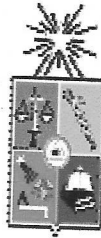


UACH - FC  
D. Ambiental  
P 397d  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES DE**  
***Orestias laucaensis* (ARRATIA, 1982) EN EL ALTIPLANO SUR-CHILE.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

FABIOLA ANDREA PEÑA MORCOM

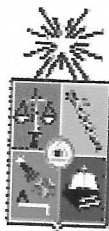


Director de Seminario de Título: Dr. Elie Poulin

Co-Director de Seminario de Título: Dr. (c) Claudia Guerrero

Julio, 2010

Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Fabiola Andrea Peña Morcom.

### DIFERENCIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Orestias laucaensis* (ARRATIA, 1982) EN EL ALTIPLANO SUR-CHILE.

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

Dr. Elie Poulin  
Director Seminario de Título

Dr (c). Claudia Guerrero  
Co-Director Seminario de Título

#### Comisión de Evaluación

Dr. Michel Sallaberry  
Presidente Comisión

Dr. David Véliz  
Evaluador



Santiago de Chile, 7 julio 2010

A mis padres,

Mis hermanos,

Y mi querido Simón, nunca dejes de preguntar.



## AGRADECIMIENTOS



En primer lugar quisiera agradecer a mis padres por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme incondicionalmente, gracias por todos sus consejos y paciencia infinita.

Agradecer a mis amigos: Pablo, Patty, Andrea, Kena, Nestor, Eduardo, Javi. Junto a ustedes aprendí, me divertí, pase los buenos y malos momentos, los quiero hartos. Dani, Alvaro amiguitos ustedes dos siempre apoyando mis locuras, gracias por todo.

Quisiera agradecer a mi tutor, Dr. Elie Poulin, por haberme permitido desarrollar esta tesis en su laboratorio, gracias por ayudarme a lograr ver de manera más analítica mi planteamiento, por todo el apoyo, consejos y ayuda prestada. Agradecer también a mi Co-tutora, Dr. (c) Claudia Guerrero, mi mentora y amiga, gracias por enseñarme todas las técnicas moleculares para lograr desarrollar mi tesis, y además por todos esos incontables cafés y buenos momentos que pasamos juntas.

A mis compañeros del LEM: Ceci, Marce, Claudia, Angie, Karin, Claudio, Christian, Josefina, Coni por su ayuda y por siempre tener una excelente disposición. Agradecer también a quienes colaboraron en hacer de los terrenos gratos recuerdos: José, Vilma, Sergio, Jime y profe Michel. Agradecer además a la profesora Irma Vila por sus consejos, sugerencias y ayuda.

Agradecer a mi comisión revisora, Dr. David Véliz y Dr. Michel Sallaberry por sus comentarios y sugerencias, por su buena disposición a ayudarme a mejorar y comprender.



Finalmente agradecer al Instituto de Ecología y Biodiversidad, al proyecto Fondecyt 1080390, 2008-2010 y al laboratorio de Ecología Molecular por haber financiado el desarrollo de mi tesis.



# INDICE DE CONTENIDOS



	Página
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
1. Introducción	1
2. Hipótesis	9
3. Objetivos	10
4. Metodología	11
4.1 Sitio de muestreo	11
4.2 Extracción de ADN	13
4.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas	14
4.4 Construcción de la red de haplotipos	15
4.5 Nivel de diferenciación genética	16
4.6 Inferencia demográfica	17
5. Resultados	19
5.1 Diversidad genética	19
5.2 Red de haplotipos	20
5.3 Distribución geográfica de la diversidad genética	22
5.4 Inferencia demográfica	23
6. Discusión	26
7. Conclusión	29
8. Referencias	31

## INDICE DE TABLAS



**Tabla 1.** Coordenadas geográficas de los distintos sitios de muestreo de *O. laucaensis*.  
Página 11.

**Tabla 2.** Índices de diversidad genética calculados para cada una de las poblaciones muestreadas y para el total de las secuencias. Índices obtenidos para los test de Neutralidad de Tajima (D) y Fu (Fs). Página 21.

**Tabla 3.** Valores obtenidos a partir del test  $\Phi_{ST}$  pareados. Página 23.

**Tabla 4.** Porcentajes de variación entre, dentro de los grupos y entre poblaciones obtenidos a partir del análisis con SAMOVA. Página 24.

## INDICE DE FIGURAS



**Figura 1.** Mapa de la zona del Altiplano ( $14^{\circ}\text{S}$ - $22^{\circ}\text{S}$ ). Página 3.

**Figura 2.** Mapa de la cuenca del río Lauca y las dos subcuencas que se originaron posteriormente al colapso del volcán Parinacota. Página 5.

**Figura 3.** Sitios de muestreo para *O. laucaensis*. Página 12.

**Figura 4.** Sitios de colecta para *O. laucaensis*. Página 13.

**Figura 5.** Red de Haplotipos (network) para las localidades de Lauca Norte, Lauca Sur, Ancuta y Cotacotani. Página 22.

**Figura 6.** Distribución del número promedio de diferencias entre pares de secuencias (mismatch). Página 25.

## RESUMEN

El género *Orestias* es el grupo más conspicuo de peces en la región altiplánica. Su distribución abarca desde Lachsa, Perú hasta el salar de Ascotan, en el norte de Chile. Las especies que habitan la zona del Altiplano chileno se caracterizan por encontrarse limitadas a tamaños poblacionales reducidos y presentar un alto endemismo local. Dentro del Parque Nacional Lauca, en la región de Arica y Parinacota, Chile, se han descrito cuatro especies: *Orestias parinacotensis* en el Bofedal de Parinacota, *O. chungarensis* en el lago Chungará, *O. piacotensis* en la laguna de Piacota y *O. laucaensis* en las lagunas de Cotacotani, el río Lauca y los bofedales asociados al río. La presencia de estas especies en sistemas acuáticos aislados, podría representar una etapa temprana de un proceso de especiación que se relacionaría con los eventos del Holoceno. Durante este periodo, esta región del Altiplano se vio afectada por un intenso vulcanismo y actividad tectónica que llevó a la formación de cuencas endorreicas. Dentro de las especies mencionadas, *O. laucaensis* destaca por ser la única especie que presenta una distribución más amplia. En este contexto se evaluó de que manera los cambios sufridos por la cuenca del río Lauca durante el Holoceno han incidido sobre la diversidad genética de *O. laucaensis*.

Los resultados señalan que *O. laucaensis* mantiene su homogeneidad genética a lo largo del río Lauca y presenta una leve estructuración genética con las lagunas de Cotacotani. Los tiempos de expansión poblacional estimados para Lauca (Norte y Sur) y Cotacotani se relacionan con la datación del colapso del volcán Parinacota (alrededor de 8.000 años atrás). Sin embargo, la población presente en el Bofedal de Ancuta muestra profundas

diferencias genéticas con el resto de los sitios muestreados, sugiriendo la existencia de un proceso de divergencia antiguo. Además, la ausencia de diversidad genética observada en la población de Ancuta podría deberse a sucesivos cuellos de botellas poblacionales generados por reiterados períodos de desecación y pérdida de su hábitat, como consecuencia de las variaciones en el régimen de precipitaciones.

## ABSTRACT

*Orestias* genus is the most conspicuous group of fishes in the Altiplanic region and is found from Lacsha, Peru to Ascotan Salt-lake in the North of Chile. Species inhabiting the Chilean Altiplanic area are characterized by small population sizes and local endemism. In the Lauca's National Park, Arica and Parinacota Region, Chile, four species have been described: *O. parinacotensis* in the Parinacota cushion bog, *O. chungarensis* in Chungará Lake, *O. piacotensis* in Piacota Lagune and *O. laucaensis* in Cotacotani Lagunes, Lauca River and in the cushion bogs associated to the river. The presence of these species in separated aquatic systems may represent an early stage of a speciation process that could be linked to Holocenic events. During this period, this Altiplanic region was particularly affected by both strength volcanic and tectonic activity that lead to the formation of endorreic basins. Among these species, *O. laucaensis* present a broader distribution range. In this context I evaluate how the changes in the Lauca river basin during the Holocene influenced the genetic diversity of *O. laucaensis*.

Results show that *O. laucaensis* maintains its genetic homogeneity along Lauca river and show low level of genetic differentiation with Cotacotani Lagunes. The estimated times of population demographic expansion for Lauca (North and South) and Cotacotani appear related to date of the Parinacota volcano collapse. In contrast, Ancuta population exhibits deep genetic differences in relation to the others samples, suggesting the existence of an old divergence process. Moreover, the absence of genetic diversity in the Ancuta population could be a consequence of repeated bottlenecks as a consequence or cyclical periods of desiccation and loss of its habitat due to oscillations on the rainfall regimen.

## 1. INTRODUCCIÓN

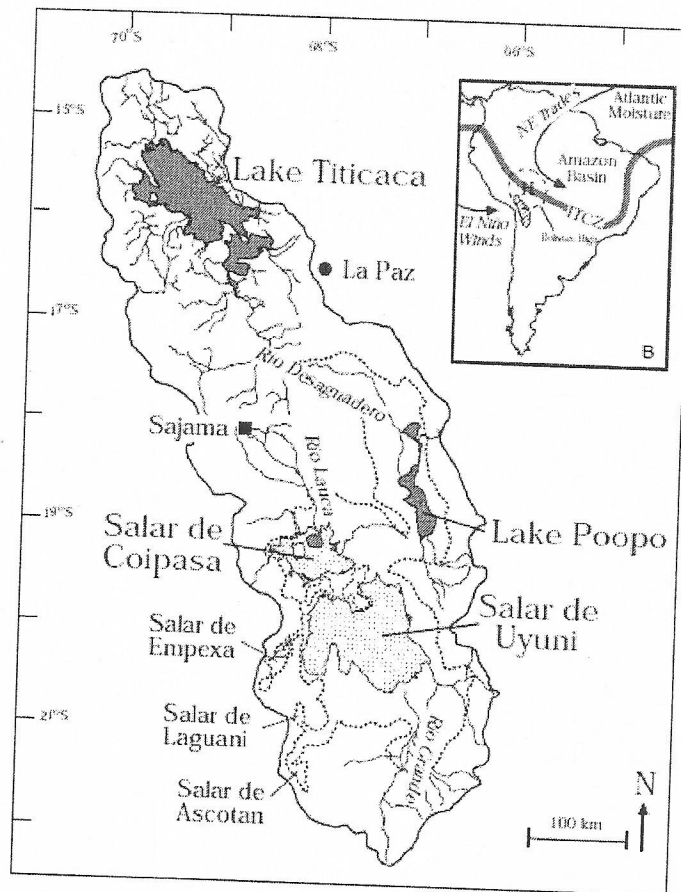
La diferenciación genética entre poblaciones se ve afectada por procesos microevolutivos como la selección natural, el flujo génico y la deriva genética (Hedrick, 2000). En poblaciones donde las variaciones geográficas han determinado cierto grado de separación física, la interrupción o permanencia del flujo génico tiene efectos significativos sobre las trayectorias evolutivas y la organización espacial de las poblaciones (Leclerc y col, 2008). Esta fuerza microevolutiva se considera como el principal responsable de la cohesión genética entre poblaciones de una misma especie (Petit & Excoffier 2009) siendo posible relacionar la diferenciación genética con la ausencia o presencia de un flujo génico, así como su intensidad y su dirección (Westberg & Kadereit 2009).

Se ha observado, en especies de peces marinos, la existencia de bajos niveles de estructuración poblacional, lo que se asocia a historias de vida, grandes habilidades de dispersión y ausencia de barreras hidrográficas (Cardenas y col, 2009). En contraste a lo anterior, se ha demostrado que los peces de agua dulce tienden a presentar mayores niveles de estructuración genética (Ward y col, 1994). Esto se explicaría por la limitada dispersión de adultos y larvas en los ambientes de agua dulce debido a la separación del hábitat entre las cuencas (Leclerc y col, 2008). Así mismo, se ha observado que eventos glaciales tendrían una influencia sobre la diversidad genética al reducir los tamaños poblacionales. Estudios desarrollados en especies de la familia *Galaxiidae* han demostrado la incidencia de los eventos de glaciación del Pleistoceno y



la orogenia del cordón de Los Andes sobre los patrones de estructuración genética de esta especie (Zemlak y col, 2008). De la misma forma, eventos geomorfológicos generan cambios en la estructura del paisaje que pueden llevar a fenómenos de aislamiento y posterior especiación. La zona del Altiplano es un buen ejemplo de este tipo de fenómenos por lo que resulta interesante estudiar de qué manera han incidido estos eventos en los procesos micro y macroevolutivos de la fauna íctica de la zona.

El Altiplano (14°S-22°S) corresponde a la zona ubicada entre los 4000 – 5000 msnm, caracterizada por cuencas endorreicas expuestas a alta radiación y bajas temperaturas (figura 1). El clima de la región se ha descrito como semiárido presentando dos regímenes de precipitación: una temporada seca y otra húmeda (también denominado invierno altiplánico o boliviano), en la cual, precipitan alrededor de 50-200 mm por año entre los meses de diciembre a marzo (Risacher y col, 1999). Estas variaciones interanuales en el régimen pluvial, generan variaciones en los niveles de agua de los sistemas lacustres modificando las condiciones fisicoquímicas de estos (Dorador y col, 2003). La zona Sur del Altiplano (18°S-22°S) abarca las Regiones de Arica y Parinacota, Antofagasta y Atacama, y en ella se encuentran diversas cuencas endorreicas que contienen diferentes sistemas lacustres como bofedales, lagunas, lagos y ríos.



**Figura 1. Mapa de la zona del Altiplano (14°S-22°S) (Placzek y col, 2006).**

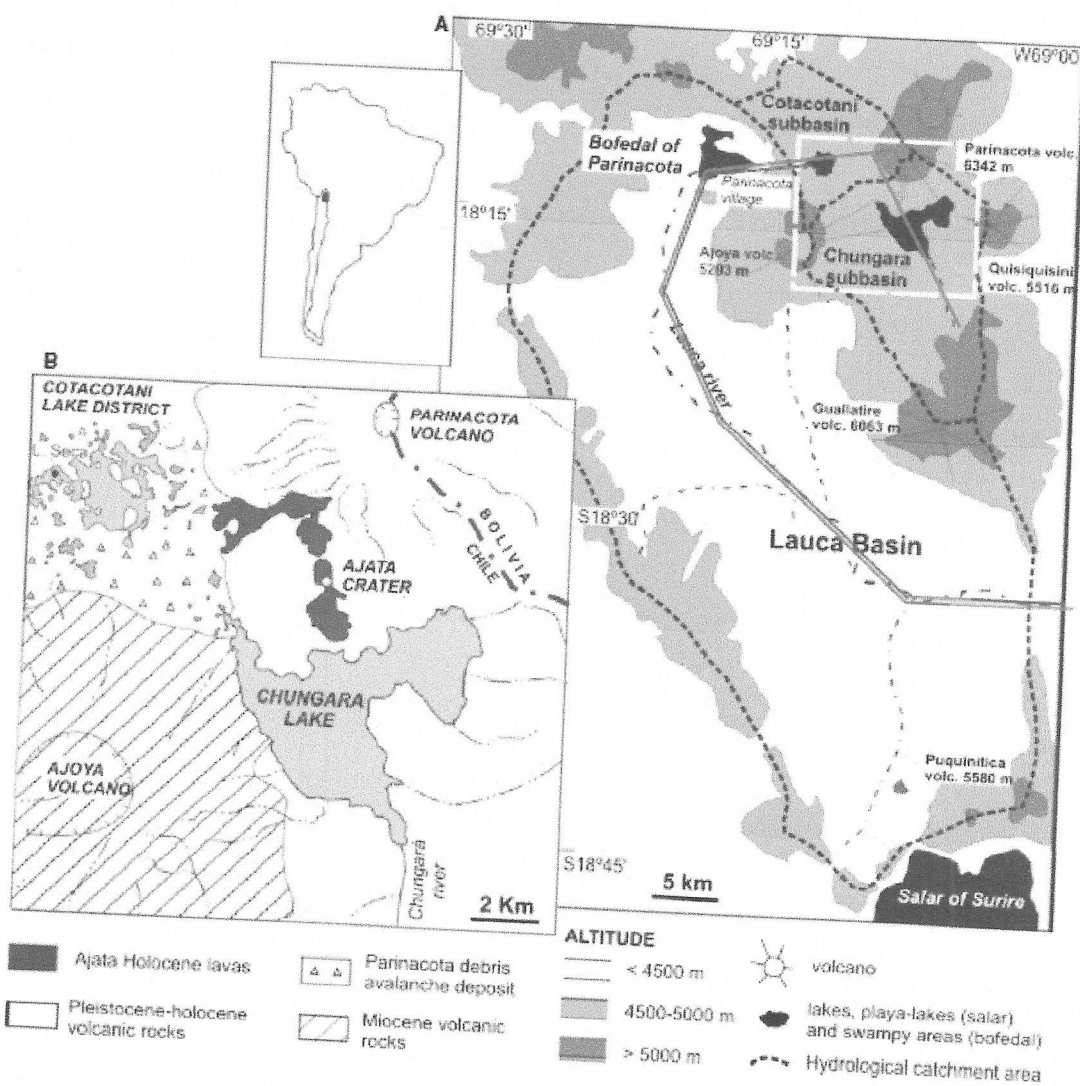
El levantamiento de la región altiplánica habría comenzado durante el Mioceno temprano (alrededor de 25 Ma) y se vio afectado por una intensa actividad volcánica y tectónica, las cuales modificaron la zona dando origen a la geomorfología actual (Allmendiger y col, 1997). Durante el Pleistoceno, episodios alternados de expansión y retrocesos de los glaciares y paleolagos, en conjunto con episodios de vulcanismo y tectónica de placas, habrían originado los sistemas lacustres presentes actualmente, en el Altiplano (Fornari y col, 2001; Placzek y col, 2006). En la zona Sur del Altiplano, la extensión de estos paleolagos alcanzó su máximo a una altura de 3.780 msnm con el paleolago Tauca (Fornari y col, 2001). Sobre esta altura, la existencia de cuencas

endorreicas se asocia a las precipitaciones y deshielos. Dentro de estas cuencas destaca la cuenca del río Lauca, la cual se ubica sobre los 4.000 msnm y se extiende desde los 18°10' S hasta los 18°40'S. Los aportes superficiales de agua que recibe la cuenca provienen de quebradas y riachuelos que nacen de cumbres englaciadas, sin embargo sus principales caudales se producen por aportes pluviales (DGA, 2004).

A fines del Pleistoceno, el paleorío Lauca fluía hacia el norte desde Guallatiri hasta Cotacotani pasando entre los volcanes de Ajoja y Parinacota. Posteriormente se dirigía hacia el oeste hacia el pueblo de Parinacota y finalmente giraba hacia el sur alrededor de 100 km retornando hacia Bolivia (figura 2) (Sáez y col, 2007). Durante el Holoceno, alrededor de 8.000 años atrás, las avalanchas fluviales y el posterior colapso del volcán Parinacota, habrían cambiado la topografía de la región altiplánica cubriendo alrededor de 140 km<sup>2</sup> (Clavero y col, 2002; Clavero y col, 2004). Estos sucesos modificaron la cuenca del río Lauca, dando origen a diversos sistemas lacustres, entre ellos el lago Chungará y las lagunas de Cotacotani (Giralt y col, 2007; Sáez y col, 2007).

Las variaciones geomorfológicas que sufrió la cuenca del río Lauca durante el Pleistoceno y, particularmente en el Holoceno, conllevaron al aislamiento geográfico de los diferentes cuerpos de agua actuales. Esto ha generado ecosistemas, que en conjunto con las particulares características ambientales del Altiplano, han permitido el desarrollo de una biodiversidad única. Debido a estas razones resulta interesante

evaluar de que manera estos cambios en la estructura del paisaje han incidido sobre la diferenciación genética y eventos especiación de la ictiofauna de la zona.



**Figura 2.** Mapa de la cuenca del río Lauca y las dos subcuencas que se originaron posteriormente al colapso del volcán Parinacota. En rojo se muestra como fluía el paleo río Lauca previo al colapso, en azul se muestra la actual disposición del río (modificado de Sáez y col, 2007).

La ictiofauna de la región ha sido caracterizada por presentar una baja diversidad taxonómica con un elevado grado de endemismo (Vila y col, 1986). Se han descrito tres géneros nativos de peces teleósteos en la zona del Altiplano: *Astroblepus*, *Trichomycterus* y *Orestias*. De estos, sólo *Trichomycterus* y *Orestias* se han encontrado en el Altiplano chileno (Parenti, 1984a).

En particular, *Orestias* corresponde al único género de la familia *Cyprinodontidae* que colonizó Sudamérica, en la actualidad el género se distribuye desde los 9°S en el lago Lachsa, Perú, hasta los 22°S en el salar de Ascotán, norte de Chile. (Vila y col, 2010). Parenti 1984 describió 4 complejos monofiléticos diferenciados por el patrón de escamación, forma del cuerpo, patrón de neuromastos y caracteres merísticos en la zona; el complejo *cuvieri* con 4 especies, complejo *mulleri* con 5 especies, complejo *gilsoni* con 10 especies y el complejo *agaziissi* con 26 especies. La gran cantidad de especies que presenta el género se ha asociado a tasas de especiación inusualmente altas. Esto ha llevado a describir el género *Orestias*, al igual que los peces de la familia *Cichlidae* en los lagos africanos, como un enjambre de especies o "Species Flock", definido como un ensamble monofilético compuesto por un número alto de especies endémicas circunscritas a un área determinada (Greenwood, 1984). Se han descrito principalmente dos mecanismos de especiación asociados al gran número de especies del género *Orestias*. La presencia de 23 morfoespecies en el lago Titicaca se explicaría por un fenómeno de especiación simpátrica, mediante una especialización del nicho, mientras que en la zona del Altiplano Sur, la existencia de 21 morfoespecies, sería consecuencia de procesos de variación geológica que fragmentaron la zona en

diversos ríos y lagos, manteniendo las poblaciones separadas por alopatria (Villwock, 1983).

En la zona norte del Altiplano chileno, dentro del Parque Nacional Lauca, se han descrito 4 morfoespecies pertenecientes al complejo *agaziissi* basadas en caracteres morfológicos y merísticos: *Orestias chungarensis* Vila & Pinto, 1986 en el lago Chungará, *Orestias piacotensis* Vila, 2006 descrita para la laguna de Piacota, *Orestias parinacotensis* Arratia, 1982 presente en el bofedal de Parinacota y *Orestias laucaensis* Arratia, 1982 descrita en la cuenca del río Lauca y las lagunas de Cotacotani. Dado que la actual geomorfología de la zona es reciente, el género *Orestias* resulta un modelo interesante para estudiar el fenómeno de diferenciación genética y los procesos incipientes de especiación.

Dentro de las especies presentes en la cuenca del río Lauca se destaca *Orestias laucaensis*. A diferencia de las otras especies presentes en la cuenca del río Lauca, *O. laucaensis* se distribuye en tres tipos de ambientes: en el río Lauca, en los bofedales asociados al río y en las lagunas de Cotacotani. Tomando en cuenta que las especies del género *Orestias* presentan la capacidad de ocupar ambientes distintos, este estudio propone evaluar la distribución de la diversidad genética existente entre las distintas poblaciones de *Orestias laucaensis* a lo largo de la cuenca del río Lauca.

Desde el punto de vista de la conservación, *Orestias laucaensis* es una especie considerada en peligro de extinción por presentar tamaños poblacionales reducidos y hábitats restringidos (Vila y col, 2007). Por un lado, su hábitat ha sido históricamente

intervenido para la extracción de agua, principalmente para usos consuntivos (Salazar, 2003). Por otro lado, se han introducido dentro de la cuenca del río Lauca truchas con el fin de incrementar la producción pesquera (*Salmo trutta* Linneau, 1785 y *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) (Vila & Pardo 2008). Desde un punto de vista genético, el estudio poblacional de *O. laucaensis* es una poderosa herramienta que permite detectar tanto, el estado en el que se encuentran las poblaciones, como la sensibilidad de estas frente a cambios abruptos en sus tamaños poblacionales, aportando de esta forma, información relevante para la toma de decisiones y programas de manejo de la cuenca del río Lauca.

## 2. HIPÓTESIS

Asumiendo la continuidad de su hábitat, *Orestias laucaensis* mantendría su homogeneidad genética a lo largo del río Lauca y los sistemas fluviales y lacustres asociados a este.



### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Evaluar la distribución geográfica de la diversidad genética de *Orestias laucaensis* a lo largo del río Lauca y de las lagunas Cotacotani.

#### Objetivos Específicos

- Analizar la diversidad haplotípica de *Orestias laucaensis* en cada uno de los diferentes sistemas acuáticos a lo largo del río Lauca.
- Evaluar la existencia de diferencias genéticas entre poblaciones locales de *Orestias laucaensis* a lo largo del río Lauca y en los diferentes ambientes de la cuenca.
- Inferir la historia demográfica de *Orestias laucaensis* en la cuenca del río Lauca.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Sitio de muestreo

Se colectaron muestras de 40 individuos de *Orestias laucaensis* por sitio (figura 3): a lo largo del río Lauca (Lauca Norte), en los bofedales asociados al río: Bofedal de Misituni (Misituni), río Lauca y bofedal de Ancuta (Ancuta), en el río Chusjavida y en las lagunas de Cotacotani ubicados en la región de Arica y Parinacota (figura 4 y tabla 1). Las muestras se obtuvieron en 2 campañas correspondientes a Octubre del 2008 y Noviembre del 2009.

**Tabla 1. Coordenadas geográficas de los distintos sitios de muestreo de *O.laucaensis*.**

Sitio	Lugar	Coordenadas	
		S	W
Lauca Norte	Río Lauca	18.19379	69.27360
Misituni (Bofedal de Misituni)	Río Lauca	18.38076	69.34923
Ancuta (Bofedal de Ancuta)	Río Lauca	18.44611	69.19486
Cotacotani 1	Lagunas de Cotacotani	18.20554	69.23104
Cotacotani 2	Lagunas de Cotacotani	18.19072	69.24300

Las muestras fueron fijadas en etanol 95% y se etiquetaron con el nombre de la localidad y fecha de colecta, para posteriormente trasladarlas al laboratorio de Ecología Molecular (LEM), Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

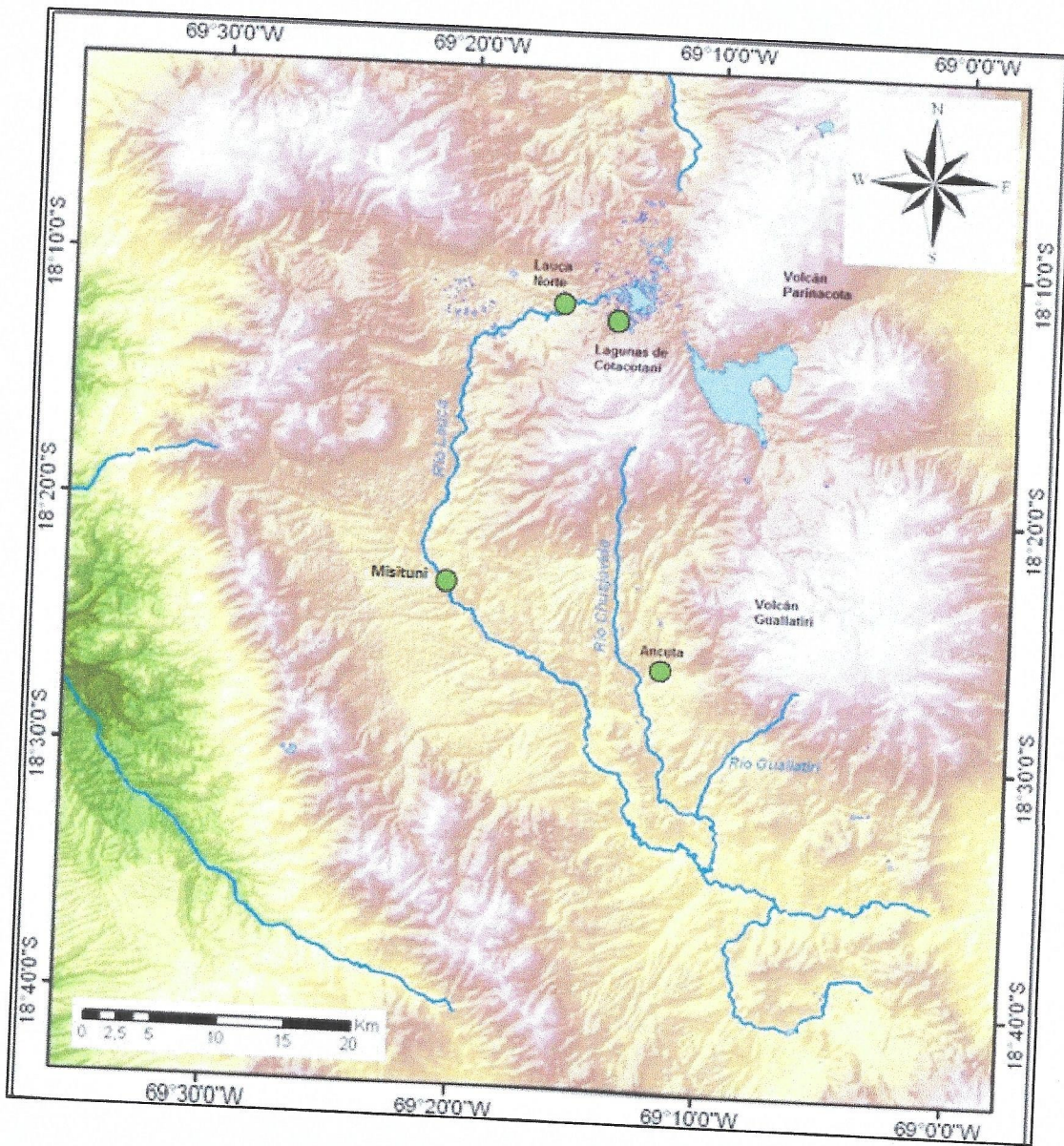
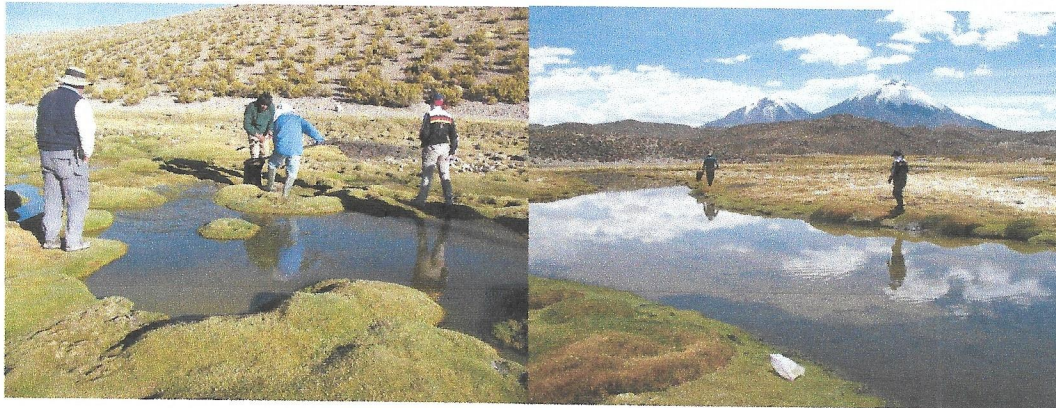


Figura 3. Sitios de muestreo para *O. laucaensis*





**Figura 4. Sitios de colecta para *O. laucaensis*. A la izquierda se observa la captura de individuos en el bofedal de Ancuta. En la imagen de la derecha se observa el sitio de colecta Lauca Norte.**

#### **4.2 Extracción de ADN, obtención de productos de amplificación y secuenciación.**

A partir de cortes de músculo de aleta dorsal se realizó la extracción de ADN basado en el método de extracción salina (Aljanabi & Martínez 1997). Para cuantificar y determinar la pureza del ADN extraído se empleó el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000.

La amplificación de la región control del ADN mitocondrial (D-Loop) se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) empleando los partidores específicos descritos por Morales (2009) para el género: directo (DO-F) de 19 nucleótidos e inverso (DO-R) de 21 nucleótidos con las siguientes secuencia:

5' ACC CCT AAC TCC CAA AGC T 3' DO-F

5' TGA TAG TAA AGT CAG GAC CAA 3'.DO-R

La reacción de PCR se optimizó en un volumen de 25  $\mu$ l que contenían 2,5  $\mu$ l de Buffer de PCR 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,0  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 2,0  $\mu$ l de cada partidor a 10 pm/ $\mu$ l, 2,0  $\mu$ l de cada dNTP 2,5 mM, 0,5  $\mu$ l Taq (Invitrogen), 9  $\mu$ l de agua ultra pura, 1  $\mu$ l DMSO y 10 ng/ $\mu$ l de ADN. Se utilizó el siguiente ciclo térmico: una primera fase de denaturación a 94°C durante 5 minutos, seguida de 38 ciclos compuestos por una fase de denaturación de 45 segundos a 94°C, luego una fase de apareamiento (annealing) a 66°C durante 1 minuto 30 segundos y una etapa de extensión de 1 minuto 30 segundos a 72°C. Finalmente, se realizó una última fase de extensión de 10 minutos. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para verificar una amplificación positiva. Posteriormente los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen Inc., en Corea del Sur ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

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

Las secuencias del D-Loop obtenidas fueron alineadas, editadas y ensambladas manualmente utilizando el programa Proseq v.2.91 (Filatov, 2002). El cálculo de los diferentes índices de diversidad genética se realizó empleando el programa DNA Sequence Polimorphism, DnaSP v.5. (Librado & Rozas 2009), estos índices son:

Número de haplotipos (K). Número total de haplotipos.

Para determinar el efecto de las diferencias en los tamaños muestrales sobre el número de haplotipos, se realizaron rarefacciones individuales empleando el programa PAST versión 1.75 (Hammer y col, 2001).

Número de sitios polimórficos (S). Número de sitios en las secuencias que presentan diferencias en los nucleótidos.

Diversidad haplotípica (H). Probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar sean diferentes, descrita por la ecuación 1.

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

ecuación 1

Donde  $n$  representa el tamaño muestral,  $k$  es el número de haplotipos y  $p_i$  es la frecuencia relativa de cada haplotipo  $i$  (Nei, 1987). Si  $H = 0$  significa que todos los alelos son iguales en la población; si  $H = 1$  todos los alelos son diferentes.

Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ ): Corresponde al número promedio de todas las combinaciones entre pares de secuencias.

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}$$

ecuación 2

Donde  $n$  representa el tamaño de la muestra,  $d_{ij}$  es un estimado del número de mutaciones ocurridas desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ,  $k$  es el número de haplotipos y  $p$  es la frecuencia del haplotipo  $i$  y  $j$  respectivamente.

#### **4.4 Construcción de la red de haplotipos.**

Para la representación gráfica de las relaciones entre los distintos haplotipos se construyó la red de haplotipos (network) empleando el algoritmo *median joining network* en el programa Network 4.5.0.2 (Bandlet y col, 1999). Esta red permite observar la posición y distancia entre los haplotipos. Cada haplotipo diferente es

representado por un círculo donde el tamaño de estos varía según la frecuencia de dicho haplotipo y la distancia entre estos equivale al número de pasos mutacionales que hay entre ellos.

#### 4.5 Nivel de diferenciación genética.

Para determinar el nivel de diferenciación genética entre cada par de poblaciones de *O. laucaensis* se realizó un test de  $\Phi_{ST}$  pareados (pairwise  $\Phi_{ST}$ ) con el programa Arlequin v.3.11 (Excoffier y col, 2005). El método se basa en el número de nucleótidos diferentes entre dos haplotipos a partir de la ecuación 3.

$$\delta_{xy} = \sum \delta_{xy}(i) \quad \text{ecuación 3}$$

Donde  $\delta_{xy}$  es la función de Kronecker que toma valor 1 si los nucleótidos del sitio *i*-ésimo son idénticos para ambos haplotipos o 0 si no lo son (Excoffier y col, 2005).

Para analizar la estructura genética en función de la componente geográfica se realizó un Análisis de Varianza Molecular Espacial, SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance; (Dupanloup y col, 2002). El método busca la maximización de la varianza genética producto de la diferencia del número óptimo de grupos de poblaciones, para esto los grupos deben cumplir con la condición de ser genéticamente homogéneas y geográficamente cercanas.

#### 4.6 Inferencia demográfica

Con el fin de determinar rastros de expansión poblacional en el pasado, se realizaron los test de neutralidad de Tajima (Tajima, 1989) y Fu (Fu, 1997), ambos se basan en un modelo de sitio infinito, sin recombinación. Valores positivos y significativos del índice de Tajima (D) y Fu (Fs) evidencian un déficit de alelos, lo que es esperable de un cuello de botella, por el contrario valores significativos y negativos señalan un exceso de alelos, evidenciando un fenómeno de expansión poblacional. Se ha observado que el test de Fu, tiende a ser más sensible a cambios en los tamaños poblacionales, por lo que frente a muestras de diferentes tamaños el test de Tajima resulta ser menos potente (Fu, 1996).

Se construyó, adicionalmente, la distribución de número de diferencias entre pares de secuencias (mismatch) empleando el programa DNA Sequence Polimorphism, DnaSP v.5. (Librado & Rozas 2009). En los casos pertinentes, se ajustó para cada sitio la distribución mismatch al modelo de crecimiento instantáneo de Rogers & Harpending (1992) para estimar el tiempo desde una posible expansión. Esta estimación se realizó bajo la hipótesis del Reloj Molecular y se emplearon las ecuaciones 4 y 5:

$$t = \frac{\tau}{2u} \quad \text{ecuación 4}$$

$$u = \left( \frac{\mu}{1.000.000} \right) \times n \quad \text{ecuación 5}$$

Donde  $u$  es la tasa de sustitución del fragmento de ADN,  $\tau$  corresponde al valor de  $\theta$  ( $\pi$ ) ajustado al modelo de Rogers & Harpending (1992),  $t$  tiempo desde la expansión,  $\mu$



es la tasa de mutación por nucleótidos y  $n$  es el largo de la secuencia bajo estudio (Rogers & Harpending, 1992).

## 5. RESULTADOS

Se colectaron muestra de un total de 162 individuos provenientes de los 5 sitios de muestreo. Para evaluar la existencia de estructuración genética dentro de las lagunas de Cotacotani se muestrearon 2 sitios ( $N_1=39$ ,  $N_2=5$ ). Dado que no se observó ninguna diferencia significativa entre los sitios, ambos se consideraron como una sola población.

### 5.1 Diversidad Genética.

Se obtuvo un total de 162 secuencias de 890 pares de bases.

En la tabla 2 se muestran los índices de diversidad genética determinados para las poblaciones correspondientes a los diferentes puntos de muestreo en la cuenca del río Lauca.

El número de haplotipos varió entre 1-9 siendo la población de Ancuta aquella que presentó el menor número de haplotipos ( $n=1$ ). Las poblaciones de Misituni y Cotacotani presentaron un mayor número de sitios polimórficos (S) con valores de  $S=7$  y  $S=9$  respectivamente.

Respecto a la diversidad haplotípica (H) se observa que la población de Cotacotani es la que presenta un mayor índice con un  $H= 0,493$ , por el contrario la población de Ancuta no presentó diversidad haplotípica con  $H=0$ .

La población de Cotacotani presentó el mayor número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ ) con un valor de  $0,637$ .

## **5.2 Red de Haplotipos.**

En la figura 5 se muestra la red de haplotipos o network construido a partir de la matriz de secuencias. Se observa, para las secuencias de Lauca Norte, Misituni y Cotacotani, un patrón en forma de estrella con un haplotipo central, el cual es compartido entre los tres sitios, además, se presentan varios haplotipos raros y de baja frecuencia separados por 1 o 2 pasos mutacionales, característico de una señal de expansión. Se observa además que las localidades de Cotacotani y Misituni presentan un haplotipo compartido. La localidad de Ancuta presenta sólo un haplotipo separado por 8 pasos mutacionales del haplotipo central.

Tabla 2. Índices de diversidad genética calculados para cada una de las poblaciones muestreadas y para el total de las secuencias. Índices obtenidos para los test de Neutralidad de Tajima (D) y Fu (Fs) Los valores con  $p < 0,05$  se indican por con el símbolo \*, valores no significativos se indican por el siglas <sup>NS</sup>.

	Tamaño muestral	Nº de sitios polimórficos (S)	Diversidad haplotípica (H)	Nº promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ )	Nº de haplotipos (K)	Rarefacción Nº de haplotipos	Desviación Estándar Nº de Haplotipos	Índice Tajima (D)	Índice Fu (Fs)
Lauca Norte	37	1	0,054	0,054	2	1,892	0,311	-1,131 <sup>NS</sup>	-1,385*
Misituni	48	6	0,34	0,368	7	5,631	0,939	-1,869*	-6,143*
Cotacotani	44	9	0,493	0,637	9	7,250	1,063	-1,984*	-6,877*
Ancuta	33	0	0	0	1	1	0	-	-
Total	162	23	0,531	3,207	16	-	-	-	-

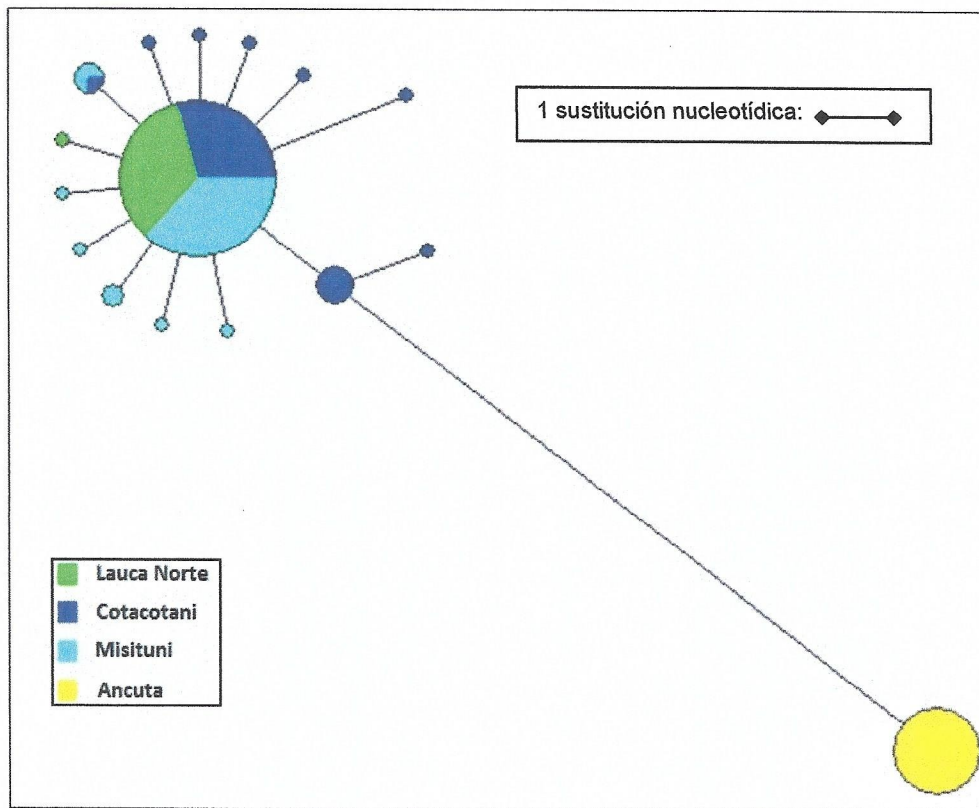


Figura 5. Red de Haplotipos (network) para las localidades de Lauca Norte, Misituni, Ancuta y Cotacotani

### 5.3 Distribución geográfica de la diversidad genética

El test de  $\Phi_{ST}$  pareados (tabla 3) realizado para analizar la diferenciación genética entre las poblaciones muestra una diferenciación muy significativa de la población de Ancuta respecto a las poblaciones de Cotacotani, Lauca Norte y Misituni con valores de  $\Phi_{ST}$  de 0,960 0,997 y 0,976 respectivamente. Estos valores se relacionan con lo observado en la red de haplotipos (figura 5) en donde se aprecia una clara separación de la población de Ancuta respecto a las poblaciones de Cotacotani, Lauca Norte y Misituni, las cuales comparten haplotipos entre sí. Se observó, por otra parte, que la población de Cotacotani muestra diferencias significativa con ambas localidades del río

Lauca, a pesar de los bajos valores de los índices de diferenciación ( $\Phi_{ST} = 0.053$  y  $0.045$ ). Finalmente, las muestras de Lauca Norte y Misituni no mostraron diferencias significativas entre ellas.

**Tabla 3. Bajo la diagonal: Valores obtenidos a partir del test  $\Phi_{ST}$  pareados. Sobre la diagonal se muestran los valores de p entre cada par destacándose en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .**

	Cotacotani	Lauca Norte	Misituni	Ancuta
Cotacotani	-	<b>0,013</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>
Lauca Norte	0,053	-	0,166	<b>0,000</b>
Misituni	0,045	0,011	-	<b>0,000</b>
Ancuta	0,960	0,997	0,976	-

En la tabla 4 se muestra el análisis de la estructuración genética realizada por medio del análisis de la varianza molecular en el espacio o SAMOVA (Spatial Analysis of the MOlecular Variance). Se separaron las poblaciones en dos y tres grupos respectivamente y se analizó el porcentaje de variación entre y dentro de los grupos. Se observa que la máxima variación (96,6%) se obtuvo al separar la muestra en dos grupos:

Grupo 1: Cotacotani, Lauca Norte y Misituni.

Grupo 2: Ancuta

Si bien, los resultados sugieren la separación de las poblaciones en dos grupos genéticamente diferenciados, la carencia de significancia de estos se asocia al bajo número de sitios permutados. Esto se explica debido a que al ser tan bajo el número de localidades, su remuestreo se hace más probable disminuyendo la significancia del test.

**Tabla 4. Porcentajes de variación entre, dentro de los grupos y entre poblaciones obtenidos a partir del análisis con SAMOVA.**

Nº.de Grupos	Porcentaje de variación entre grupos	Porcentaje de variación entre poblaciones	Porcentaje de variación dentro de los grupos
2	96,6	0,19	3,21
3	94,13	0,02	5,85

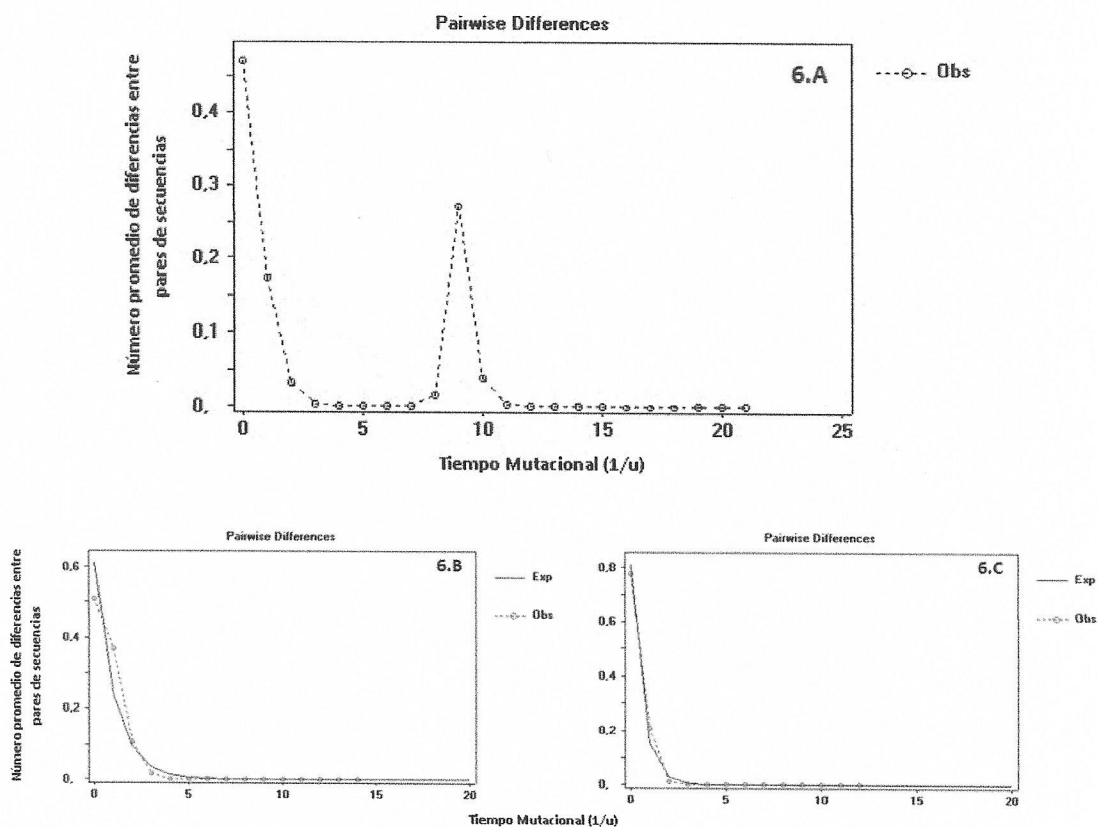
#### 5.4 Inferencia Demográfica

En la figura 6 se muestra la distribución del número promedio de diferencias entre pares de secuencias o mismatch. Se observa en la figura 6.A que la mismatch construida a partir de las secuencias de los 4 sitios de muestreo presenta una distribución bimodal. A continuación se procedió a realizar la mismatch para las localidades de Cotacotani (6.B) y Lauca (Norte y Misituni) que se aprecia en la figura 6.C, las cuales se ajustan al modelo esperado Rogers & Harpending (1992) permitiendo la estimación de los valores de  $\tau$ .

La estimación de los tiempos a la expansión para cada población se realizó empleando una tasa mutacional de 2.8% descrita para D-Loop en el género *Cyprinodon*, familia *Cyprinodontidae* (Strecker y col, 1996). A partir de esta tasa se calcularon los valores de los tiempos a la expansión para cada población empleando los valores de  $\tau$  obtenidos de la distribución mismatch (figura 6.B y 6.C). Debido a que las poblaciones de las localidades de Lauca Norte y Misituni no mostraron una diferenciación genética significativa, se consideraron como una sola población, obteniendo 12.781 y 4.675 años para las poblaciones de Cotacotani y Lauca (Norte y Misituni) respectivamente. Para la población de Ancuta no se pudo estimar el tiempo a la expansión, ya que, solo



presentó un haplotipo por lo que, no se pueden determinar los valores  $\theta$  ( $\pi$ ), y por lo tanto, tampoco para  $\tau$ .



**Figura 5. Distribución del número promedio de diferencias entre pares de secuencias (mismatch). 6.A corresponde a la mismatch realizada para las 4 localidades. La figura 6.B corresponde a la mismatch realizada para la población de Cotacotani, finalmente la figura 6.C corresponde a la mismatch de las localidades de Lauca (Norte y Misituni)**



## 6. DISCUSIÓN

En primer lugar, se destaca la gran diferenciación entre la población del Bofedal de Ancuta respecto a las de Lauca Norte, Misituni y Cotacotani, conformando así dos haplogrupos separados por 8 pasos mutacionales. Esta distancia representa alrededor de 1 % de divergencia entre ambos grupos, valor similar a la divergencia observada entre otras especies de *Orestias* (Scott, 2010). Estos resultados sugieren que la población presente en la localidad de Ancuta podría ser una unidad taxonómica distinta.

Esta diferencia podría explicarse por la ausencia de conexión directa entre el bofedal de Ancuta y el río Lauca, debido a que el primero recibe sus aguas del río Chusjajida, el cual se conecta más al sur con el río Lauca (figura 3). Otra posible explicación podría asociarse a diferencias en la composición fisicoquímica del agua, oferta ambiental, diferencias en el caudal, entre otros factores abióticos que pueden llevar a un fenómeno de aislamiento y adaptación local, que termine por generar un proceso de especiación. En ambos casos, la separación de estos dos taxa que habría iniciado la divergencia molecular sería muy anterior a los cambios geomorfológicos a los que estuvo expuesta la cuenca del río Lauca durante la transición Pleistoceno - Holoceno (Sáez y col, 2007). Bajo la hipótesis del reloj molecular, ambos haplogrupos se habrían separado hace aproximadamente 4 tiempos mutacionales atrás, es decir más de 150.000 años atrás ( $\mu = 2.8\%$ ). La población de Ancuta merece especial atención, ya que no presenta diversidad genética por sólo mostrar un haplotipo para la región control del ADNmt. Esta ausencia de diversidad podría atribuirse al efecto de

recurrentes periodos de desecación y recuperación de su hábitat producto de las constantes variaciones en el régimen de precipitaciones. Como resultado, los sucesivos cuellos de botellas poblacionales habrían permitido que la deriva génica actuara con mayor intensidad facilitando la pérdida de diversidad genética. Pese a que todas las localidades están expuesta al mismo régimen climático, algunas particularidades del sitio de Ancuta podrían haber acentuadas estos efectos: mayor aislamiento de esta población, tamaño poblacional reducido o un caudal más susceptible a las variaciones pluviales, son algunas de las explicaciones posibles de este patrón. Muestras recolectadas en junio del 2010 en nuevas localidades asociadas al Río Chusjávída podrían aportar elementos de respuestas a este patrón singular de diversidad genética observado en Ancuta.

Pese a tratarse de ambientes diferentes (río vs. bofedal), los resultados señalan la ausencia de una diferenciación genética entre las poblaciones de Lauca Norte y Misituni. Esto sugiere la existencia de una conectividad importante entre ambas localidades, manteniendo de esta forma la homogeneidad genética entre estas dos poblaciones de *O. laucaensis* a través del río. En contraste, las muestras colectadas en el río Lauca y en las lagunas de Cotacotani mostraron diferencias significativas. Sin embargo, los índice de estructuración son bajos ( $\Phi_{ST} = 0,053$  y  $0,045$ ) y sugieren la existencia de un flujo genético limitado entre estas localidades. Ambos sistemas están físicamente conectados por medio de un exutorio estrecho entre las lagunas de Cotacotani y el río Lauca (Risacher y col, 1999) que podría limitar a la migración de peces entre ambos sistemas.

Las señales de expansión que se observan en las poblaciones de Cotacotani y Lauca (Norte y Misituni), podrían relacionarse con los cambios sufridos por la cuenca del río Lauca debido al colapso del volcán Parinacota, hace aproximadamente 8.000 años (Clavero y col, 2002; Clavero y col, 2004). Estos cambios habrían tenido un impacto catastrófico sobre la fauna íctica de la cuenca, generando una drástica pérdida de diversidad genética. Posteriormente, las poblaciones remanentes habrían comenzado a recuperarse y expandirse, señal que se observa en la figura 5. Los tiempos de expansión poblacional obtenidos para las 3 localidades presentes en el río Lauca, señalan un crecimiento reciente que coincidiría con los tiempos estimados para el colapso del volcán Parinacota (8.000 años atrás) y posterior desvío del cauce del río Lauca, permitiendo la formación de la geomorfología actual de los cuerpos de agua (Sáez y col, 2003).

## 7. CONCLUSIÓN

La conectividad existente entre el río Lauca y los sistemas acuáticos asociados a este, ha permitido la mantención de la cohesión genética de *Orestias laucaensis* entre las poblaciones presentes a lo largo del río Lauca y las Lagunas de Cotacotani. Sin embargo esta cohesión no se mantendría a lo largo de toda la cuenca lo que se observa en la localidad de Ancuta donde no se aprecia conectividad entre el río y el bofedal de Ancuta, frente a lo cual se podría hablar de un fenómeno de divergencia. Debido a que no se observa conectividad entre la población de Ancuta con las poblaciones del río Lauca (Norte y Misituni) y de las lagunas de Cotacotani, resulta importante el desarrollo de muestreos que abarquen las zonas de conexión entre el río Lauca y sus afluentes de modo de evaluar la existencia de conectividad en zonas mas al Sur del área de estudio.

La baja diversidad observada así como las cortas genealogías entre los haplotipos refleja poblaciones jóvenes en el Río Lauca y las lagunas Cotacotani, respecto al ancestro común mas reciente. Los eventos geomorfológicos descritos para la zona de estudio, habrían incidido sobre las poblaciones presentes en el (paleo) río Lauca generando la pérdida de diversidad genética. El crecimiento demográfico de estas poblaciones remanentes habría dado origen de las poblaciones actuales. Por otra parte, es posible que las variaciones estacionales en los niveles de agua hayan incidido sobre la población de Ancuta generando sucesivos cuellos de botellas que hayan llevado a la fijación de un solo alelo.

Respecto a la relevancia en la conservación de este estudio, se observa que la población de Ancuta se diferencia de las poblaciones presentes a lo largo del río Lauca y en las Lagunas de Cotacontani. Esto permite distinguir dos unidades de conservación: La población presente en el bodefal de Ancuta, y las poblaciones presentes en el río Lauca (Norte y Sur) y en las lagunas de Cotacotani. De esta forma la población (o especie) de Ancuta presentaría una diversidad única lo que la distingue como una Unidad Evolutiva Significativa (ESU). Debido a que la zona de estudio se encuentra sometida a la extracción de agua e introducción de especie, este estudio entrega información importante para el manejo de la extracción y explotación de los recursos hídricos en el río Lauca y los sistemas acuáticos asociados a este.

Finalmente, resulta importante destacar la necesidad de desarrollar estudios empleando otros marcadores moleculares, los cuales, permitan detectar cambios poblacionales en escalas de tiempo más pequeños debido a la poca sensibilidad del marcador D-Loop a eventos de expansión recientes.

## 8. REFERENCIAS

- Aljanabi, S.M. y Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Allmendinger, R., Jordan, T.E., Kay, M.S. y Isacks, B.L. 1997. The evolution of the Altiplano-Puna plateau of the Central Andes. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 25: 139-174.
- Arratia, G. 1982. Peces del Altiplano de Chile, p. 93-133. *En: El Hombre y los Ecosistemas de Montaña*. A. Veloso y E. Bustos (eds.). Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay.
- Bandelt, H.J., Forster, P. y Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Cardenas, L., Silva, A.X., Magoulas, A., Cabezas, J., Poulin, E. y Ojeda, F.P. 2009. Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the Southern-eastern Pacific Ocean. *Fisheries Research* 100: 109-115.
- Clavero, J.E., Sparks, R.S.J., Huppert, H.E. y Dade, W.B. 2002. Geological constrains on the emplacement mechanism of the Parinacota debris avalanche, northern Chile. *Bulletin of Volcanology*. 64:40-54
- Clavero, J.E., Sparks, S.J., Polanco, E. y Pringle, M.S. 2004. Evolution of Parinacota volcano, Central Andes, Northern Chile. *Revista geológica de Chile*. 31(2): 317-347.
- Dirección General de Aguas (DGA), Ministerio de Obras Publicas. Gobierno de Chile. 2004. Diagnostico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivo de calidad: Cuenca Río Lauca. 86 pp.

Dorador, C., Pardo, R. y Vila, I. 2003. Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76: 15-22.

Dupanloup, S., Schneider, S. y Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*. 11: 2571-2581.

Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.

Filatov, D.A. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2: 621-624.

Fornari, M., Risacher, F. y Féraud, G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 172: 269-282.

Fu, X.Y. (1996) New statistical test of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*. 143: 557-570.

Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.

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

Greenwood, P.H. 1984. What is a Species Flock?. En A.A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, pp. 13-19. University of Maine, Orono.



- Hammer, O., Harper, D., y Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4 (1): 9 pp.
- Hedrick, P. 2000. Gene Flow and Population Structure. P. Hedrick (ed), *Genetics of Populations*. pp 265-306. Jones and Bartlett Publishers. Boston.
- Leclerc, E., Mailhot, Y., Mingelbier, M. y Bernatchez, L. 2008. The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Molecular Ecology*. 17: 1702-1717.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452
- Lüssen, A., Falk, T. 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: 151-160.
- Morales, P. 2009. Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: El caso de *Orestias* (*Teleostei; Cyprinodontidae*) de los salares de Ascotan y Carcote en el Altiplano chileno. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Nei, M., 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Parenti, L.R. 1984a. A taxonomic revision of the Andean Killifish genus *Orestias* (*Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae*). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 178: 107-214.
- Parenti, L.R. 1984b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept. *En* A.A. Echelle e I. Kornfield (eds.), *Evolution of Fish Species Flocks*, pp. 21-25. University of Maine, Orono.



- Parker, A. y Kornfield, I. 1995. Molecular perspective on evolution and zoogeography of Cyprinodontid Killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1995 (1): 8-21.
- Petit, R. y Excoffier, L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*. 24(7): 386-393.
- Placzek, C., Quade, J. y Patchett, P.J. 2006. Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *Geological Society of America Bulletin*. 118:515-532.
- Risacher, F., Alonso, H. y Salazar, C. 1999. Geoquímica de aguas en cuencas cerradas: I, II y III Regiones-Chile. Convenio de Cooperación Dirección General de Aguas, Ministerio de Obras Públicas, Universidad Católica del Norte y Institut de recherche pour le développement. Volumen II. pp. 1-36.
- Rogers, A.R. y Harpending, H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9(3): 552-569.
- Sáez, A., Valero-Garcés, B., Moreno, A., Bao, R., Pueyo, J., González-Sampériz, P., Giralt, S., Taberner, C., Herrera, C. y Gibert, R. 2007. Lacustrine sedimentation in active volcanic settings: the Late Quaternary depositional evolution of Lake Chungará (northern Chile). *Sedimentology*. 54: 1191-1222.
- Salazar, C. 2003. Situación de los recursos hídricos en Chile. Third world centre for water management. 109 pp.
- Schwalb, A., Burns, S. y Kelts, K. 1999. Holocene environments from stable isotope stratigraphy of ostracods and authigenic carbonate in Chilean Altiplano Lakes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 148: 153-168.

- Scott, S. 2010. Sistemática y filogenia de *Orestias* del complejo *agassizii* (Teleostei: Cyprinodontidae) de la Puna. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585-595.
- Vila, I. y Pinto, M. 1986. A new species of killifish (*Pisces, Cyprinodontidae*) from the Chilean Altiplano. *Hydrobiologica Tropical* 19(3-4): 233-239.
- Vila, I., Pardo, R. y Scott, S. 2007. Freshwater fishes of the Altiplano. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 10(2): 201-211.
- Vila, I. y Pardo, R. 2008. Peces límnicos. *En* CONAMA (Ed), Biodiversidad Patrimonio y desafíos. 2ª Edición. pp 302-308.
- Vila, I., Scott, S., Iturra, P., Lam, N. y Méndez, M. 2010. The species of genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the southern Altiplano. *En* J. Nelson, H. Schultze & M. Wilson(Eds), *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*. pp 471-480. München, Germany.
- Villwock, W. 1983. El género *Orestias* y su Evolución en Altiplano del Perú y Bolivia. Informe Final IX CLAZ Perú. pp. 59-66
- Ward, R., Woodwark, M. y Skibinski, D. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 44: 213-232.
- Westberg, E. y Kadereit, J. 2009. The influence of sea currents, past disruption of gene flow and species biology on the phylogeographical structure of coastal flowering plants. *Journal of Biogeography*. 36:1398-1410.

Zemlak, T., Habit, E., Walde, S., Battini, M., Adams, E. y Ruzzante, D. 2008. Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology*. 17: 5049-5061.