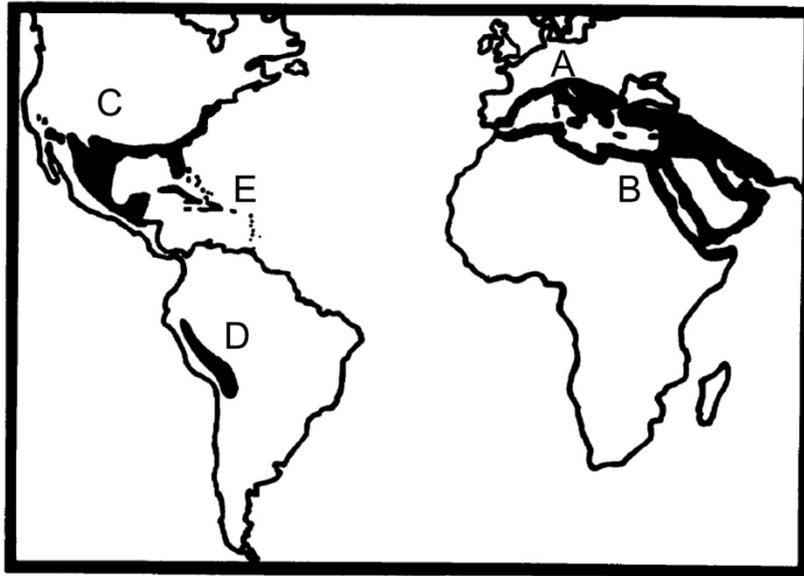


Figura 1. Distribución de la familia Cyprinodontidae. A) Eurasia; B) África; C) Norte América; D) Sudamérica; E) Caribe (extraída de Parker y Kornfield, 1995).

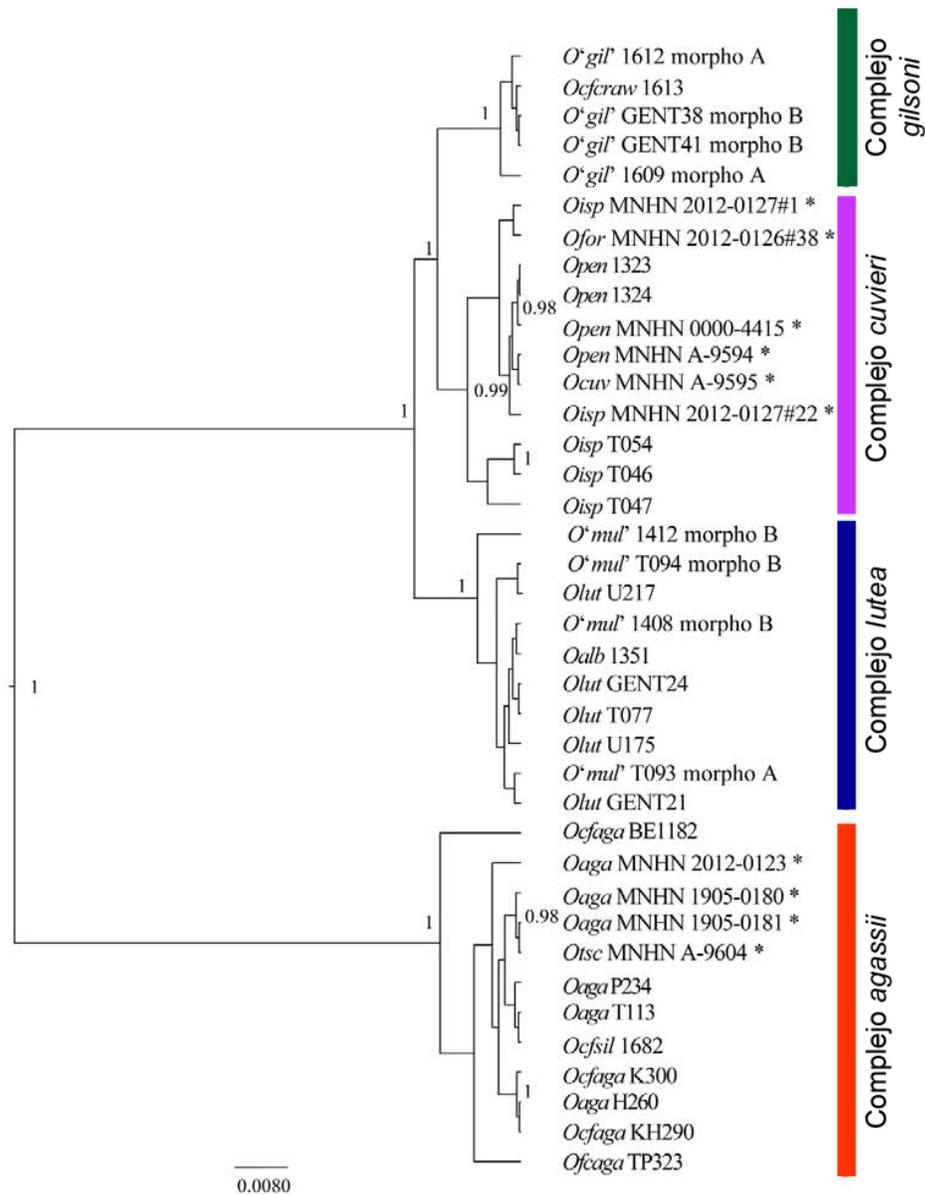


Figura 2. Filogenia molecular de los complejos del género *Orestias*. Esta filogenia incluye morfo tipos de las especies. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo. El único complejo que no se representa es el *mulleri* (extraído de Esquer-Garrigos y col., 2013).

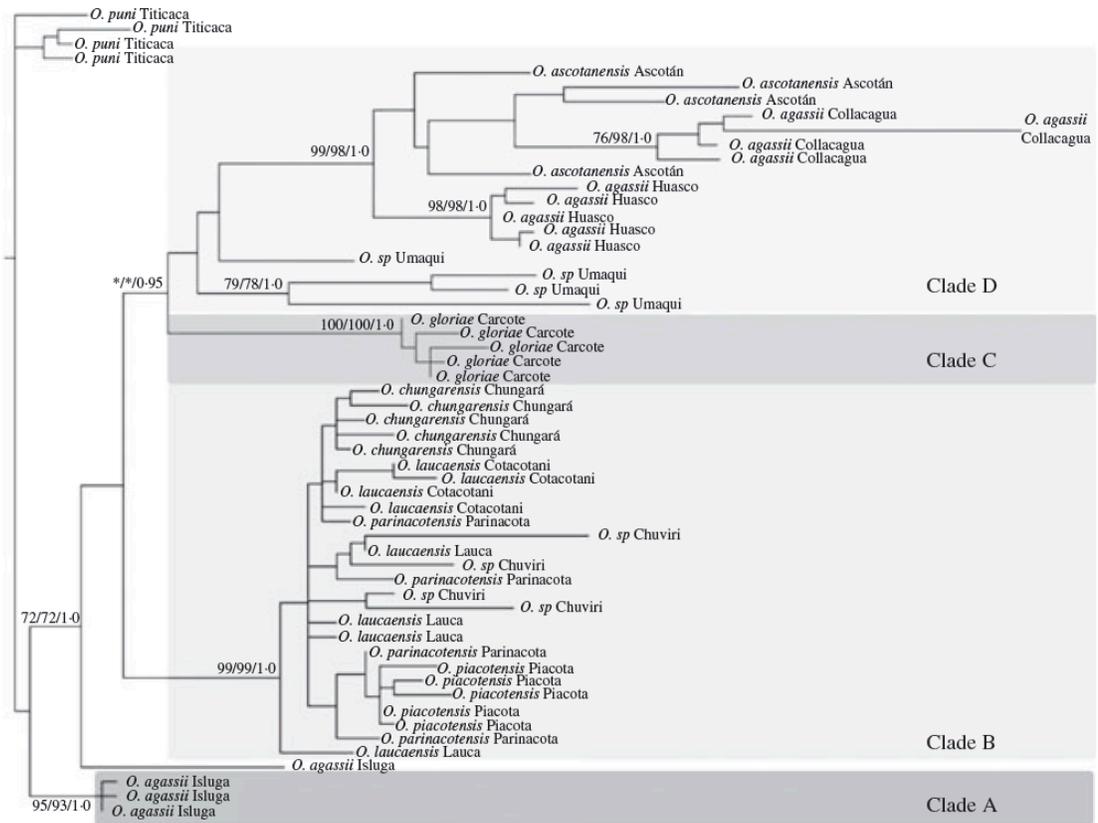


Figura 3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) con genes mitocondriales de *Orestias* en Chile. (Extraído de Vila y col., 2013).

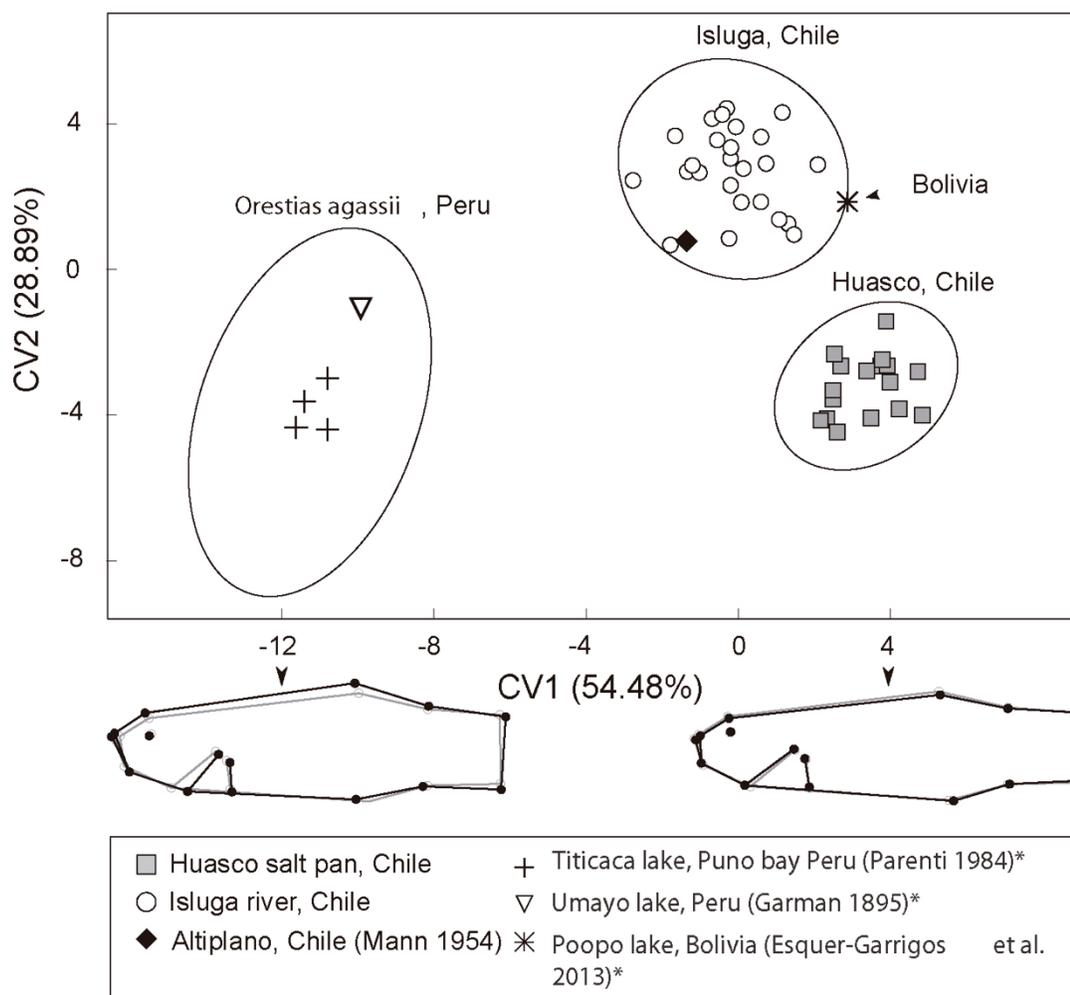


Figura 4. Análisis de variables canónicas (CVA) de la comparación entre localidades de *Orestias agassii* de Perú, Bolivia y Chile. * corresponde a los sintipos de *O. agassii* (Extraído de Cruz-Jofré y col., 2014).

La distribución del género *Orestias* es más abundante en la cuenca del Lago Titicaca (Parenti 1984 b). Esta cuenca corresponde a una meseta ubicada entre dos cordones montañosos de los Andes, entre los 14°S – 22°S (Clayton y Clapperton, 1997; Garreaud y col., 2003), se ubica entre los 3.700 a 4.600 m.s.n.m., y tiene una extensión de aproximadamente 200.000 km² (Dejoux y Iltis, 1992; Canedo y col., 2016). Los puntos más altos se encuentran en los bordes de la meseta, con una altura promedio de 4.000 m.s.n.m. y corresponden al cordón montañoso que rodea la cuenca del Titicaca, sector conocido como Puna (Montti y Henríquez, 1970; Allmendinger y col., 1997). La cuenca del Titicaca presenta un gradiente altitudinal de norte a sur, el sector norte está a mayor altura, y el sector sur a menor altura, la altura mínima se encuentra en el salar de Uyuni (Roche y col., 1992). Sin embargo, el Lago Titicaca tiene una profundidad de 285 m, y este punto sería en estricto rigor el nivel de menor altura en el Altiplano (Fornari y col., 2001). La cuenca del Titicaca se comporta como una gran cuenca endorreica. El aporte hídrico que recibe anualmente, proviene principalmente de las precipitaciones y de las reservas de hielo en las montañas (Clayton y Clapperton, 1997). Actualmente, tiene cuatro grandes cuerpos de agua, el Lago Titicaca, Lago Poopó, Salar de Coipasa y Salar de Uyuni, los cuales están interconectados por el gradiente altitudinal (Roche y col., 1992; Fornari y col., 2001). El mayor reservorio de agua y el lago más grande, es el Lago Titicaca, el lago navegable más grande de Sudamérica, el cual se divide en dos grandes lagos, lago mayor y lago menor. Cuando el nivel del agua aumenta en el lago menor y supera la altura de los 3803 m.s.n.m., el agua empieza a drenar hacia el

sur, por el río Desaguadero hacia el lago Poopó, ubicado a 3685 m.s.n.m. El lago Poopó a su vez, drena hacia el Salar de Coipasa, ubicado a 3656 m.s.n.m., a través del Río Laka jaurira. Cuando el Salar de Coipasa sobrepasa cierto nivel, el agua empieza a drenar hacia el Salar de Uyuni, ubicado a 3653 m.s.n.m. (Roche y col., 1992; Fornari y col., 2001). En el sector sur de la cuenca del lago Titicaca, el Río Grande de Lípez drena hacia el Salar de Uyuni. Este sistema de interconectividad de los grandes cuerpos de agua en la cuenca del Altiplano se denomina el sistema TPDS, por las siglas Lago Titicaca, Lago Poopó, Río Desaguadero y Salares de Coipasa y Uyuni (Figura 5) (Abaraca-del-Rio y col., 2012; Canedo y col., 2016). Adicionalmente, en la cuenca del Titicaca hay varios ríos que tienen su origen en la Puna altiplánica de Chile y drenan hacia la cuenca. Por ejemplo, el Río Isluga y Río Lauca tienen su origen en Chile y drenan hacia el Salar de Coipasa, Bolivia (Klohn, 1972). Por otro lado, en el sector de la Puna de la cuenca del Titicaca, existen pequeñas cuencas endorreicas a mayor altura (> 4.000 m.s.n.m), que han quedado aisladas debido al surgimiento de volcanes que sobrepasan los 6.000 m.s.n.m. (Montti y Henríquez, 1970). Tan solo en el territorio chileno, existen 33 cuencas endorreicas, en las cuales está presente la cuenca de Isluga, Huasco, y Lauca (Montti y Henríquez, 1970; Klohn, 1972).

En el Cuaternario (2.5 Ma), el Altiplano se vio afectado por distintos eventos climáticos, los cuales afectaron directamente el aporte hídrico a la cuenca del Titicaca. Algunos de los eventos climáticos que ocurrieron fueron la intensificación del monzón sudamericano, el incremento de la insolación durante el verano, las glaciaciones, eventos Heinrich, y fluctuaciones en el nivel del mar

(Clapperton y col., 1997; Baker y col., 2001; Rowe y col., 2002). Durante este periodo hay registros de eventos climáticos asociados a altas y bajas precipitaciones (Baker y col., 2001; Fornari y col., 2001). Durante los periodos con altas precipitaciones y altos niveles de insolación, se han registrado grandes deposiciones lacustres (Minchin, 1882; Lavenu 1992; Clayton y Clapperton, 1997). El registro lacustre más reciente es el del paleólago Coipasa, el cual estuvo presente hace 12 – 14 mil años atrás. Luego, hay registros del paleólago Tauca, el cual estuvo presente hace 12 – 18 mil años atrás, con una extensión de 60.000 km², y una altura máxima de 3780 m (Baker y col., 2001; Fornari y col., 2001; Placzek y col., 2011). Los paleolagos más antiguos son el paleólago Sajsi, presente durante el periodo de 20 – 24 mil años atrás, y el Inca-Huasi presente entre los 46 – 50 mil años atrás. Luego hay un periodo de sequia durante los 50 – 80 mil años atrás, donde no hay registros de cuerpos lacustres. Después de este periodo seco, hay dos registros de periodos húmedos, uno es el del paleólago Salinas entre los 80 – 95 mil años atrás y el paleólago Ouki entre los 95 – 120 mil años atrás (Placzek y col., 2013; Placzek y col., 2011) (Figura 6). Estos paleolagos intensificaron la conexión dentro del sistema TPDS, influenciando la conexión histórica entre todos los cuerpos lacustres de la cuenca del Altiplano durante el cuaternario.

Por último, la mayor abundancia de *Orestias agassii* se encuentra en la cuenca del Titicaca. En consecuencia, su distribución actual ha sido influenciada por la topología de esta cuenca, por su gradiente altitudinal, por su aislamiento, la conectividad entre los cuatro grandes cuerpos hídricos (sistema TPDS) y su

historia geológica más reciente en el cuaternario. Considerando estos hechos, las poblaciones de *Orestias agassii* que se encuentran a menor altura se mantendrían conectadas por el pendiente altitudinal de la cuenca y el sistema TPDS. La interrogante que surgen, es sobre la conectividad entre las poblaciones que se encuentran en el borde de la cuenca, a mayor altura, en comparación a las poblaciones que se encuentran a menor altura.

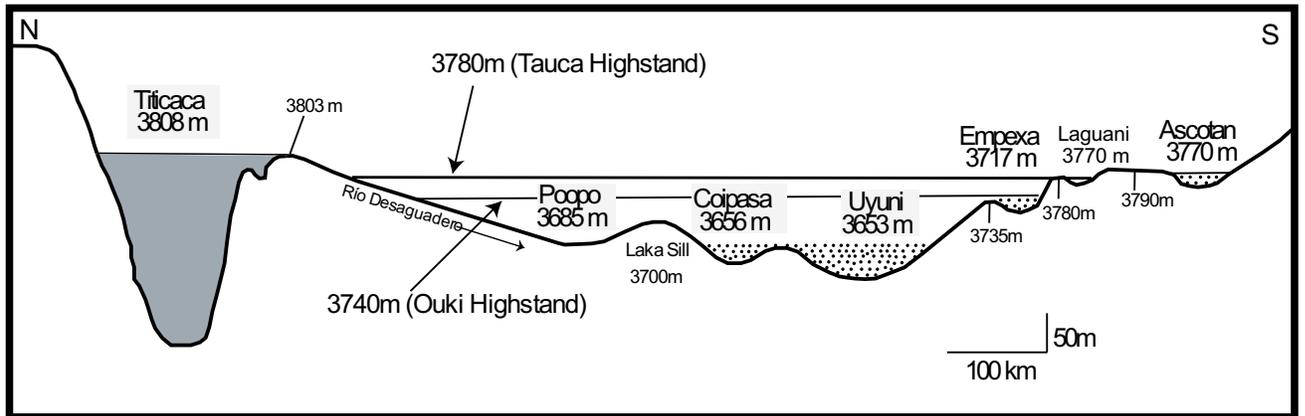


Figura 5. Perfil longitudinal de la cuenca endorreica del Altiplano. Se observan las principales características del altiplano, a) la altura de los cuerpos de agua, b) el gradiente altitudinal, y c) la altura de los paleólago de mayor extensión (extraída de Placzek y col., 2006).

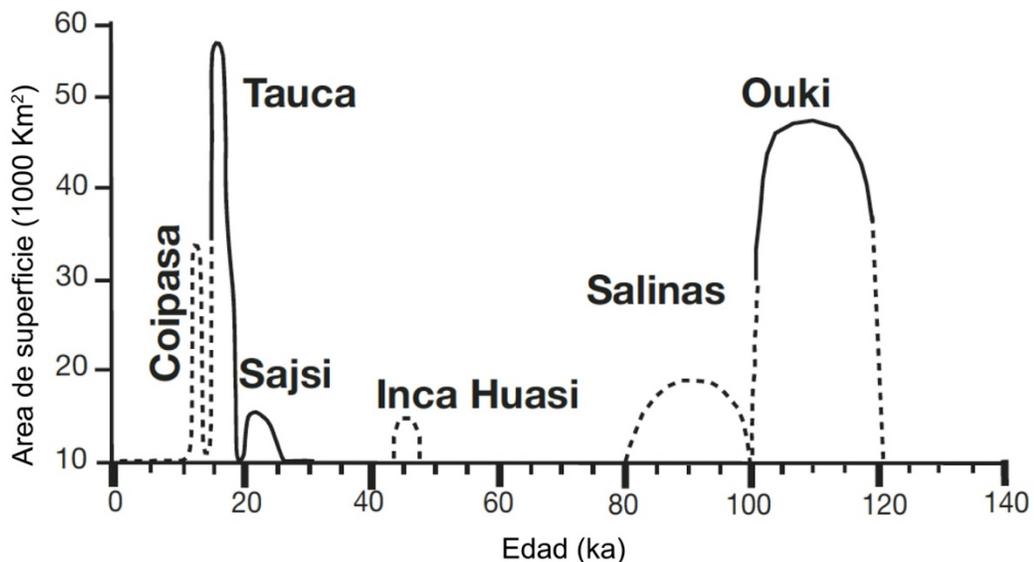


Figura 6. Reconstrucción histórica de los paleo lagos según los depósitos en las paleo costas. Se observa que el paleólago Tauca fue el más extenso y más reciente, mientras el paleólago Ouki fue el más extenso, pero más antiguo (extraída de Placzek y col., 2006).

Antecedentes e Hipótesis

Antecedentes:

- 1) Vila y col. (2013) sugieren que la población de *Orestias agassii* del Río Isluga es un linaje independiente y grupo hermano de las especies de *Orestias* descritas para Chile;
- 2) Cruz-Jofré y col. (2014) agrupan morfológicamente a la población del Río Isluga con poblaciones de Bolivia;
- 3) Abaraca-del-Río y col. (2012) y Canedo y col. (2016) sugieren una conexión hídrica historia y actual entre los cuatro grandes lagos de la cuenca del Titicaca nominado TPDS, y
- 4) Placzek y col. (2013) proponen la extensión más actualizada del paleólago Tauca hace 12-14 mil años atrás, la cual incluye la desembocadura del río Isluga, en el Salar de Coipasa.

Se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis: Las poblaciones de *Orestias agassii* presentes en Perú, Bolivia y Chile, presentan un patrón de conexión mediado por la conexión hídrica actual e histórica.

Predicción 1: Las poblaciones presentes en Perú tienen una divergencia genética con las poblaciones de la cuenca del Titicaca, debido a su lejanía y nula conexión hídrica.

Predicción 2: Las poblaciones de *Orestias agassii* dentro de la cuenca del Titicaca no presentan una estructuración genético-poblacional, ya que su conectividad hídrica es facilitada por el sistema TPDS.

Predicción 3: Las poblaciones de *Orestias agassii* de del Río Isluga tienen un ancestro común más reciente con las poblaciones de Bolivia.

Predicción 4: El tiempo de divergencia de las poblaciones de *Orestias agassii* de altura (mayor a los 3800 m.s.n.m.) se correlaciona con la fecha estimada del paleolago Tauca.

Predicción 5: Las poblaciones de *Orestias agassii* influenciadas por el sistema TPDS comparten haplotipos asociados a la extensión del paleólago Tauca, los cuales estarán ausentes en poblaciones de altura (arriba de 3800 m.s.n.m.).

Objetivos

Objetivo general

Elucidar la historia evolutiva de las poblaciones de *Orestias agassii* de Perú, Bolivia y Chile.

Objetivos específico

- Inferir las relaciones evolutivas entre las poblaciones de *Orestias agassii* de Perú, Bolivia y Chile.
- Determinar la influencia de los paleólagos en la distribución actual de *Orestias agassii*.
- Caracterizar los patrones de divergencia genética de las poblaciones de *Orestias agassii*.

Materiales y Métodos

Muestreo

Se recolectaron entre 1 a 10 ejemplares de *Orestias* spp. en 48 localidades donde la especie *O. agassii* ha sido previamente descrita, principalmente por los autores Eigenmann y Allen (1942), Tchernavin (1944), Parenti (1984 a), Vila y col. (1999), De la Barra y col. (2009) y Esquer-Garrigos y col. (2013) (Tabla 1, Figura 7). Adicionalmente, se recolectaron 30 ejemplares en toda la extensión del Río Isluga. Los muestreos fueron realizados durante los meses de octubre-noviembre, durante los años 2014-2018. Todos los ejemplares fueron capturados con una malla de pescar, individualizados y posteriormente fijados en alcohol para análisis. A cada ejemplar se les extrajo la aleta pectoral derecha para los análisis moleculares.

Tabla 1. Localidades muestreadas de *Orestias agassii* distribuidas en Perú (PE), Bolivia (BO) y Chile (CL).

Localidad	País	Latitud	Longitud	Altura (m)	Eigenmann y Allen, 1942	Tchernavin, 1944	Parenti, 1984 a	Vila, 2006	De la Barra y col., 2009	Esquer-Garrigos y col., 2013
Carabuco	BO	15°45'S	69° 4'W	3828						
Laka Jahuira	BO	19° 4'S	67°20'W	3703					X	
Santiago de Huata	BO	15°57'S	68°44'W	3827						
Lago Uru-Uru	BO	18° 1'S	67° 8'W	3710					X	X
Lauca	BO	18°35'S	68°58'W	3868					X	X
Avaroa	BO	18°52'S	67°28'W	3722						
Río Desaguadero	BO	17°40'S	67°29'W	3728			X		X	
Chalviri	BO	22°33'S	67°39'W	4409						X
Empexa	BO	20°31'S	68°26'W	3781					X	X
Hichukhota	BO	16°10'S	68°22'W	4335						X
Huatajata	BO	16°12'S	68°41'W	3826			X			X
Sajama	BO	18°13'S	68°56'W	4143					X	
Macaya	BO	18°32'S	68°57'W	3855						X
Villamar Mallcu	BO	21°45'S	67°28'W	4013					X	

Poopó	BO	18°52'S	67° 5'W	3673		X	X		X	X
Opaqueri	BO	18°32'S	67°54'W	3767						X
Río Chinta	BO	15°57'S	68°42'W	3828						
Río Huaycho	BO	15°39'S	69°11'W	3823						
Río Mogachi	BO	18°26'S	68°59'W	4628						X
Río Mulato	BO	19°41'S	66°46'W	3820	X		X		X	
Río Pichu-Pichu	BO	17°20'S	67°54'W	3754						
Río Suches	BO	15°38'S	69° 4'W	3828						X
Sol de Mañana	BO	22° 7'S	67°16'W	4187						X
Taquiri	BO	16°17'S	68°48'W	3819						X
Taraco	BO	16°25'S	68°46'W	3815						
Tiquina	BO	16°13'S	68°50'W	3843						
Puno	BO	15°50'S	69°57'W	3791	X	X	X			X
Alota	BO	21°24'S	67°37'W	3834					X	X
Arabilla	CL	19°13'S	68°50'W	3973						
Cariquima	CL	19°27'S	68°38'W	3761						
Cotaculco	CL	19°38'S	68°45'W	4265						
Chaguane	CL	19°14'S	69° 0'W	4153						
Río Collacagua	CL	20° 8'S	68°50'W	3932				X		X
Enquelga	CL	19°13'S	68°49'W	3931						
Salar del Huasco	CL	20°15'S	68°52'W	3803				X		X
Isluga	CL	19°15'S	68°42'W	3742				X		X
Lupihuala	CL	19°19'S	69° 4'W	3878						
Muco Mucone	CL	19° 2'S	68°55'W	4280						

Escapiña	CL	19°10'S	68°55'W	4149						
Río Todos los Santos	CL	19° 6'S	68°54'W	4234						
Taipicollo	CL	19°12'S	68°52'W	4018						
Tambo Cancosa	CL	19°51'S	68°35'W	3890						
Toroni	CL	19°30'S	68°42'W	3841						
Canal Callanas	PE	13°20'S	72° 7'W	3378						
Callacami	PE	16°35'S	69°21'W	3878						
Rio Juli	PE	16°14'S	69°28'W	3875	x		x			
Lago Huaypo	PE	13°23'S	72° 7'W	3531	x		x			
Oropesa	PE	13°35'S	71°46'W	3066						
Tambo Real	PE	13°28'S	72°14'W	3330						

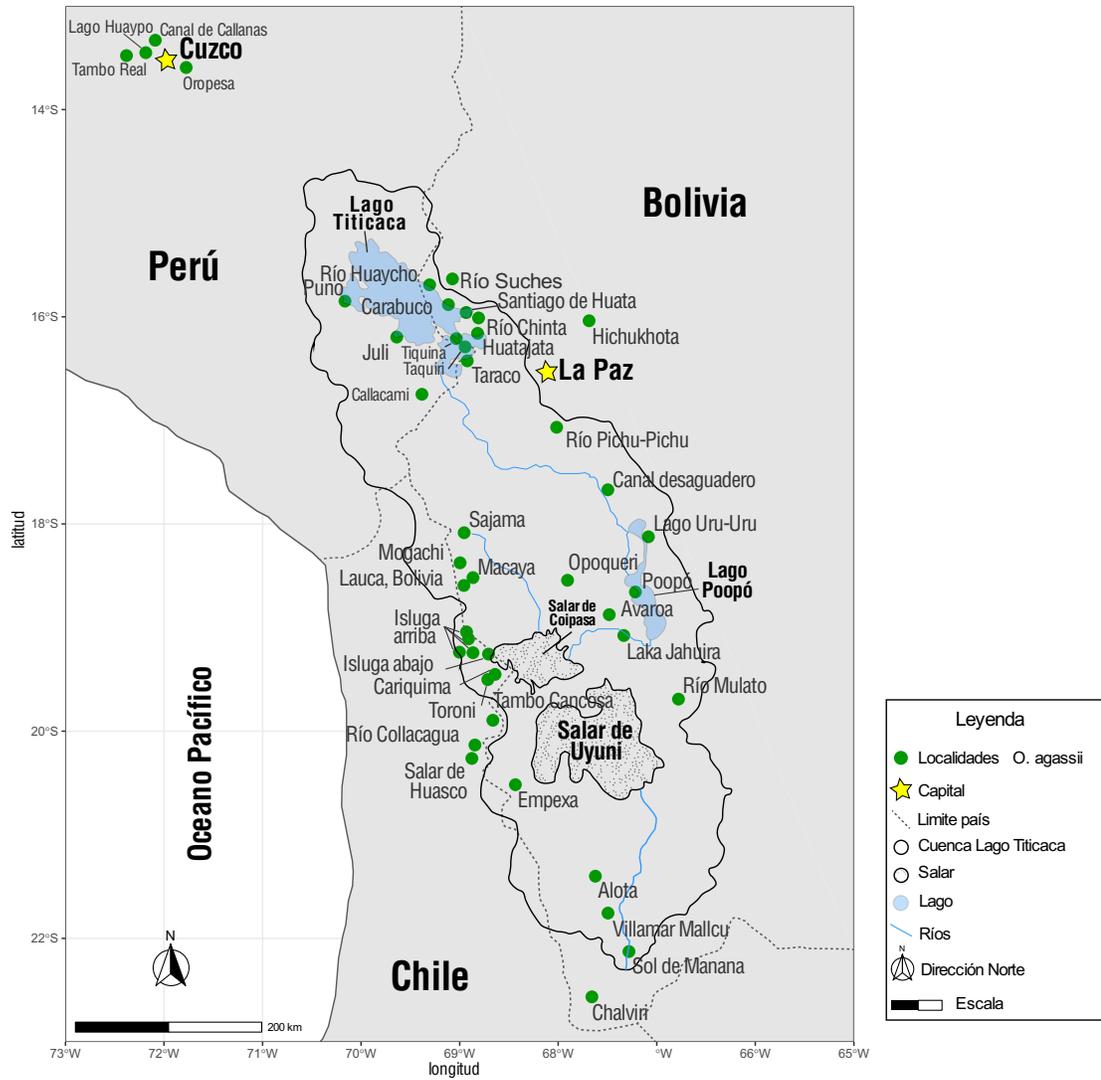


Figura 7. Mapa de las localidades muestreadas de *Orestias agassii* distribuidas en Perú, Bolivia y Chile.

Extracción, amplificación y edición de secuencias de DNA

La extracción de DNA se realizó desde la aleta pectoral de cada ejemplar, mediante el método de salting-out (Modificado de Jowett, 1986). La verificación de la extracción de DNA se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y la cuantificación en un equipo de espectrofotometría NanoDrop™ Lite (ThermoFisher Scientific). Todo el DNA purificado fue diluido a una concentración de 10 ng/μl para futuros análisis genéticos. Posteriormente, se realizó la amplificación de los genes mitocondriales *región control (dloop)* y *citocromo b (cytb)* (Vila y col., 2013), y el gen nuclear *glycosyltransferase (glyt)* (Pohl y col., 2015) (Tabla 2) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La solución para la PCR fue preparada con un volumen final de 30 μl, con 1X PCR *buffer* (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μM de cada partidor *forward* y *reverse*, 0.3 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen™), y 15 ng DNA templado para cada partidor. Las condiciones del termociclador consistieron de una temperatura inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, la temperatura de annealing de cada partidor (Tabla 2) por 30 seg, y 72°C por 45 seg, con una etapa de extensión final a 72°C por 10 min. La amplificación de cada muestra se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con un buffer de carga con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Los productos amplificados fueron enviados a Macrogen Inc. (dna.macrogen.com/) para ser purificados y secuenciados por un secuenciador automático ABI3730x1. Las secuencias

fueron editadas y alineadas utilizando la opción ClustalW en Geneious® 10.2.6 (<https://www.geneious.com>).

Tabla 2. Marcadores moleculares utilizados.

Marcador	Gen	Nombre partidor	Ta	Referencia
Mitocondrial (mtDNA)	<i>Dloop</i>	DloopF	60°C	Morales y col., 2011
		DloopR		
	<i>Cytb</i>	L14724	54°C	Xiao y col., 2001
		H15915		
Nuclear (ncDNA)	<i>Glyt</i>	GlytF577	54°C	Pohl y col., 2015
		GlytR1562		

Adicionalmente, se realizó la amplificación de ocho marcadores microsatélites, bajo las condiciones descritas por Esquer-Garrigos y col. (2011). El marcaje de los microsatélites se realizó con una cola M13 conectada a un fluoróforo (PET, FAM, NED, VIC), siguiendo el método descrito por Schuelke (2000). La solución para la PCR fue preparada con un volumen final de 15 µl, con 1X PCR *buffer* (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM del partidor *reverse*, 0.05 µM del partidor *forward* y 0.13 µM de la cola M13 con un fluoróforo, 0.3 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen™), y 15 ng DNA templado para cada partidor. Las condiciones del termociclador consistieron de una temperatura inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 seg, la temperatura de annealing de cada partidor (Esquer-Garrigos y col, 2011) por 30 seg, 72°C por 45 seg, con una segunda etapa de 8 ciclos de 94°C por 30

seg, la temperatura de annealing de la cola M13 (53°C) por 30 seg, 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 10 min (Schuelke, 2000). Se verificó la amplificación de cada muestra mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con un buffer de carga con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Los productos amplificados fueron enviados al Centro de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile para ser genotipificados y analizados en un ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* usando GeneScan500 LIZ como el tamaño estándar de muestra (Applied Biosystems). Para la lectura y detección de los microsatélites, se utilizó el programa Geneious v6.1.8 software (<https://www.geneious.com>). La matriz de datos obtenida se analizó en el programa MicroChecker v2.2.3 (van Oosterhout y col., 2004) para identificar potenciales errores en la lectura y detección de los microsatélites.

Análisis filogenéticos

Para inferir las relaciones filogenéticas entre los ejemplares de *Orestias* spp., se incluyeron secuencias de *Orestias ispi*, especie perteneciente al complejo *cuvieri*, como primer outgroup, y secuencias de *O. lutea*, especie perteneciente al complejo *lutea*, como segundo outgroup. Estas secuencias fueron analizadas mediante el método de Máxima Parsimonia (MP) con el programa PAUP* versión 4.0a (Swofford, 2002), el método de Máxima Verosimilitud (ML) con el programa IQ-Tree 1.6.12 (Nguyen y col., 2015) y Análisis de Inferencia Bayesiana (BI) con el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist y col., 2012). Para la reconstrucción de MP se excluyeron los caracteres no informativos, se asignó a *O. ispi* como outgroup y se realizó una búsqueda heurística con un límite de 100 árboles, considerando

a los caracteres como no ordenados y de igual peso. Se utilizó un algoritmo de bisección y reconexión del árbol (Tree – Bisection – Reconnection, TBR), con un límite de ocho. Adicionalmente, los valores de soporte de nodo fueron obtenidos mediante un análisis de bootstrap con 1000 replicas en PAUP*. Para el análisis de ML, se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídicas mediante el Criterio de Información Bayesiano (BIC), obtenido por ModelFinder (Kalyaanamoorthy y col., 2017) y los valores de soporte de nodo fueron obtenidos mediante un análisis de ultrafast bootstrap (Hoang y col., 2018) con 1000 replicas en IQ-Tree 1.6.12. Para el análisis de BI se estimó el mejor modelo de sustitución nucleotídicas en el programa JModelTest2 (Darriba y col., 2012) y se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídicas mediante el Criterio de Información Bayesiano (BIC). La temperatura de las cuatro cadenas generadas se estableció en 0.20 y con un burn-in del 25%. Además, para el análisis de BI se corroboró que cada una de las corridas hayan alcanzado la convergencia comprobando que los valores del Tamaño de Muestra Estimado (*Estimated Sample Size, ESS*) fueran superiores a 100, que la temperatura de Factor Potencial de Reducción Escalado (*Potential Scale Reduction Factor, PSRF*) se aproximen a 1,00, y que la desviación estándar de las biparticiones de taxa informativos se aproximará a cero. Adicionalmente, la convergencia de las corridas independientes fue corroborada en el programa Tracer V1.7.1 (Rambaut y col., 2018). Este procedimiento fue realizado para cada uno de los marcadores (*dloop, cytb* y *glyt*) individualmente y además con la concatenación de *dloop-cytb* y *dloop-cytb-glyt*.

Para el análisis concatenado (*dloop-cytb* y *dloop-cytb-glyt*), se realizó una prueba de Partition Homogeneity (ILD) en PAUP*, con 1000 replicas, realizando una búsqueda heurística y con un máximo de 100 árboles. Luego, se realizó un test de saturación en el programa DAMBE v6.4.48 (Xia, 2013). En DAMBE, se estimó la proporción de sitios invariantes y con el valor entregado, se calculó la saturación de sustituciones (*index of substitution saturation*, ISS) (Xia y col., 2003; Xia 2013). Esta prueba evalúa el nivel de homoplasia debida a múltiples sustituciones, el cual asume un índice crítico de saturación de sustitución (*critical index of substitution saturation*, ISSc) que define un umbral en el cual las saturaciones son altas en el set de datos e indica que el gen no es apto para análisis filogenéticos. Adicionalmente, para el análisis de BI se utilizó el programa PartitionFinder2 (Lanfear y col., 2017), para seleccionar el mejor modelo de partición utilizando el algoritmo *greedy* (Lanfear y col., 2012), bajo el programa PhyML 3.0 (Guindon y col., 2010), y el mejor modelo de sustitución nucleotídicas bajo el criterio de Información Bayesiano (BIC) para las matrices de los genes concatenados.

Tiempo de divergencia

La estimación del tiempo de divergencia se realizó mediante el método de inferencia bayesiana implementada en el programa BEAST2 v2.6.1. (Bouckaert y col., 2014). Se realizó el análisis con el gen *cytb* y se estimó el mejor modelo de sustitución mediante la herramienta bModelTest (Bouckaert y Drummond, 2017). La calibración se basó en la tasa de divergencia del gen mitocondrial *cytb* de 1% por millones de años, ampliamente aplicada en peces de agua dulce

(Pérez y col., 2007). Se utilizó el método de reloj molecular estricto y el modelo de Yule como árbol prior. Para la estimación se realizaron 2 corridas independientes de 100 millones de generaciones, muestreando cada 10.000 generaciones. El árbol final fue visualizado en FigTree v1.4.4. El alineamiento utilizado para este análisis además de incluir todo lo descrito con *O. agassii*, incluye secuencias de las otras seis especies del género *Orestias* descritas en Chile, *O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. gloriae*, *O. piacotensis* y *O. ascotanensis* las cuales fueron obtenidas desde genbank (Vila y col., 2013). Adicionalmente el outgroup fue excluido de este análisis, debido al grado de diferencia entre el ingroup y outgrupo.

Diversidad genética y red de haplotipos

Con la finalidad de estudiar la conexión histórica de las poblaciones de *O. agassii* muestreadas en la cuenca del Urubamba y Cuencas de Titicaca, se realizó un análisis de diversidad genética con 495 secuencias *dloop* y 259 secuencias *cytb*. La diversidad genética de cada gen fue caracterizada calculando los siguientes índices de diversidad genética: i) Número de sitios polimórficos (S); ii) Número de haplotipos (K); iii) Diversidad haplotípica (H); y iv) Promedio de diferencias por par de secuencias (Π), en el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). Luego se realizó una red de haplotipos con cada gen, estimada con el método de median-joining network usando el programa PopART (Leigh y Bryant, 2014).

Para estudiar la conexión histórica de las poblaciones de *O. agassii* de menor altura e influenciadas por el paleolago Tauca, se seleccionaron únicamente los

individuos del grupo TPDS y se estimó los índices de diversidad y una red de haplotipos siguiendo los mismos pasos previamente descritos.

Análisis de estructuración poblacional

Se utilizaron únicamente los ejemplares pertenecientes al grupo TPDS para realizar el análisis de estructuración poblacional con el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard y col., 2000). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: 103 individuos, 8 loci, K 1-15, 1000 Burn-in period y 1000 reps. Este análisis se repitió 3 veces y los resultados fueron sometidos al método de Evanno para determinar el número poblacional más probable (Evanno y col., 2005; Earl y Vonholdt 2012). El grafico final fue hecho en el programa STRUCTUREPLOT v2.0 versión online (<http://omicsspeaks.com/strplot2/>) (Ramasamy y col., 2014).

Resultados

Secuencias

La extracción, amplificación y secuenciación fue exitosa para la mayoría de los individuos recolectados en este estudio. Solamente cinco individuos de las localidades de Khancoyo y Río Mulato presentaron *indels* para el gen *dloop*, los cuales fueron excluidos de todo análisis.

Se obtuvieron un total de 495 secuencias del gen *dloop*, con una extensión de 957 pb y una composición nucleotídicas de 29% Adenina, 22% Citosina, 16% Guanina y 33% Tiamina. Un total de 259 secuencias del gen *cytb*, con una extensión de 1121 pb y una composición nucleotídicas de 24% Adenina, 28% Citosina, 16% Guanina y 32% Tiamina. Un total de 103 secuencias del gen *glyt*, con una extensión de 938 pb y una composición nucleotídicas de 32% Adenina, 23% Citosina, 23% Guanina y 22% Tiamina.

Los resultados de la prueba de Partition Homogeneity (ILD), resultaron en un árbol de 522 pasos para la partición original de los datos, para un total de 1000 replicas. El valor de P fue de 0.995 ($P > 0.05$), lo que sugiere que no existe una incongruencia entre los sets de datos concatenado. Adicionalmente, el análisis de saturación de sustitución realizado en DAMBE no evidencio un nivel elevado

de saturación para ninguno de los genes utilizados, indicando que los tres genes seleccionados son aptos para los análisis filogenéticos.

Construcción filogenética

El análisis de MP para los genes concatenados (*glyt-dloop-cytb*) tiene una extensión de 3019 pb y un total de 248 caracteres informativos. La búsqueda heurística retuvo 100 árboles igualmente parsimoniosos con valores de CI= 0,6469, HI=0,3531, RI=0,8728 y RC=0,5646. Lo que refleja un alto número de homoplasias presentes en la matriz. El análisis de ML para los genes concatenados entregó un único árbol con un valor de máxima verosimilitud de $\ln L = -7107.4716$. Finalmente, el análisis de MB para los genes concatenados entregó un árbol de consenso, con valores de ESS arriba de 200 y PSRF cercanos a 1. La reconstrucción filogenética de los tres análisis (MP, ML y IB) recuperó la misma topología, por lo tanto, se presenta el árbol de consenso del análisis de IB como árbol final (Figura 8). Este árbol se presenta con el largo de rama modificado en FigTree v1.4.4 para visualizar las relaciones evolutivas entre los linajes. Se detectan dos linajes principales, A y B, los cuales fueron recuperados en la reconstrucción filogenética realizada con *cytb* y *dloop-cytb* (figura 9). Por otra parte, el árbol *dloop* resultó en una gran politomía (figura 10). En el árbol final de los tres genes concatenados, el Linaje A agrupa a los individuos recolectados en las localidades dentro de la cuenca del Urubamba, Cuzco, Perú (localidades señaladas en verde) (Figura 11), mientras que el Linaje B, recupera todos los individuos recolectados dentro de la cuenca del Lago Titicaca, incluyendo la zona de la puna y la meseta.

Los análisis filogenéticos sugieren que los individuos de *Orestias agassii* recolectados dentro de la cuenca del Titicaca, pertenecen a un gran linaje, linaje B. Dentro del Linaje B, se pueden detectar sub-linajes los cuales representan poblaciones de *O. agassii*. De estos sub-linajes, se destacan algunos que están únicamente representados por individuos recolectado en una misma cuenca. Por ejemplo, los individuos recolectados en las localidades de Collacagua, Huasco y Uyuni, son sub-linajes representados por individuos recolectados únicamente en esas cuencas, que además son cuencas hidrográficas aisladas. Un caso inusual, es el caso del Río Isluga, donde los ejemplares recolectados en está localidad quedan asignados a dos sub-linajes completamente diferentes. Algunos individuos quedan agrupados al sub-linaje que se titula como “Isluga arriba” (Figura 11), el cual agrupa a los individuos recolectados a lo largo del Río Isluga, y otros quedan agrupados al sub-linaje titulado “Isluga abajo” (Figura 12), el cual agrupa a individuos recolectados en la desembocadura del Río Isluga (hacia el salar de Copiasa), Cariquima y Toroni. Este ultimo sub-linaje es el grupo hermano del sub-linaje que agrupa a todas las localidades presentes en el sistema TPDS. Los individuos recolectados en las localidades de los alrededores del Lago Titicaca quedan separados en dos sub-linajes, con una gran divergencia entre ambos. Al observar el árbol se observa el sub-linaje titulado “Lago Titicaca, sistema TPDS 1”, es el grupo hermano del sub-linaje de Collacagua, en cambio los sub-linajes “sistema TPDS 2,3,4 y 5”, son el grupo hermano del sub-linaje “Isluga abajo”.

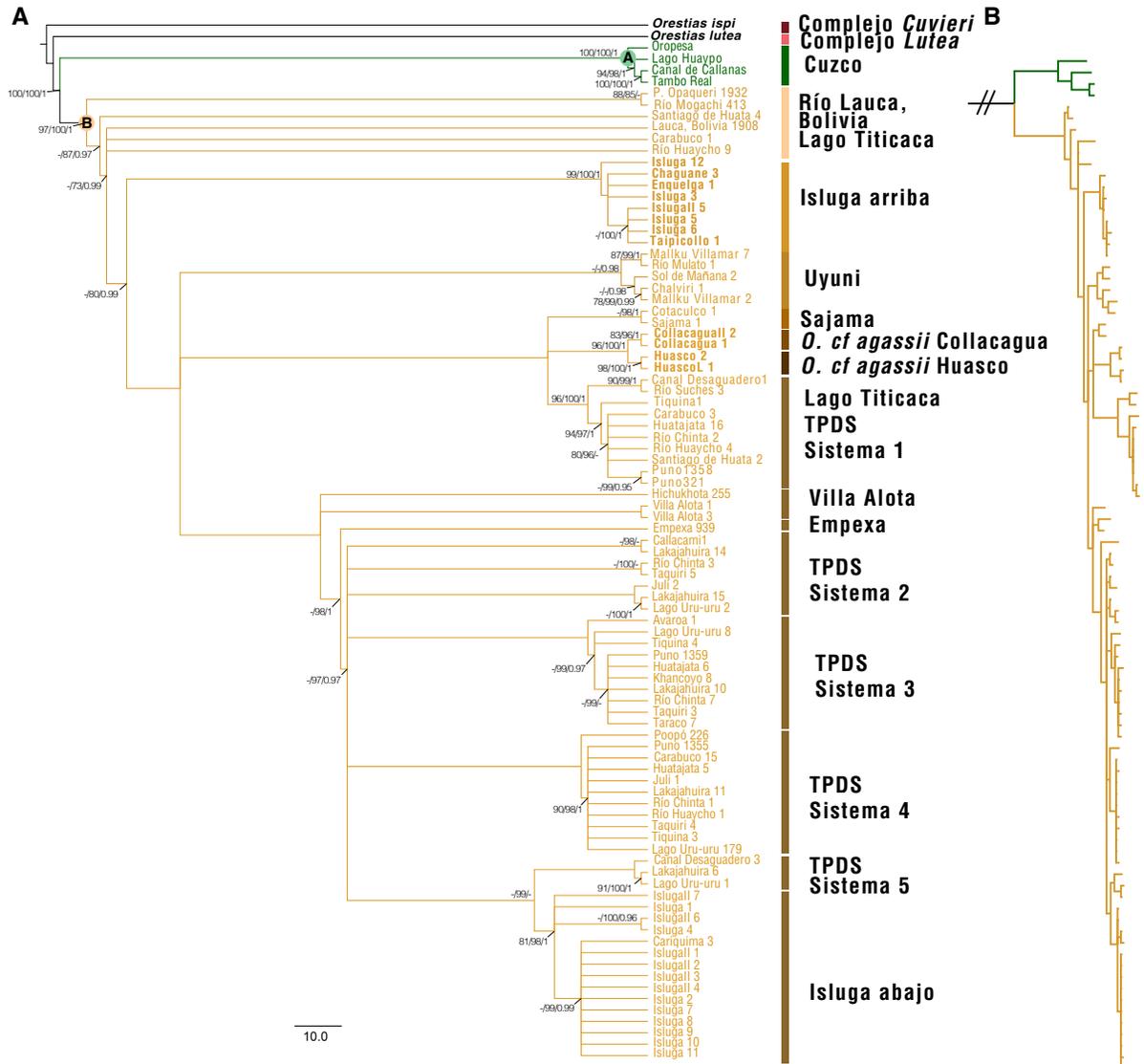


Figura 8. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop*, *cytb* y *glyt*. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha. A) Filogenia reconstruida con los genes *dloop-cytb-glyt*, con los largos de ramas modificados. B) Filogenia reconstruida con los genes *dloop-cytb-glyt*, sin el largo de rama modificado.

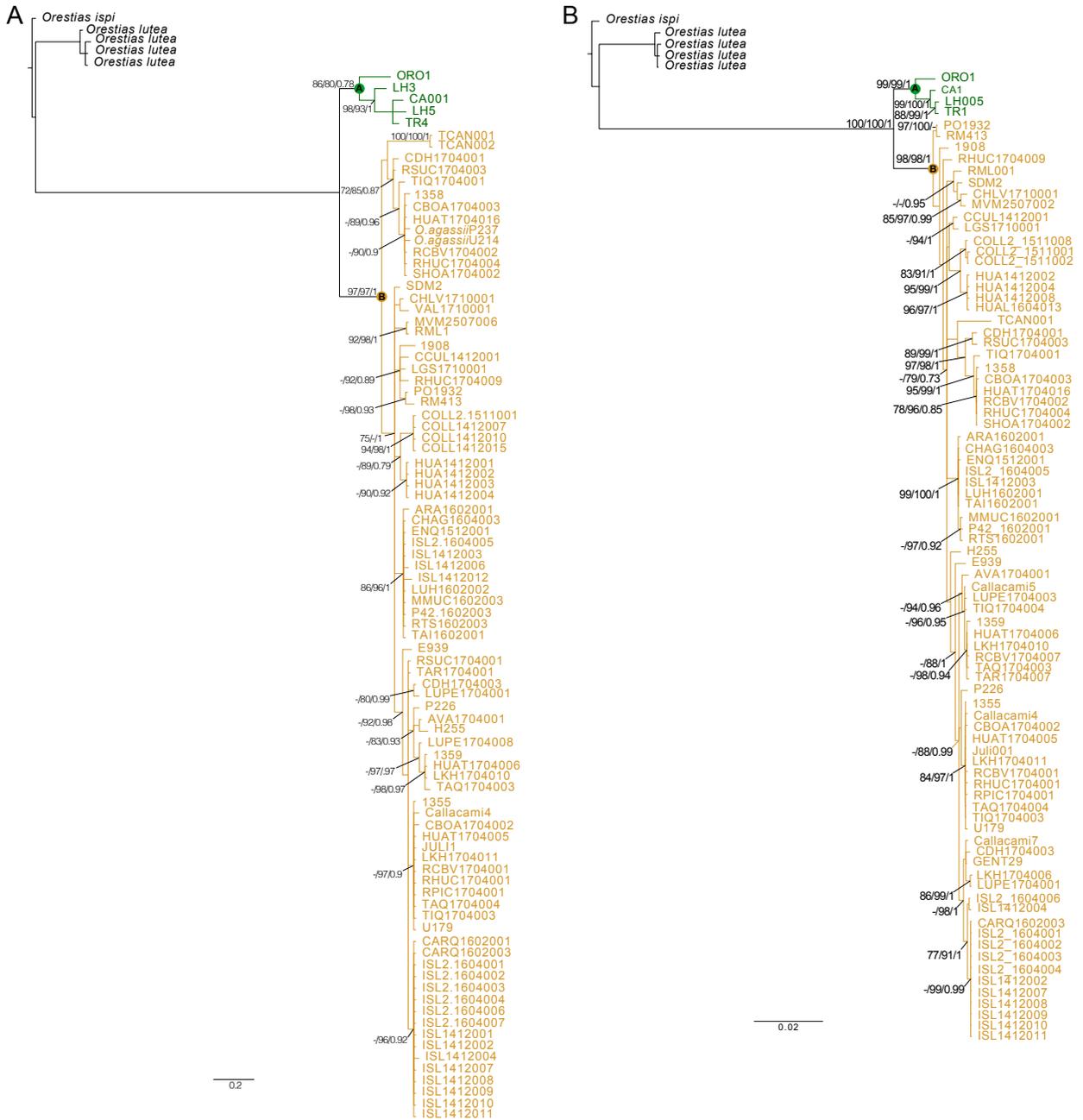


Figura 9. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha. A) árbol IB con el gen *cytb*; B) árbol IB con los genes *dloop-cytb*.

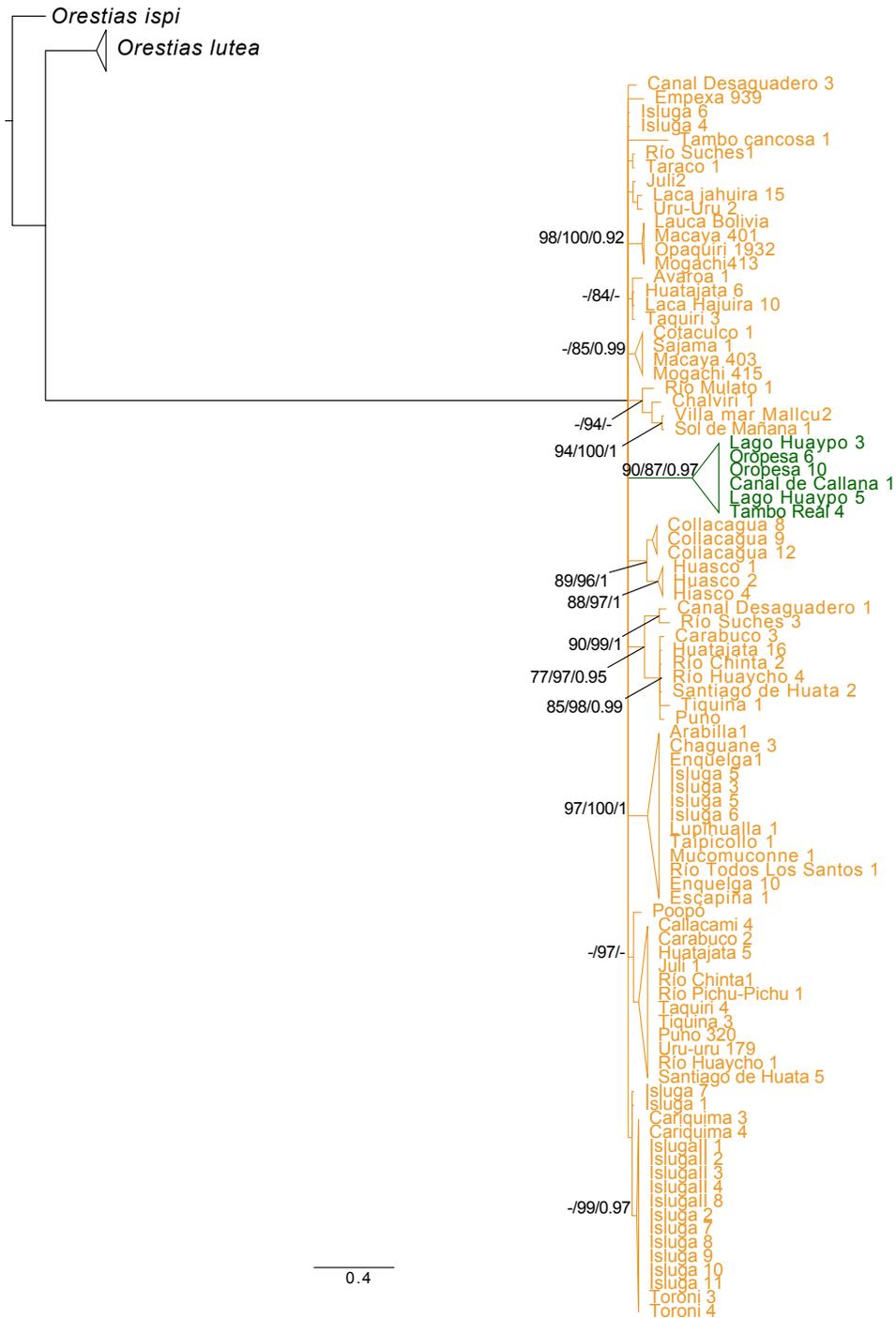


Figura 10. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con el gen *dloop*. El soporte de nodo está indicado arriba del nodo o indicado con una flecha.

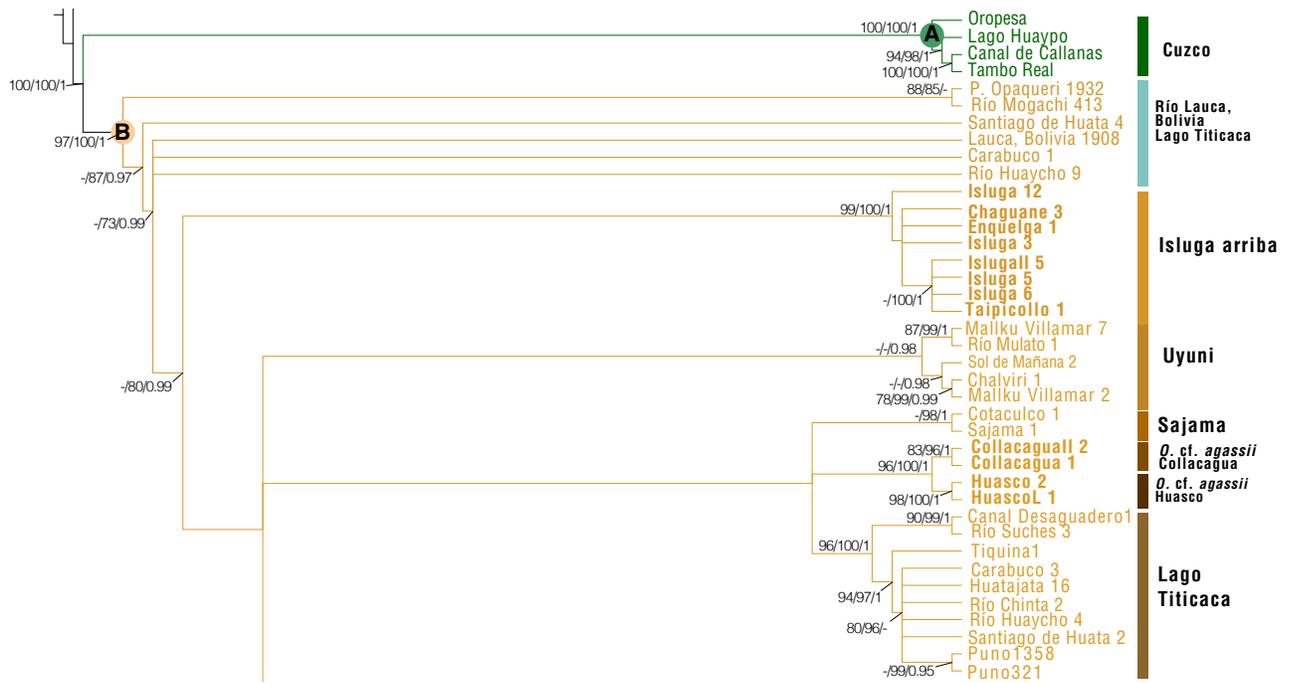


Figura 11. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop-cytb-glyt*. Linaje A corresponde a al linaje de la cuenca del Urubamba, Cuzco. Linaje B corresponde a las poblaciones del *O. agassii* de la cuenca del Titicaca.

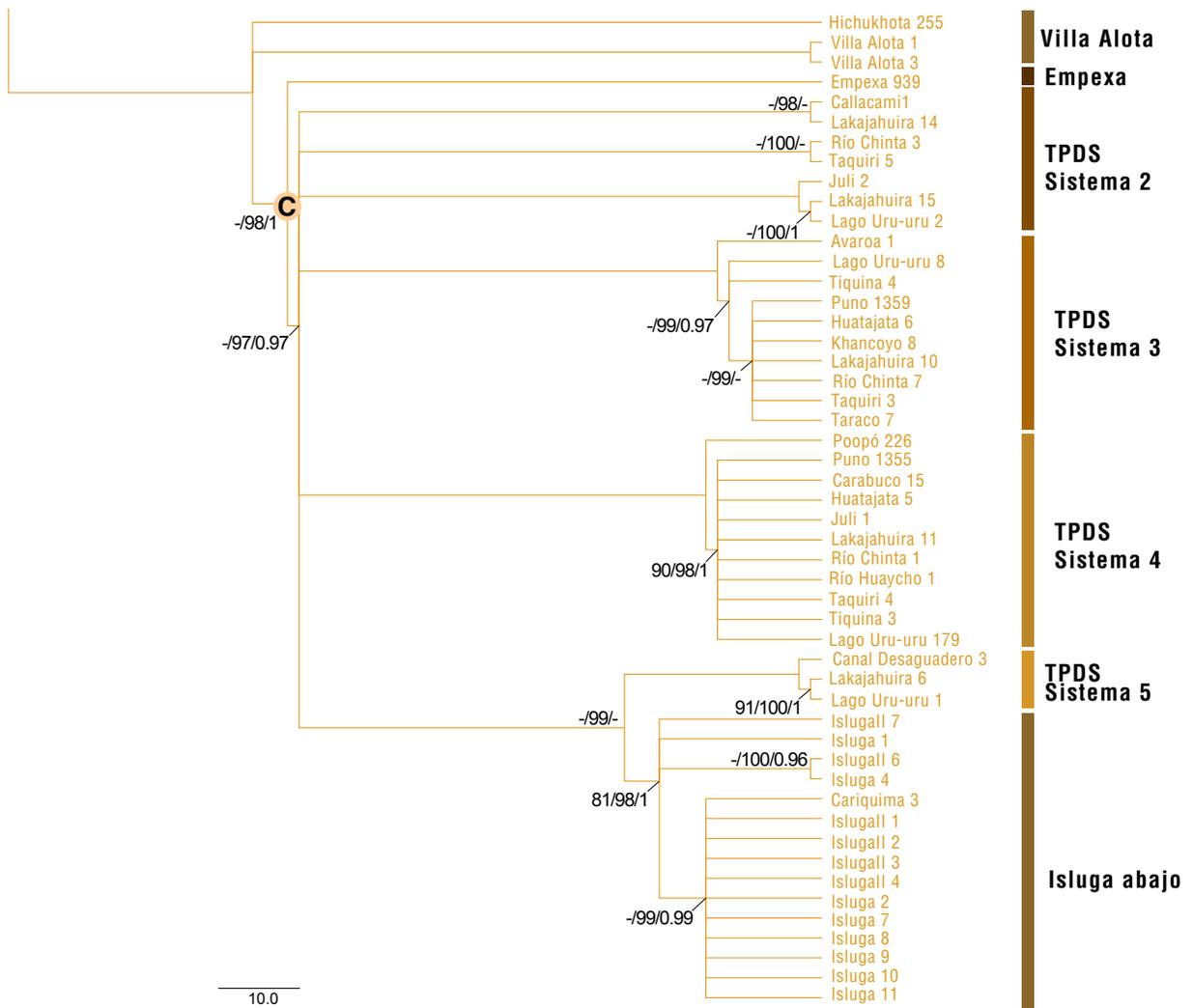


Figura 12. Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana de *Orestias agassii* descritas en Perú, Bolivia y Chile con los genes *dloop-cytb-glyt*. El sub-linaje C corresponde al “grupo TPDS” con individuos que habitan bajo los 3800 m.s.n.m.

Diversidad genética y red de haplotipos de las poblaciones de *O. agassii*

Se analizaron un total de 495 individuos con el marcador *Dloop*, 259 individuos con el marcador *cytb*, y se encontraron 114 haplotipos únicos para *dloop* y 96 haplotipos únicos para *cytb*. Los valores de la estimación de Tajima's D y Fu and Li's son menores a cero. Para el marcador *dloop*, los valores no fueron significativos sugiriendo una población estable, pero para el marcador *cytb* si fueron significativos sugiriendo una población en crecimiento (Tabla 3).

Al observar la red de haplotipos de *dloop* y *cytb* se observa que los ejemplares de la cuenca del Urubamba, Cuzco, Perú son un haplogrupo separado por varios pasos mutacionales. En este caso, los individuos de Collacagua y Huasco también forman un haplogrupo independiente, ya que su haplotipo no fue compartido por ninguna otra localidad. En Isluga, se observó el mismo resultado que con los resultados filogenéticos, hay un haplogrupo que agrupa a los haplotipos de las localidades de "Isluga arriba", y un haplogrupo que agrupa a las localidades de "Isluga abajo" los cuales están separados por varios pasos mutacionales entre si (Figura 13 y 14). Ambas redes de haplotipo indican el mismo patrón, y presentan los mismos haplogrupos.

Adicionalmente, una de las interrogaste de está tesis es evaluar como afecta la altura a la cual están ubicadas estas localidades y la conectividad hídrica actual e histórica al patrón de estructuración poblacional. Por lo tanto, se separaron las localidades dentro de la cuenca del Titicaca por rangos de altura según la extensión del paleolago Tauca, 3750 m.s.n.m. El primer criterio fue señalar las localidades que se encuentran a una altura mayor a los 3800 m.s.n.m. con

amarillo, y las localidades que se encuentran a una altura inferior a los 3800 m.s.n.m., con morado (Figura 15). Esto además fue corroborado con la altura de cada localidad (Tabla 4). Las localidades marcadas con amarillo son localidades nominadas como “Altura”, tienen en promedio una altura de 4051 m.s.n.m., y no tuvieron conexión con la extensión máxima del paleolago Tauca. Las localidades marcadas con morado son localidades nominadas “TPDS”, tienen una altura promedio de 3768 m.s.n.m., y si tuvieron una conexión con el paleolago Tauca. La mayoría de las localidades del lago Titicaca están señaladas en negro y señalando localidades donde puedes encontrar individuos que pertenecen al haplogrupo de “altura” y al haplogrupo “TPDS”. Estos criterios fueron utilizados para hacer la agrupación de los individuos en una nueva red de haplotipos (Figura 16), donde se observan haplotipos de altura, haplotipos del grupo TPDS y los haplotipos mixtos presentes en el Lago Titicaca y en el Río Isluga.

Tabla 3. Índices de diversidad genética

	s	k	H	Π	Tajima's D	Fu and Li's
<i>Dloop</i> completo	85	114	0.9562	11.709	-0.47578	0.42539
<i>Cytb</i> completo	132	96	0.962	8.375	-1.91151	-4.32861
<i>Dloop</i> TPDS	43	63	0.938	3.726	-1.59225	-2.7496

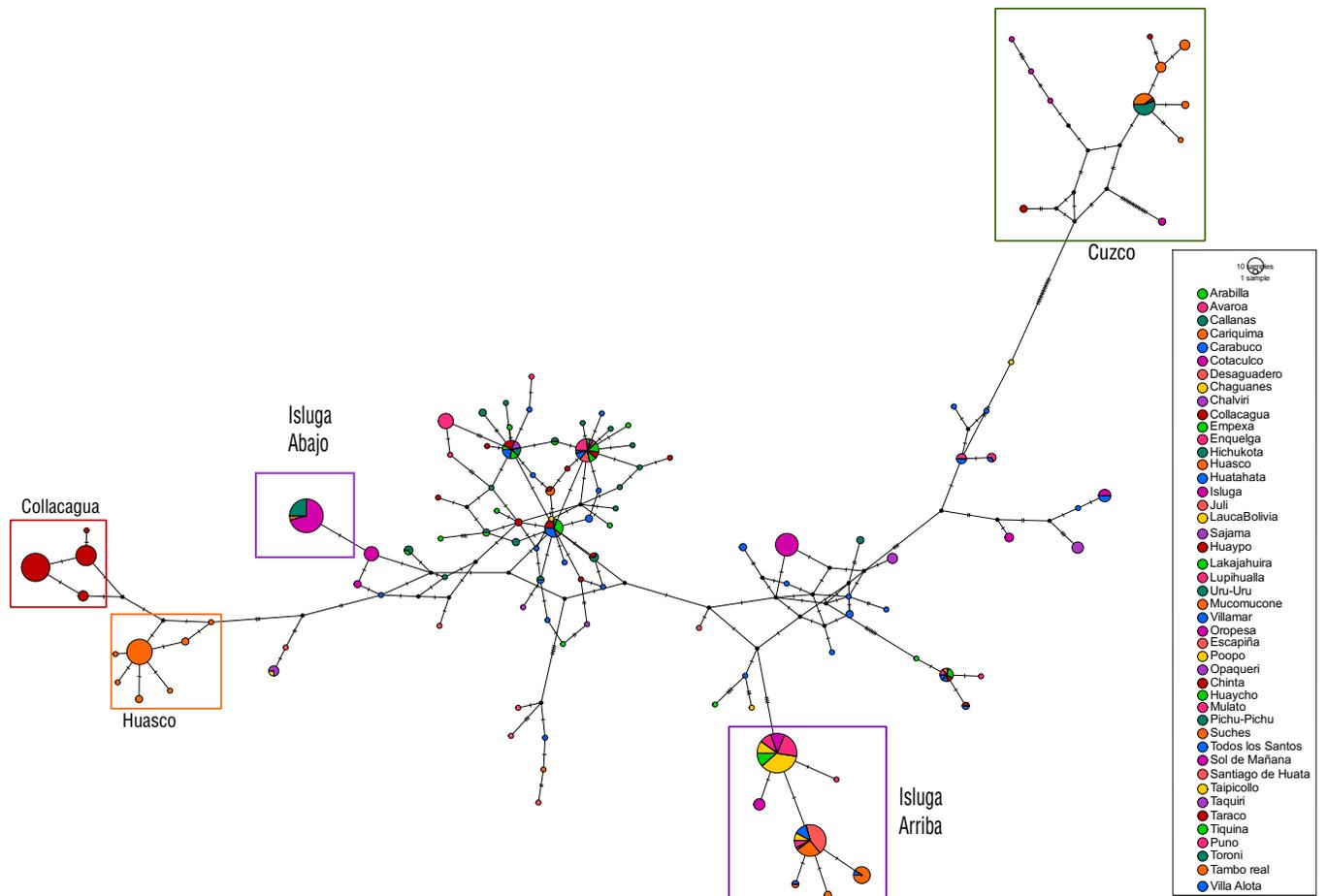


Figura 13. Red de haplotipos con marcador *dloop* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile.

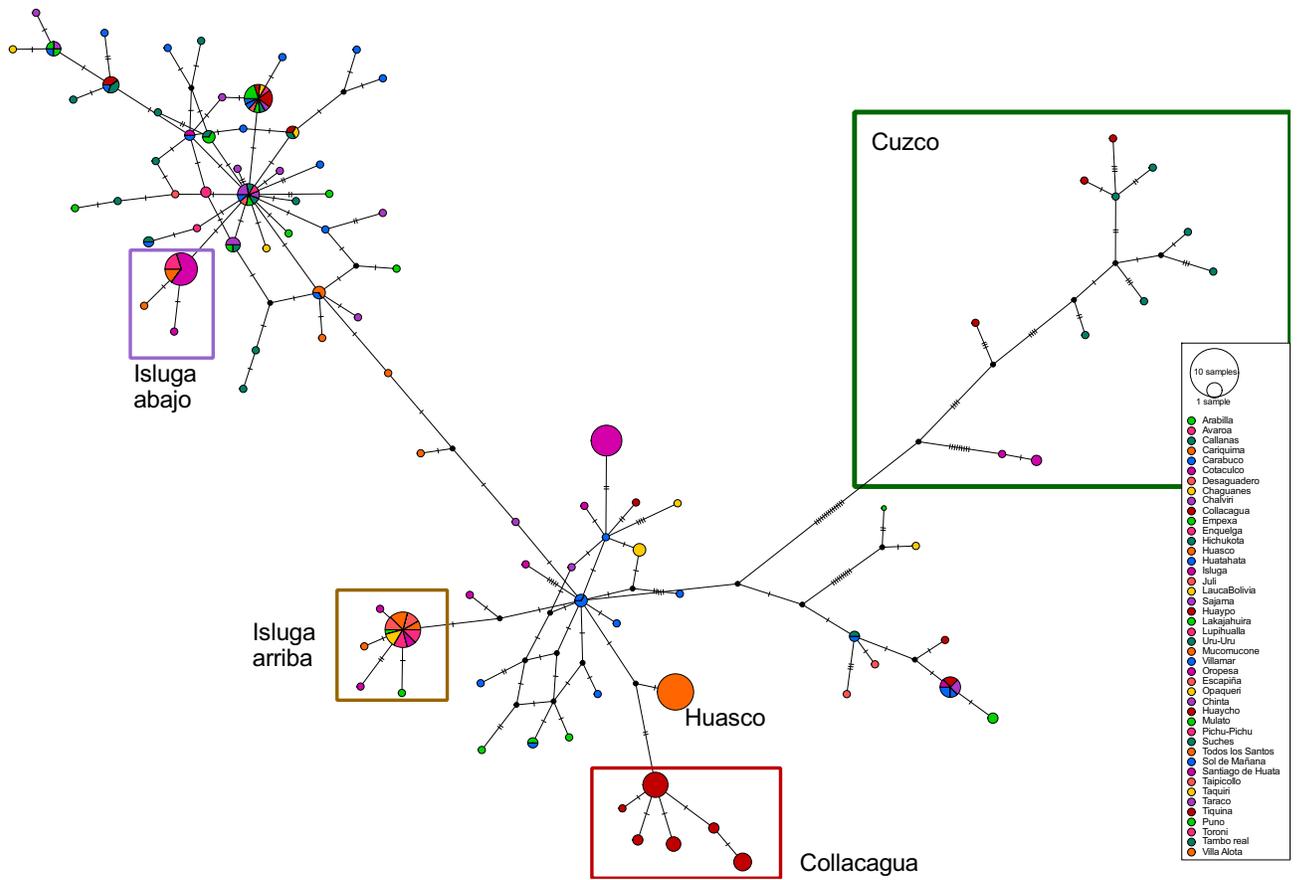


Figura 14. Red de haplotipos con marcador *cytb* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile.

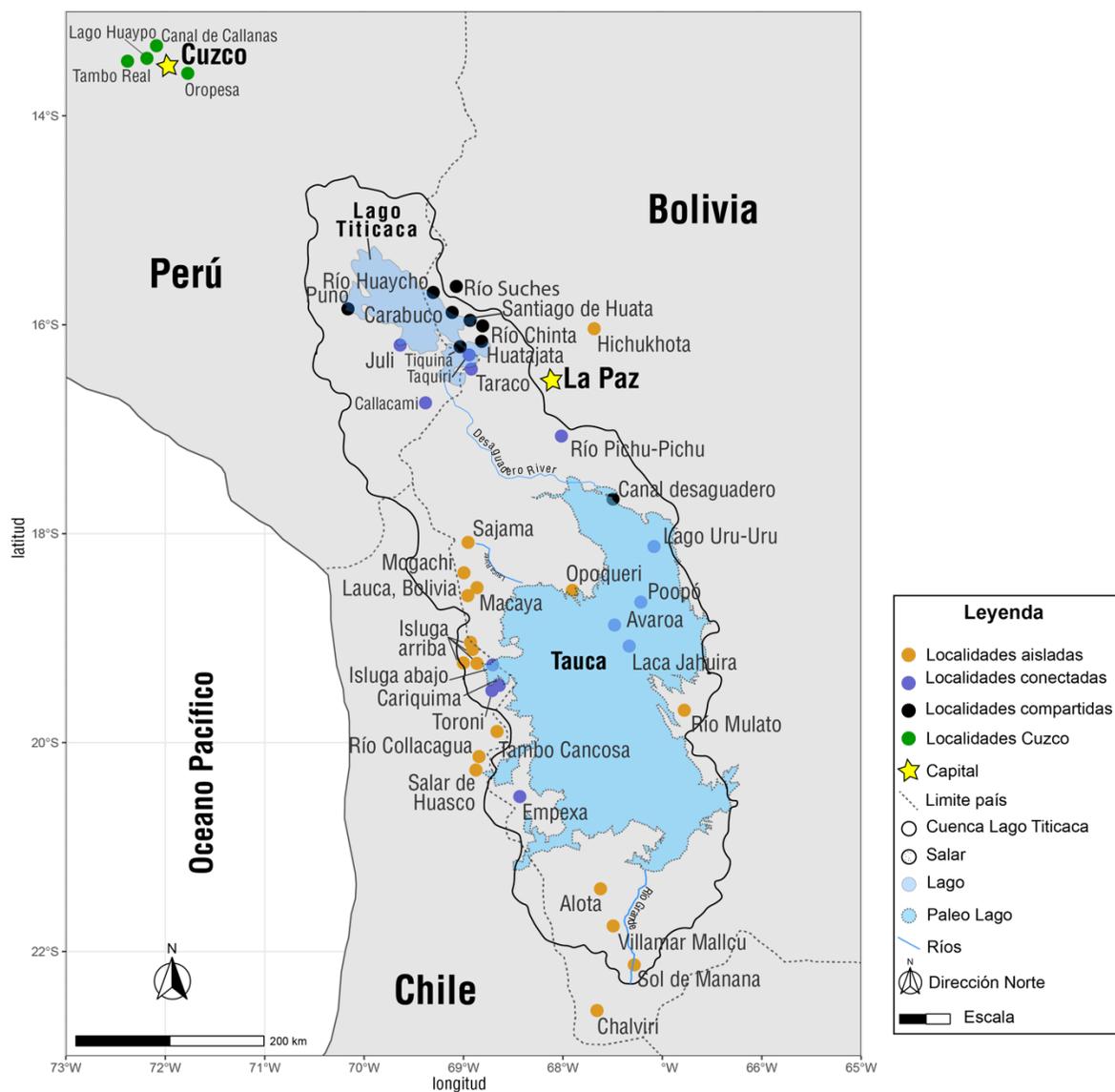


Figura 15. Mapa de las localidades muestreadas de *Orestias agassii* distribuidas en Perú, Bolivia y Chile. La extensión del paleólago Tauca se muestra en azul.

Tabla 4. Altura de cada localidad estudiada

Lago Titicaca	Altitude (m.s.n.m.)	TPDS	Altitude (m.s.n.m.)	Altura	Altitude (m.s.n.m.)
Carabuco	3828	Laca Jahuira	3703	Lauca	3868
Huatajata	3826	Lago Uruuru	3710	Chalviri	4409
Río Chinta	3828	Avaroa	3722	Sajama	4143
Tiquina	3843	Empexa	3781	Macaya	3855
Puno	3791	Poopó	3673	Villamar	4013
				Mallcu	
Río Huaycho	3823	Río Pichu-Pichu	3754	Opaqueri	3767
Río Desaguadero	3728	Cariquima	3761	Río Mogachi	4628
Río Suches	3828	Callacami	3878	Río Mulato	3820
Santiago de Huata	3827	Rio Juli	3875	Sol de Mañana	4187
Taquiri	3819	Toroni	3841	Arabilla	3973
Taraco	3815	Isluga down	3742	Cotaculco	4265
Max	3843	Max	3878	Chaguane	4153
Min	3728	Min	3673	Río Collacagua	3932
Aver	3814	Aver	3767	Enquelga	3931
				Salar del Huasco	3803
				Lupihualla	3878
				Muco	4280
				Mucone	
				Escapiña	4149
				Río Todos los Santos	4234
				Taipicollo	4018
				Tambo	3890
				Cancosa	
				Hichukhota	4335
				Alota	3834
				Isluga up	3855
				Max	4628
				Min	3767
				Aver	4051

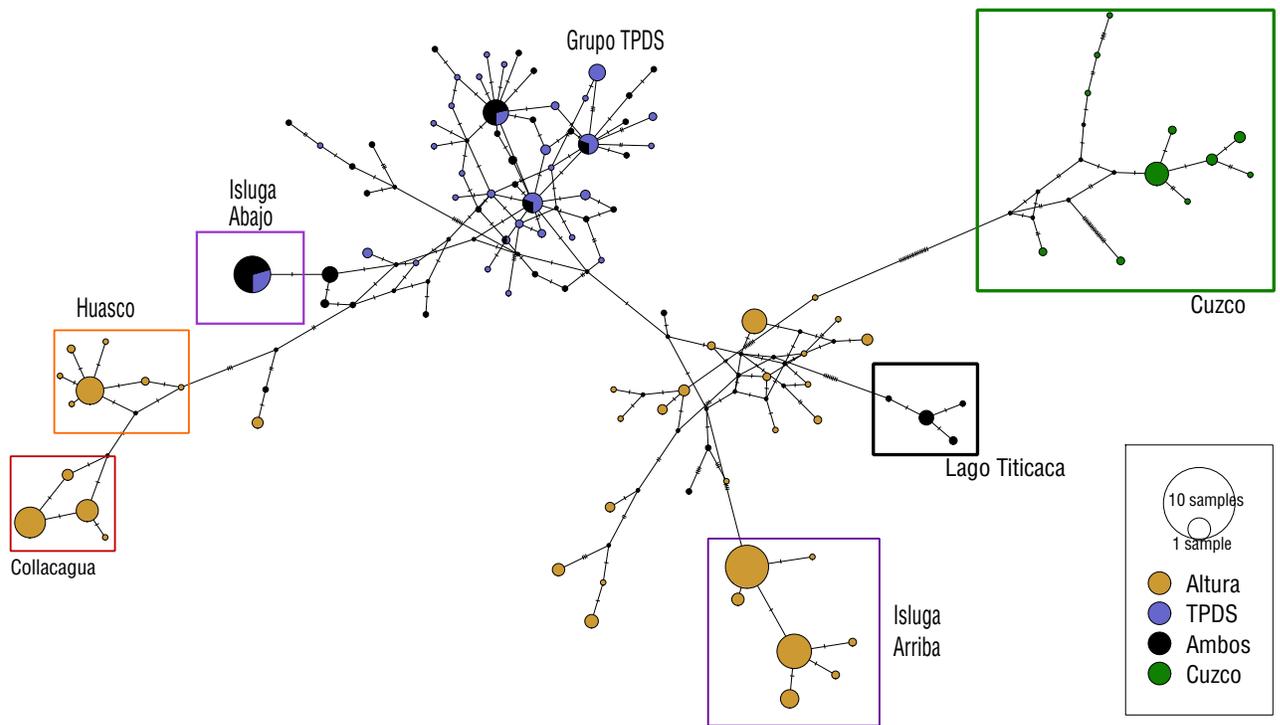


Figura 16. Red de haplotipos con marcador *dloop* de *O. agassii* de Perú, Bolivia y Chile. Los colores indican rango de altura en la cual están ubicadas las localidades.

Tiempo de Divergencia

La divergencia de las especies del complejo *agassii* está dentro de la escala de tiempo del cuaternario (Figura 17). La divergencia entre el linaje A, localidades del Cuzco, y el linaje B habría ocurrido hace 570.000 a 1.010.000 de años atrás. El proceso de diversificación de las poblaciones de *Orestias agassii* presentes en la cuenca del Titicaca comenzó hace unos 320.000 a 580.000 años atrás. Posteriormente, la divergencia entre los dos clados presentes en el río Isluga data entre 240 mil y 410 mil años atrás. El sub-linaje C, correspondiente al “grupo TPDS”, empezó a divergir entre los 180 mil a 320 mil años atrás. Todas estas fechas son posteriores a las fechas de los paleolagos con mejor datación para la cuenca del Titicaca, y se relacionan mejor con la fecha datada para el Paleolago Escara, datado para 191.000 años atrás (Fornari y col., 2001).

Diversidad genética y red de haplotipos

Se analizaron un total de 152 individuos pertenecientes al sub-linaje C, correspondiente al “grupo TPDS” con el marcador *Dloop*, y se encontraron 43 haplotipos únicos. Los valores de la estimación de Tajima's D y Fu and Li's son menores a cero, e indican que hay un alto número de haplotipos raros (Tabla 3). Al observar la red de haplotipos se observa un gran número de haplotipos únicos con pocas diferencias nucleotídicas entre ellos, y tres haplotipos centrales, compartidos por la gran mayoría de las localidades. Para la localidad de “Isluga abajo” hay un mayor número de individuos muestreados en comparación con las demás localidades. Sin embargo, todos los individuos muestreados allí se agrupan mayoritariamente en un único haplotipo, el cual no es compartido por

ningún individuo de otra localidad, a diferencia de lo que ocurre con los individuos del sistema TPDS. Otro haplotipo donde ocurre el mismo patrón es en la localidad de Empexa, el cual se separa por cuatro pasos mutacionales de la red y su haplotipo no es compartido por ningún individuo de otra localidad. Esta red de haplotipos sugiere que los ejemplares de Empexa e “Isluga abajo” presentan una conexión histórica con las localidades del sistema TPDS, pero con un nivel de aislamiento, debido al número de pasos mutacionales que los separa y por no compartir haplotipos con ninguna otra localidad (Figura 18).

Análisis de estructuración poblacional

Se analizó un total de 103 individuos del sub-linaje linaje C, correspondiente al “grupo TDPS” con ocho microsatélites. Ninguno de los loci se encontró fuera del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W). El análisis bayesiano de estructuración poblacional realizado con el programa STRUCTURE, arrojó un valor de $K=2$ como el número de clusters más probable (Figura 19). Se observan dos grupos bien estructurados, con poco intercambio genético entre ellos. Un grupo corresponde a las localidades del “Isluga abajo” (morado claro), y el otro grupo correspondiente a las localidades dentro del sistema TPDS (morado oscuro). Estos resultados sugieren que la población presente en el “Isluga abajo” no presentan una conexión actual con las poblaciones presentes en el sistema TPDS de Perú-Bolivia.

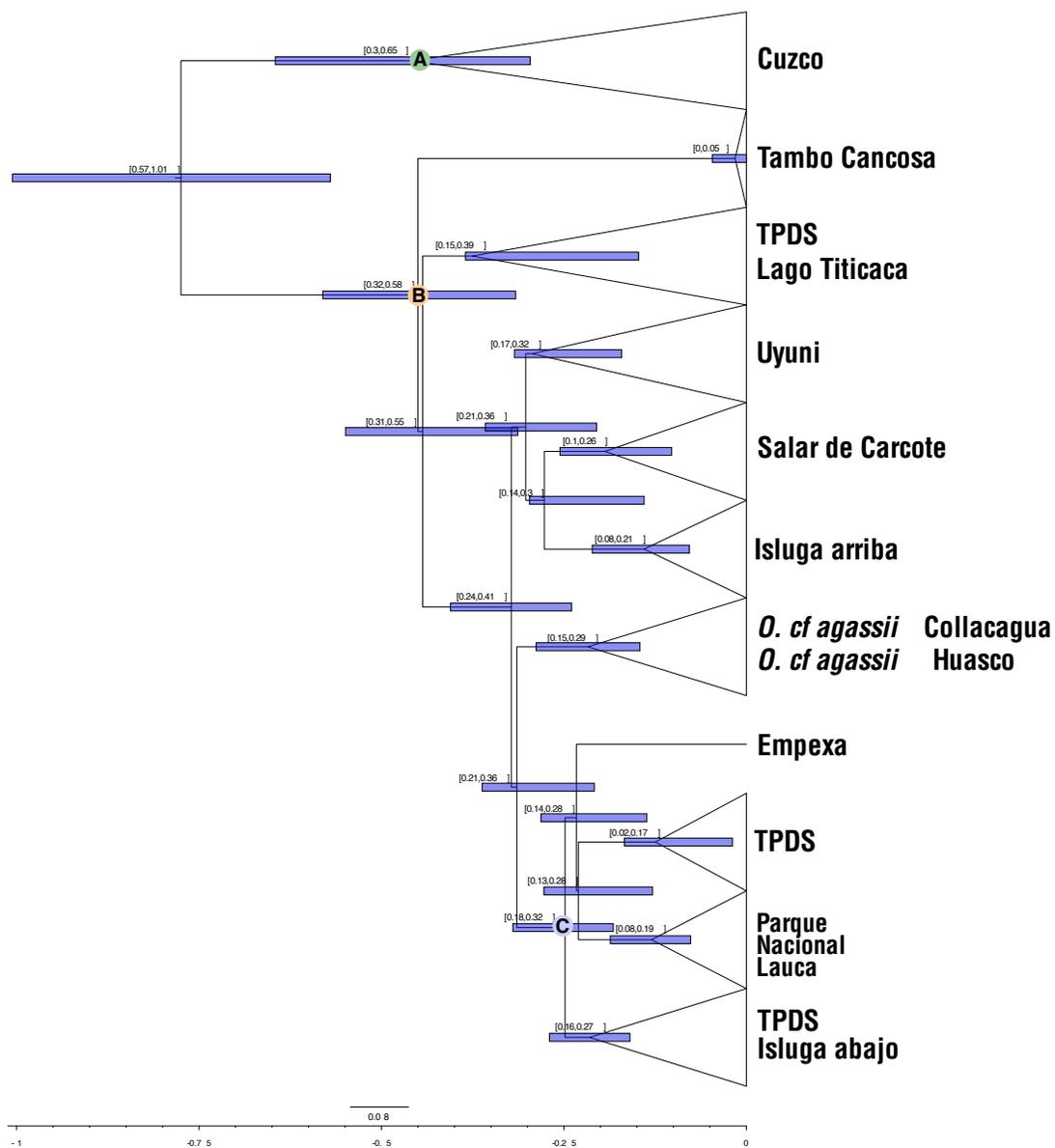


Figura 17. Árbol IB bajo el modelo de reloj estricto de *Orestias agassii*. El valor arriba de los nodos indica el tiempo de divergencia entre los linajes. Las barras indican los intervalos del 95% de la alta densidad posterior (HPD).

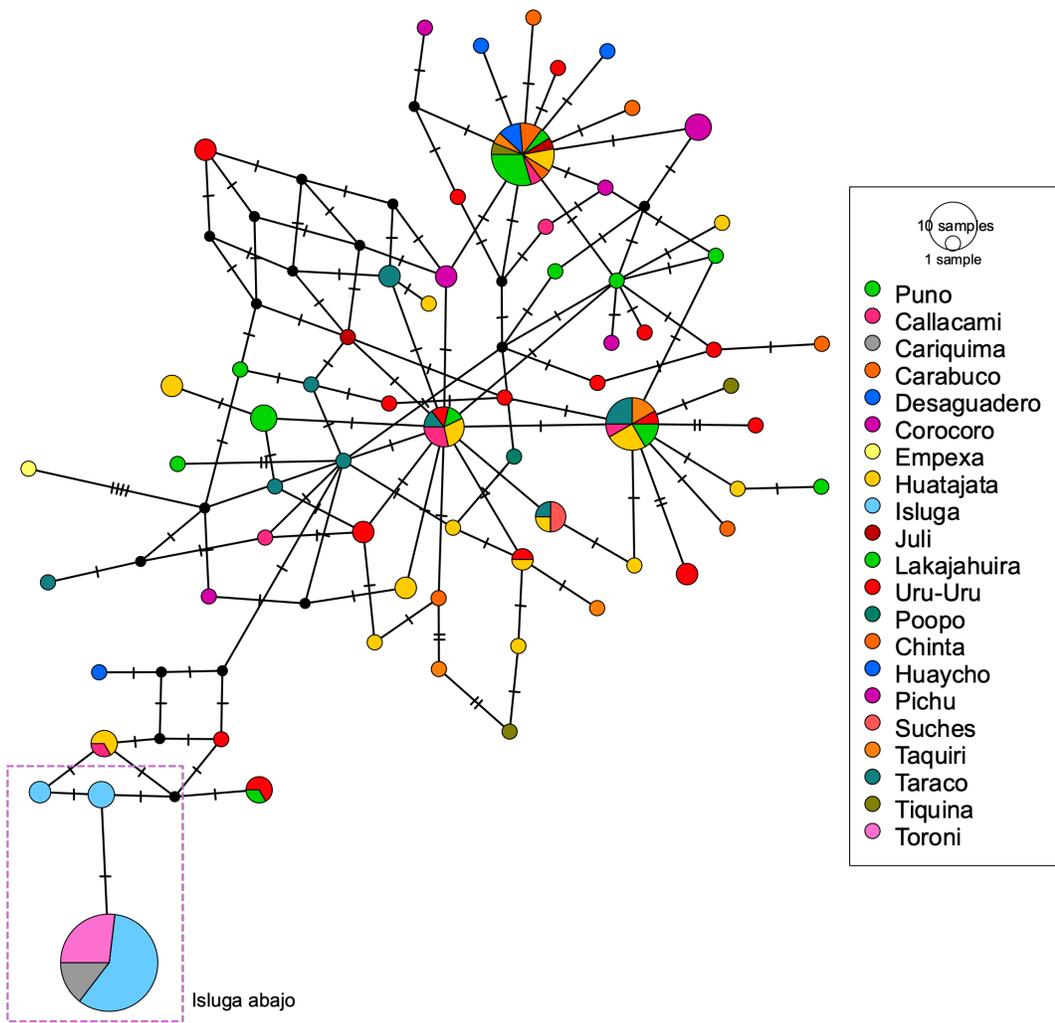


Figura 18. Red de haplotipos de los individuos pertenecientes al sub-linaje C, "grupo TPDS".

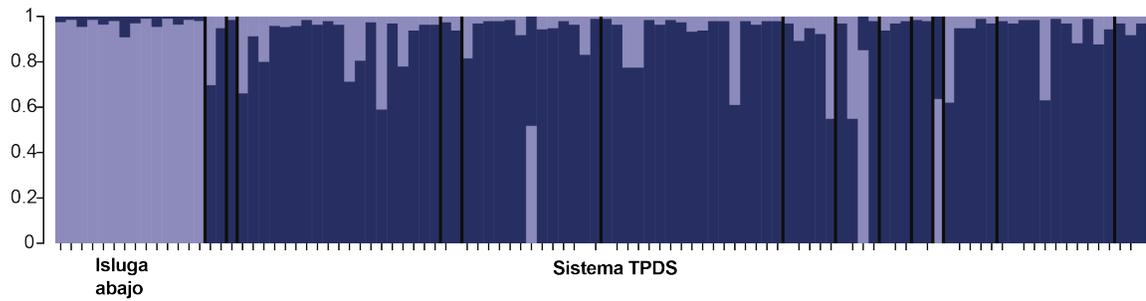


Figura 19. Análisis bayesiano de detección de número de clusters genéticos implementados en el programa STRUCTURE para las poblaciones del *Orestias agassii* del linaje C. Cada individuo esta representado por una barra y los colores corresponden a la probabilidad de asignación a un cluster. El análisis indica $K = 2$ como el número más probable de clusters. El color morado claro corresponde al cluster asignado como “Isluga abajo” y el morado oscuro al cluster asignado como sistema TPDS.

Discusión

Evidencias filogenéticas

Los resultados obtenidos de las inferencias filogenéticas con los marcadores moleculares (mitocondriales y nucleares) sugieren que las poblaciones asignadas a *Orestias agassii* de Perú, Bolivia y Chile no corresponde a un grupo monofilético, y está compuesta por dos linajes principales (Figura 8). Estudios anteriores (Vila y col., 2013) habían detectado este fenómeno, pero utilizando únicamente muestras de *O. agassii* de Chile. Uno de los linajes recuperados de los análisis filogenéticos, es el linaje A, el cual agrupa únicamente a los individuos de la cuenca del Urubamba. El linaje detectado en Urubamba es único y muy diferente a todo lo descrito como *O. agassii*, o a cualquier otra *Orestias* utilizada como grupo hermano en los análisis filogenéticos. Considerando la posición filogenética de este linaje, como grupo hermano de las poblaciones de *O. agassii* presentes en la cuenca del Titicaca, posiblemente, este linaje pueda corresponder a otra especie del género de los otros complejos (*cuvieri*, *mulleri*, *gilsoni* o *lutea*), o a un complejo completamente nuevo no estudiado. Este es el primer estudio en analizar y comparar genéticamente poblaciones de *O. agassii* de las cuencas del Titicaca y Urubamba.

El linaje B, agrupa a todos los ejemplares recolectados en la cuenca del Lago Titicaca y representa poblaciones de *O. agassii*. Dentro del linaje B se encuentran poblaciones que están situadas en cuencas aisladas de la Puna chilena. Como, por ejemplo, la población del salar del Huasco, ubicada en la cuenca del Huasco (Montti y Henríquez 1970), la cual es un sub-linaje del linaje B (figura 11), la población del Río Collacagua, la población del sur del Salar de Uyuni. El Salar de Uyuni es el punto más bajo donde drena el agua dentro del sistema TPDS y desde el sur recibe un aporte hídrico aportado por el río Grande de Lípez. Este sub-linaje recuperado al sur de Uyuni, sugiere una desconexión del río grande de Lípez con el sistema TPDS, el cual puede estar mediado por algún aislamiento geográfico y el déficit hídrico del altiplano. Otro caso de un sub-linaje aislado es el caso de la población de *O. agassii* muestreada río arriba del río Isluga (figura 11), el cual presenta una alta divergencia de la otra población muestreada río abajo del río Isluga. A pesar de que el río Isluga drena continuamente hacia el Salar de Coipasa, se encontraron diferencias genéticas con los tres marcadores entre los individuos muestreados a lo largo del río Isluga. Esto se debe a un aislamiento generado por la cuenca hidrográfica Isluga (Montti y Henríquez, 1970), limitando el contacto con las poblaciones río arriba y río abajo.

Los otros sub-linajes titulados “sistemas TPDS 2,3,4,5”, son el caso contrario. Estos sub-linajes están presentes en el Lago Titicaca y en las localidades de menor altura dentro de la cuenca del Lago Titicaca (parte sur). Adicionalmente, al sobreponer la extensión del paleólago Tauca con la distribución de estos linajes, estos se sobreponen en su mayoría (Figura 15), sugiriendo una conexión

histórica. Ninguno de estos sub-linajes mencionados, presenta un alto soporte de nodo, ni corresponden a cuencas o localidades aisladas. Por ejemplo, los individuos muestreados en la localidad de Laka jahuirá, se encuentran en los linajes señalados como sistema TPDS 2, 3, 4 y 5. Se encuentran todos estos linajes en una misma localidad, sugieren una conexión actual entre los sistemas hídricos del TPDS. La única excepción es el linaje de las poblaciones de *O. agassii* Isluga abajo (Figura 12). El cual agrupa únicamente a individuos del río Isluga con un alto soporte de nodo.

Evidencia genética de poblaciones

Los resultados poblacionales de *Orestias agassii* de la cuenca del Titicaca con la red de haplotipos sugiere la presencia de 7 haplogrupos. Estos son Cuzco, Huasco, Collacagua, Isluga arriba, Titicaca, las localidades señaladas en naranja como “Altura”, y las localidades en morado “grupo TPDS” (Figura 15 y Tabla 4). Todos los haplotipos señalados en naranja, agrupa a individuos que habitan cuencas hidrográficas aisladas y a gran altura, lo cual ha generado una divergencia notoria entre estas poblaciones de *O. agassii* presentes en el Altiplano. Este aislamiento geográfico está mediado por la topografía y la geología del Altiplano, y ha generando islas geográficas en altura (Eguiarte y col., 2007), las cuales se reflejan en la estructuración poblacional de *O. agassii*. Por otro lado, los haplotipos señalados en morado, agrupa a los individuos que habitan a menor altura, principalmente en los cuatro grandes cuerpos de agua de la cuenca del Titicaca. A este grupo se le nomina “grupo TPDS” ya que su conectividad actual e histórica ha sido facilitada por el sistema TPDS.

El Lago Titicaca y el río Isluga son los únicos lugares donde se observan ejemplares que pertenecen a dos haplogrupos, señalados en negro en la red de haplotipos. Lo cual sugiere que en el Lago Titicaca y en el Río Isluga habitan individuos con una historia evolutiva representada por islas de altura e individuos del sistema TPDS. Para el caso del Lago Titicaca, esto se puede explicar debido a que el Lago Titicaca está rodeado de un cordón montañoso el cual presenta sistemas límnicos, donde pueden existir poblaciones de *Orestias* de altura, las cuales durante épocas lluviosas drenan hacia el Lago Titicaca. Esto no es posible confirmar, debido a que no se han muestreado las poblaciones de altura que rodean el Lago Titicaca. Adicionalmente, cabe destacar que el Lago Titicaca es uno de los reservorios de agua más antiguos presentes en la cuenca del Titicaca, por lo tanto, se puede catalogar como un lago antiguo (Martens, 1997; Schön y Martens, 2004), el cual ha tenido la función de ser reservorio de haplotipos ancestrales del género *Orestias*. Por otra parte, el Río Isluga es un río que tiene su origen en Chile y drena hacia el Salar de Coipasa, Bolivia. La parte baja del río se caracteriza por la presencia de dos haplotipos, lo cual se puede explicar por su conectividad con el Salar de Coipasa. El Salar de Coipasa es uno de los grandes cuerpos de agua de la cuenca del Titicaca que ha sido afectado por los últimos paleolagos. La presencia de estos haplotipos del “grupos TPDS” en el Río Isluga, son un reflejo de un contacto secundario que tuvo la población de *O. agassii* del Río Isluga, con la población del “grupo TPDS” a través del Salar de Coipasa.

En Chile, existen tres localidades descritas para *O. agassii*, los resultados filogenéticos sugieren que estas poblaciones corresponden a tres sub-linajes con historias evolutivas diferentes. Uno de estos linajes corresponde a las poblaciones del Río Collacagua y del Salar del Huasco, las cuales comparten la historia evolutiva con el grupo de “Altura”. Por lo tanto, quedan dentro del grupo de las *Orestias* que han evolucionado dentro de un sistema de islas geográficas de altura. Los otros dos se encuentran en el Río Isluga, un sub-linaje corresponde a las poblaciones muestreadas río arriba y comparten la historia evolutiva de un sistema de islas geográficas, y otro linaje que se encuentra río abajo y comparte la historia evolutiva con el “grupo TPDS”. Dentro de los resultados, el linaje recuperado como “Isluga abajo” es el único linaje que comparte una historia evolutiva con poblaciones de *Orestias* del Perú y Bolivia. En este estudio no se incluyeron muestras de la localidad tipo de *O. agassii*, Corocoro, esta localidad está situada en el medio de la cuenca del Lago Titicaca, y forma parte del sistema TPDS. Por lo tanto, se espera que al agregar ejemplares de la localidad tipo, estos se agrupen con el sub-linaje “grupo TPDS”. Estos resultados apoyarían parcialmente la hipótesis inicial de este estudio, ya que el sistema hídrico actual e histórico, solamente ha mantenido la conectividad entre las poblaciones del *O. agassii* que habiten el sistema TPDS, excluyendo los individuos de Cuzco y las poblaciones que han estado aisladas geográficamente en altura.

Tiempos de divergencias

En este estudio se realizó una estimación del tiempo de divergencia utilizando la tasa mutacional del gen *cytb*. Estos resultados sugieren que la divergencia del linaje presente en Cuzco es mucho más antigua que cualquier paleólogo datado para la cuenca del Titicaca. Debido a que el tiempo de divergencia entre estos dos linajes se estima hace unos 570.000 a 1.010.000 de años atrás, se sugiere separar a las poblaciones de *Orestias* presentes en Cuzco como una especie completamente diferente a *O. agassii*. Adicionalmente, el tiempo de divergencia del linaje B y C es mucho más antiguo que cualquier paleólogo datado para la cuenca del Titicaca, sugiriendo que su divergencia estuvo asociada a otros eventos bióticos y abióticos, como las glaciaciones, asociadas al cambio al aporte hídrico dentro de la cuenca del Titicaca, o el surgimiento de nuevos volcanes generando un aislamiento geográfico. La divergencia para las poblaciones presentes en Río Isluga se estima entre los 240.000 y 410.000 años atrás, lo cual también es más antiguo que cualquier paleólogo datado para la cuenca del Titicaca. En general, estos resultados sugieren que las divergencias entre los principales sub-linajes de *Orestias agassii* ocurrieron durante el cuaternario, y los tiempos de divergencia más recientes se correlacionan con el paleólogo escara datado para 191.000 años atrás (Fornari y col., 2001).

Red de haplotipos

Se detectó que las poblaciones del *Orestias* “Isluga abajo” comparten una historia evolutiva con las poblaciones del sistema TPDS. Por lo tanto, se estudió la temporalidad de estas relaciones con el marcador mitocondrial *Dloop*. Este análisis arrojó un alto número de haplotipos raros, una alta diversidad haplotípica, y un valor de Tajima's D y Fu's and Li's negativo, el cual sugiere que la población muestreada está pasando por un proceso de expansión poblacional. El haplogrupo de “Isluga abajo” presenta un paso mutacional de diferencia con ejemplares de las localidades del Lago Uru-Uru, Laka jahuirá y Huatajata, todas localidades presentes dentro del sistema TPDS de Bolivia. Estos resultados sugieren que el sub-linaje “grupo TPDS”, se comporta como una población en crecimiento y que históricamente ha estado conectada con las poblaciones presentes en Bolivia. Por otro lado, la presencia de este haplotipo en Isluga se puede explicar por un contacto secundario de la población de Isluga por su conectividad con el Salar de Coipasa.

Estructuración poblacional

Los resultados de los análisis realizados con los microsatélites sugieren que el sub-linaje “grupo TPDS” se estructura en dos clusters genéticos con la presencia de pocos híbridos. Un cluster agrupa a la población “Isluga abajo” y el otro a la población del sistema TPDS. La ausencia de híbridos sugiere una escasa conexión actual entre las poblaciones de “Isluga abajo” y el sistema TPDS. Esto, se observa también en los análisis filogenéticos, ya que el linaje de Isluga abajo, agrupa únicamente a individuos de Isluga abajo como monofiléticos y con alto

soporte de nodo. De estos últimos resultados se puede inferir que la población presente en “Isluga abajo” está aislada y posiblemente en un proceso inicial de divergencia, si se diferenciará o no va a depender de la intensidad de su aislamiento. Un escenario de una alta diferenciación es bastante probable debido a que el aporte hídrico anual en el Altiplano ha ido disminuyendo año tras año (Viveen y col., 2019). Por lo tanto, es esperable que estas poblaciones no se vuelvan a conectar al menos en este siglo. Los efectos de escases hídrica para las poblaciones de *Orestias* en el Altiplano ha sido detectado anteriormente por Cruz-Jofré y col. (2016), para las poblaciones de *Orestias ascotanensis*, del Salar de Ascotán. En donde los individuos de la vertiente 11 muestran señales de aislamiento, bajo flujo génico y baja tasa de migración, determinadas por un aislamiento altitudinal y un déficit hídrico del sistema (Cruz-Jofré y col. 2016).

Conclusión

En el presente estudio se realizaron análisis micro y macro evolutivos de las poblaciones conferidas a *Orestias agassii* presentes en Perú, Bolivia y Chile utilizando marcadores moleculares. Como resultado general de los análisis filogenéticos, se recupera que las poblaciones de *O. agassii* no corresponden a un grupo monofilético. Esto se debe principalmente a que las poblaciones de *O. agassii* quedan agrupadas en dos grandes linajes, con historias evolutivas muy diferentes. El linaje A, es un linaje con localidades exclusivas de la cuenca del Urubamba. El cual requiere futuros estudios para determinar si es una especie nueva, y el linaje B, el cual representa a poblaciones de *Orestias agassii*, el cual se separa en varios sub-linajes. Dentro del linaje B, hay sub-linajes representados por localidades que han evolucionado bajo un modelo de islas biogeográficas de altura y un sub-linaje donde existe una conexión actual e histórica entre las localidades, la cual esta mediada con el sistema TPDS. Además, en el sub-linaje C o del “grupo TPDS” se recupera otro sub-linaje único para la población de “Isluga abajo”, con un alto soporte de nodo, lo cual sugiere un posible aislamiento geográfico y actual proceso de divergencia con las localidades conectadas del sistema TPDS, mediado por el déficit hídrico presente

año a años en el Altiplano. Este mismo patrón se observa con los resultados de estructuración poblacional para estas poblaciones.

Con respecto a las poblaciones de *O. agassii* en Chile, se recuperan como polifiléticas, estando separadas en tres sub-linajes del linaje B. Un sub-linaje agrupa a las poblaciones del río Collacagua y Salar del Huasco, el cual pertenece al grupo de islas biogeográficas de altura. Otro sub-linaje, se encuentra en las poblaciones del río “Isluga arriba”, el cual también pertenece al grupo de islas biogeográficas de altura. Finalmente, el otro sub-linaje recuperado se encuentra en las poblaciones del “Isluga abajo”, el cual presenta una conexión con las poblaciones presentes en Perú y Bolivia del sistema TPDS. Esta conexión está mediada por la conexión historia y reciente entre los cuatro grandes cuerpos de agua presentes en el Altiplano, Lago Titicaca, Lago Poopó, Salar de Coipasa y Salar de Uyuni. Por lo tanto, a lo largo de la extensión del Río Isluga se encuentran dos sub-linajes con historias evolutivas diferentes. Este caso en particular es una evidencia de una conexión secundaria entre las poblaciones de altura y la población del sistema TPDS, la cual se mantiene por los factores abióticos del sistema TPDS, como el gradiente altitudinal propio de la cuenca del Titicaca. Finalmente, se requieren futuros estudios para determinar si estos dos linajes cohabitan a lo largo del Río Isluga o están restringidos por la cuenca Isluga.

Los análisis biogeográficos de diversidad genética, red de haplotipos y estructuración poblacional de las poblaciones conferidas a *O. agassii* del sistema TPDS, sugieren la existencia de una conexión histórica entre las poblaciones de

“Isluga abajo” y el sistema TPDS. En particular, los resultados de la red de haplotipos también sugieren una conexión histórica, pero leve, entre Isluga abajo y el sistema TPDS, ya que no se encuentra un haplogrupo bien definido. Por otro lado, los resultados de estructuración poblacional, sugieren poco intercambio genético entre las poblaciones de “Isluga abajo” y las poblaciones del sistema TPDS. Estos dos análisis, detectan que las poblaciones de *O. agassii* del río Isluga abajo ha pasado por un proceso de divergencia histórica y actual, posiblemente mediada por la disminución del aporte hídrico en el Altiplano.

Finalmente, todos los resultados permitieron elucidar la historia evolutiva de *Orestias agassii*, no tan solo en Chile y Bolivia, sino también del Perú. Este trabajo sugiere que *Orestias agassii* está presente únicamente dentro de la cuenca del Lago Titicaca. Estas poblaciones están pasando por un proceso de divergencia mediada por la desconexión hídrica entre las cuencas del Titicaca, la cual ha aislado a las poblaciones de islas de altura con las poblaciones de menor altura del sistema TPDS. Para un futuro se espera que el aporte hídrico a la cuenca del Titicaca siga disminuyendo, y así limitando la conexión entre las poblaciones de *O. agassii*.

En el marco de este proyecto, una de las primeras proyecciones futuras es realizar los análisis filogenéticos con ejemplares de la localidad tipo, Corocoro. Adicionalmente, se piensa evaluar si los linajes detectados presentan sinapomorfías morfológicas. Con la finalidad de detectar linajes únicos y elucidar la historia evolutiva de *O. agassii* en la cuenca del Titicaca.

Bibliografía

- ABARCA-DEL-RIO, R., CRÉTAUX, J. F., BERGE-NGUYEN, M., Y MAISONGRANDE, P. 2012. Does Lake Titicaca still control the Lake Poopó system water levels? An investigation using satellite altimetry and MODIS data (2000–2009). *Remote sensing letters*. 3(8):707-714.
- ALLMENDINGER, R. W., JORDAN, T. E., KAY, S. M., Y ISACKS, B. L. 1997. The evolution of the Altiplano-Puna plateau of the Central Andes. *Annual review of earth and planetary sciences*. 25(1):139-174.
- ARRATIA, G. 1981. Géneros de peces de aguas continentales de Chile. *Publicación Ocasional Museo Nacional Historia Natural*. 34:3-108.
- ARRATIA, G. 1982. Peces del altiplano de Chile. *En*: ARRATIA, G., VELOSO, A., Y BUSTOS, E. *El Hombre y los Ecosistemas de Montaña*. Santiago de Chile. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe-Rostlac. pp:93-133
- ARRATIA, G., VILA, I., LAM, N., GUERRERO, C. J., Y QUEZADA-ROMEGIALLI, C. 2017. Morphological and taxonomic descriptions of a new genus and species of killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes) from the high Andes of northern Chile. *PloS ONE*, 12(8):1-36.
- BAKER, P. A., RIGSBY, C. A., SELTZER, G. O., FRITZ, S. C., LOWENSTEIN, T. K., BACHER, N. P., Y VELIZ, C. 2001. Tropical climate changes at millennial and orbital timescales on the Bolivian Altiplano. *Nature*. 409(6821):698-701.
- BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C. H., XIE, D., ... Y DRUMMOND, A. J. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*. 10(4):1-6.

- BOUCKAERT, R. R., Y DRUMMOND, A. J. 2017. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evolutionary Biology*. 17(1):1-11.
- CANEDO, C., PILLCO ZOLÁ, R., Y BERNDTSSON, R. 2016. Role of Hydrological Studies for the Development of the TDPS System. *Water*. 8(4):144.
- CLAPPERTON, C. M., CLAYTON, J. D., BENN, D. I., MARDEN, C. J., Y ARGOLLO, J. 1997. Late Quaternary glacier advances and palaeolake highstands in the Bolivian Altiplano. *Quaternary International*. 38:49-59.
- CLAYTON, J. D., Y CLAPPERTON, C. M. 1997. Broad synchrony of a Late-glacial glacier advance and the highstand of palaeolake Tauca in the Bolivian Altiplano. *Journal of Quaternary Science: Published for the Quaternary Research Association*. 12(3):169-182.
- CRUZ-JOFRÉ, F., Y MENDEZ TORRES, M. A. 2013. The genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): nomenclatural errors in the assignation of species names. *Zootaxa*. 3746(4):597-599.
- CRUZ-JOFRE, F., MORALES, P., ESQUER-GARRIGOS, Y., VILA, I., HUGUENY, B., GAUBERT, P., Y MENDEZ, M. A. 2014. Taxonomic identity of the forms of *Orestias agassii* (Teleostei: Cyprinodontidae) from Chile: A morphological comparison with the syntypes of the species of Peru and Bolivia. *Gayana*. 78(1):41-45.
- CRUZ-JOFRÉ, F., MORALES, P., VILA, I., ESQUER-GARRIGOS, Y., HUGUENY, B., GAUBERT, P., ... Y MÉNDEZ, M. A. 2016. Geographical isolation and genetic differentiation: the case of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), an Andean killifish inhabiting a highland salt pan. *Biological journal of the Linnean Society*. 117(4):747-759.
- CUVIER, G., Y VALENCIENNES, A. 1846. *Histoire naturelle des Poissons* Vol. 18,-Paris-Strasbourg.

- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., Y POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9(8):772-772
- DE LA BARRA, E., MALDONADO, M., CARVAJAL-VALLEJOS, F., Y CORONEL, J. S. 2009. Los peces del género *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) en la puna meridional de Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental*. 26:1-7.
- DE LA BARRA E., MALDONADO M., IRMA VILA., IBÁÑEZ C., JÉGU M. Y CARVAJAL-VALLEJOS F.M. 2020. Resumen del conocimiento sobre la biología y taxonomía del género *Orestias* Valenciennes 1839 (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *Hidrobiología Neotropical y Conservación. Acuática*. 1(2):185-224.
- DEJOUX, C. Y ILLIS A. 1992. *Lake Titicaca: A synthesis of limnological knowledge*. La Paz, Bolivia. Springer Science & Business Media. 573p.
- EARL, DENT A. Y VONHOLDT, BRIDGETT M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4(2):359-361.
- EGUIARTE, L., SOUZA, V. Y AGUIRRE, X. 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Coyoacán, México, D.F. 573p.
- EIGENMANN, C. H. 1920. On the genera *Orestias* and *Empetrichthys*. *Copeia*. 89:103-106.
- EIGENMANN, C. H. 1927. *The fresh-water fishes of Chile*. US Government Printing Office. 80 p.
- EIGENMANN, C. H., Y ALLEN, W. R. 1942. *Fishes of western South America*. I. The intercordilleran and Amazonian lowlands of Peru. II. The high pampas of Peru, Bolivia, and northern Chile. The University of Kentucky, Lexington, Kentucky. 520 p.

- ESMAEILI, H. R., ASRAR, T., Y GHOLAMIFARD, A. 2018. Cyprinodontid fishes of the world: an updated list of taxonomy, distribution and conservation status (Teleostei: Cyprinodontoidea). *Iranian Journal of Ichthyology*. 5(1):1-29.
- ESQUER-GARRIGOS, Y., LAMBOURDIERE, J., IBANEZ, C., Y GAUBERT, P. 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. E., HUGUENY, B., KOERNER, K., IBANEZ, C., BONILLO, C., PRUVOST, P., ... Y GAUBERT, P. 2013. Non-invasive ancient DNA protocol for fluid-preserved specimens and phylogenetic systematics of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Zootaxa*. 3640(3):373-394.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., Y GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14:2611-2620.
- EVERMANN, B. W. Y RADCLIFFE, L. 1909. Notes on a Cyprinodont (*Orestias agassizii*) from central Peru. *En: Proceedings of the Biological Society of Washington*. Washington, DC. Biological Society. pp. 165-170.
- FORNARI, M., RISACHER, F., Y FÉRAUD, G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 172(3-4):269-282.
- GARREAUD, R., VUILLE, M. Y CLEMENT, A.C. 2003. The climate of the Altiplano: observed current conditions and mechanisms of past changes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 194(1-3):5-22.
- GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., Y GASCUEL, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59(3):307-321.

- JOWETT T. 1986. Preparation of nucleic acids. En: ROBERTS DB. *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, Oxford. pp. 275-286.
- HOANG, D. T., CHERNOMOR, O., VON HAESELER, A., MINH, B. Q., Y VINH, L. S. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522.
- KALYAANAMOORTHY, S., MINH, B. Q., WONG, T. K., VON HAESELER, A., Y JERMIIN, L. S. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14(6):587-589.
- KLOHN, W. 1972. *Hidrografía de las zonas desérticas de Chile*. Santiago de Chile. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 177p.
- LANFEAR, R., CALCOTT, B., HO, S. Y., Y GUINDON, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*. 29(6):1695-1701.
- LANFEAR, R., FRANSEN, P. B., WRIGHT, A. M., SENFELD, T., Y CALCOTT, B. 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*. 34(3):772-773.
- LAVENU, A. 1992. *Origins*. En: DEJOUX, C. Y ILLIS A. *Lake Titicaca: A synthesis of limnological knowledge*. La Paz, Bolivia. Springer Science & Business Media. pp. 3-15.
- LEIGH, J. W., Y BRYANT, D. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 6(9): 1110-1116.
- LIBRADO, P., Y ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25(11):1451-1452.

- 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*. 29(1):151-160.
- MARTENS, K. 1997. Speciation in ancient lakes. *Trends in Ecology & Evolution*. 12(5):177-182.
- MINCHIN, J. B. 1882. Notes of a journey through part of the Andean table-land of Bolivia in 1882. En: *Proceedings of the Royal Geographical Society and Monthly Record of Geography*. Royal Geographical Society (with the Institute of British Geographers), Wiley. pp. 671-676.
- MONTTI, S., Y HENRÍQUEZ, H. 1970. Interpretación hidrogeológica de la génesis de salares y lagunas del Altiplano Chileno. En: SEGUNDO CONGRESO Geológico Chileno. Arica, Chile. Instituto de Investigaciones Geológicas. pp 69-81.
- MORALES, P., VILA, I., Y POULIN, E. 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(6):1639-1643.
- NGUYEN, L. T., SCHMIDT, H. A., VON HAESELER, A., Y MINH, B. Q. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32(1):268-274.
- PARENTI, L. R. 1984 a. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 178 (2): 07-214.
- PARKER, A. Y KORNFIELD, I. 1995. Molecular perspective on evolution and zoogeography of cyprinodontid killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1:8-21.

- PARENTI, L. R. 1984 b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept. Evolution of species flocks Chapter: 7. Publisher: University of Maine at Orono Press Editors: A. A. Echelle and I. Kornfield
- PÉREZ, G. A. C., ŘÍČAN, O., ORTÍ, G., BERMINGHAM, E., DOADRIO, I., Y ZARDOYA, R. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43(1): 91-110.
- PINTO, M., Y VILA, I. 1987. Relaciones tróficas y caracteres morfofuncionales de *Orestias laucaensis* Arratia 1982 (Pisces, Cyprinodontidae). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso*. 18:77-84.
- PLACZEK, C. J., QUADE, J., Y PATCHETT, P. J. 2011. Isotopic tracers of paleohydrologic change in large lakes of the Bolivian Altiplano. *Quaternary Research*. 75(1):231-244.
- PLACZEK, C. J., QUADE, J., Y PATCHETT, P. J. 2013. A 130 ka reconstruction of rainfall on the Bolivian Altiplano. *Earth and Planetary Science Letters*. 363:97-108.
- POHL, M., MILVERTZ, F. C., MEYER, A., Y VENCES, M. 2015. Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of Pantanodon. *Vertebrate Zoology*. 65(1):37-44.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., Y DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945-959.
- RAMASAMY, R. K., RAMASAMY, S., BINDROO, B. B., Y NAIK, V. G. 2014. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*. 3(1):1-3.
- RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. J., XIE, D., BAELE, G., Y SUCHARD, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67(5):901-904.

- ROCHE, M.A., BOURGES, J., CORTES, J. Y MATTOS, R. 1992. Climatology and Hydrology. En: DEJOUX, C. Y ILTIS A. Lake Titicaca: A synthesis of limnological knowledge. La Paz, Bolivia. Springer Science & Business Media. pp. 63-88.
- RONQUIST F, M TESLENKO, P VAN DER MARK, DL AYRES, A DARLING, S HÖHNA, B LARGET, L LIU, MA SUCHARD Y JP HUELSENBECK. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61(3):539-542.
- ROWE, H. D., DUNBAR, R. B., MUCCIARONE, D. A., SELTZER, G. O., BAKER, P. A., Y FRITZ, S. 2002. Insolation, moisture balance and climate change on the South American Altiplano since the Last Glacial Maximum. *Climatic Change*. 52(1):175-199.
- SCHÖN, I., Y MARTENS, K. 2004. Adaptive, pre-adaptive and non-adaptive components of radiations in ancient lakes: a review. *Organisms Diversity & Evolution*. 4(3):137-156.
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18:233–234.
- SWOFFORD DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAKAHASHI, T., Y MORENO, E. 2015. A RAD-based phylogenetics for *Orestias* fishes from Lake Titicaca. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 93:307-317.
- TCHERNAVIN, D. V. 1944. A Revision of the Subfamily Orestiinæ. En Proceedings of the Zoological Society of London. Oxford, UK. Blackwell Publishing Ltd. pp 140-233.
- VALENCIENNES, A. 1839. Poissons d'Amerique. Rapport sur quelques poissons d'Amerique rapportes par M. Pentland du lac Titicaca et des autres points eleves des Andes. L'Institut, 276:118.

- VALENCIENNES, A. 1846. Chapitre XII Des *Orestias*. In: Cuvier, G. & Valenciennes, A. (Eds.), Histoire Naturelle des Poissons (Volume XVIII, Livre XVIII). Paris, Francia, p 221–244.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M. Y SHIPLEY, P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4:535–538.
- VILA, I., FUENTES, L., Y CONTRERAS, M. 1999. Peces límnicos de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. 48:61-75.
- VILA, I. 2006. A new species of killifish in the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia*. 2006(3):472-477.
- VILA, I., SCOTT, S., LAM, N., ITURRA, P. Y MÉNDEZ., M. 2010. Karyological and morphological analysis of divergence among species of the killifish genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the southern altiplano. En: NELSON, J., SCHULTZE, H. Y WILSON, V. Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts. Munchen: Verlag Dr. Friedrich Pfeil. pp. 471–480.
- VILA, I., MORALES, P., SCOTT, S., POULIN, E., VÉLIZ, D., HARROD, C., Y MÉNDEZ, M. 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(3):927-943.
- VIVEEN, W., ZEVALLOS-VALDIVIA, L., Y SANJURJO-SANCHEZ, J. 2019. The influence of centennial-scale variations in the South American summer monsoon and base-level fall on Holocene fluvial systems in the Peruvian Andes. *Global and Planetary Change*. 176:1-22.
- XIA, X. 2013. A Comprehensive Software Package for Data Analysis in molecular biological evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 30:1720-1728.

XIA, X., LI, C., Y YANG, Q. 2003. Routine analysis of molecular data with software DAMBE. Fundamental concepts and methodology in molecular palaeontology. Science Publishers, China. pp 149-167.

XIAO, W., ZHANG, Y., Y LIU, H. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. Molecular phylogenetics and evolution. 18(2):163-173.