

UCH-FC
DOC-EBE
S425
C.1

**Sistemática y filogenia de *Orestias* del complejo
agassizii (Teleostei: Cyprinodontidae) de la Puna.**

Tesis

Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Doctor en Ciencias
Con Mención en Ecología y Biología Evolutiva



Facultad de Ciencias

Por
Sergio Andrés Scott Alarcón
Enero, 2010.

Directores de Tesis:
Irma Vila Pinto
Marco A. Méndez Torres

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Sergio Andrés Scott Alarcón.

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de Noviembre de 2009.

Directores de Tesis:

Irma Vila Pinto

Marco A. Méndez Torres

Comisión de Evaluación de la Tesis

Alberto Veloso

Elie Poulin

Bryan Dyer



The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written on a horizontal line. To the right of the signatures is a circular purple stamp. The stamp contains the text: "FACULTAD DE CIENCIAS" at the top, "BIBLIOTECA" in the center, and "UNIVERSIDAD DE CHILE" at the bottom.

A mi familia y amigos



"La diligencia en escuchar es el más breve camino hacia la ciencia".

Juan Luis Vives (1492-1540)



Sergio Scott Alarcón nace el 8 de Junio de 1976 en Santiago, Chile. Realizó sus estudios en el Liceo José Victorino Lastarria, obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología, en la Universidad de Chile, luego de lo cual hace ingreso al Doctorado en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Desde muy temprano en su aprendizaje surgió el gusto por la zoología y la evolución, en el cual pudo estudiar pasando por diversos laboratorios de investigación en la universidad. Como académico ha realizado prácticos de laboratorios de zoología, biología del desarrollo, limnología y procesos evolutivos. Conjuntamente con esto ha participado en varios proyectos de investigación y aplicados, así como en estudios de impacto ambiental. Sus publicaciones están orientadas a los trabajos en peces y sistemas límnicos.



AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a mi familia, que me apoyo en todo momento, y me dio la libertad de estudiar lo que me gusta. Un agradecimiento especial a mis queridos amigos que me ayudaron a mantener un pie en la tierra y largas discusiones de diversos temas con variados puntos de vista.

Un especial agradecimiento a mis tutores, ya que sin su apoyo, paciencia y la generosa entrega de sus conocimientos esta tesis no se hubiese podido realizar, dejándome crecer como científico con mi propia independencia.

Agradecer a mi comisión de tesis, en especial al Profesor A. Veloso, quienes me dieron una valiosa guía en este camino, para el mejoramiento y ordenamiento de ésta.

Gracias a mis compañeros y colegas que me han apoyado de diversas formas, con discusiones, valiosas críticas y de oyentes de interminables sesiones de seminarios sobre *Orestias*.

Agradecer a Hernán Thielemann, Eduardo Soto y muchos más, que sin mencionar su nombre saben quienes son por la asistencia en terreno. A Manuel Contreras y el Centro de Ecología Aplicada (CEA) por financiar las primeras salidas a terreno, este estudio fue parcialmente financiado por los proyectos MULT 05/04-2 DI Y DOMEYKO Iniciativa transversal I de la Universidad de Chile, FONDECYT 1061256; 1080390. Sergio Scott es becario Doctoral MeceSup UCO-214 y beca de término de Tesis TT-23080123.

CONTENIDO.



Capítulo I- INTRODUCCIÓN

Sección 1.1 El Género <i>Orestias</i>	1
Sección 1.2 El Altiplano.....	9
Sección 1.3 Historia Geológica del Altiplano.....	10
Sección 1.4 Fluctuaciones históricas del nivel de los lagos altiplánicos.....	12

Capítulo II HIPÓTESIS.....19

Capítulo III OBJETIVOS

Sección 3.1 Objetivo General.....	20
Sección 3.2 Objetivos Específicos.....	20

Capítulo IV MATERIALES Y MÉTODOS.

Sección 4.1 Colecta de Muestras.....	21
Sección 4.2 Análisis Morfométrico y Merístico.....	22
Sección 4.3 Extracción de DNA, amplificación y alineamiento.....	24
Sección 4.4 Análisis Filogenético.....	27
Sección 4.5 Tiempos de divergencia.....	29

Capítulo V RESULTADOS.

Sección 5.1 Morfometría y Merística.....	30
Sección 5.2 Análisis Molecular.....	36
Sección 5.2.1 Región Control.....	36
Sección 5.2.2 Citocromo b.....	39
Sección 5.2.3 ND2.....	41

Sección 5.3 Análisis de Evidencia Total.....	43
Sección 5.3.1 Caracteres Moleculares.....	43
Sección 5.3.2 Caracteres Moleculares y Caracteres Morfológicos.....	46
Sección 5.4 Reloj Molecular.....	48
Capítulo VI DISCUSIÓN.....	51
Sección 6.1 Caracteres morfológicos y merísticos de las poblaciones de <i>Orestias</i>	52
Sección 6.2 Establecimiento de una hipótesis filogenética de las especies de <i>Orestias</i> de la Puna.....	53
Sección 6.3 Tiempos de Divergencia.....	56
Capítulo VII CONCLUSIONES.....	62
Capítulo VIII BIBLIOGRAFÍA.....	65



LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Complejos de especies del género <i>Orestias</i> , modificado de Parenti (1984a).....	4
Tabla II. Localidades de las especies descritas de <i>Orestias</i> del Altiplano Sur.....	8
Tabla III. Localidades estudiadas y número de especímenes analizados para cada uno de los genes.....	26
Tabla IV. Variación de las mediciones morfológicas y merísticas utilizadas en este estudio, en milímetros.....	31
Tabla V. Análisis de Tukey para muestras desiguales, para las diferenciaciones morfológicas entre localidades estudiadas. Las siglas que se muestran corresponden a los caracteres que presentan diferencias significativas entre las especies. LPD: Longitud Predorsal; LPA: Longitud Preanal; LC: Longitud Cabeza; HC: Altura Cabeza; HM: Altura Máxima; LPC: Longitud Pedúnculo Caudal; HPC: Altura Pedúnculo Caudal; DO: Diámetro Orbita; AB: Ancho Bucal; DP: Distancia Preorbital; RD: Rayos Dorsal; RP: Rayos Pectoral; RA: Rayos Anal; RC: Rayos Caudal; EL: Escamas Línea Lateral.....	34
Tabla VI. Análisis de Tukey para muestras desiguales, para las diferenciaciones morfológicas entre tipos de ambientes de las localidades estudiadas. Las siglas que se muestran corresponden a los caracteres que presentan diferencias significativas entre las especies. LPD: Longitud Predorsal; LPA: Longitud Preanal; LC: Longitud Cabeza; HC: Altura Cabeza; HM: Altura Máxima; LPC: Longitud Pedúnculo Caudal; HPC: Altura Pedúnculo Caudal; DO: Diámetro Orbita; AB: Ancho Bucal; DP: Distancia Preorbital; RD: Rayos Dorsal; RP: Rayos Pectoral; RA: Rayos Anal; RC: Rayos Caudal; EL: Escamas Línea Lateral.....	35

Tabla VII. Análisis Discriminante. Número de Individuos correctamente clasificados basado en sus caracteres morfométricos y merísticos.....	36
Tabla VIII. Tiempo de divergencia de los distintos linajes de la figura 14, para cada uno de los genes utilizados. Los tiempos de divergencia utilizados para cada reconstrucción se encuentran es paréntesis.....	50
Tabla IX. Resumen, principales interrogantes y sus respuestas, en los capítulos que consta esta Tesis.....	64

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Mapa representativo del supercontinente Pangea, mostrando la presencia del Mar de Tetis.....2
- Figura 2.** Cladograma de las especies del complejo *agassizii*.....5
- Figura 3.** Árbol de Neighbor-joining resumiendo las relaciones genéticas de diferentes aplotipos de *Orestias*, en este se observa la subdivisión del Clado 1 en lo que llama “Northern and southern chilean populations”.....6
- Figura 4.** Distribución de los continentes en el Cretácico Tardío.....11
- Figura 5.** Historia de los paleolagos, reconstruida a partir de líneas de costa, de los últimos 120 mil años, mostrando los diferentes períodos lacustres y sus respectivas duraciones.....13
- Figura 6.** A y B) Sección norte-sur de las altitudes de los paleolagos Minchin, Ouki y Tauca, se muestra las cotas aproximadas de los sistemas actuales.13
- Figura 7.** Reconstrucción de los paleolagos y glaciares durante el Pleistoceno en la cuenca Andina.....15
- Figura 8.** Mapa de Distribución de las localidades donde existe la presencia de *Orestias* utilizadas en este estudio.....22

Figura 9. Mediciones Morfológicas y merísticas utilizadas en este estudio. 1 distancia interorbital. 2 largo cabeza. 3 longitud predorsal. 4 Largo estándar. 5 largo total. 6 rayos aleta dorsal. 7 largo narina. 8 profundidad del cuerpo. 9 escamas de la línea lateral. 10 profundidad pedúnculo caudal. 11 rayos aleta pectoral. 12 largo del pedúnculo caudal. 13 rayos aleta anal. 14 aleta caudal. 15 Longitud preanal. 16 Altura de la cabeza.....24

Figura 10. Análisis de Componentes Principales de 16 caracteres morfológicos y merísticos medidos en especies del complejo agassizii del Altiplano Sur. Los valores junto a los ejes corresponden al porcentaje de varianza explicado por cada uno de ellos.....32

Figura 11. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud del gen Mitocondrial Región Control. 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.....38

Figura 12. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud del gen Mitocondrial Citocromo b. 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.....40

Figura 13. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud del gen Mitocondrial ND2. 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.....42

Figura 14. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud de los tres genes Mitocondriales incorporándose en una matriz de Evidencia Total (ND2; Región Control; Citocromo b). 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.....	45
Figura 15. Árbol Filogenético de Máxima Parsimonia de la Matriz de Evidencia Total. 1000 réplicas de bootstrap, los valores no mostrados corresponden a valores menores al 50%.....	47
Figura 16. Árbol Filogenético Bayesiano de la Matriz de Evidencia Total. Los soportes de los nodos corresponden a la probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados corresponden a valores menores al 0.95.....	47
Figura 17. Reconstrucción del tiempo de divergencia de los nodos, utilizando el gen Citocromo b, realizados por Inferencia Bayesiana, El valor sobre el nodo es el tiempo de divergencia estimado.....	49
Figura 18. Reconstrucción del tiempo de divergencia de los nodos, utilizando el gen Citocromo b. El valor sobre el nodo es el tiempo de divergencia, se grafican los tiempos aproximados en que estuvieron presentes los principales eventos lacustres en el Altiplano.....	58
Figura 19. Reconstrucción de las áreas de paleolagos y las fechas de estos eventos lacustres.....	59

RESUMEN.

Orestias es un género de peces endémico de sistemas lacustres y lóticos que se distribuye en la región de altura de Perú, Bolivia y Chile o Altiplano. Los estudios taxonómicos realizados en este grupo, basados principalmente en caracteres morfológicos, han establecido 44 especies para la región altiplánica, existiendo seis especies para la zona sur de la región o Altiplano Sur (17°–22° S). Se ha propuesto que este alto número de especies sería el resultado de dos tipos diferentes de procesos de especiación, por una parte, especiación simpátrica en la parte norte, especialmente en el Lago Titicaca, y especiación alopátrica en las cuencas de la zona más austral del Altiplano. La distribución geográfica actual de *Orestias* estaría asociada a la variación de los niveles de agua en las cuencas ocurridas en el Pleistoceno, con períodos húmedos seguidos de períodos de aridez, donde en la actualidad las distintas especies se encuentran separadas entre sí, presentándose como un modelo para evaluar la historia del desarrollo de los sistemas lacustres del Altiplano la cual podría ser determinante para explicar la distribución actual de los grupos presentes en esta área y que habrían dado origen a la diversidad de especies de *Orestias* presentes actualmente y sus relaciones biogeográficas.

Con la finalidad de evaluar las relaciones evolutivas de las especies descritas para esta zona, se recolectaron 258 individuos de 12 sistemas límnicos del Altiplano Sur. Se realizó un estudio morfométrico y merístico, y un estudio de sistemática molecular, con cuatro o cinco individuos de cada localidad, utilizando los genes mitocondriales ND2 (1120 pares de bases), Citocromo b (1114 pares de bases) y Región Control (972 pares de bases), para ello se utilizó los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia

Bayesiana, para cada uno de los genes y para una matriz de evidencia total incorporando caracteres morfométricos y merísticos. Se estimó, en base a los genes estudiados, los tiempos de divergencia de los linajes obtenidos.

Los resultados morfométricos y merísticos muestran que la mayoría de las especies descritas pueden diferenciarse utilizando una combinación de estos caracteres, con excepción de *O. piacotensis* la cual no presenta una clara diferenciación del resto de las especies estudiadas. El estudio filogenético molecular muestra tres clados principales bien diferenciados, 1) el primero agrupa a *O. agassizii* del Río Isluga, cercano a *O. puni* del Titicaca, 2) un segundo clado corresponde a *O. ascotanensis*, *O. agassizii* del Río Huasco presentándose como un grupo hermano a este *Orestias sp.* del Salar de Carcote, y 3) un clado que agrupa a las especies del Parque Nacional Lauca. Interesantemente, los análisis realizados distinguen dos unidades evolutivas distintas una del Salar de Ascotán y otra del Salar de Carcote, ambas previamente identificadas como *O. ascotanensis*. También, dos diferentes linajes fueron encontrados para *O. agassizii*, descrita para las localidades de Isluga y Huasco. Finalmente, para las cuatro especies de *Orestias* descritas para el Parque Nacional Lauca, los resultados sugieren que corresponden a un grupo monofilético.

Los resultados del análisis de reloj molecular muestran una divergencia anterior a los últimos grandes paleolagos de la cuenca Altiplánica, siendo más reciente la diversificación de las especies presentes en el Parque Nacional Lauca.

ABSTRACT

Orestias is an endemic fish genus of lacustrine and lotic systems that are distributed over the highland region (Altiplano) of Peru, Bolivia and Chile. Based on morphological characters, taxonomic studies have established 44 species, including six species on the southern Altiplanic region (17°–22° S). It is proposed that this high species diversity would result from two different processes of speciation; on the one hand, sympatric speciation in the north, especially in Lake Titicaca, and allopatric speciation in the basins of the southernmost region of Altiplano. The current geographical distribution of *Orestias* would be associated to the variation of the water levels in the basins, changing from very wet to arid periods during the Pleistocene. In this context, this group arises as a model to assess the development history of the Altiplanic lake systems. This study could be decisive in explaining the current distribution of the groups present in this area and would explain the diversity of species currently present of *Orestias* and their biogeographic relationships.

In order to assess the evolutionary relationships of the *Orestias* species, we collected 258 individuals from 12 south highland limnic systems. We performed morphometric, meristic and molecular systematics studies, with four or five individuals from each locality. Using the mitochondrial ND2 gene (1120 pb), cytochrome b (1114 bp) and control region (972 bp), we performed the following phylogenetic analyses: maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference. The analyses were for each gene and for a total evidence matrix including both morphometric and meristic characters. Based on the genes studied the divergence times of lineages were obtained.

The morphometric and meristic results show that most of described species can be distinguished using a combination of these characters, except for *O. piacotensis* which

shows no clear differentiation from all other species studied. The molecular phylogenetic study shows three distinct major clades, 1) the first grouping the *O. agassizii* from Isluga River closely to the *O. puni* from Titicaca Lake, 2) a second clade with the species *O. ascotanensis* and *O. agassizii* from Huasco River as a sister group of the *Orestias sp.* from the Carcote salar, and 3) a clade comprising species from Lauca National Park. Interestingly, the analysis distinguished two distinct evolutionary units from the Ascotán and Carcote salar, both previously identified as *O. ascotanensis*. Also, two different lineages were found for the *O. agassizii*, described from the Huasco and Isluga systems. Finally, for the four *Orestias* species recognized from the Lauca National Park, results suggest that all belong to a monophyletic group. Molecular clock estimates a divergence before the last great paleolakes Plateau basin, the more recent diversification of species occurring in the Lauca National Park.

INTRODUCCIÓN.

1.1 El Género Orestias

En el Altiplano solo se citan tres géneros de peces: *Astroblepus*, *Orestias* y *Trychomicterus*. Para el género *Orestias*, “karachi”, creado por Valenciennes (1839), se reconocen actualmente 44 especies, 23 especies endémicas descritas para el Lago Titicaca y 20 distribuidas en diferentes sistemas altiplánicos (Arratia 1982; Parenti 1984a, Vila y Pinto 1986; Vila 2006).

Parker y Kornfield (1995), utilizando el gen mitocondrial 16S, asignó al género *Orestias* una posición dentro de la familia *Cyprinodontidae*. El ancestro Cyprinodóntido habitó el oeste del Mar de Tetis entre 146 y 100 Ma (Jurásico Tardío-Cretácico: **Figura 1**) y la colonización del norte de Sudamérica habría ocurrido entre 100 y 80 Ma. El género *Aphanius* considerado grupo hermano de *Orestias*, también tiene una distribución determinada por el Mar de Tetis (Parker y Kornfield, 1995).

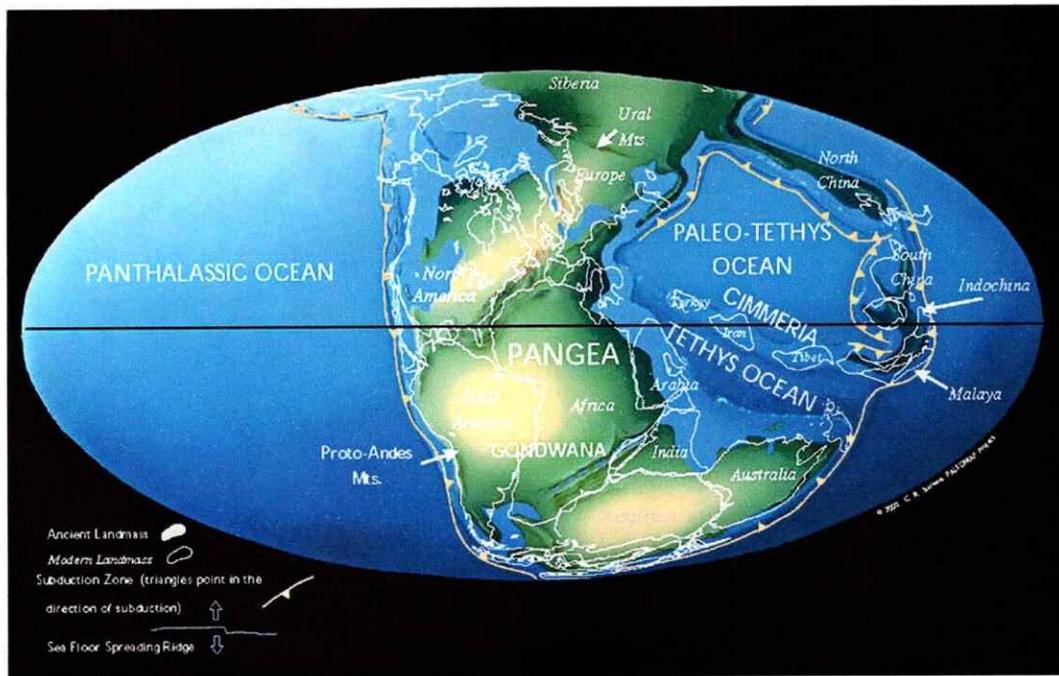


Figura 1. Mapa representativo del supercontinente Pangea, mostrando la presencia del Mar de Tetis.

Parenti (1984a) en una revisión de las especies descritas en *Orestias*, lo reconoce al como un grupo monofilético, el que es definido por siete sinapomorfias: ausencia de aletas pélvicas, falta del primer postcleitrum, ausencia de vomer, radiales cartilaginosos de las aletas media anal y media dorsal, separación ventral del ceratohial anterior y posterior, patrón único de escamación y poros de la cabeza, y la ausencia de la extensión ventral en el ángulo articular, que distinguen este género de otros peces cyprinodontoideos. Al mismo tiempo, esta autora, separa cuatro complejos dentro del género *Orestias*, los complejos *cuvieri*, *mulleri*, *gilsoni* y *agassizii* (**Tabla I**). Este último comprende 26 especies incluyendo las especies del Altiplano Sur. Las especies del Altiplano Sur son un grupo monofilético, el que estaría definido por el patrón de escamación sexualmente dimórfico, ya que las hembras tienden a tener mayor cantidad de escamas que los machos (**Figura 2**: Parenti 1984a). La validez del número de especies de *Orestias* descritas para la región del Altiplano sur es discutida por Villwock

et al (1986) y Villwock & Sienknecht (1995, 1996) quienes señalan que las diferencias entre estas especies se deberían a variación ontogenética entre los ejemplares utilizados por los autores y la presencia de híbridos de primera generación entre algunas de estas especies. Estos autores afirman que varias de las especies descritas para el complejo *agassizii* representan diferentes estadios ontogenéticos (juveniles y adultos), correspondiendo a poblaciones locales de una misma especie. Costa (1998) y posteriormente Dyer (2000) en sus respectivos trabajos confirman la validez de las especies reconocidas por Parenti (1984a) y señalan como centro de origen y radiación hacia el resto del Altiplano el lago Titicaca.

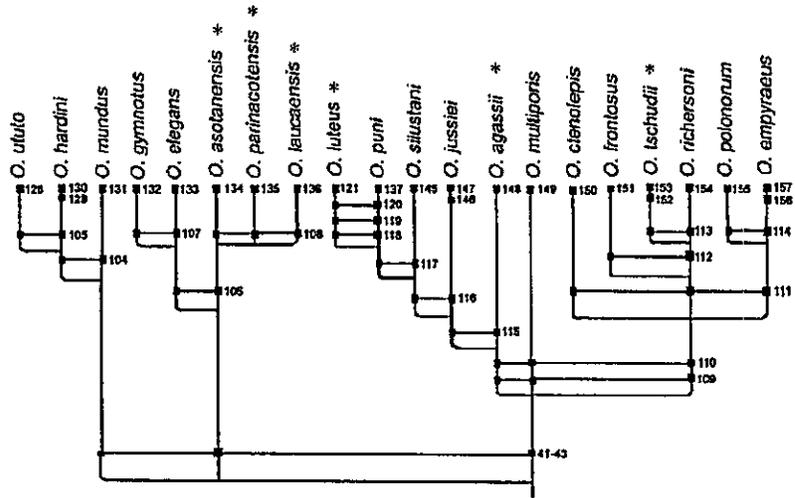
Lüssen et al. (2003), utilizando marcadores mitocondriales (Región Control) sugiere que las especies del Altiplano sur se agrupan en dos clados, uno con especies del Lago Titicaca, y otro con las especies del Altiplano sur. En este trabajo, al igual que autores que lo preceden también propone una colonización desde el lago Titicaca hacia el sur del Altiplano, que habría tenido lugar durante el cuaternario tardío (530.000 – 880.000 años) y agregan una posterior recolonización de algunas de estas especies hacia el lago Titicaca. Lüssen et al (op.Cit) establecen hace una subdivisión entre lo que llama “Northern and Southern chilean populations” las que habrían divergido entre 370.000 y 600.000 años (Figura 3).

La distribución geográfica actual de *Orestias* estaría asociada a la variación en los niveles de agua en las cuencas ocurridas a partir del Plioceno, hecho que condiciona su dispersión en la región y sus especies constituyen en la actualidad un grupo endémico de la cuenca inter-Andina de Perú, Bolivia y Chile, y conservan su distribución entre los 11° y 22° S y hasta altitudes de 4.600 msnm entre el lago Llacsha, en Perú central, hasta las vertientes del salar de Ascotán, en el norte de Chile (Parenti, 1984a; Lauzanne 1982).

En Chile, este género se encuentra en lagos y ríos tributarios de altura, pertenecientes a diferentes cuencas endorreicas sin interconexión en la actualidad (Khlon 1972; Montti y Henríquez 1979; Niemayer y Cereceda 1984).

cuvieri	mulleri	gilsoni	agassizii
<i>cuvieri</i>	<i>mulleri</i>	<i>gilsoni</i>	<i>luteus</i>
<i>pentlandii</i>	<i>gracilis</i>	<i>taquiri</i>	<i>rotundipinnis</i>
<i>ispi</i>	<i>crawfordi</i>	<i>moonii</i>	<i>farfani</i>
<i>forgeti</i>	<i>tutini</i>	<i>uruni</i>	<i>albus</i>
	<i>incae</i>	<i>minimus</i>	<i>olivaceus</i>
		<i>minutus</i>	<i>silustani</i>
		<i>tchernavini</i>	<i>agassizii</i>
		<i>imarpe</i>	<i>empyraeus</i>
		<i>tomcooni</i>	<i>frontosus</i>
		<i>robustus</i>	<i>polonorum</i>
			<i>elegans</i>
			<i>jussiei</i>
			<i>puni</i>
			<i>parinacotensis</i>
			<i>laucaensis</i>
			<i>tschudii</i>
			<i>gymnotus</i>
			<i>hardini</i>
			<i>ctenolepis</i>
			<i>ascotanensis</i>
			<i>richersoni</i>
			<i>multiploris</i>
			<i>mundus</i>
			<i>ututo</i>
			<i>chungarensis</i>
			<i>piacotensis</i>

Tabla I. Complejos de especies del género *Orestias*, modificado de Parenti (1984a).



Agassii Komplex

Figura 2. Cladograma de las especies del complejo *agasszii* (de Parenti, 1984a)

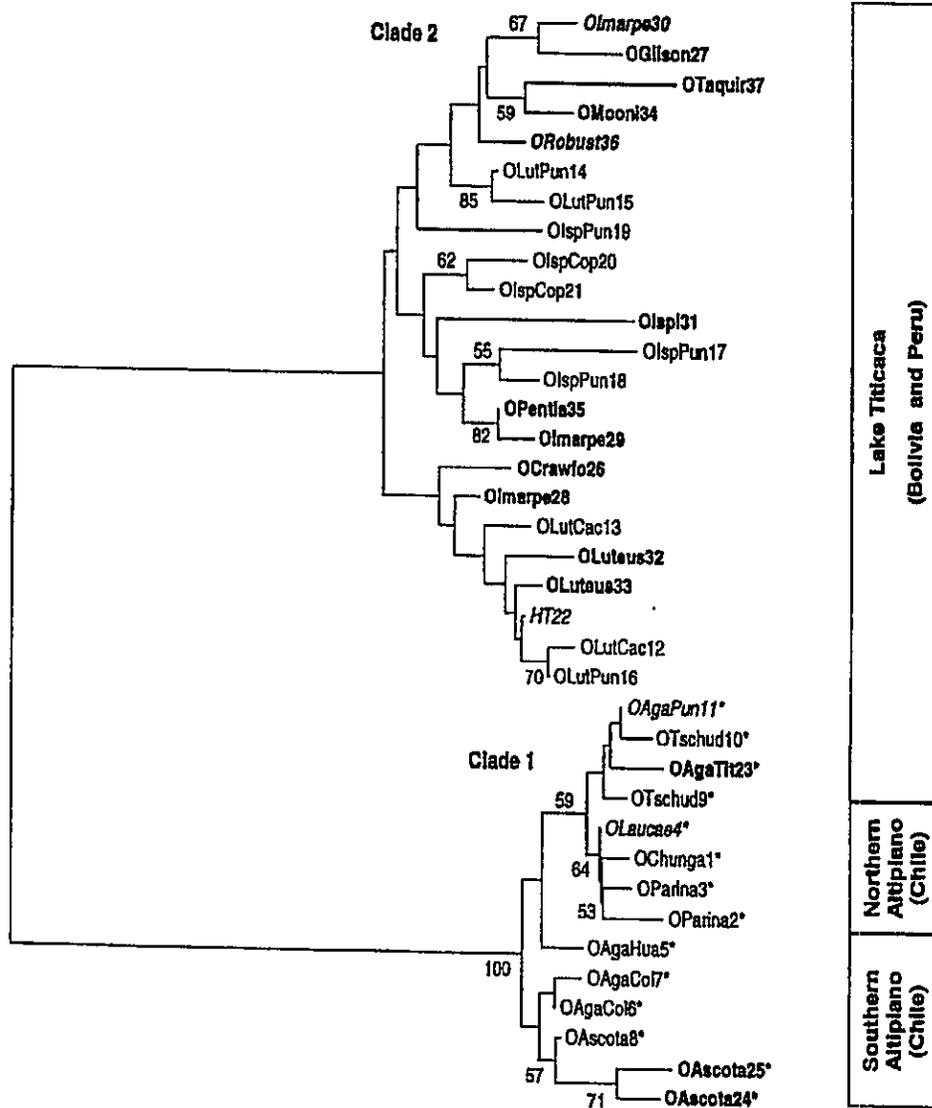


Figura 3. Árbol de Neighbor-joining resumiendo las relaciones genéticas de diferentes aplotipos de *Orestias*, en este se observa la subdivisión del Clado 1 en lo que llama "Northern and southern chilean populations" (Lüssen et al. 2003).

En el sur del Altiplano desde 17° a 22° S se ha descrito una especie de *Orestias* por sistema límnico y en la actualidad, se reconocen cinco especies endémicas y una especie distribuida desde el lago Titicaca, Salar de Uyuni, hasta el Salar de Huasco e Isluga. La actual distribución de las especies de *Orestias*, en los sistemas acuáticos de la región del Altiplano Sur podría ser explicada por la dispersión de los peces, la cual se habrá visto favorecida por la formación de paleolagos (Keller y Soto, 1998). La especiación de *Orestias* sería el resultado de un proceso de la fragmentación de poblaciones ancestrales causada por la inestabilidad de los hábitats y condiciones ambientales heterogéneas (Northcote; 2000). Las especies descritas para esta zona pertenecen al complejo *agassizii* y son las siguientes: *O. parinacotensis* Arratia 1982, distribuida en la Laguna de Parinacota, *O. laucaensis* Arratia 1982, en el río Lauca, *O. chungarensis* Vila & Pinto 1986, se distribuye en el Lago Chungará y *O. ascotanensis* Parenti 1984, en el Salar de Ascotán, *O. piacotensis*, en la laguna de Piacota (Vila 2006) y *O. agassizii* que presenta la más amplia distribución del grupo, desde el Lago Titicaca, Salar de Uyuni y en el Salar de Huasco y en los ríos Isluga y Collacahua (sensu Mann 1954). (Tabla II).

ESPECIE		LOCALIDAD	LATITUD (S) LONGITUD(W)
<i>O. parinacotensis</i>	Arratia 1982	Bofedal de Parinacota	18° 12' 02" S 69° 16' 04" W
<i>O. laucaensis</i>	Arratia 1982	Río Lauca	18° 22' 50.4" S 69° 20' 56.0" W
<i>O. laucaensis</i>	Arratia 1982	Laguna Cotacotani	18° 12' 38.9" S 69° 14' 02.1" W
<i>O. chungarensis</i>	Vila & Pinto 1986	Lago Chungará	18° 15' 01.8" S 69° 10' 34.6" W
<i>O. ascotanensis</i>	Parenti 1984	Salar de Ascotán	21° 29' 07.7" S 68° 15' 21.5" W
<i>O. piacotensis</i>	Vila 2006	Laguna de Piacota	18° 12' 01.5" S 69° 16' 02.1" W
<i>O. agassizii</i>	(Sensu Mann, 1954)	Río Isluga	19° 15' 22.9" S 68° 42' 22.7" W
<i>O. agassizii</i>	(Sensu Mann, 1954)	Salar de Huasco	20° 15' 46.0" S 68° 52' 31.6" W

Tabla II. Localidades de las especies descritas de *Orestias* del Altiplano Sur.

La mayoría de los trabajos filogenéticos y las descripciones originales de las especies realizados en el género *Orestias* utilizan principalmente atributos de morfología externa (merísticos y morfométricos), los cuales pueden presentar una alta variabilidad de los caracteres. El origen de esta variación puede deberse al alto grado de sensibilidad de los caracteres utilizados a las fluctuaciones de variables ambientales, como lo son la salinidad y la temperatura (Koumoundouros, 2001; Hall y Johnston, 2003; Spier, 2003; Kinne O., Kinne EM., 1962 a y b; MacGregor y MacCrimmon, 1976 y 1977; Swanson, 1998; Hosoya y Kawamura, 1997; Barlow G W, 1961).

Los caracteres moleculares, han sido de extrema utilidad para la resolución de las relaciones filogenéticas en los peces, especialmente cuando los caracteres morfológicos no han sido útiles para la resolución de las relaciones filogenéticas. Entre otros se puede mencionar los trabajos de Farias et al. (2000), los que utilizando el gen 16S establecen las relaciones de la Familia *Cichlidae*; Sturmbauer y Meyer, (1993), con los genes de la Región Control y Citocromo b, resuelven la filogenia de las especies de Cíclidos del lago Tanganyka.

El establecimiento de las relaciones filogenéticas dentro del género *Orestias* podría verse favorecido con la realización de estudios moleculares más integrales, que incorporen al análisis un mayor número de caracteres moleculares y nuevas poblaciones comprendidas en el rango de distribución de estos taxa. Conjuntamente con lo antes señalado, es necesaria la realización de trabajos filogenéticos que incorporen las especies presentes en la región de Altiplano Sur, y hagan posible la integración de evidencia morfológica y caracteres moleculares en sus análisis (evidencia total). Esto en relación con la historia del desarrollo de los sistemas lacustres del Altiplano lo cual podría ser determinante para explicar la distribución actual de los grupos presentes en esta área como es el caso de la familia Cyprinodontidae con el género *Orestias* y sus relaciones biogeográficas.

1.2 El Altiplano

El Altiplano Andino, planicie en altura en los Andes de Perú, Bolivia, Chile y Argentina ubicado entre los 11° y 22° latitud Sur, con una altitud entre los 3700 y los 4600 msnm y una altura promedio de 4200 msnm, es una región con clima árido y cuyo eje norte sur presenta un promedio anual de precipitaciones entre 200 y 500 mm, que caen principalmente durante diciembre a febrero a través del denominado "Invierno Altiplánico", (Hurlbert & Chang 1984; Salazar 1997). Aunque estas pueden no alcanzar directamente ciertas zonas, las aguas precipitadas en las altas montañas llegan a las cuencas a través de escorrentías o por infiltración subterránea (Keller y Soto 1998).

En el Altiplano sur (17° a 22° S) o Puna en el territorio chileno, se han descrito 33 cuencas hidrográficas, las que han sido clasificadas por diversos autores en dos tipos:

1) hidrológicamente cerradas cuyo único mecanismo de descarga es la evaporación, situación que ocurre en la mayoría de lagos y salares, y 2) cuencas hidrológicamente abiertas, las cuales tienen comunicación subterránea con cuencas vecinas, aún cuando son superficialmente cerradas. El hecho de que las cuencas no presenten interconexión superficial entre ellas supone un aislamiento de las especies acuáticas, por lo menos desde el último gran levantamiento de la cordillera de los Andes al final del Mioceno, lo que habría permitido la diferenciación tanto físicamente como químicamente en los distintos sistemas hídricos presentes hasta la actualidad.

1.3 Historia Geológica del Altiplano.

El Altiplano es una formación intermontana cuyo origen estuvo determinado por la compresión tectónica este-oeste, proceso que ha ocurrido en varias fases en los últimos 90 millones de años (**Figura 4**) (Lundberg et al, 1998). Durante el Terciario y el Cuaternario, el Altiplano fue objeto de una intensa actividad volcánica y sedimentaria que afectó a extensos sistemas lacustres que evolucionaron hacia cuencas evaporíticas de diverso tamaño, proceso aún presente y que determina la existencia de lagos, lagunas salinas y salares en la región (Chong, 1988).

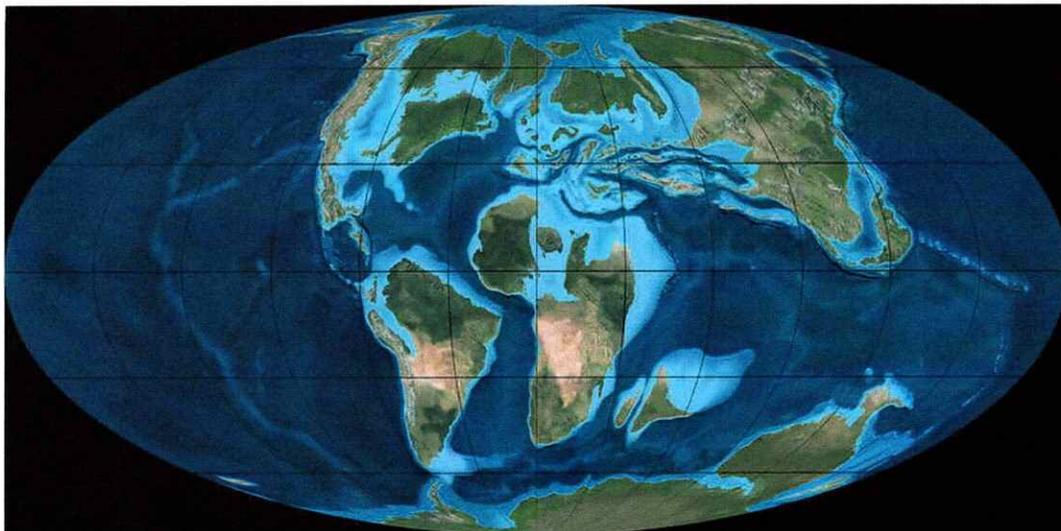


Figura 4. Distribución de los continentes en el Cretácico Tardío (90 Ma).

Etapas de fuertes fases de elevación pueden ser datadas en 89 Ma, 73 Ma, 59 Ma, 43 Ma, 30 Ma y 11 Ma (Marshall & Sempere, 1993; Sempere et. al. 1997). La elevación de los Andes, que llevó a la formación del Altiplano comenzó hace 60 Ma aproximadamente. La fase más fuerte de elevación para los Andes centrales ocurrió aproximadamente entre 20-30 Ma, durante este período el Altiplano se fue elevando sobre los 3000 msnm (Marshall & Sempere 1993, Lundberg et al. 1998). Además existieron fuertes elevaciones en el norte de los Andes entre 5 a 3 Ma. Con estas elevaciones el Altiplano fue aislado, desarrollándose además la cordillera oriental de los Andes Ecuatorianos y Colombianos.

El cambio de las vías de flujo de los grandes ríos sudamericanos y probablemente también masas de aguas marinas jugaron un rol en el desarrollo y distribución de la ictiofauna, dada la inundación de las áreas bajas de Sudamérica. Estas transgresiones marinas podrían representar potenciales rutas de migración. El relleno de las tierras bajas por sedimentos podría causar fenómenos de vicarianza, el cual pudo haber sido de importancia en el desarrollo de la ictiofauna sudamericana. En la

interacción de los procesos tectónicos fue repetitivo el aislamiento de los sistemas límnicos periféricos. A partir de documentación fósil (Lundberg 1998, Gayet & Meunier 1998) es conocido que la fauna íctica neotropical se diversificó hasta el final del Mioceno.

Los cambios antes mencionados en los sistemas acuáticos y la elevación andina fueron de importancia para la evolución de los peces y se postula que varios de los grupos presentes podrían ser tan antiguos como la elevación de las montañas. Estos eventos serían responsables de la ocurrencia de una serie de endemismos en Sudamérica (Lundberg et al. 1986, 1988, Lundberg 1997; Vari & Weitzmann, 1990; Retzer, 1994; Rice 1998) creando nuevos tipos de hábitats en el Altiplano.

1.4 Fluctuaciones históricas del nivel de los lagos altiplánicos.

Durante el Plioceno (2-3 Ma), la cordillera de los Andes adquirió su altitud actual. El levantamiento cordillerano más la tectónica durante el cuaternario es la causa de una importante fracturación de la cuenca en el Altiplano. Durante el Pleistoceno se presentaron fluctuaciones en los niveles hidrológicos en la cuenca altiplánica, encontrándose en este período una sucesión de períodos secos y períodos húmedos, evidenciado por la existencia de paleolagos de distinta extensión y profundidad (**Figura 5 y Figura 6**).

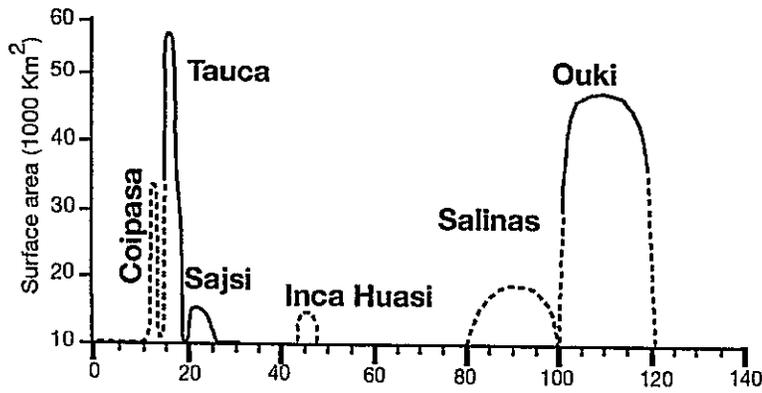


Figura 5. Historia de los paleolagos, reconstruida a partir de líneas de costa, de los últimos 120 mil años, mostrando los diferentes periodos lacustres y sus respectivas duraciones. (Placzek et al., 2006).

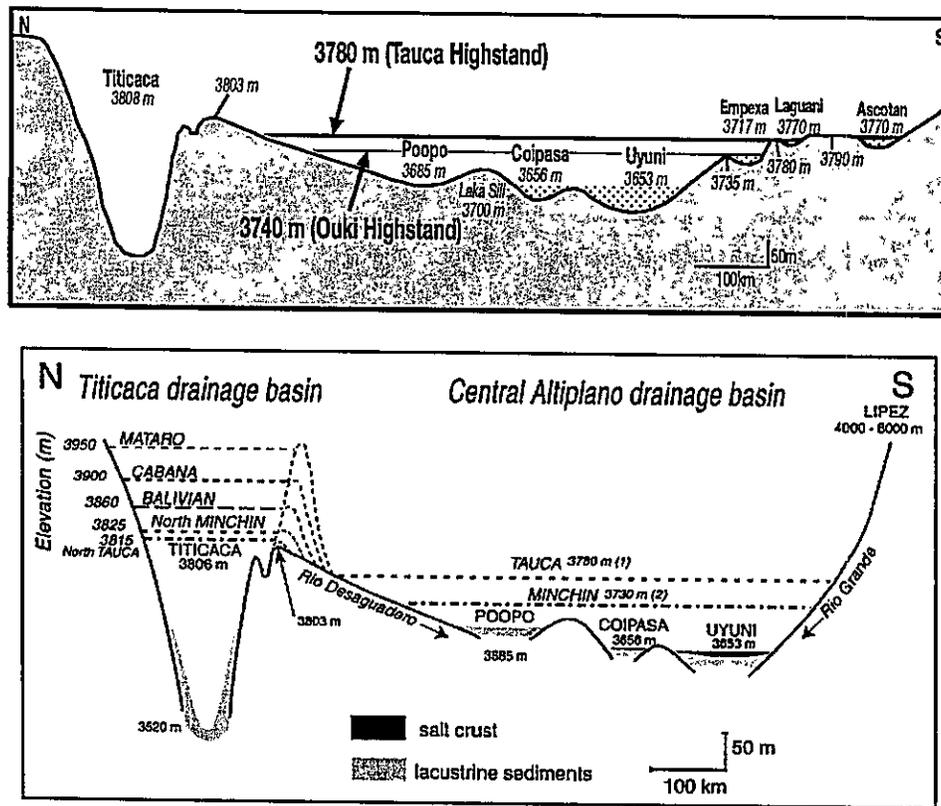


Figura 6. A y B) Sección norte-sur de las altitudes de los paleolagos Minchin, Ouki y Tauca, se muestra las cotas aproximadas de los sistemas actuales. (modificada de Placzek et al., 2006).

El holoceno superior en la zona subtropical del Altiplano fue un período con fluctuaciones climáticas del orden temporal del milenio y de considerable magnitud. Los sedimentos lacustres más recientes muestran una evolución de las condiciones climáticas hacia características de aridez (Vila, 1975).

El Lago Mataro con una profundidad de 140 metros se desarrolló sobre el nivel del actual lago Titicaca (3180 msnm) cubriendo completamente la zona norte y centro de altiplano en su máxima extensión, durante la era del hielo Calvario, aproximadamente 1.8 Ma, representando el más extendido paleosistema; en la zona Sur del Altiplano, durante el pleistoceno medio, se desarrolló el Paleolago Cabana, a una altura de 3900 msnm, ambos sistemas se caracterizaron por formar un solo plano de agua en el Altiplano (Lavenu et al. 1984; Fornari et al. 2001). Se describen sedimentos del paleolago siguiente, el Lago Ballivián, presente durante el pleistoceno superior, después de la edad del hielo Sorata, la cual terminó hace 700,000 años. El Lago Escara, con una datación de 190,000 años, contemporáneo al lago Ballivián en el norte del Altiplano, se situó en una altura de 3780 msnm, abarcando una gran superficie del Altiplano centro sur (Fornari et al. 2001). La conexión entre la parte norte y sur del Altiplano fue interrumpida por la llamada loma Ulloma Callapa (100 kilómetros al sur del lago Titicaca actual), El evento lacustre siguiente es el Lago Ouki, cuyo origen se data entre 105 a 100 Ka, éste se ubicaba a 3740 msnm, y abarcaba cuencas actuales del Lago Poopo y los Salares de Coipasa, Uyuni y Empexa. El final del Pleistoceno está marcado por el Lago Minchin el cual se ubicó a una altura de 3825 metros y una fecha de datación de sus terrazas entre 72,000 – 32,200 años (Fornari et al. 2001, Servant & Fontes 1978), estando dividido por la loma Ulloma Callapa en dos grandes cuerpos de agua, siendo la del sur de mayor tamaño. Posterior a estos, el paleolago Tauca formado hace 10,000 años al final de la última era glacial, a un nivel máximo alrededor de los

3780-3790 msnm abarcó una extensión de 60.000 Km², teniendo la misma extensión del lago Minchin (**Figura 7**). Este paleolago ocupó las cuencas de la parte central y sur del Altiplano, incluyendo los actuales Lago Poopo y los Salares de Coipasa, Uyuni, Empexa y Laguani. Los paleolagos Ballivian, Minchin y Tauca conformaron dos cuerpos de agua separados, uno norte, que comprendió el área donde se ubica el actual lago Titicaca y uno sur que cubría las zonas centro y sur del altiplano, siendo la única conexión posible el paleo río Desaguadero.

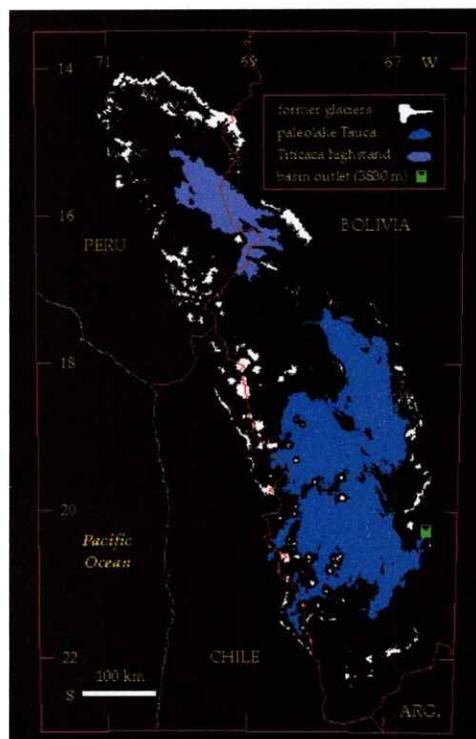


Figura 7. Reconstrucción de los paleolagos y glaciares durante el Pleistoceno en la cuenca Andina.

En el Altiplano occidental, Sáez et al. 2005, ubican la formación del Lago Chungará anterior a los 13 Ka, debido al colapso de la caldera del volcán Parinacota el cual bloqueó el paso del Paleo río Lauca, causando el aislamiento de esta sub-cuenca. La reconstrucción de la hidrología de esta sub-cuenca muestra fluctuaciones en sus

niveles durante el Pleistoceno-Holoceno, encontrando los mayores volúmenes del Lago Chungará durante el Holoceno tardío. Asimismo entre estos períodos húmedos hay evidencia de períodos secos como es el caso de la presencia de salares entre 95-80 Ka (Placzek et al. 2006; Zreda et al. 2001; Fritz et al. 2004; Formari et al. 2001; Schwalb et al, 1999; Silvestre et al. 1999; Lavenu et al. 1984). Zreda et al. (2001). muestra una aparente ausencia de depósitos que se correlacionen con el Último Máximo Glacial, el cual se relaciona con las condiciones climáticas, las cuales fueron desfavorables para el desarrollo de glaciares.

La historia y sucesiones de estos lagos Pleistocénicos, como consecuencia de fenómenos geológicos y climáticos, habría ocasionado que las poblaciones de especies acuáticas que habitaron en los grandes sistemas lacustres del Terciario y Cuaternario se vieran afectadas, fraccionándose en múltiples subpoblaciones total o parcialmente aisladas unas de otras. Lo anterior habría producido un mosaico de poblaciones con distinto grado de divergencia o incluso podría haber generado la formación de distintas especies. Es posible, además, esperar que las especies de los sistemas que se separaron primero fuesen más divergentes (por ejemplo aquellas que habitan el lago Titicaca), que las especies de los sistemas más nuevos como es el caso de los salares de Uyuni, Coipasa, Huasco, Río Isluga y los Lagos Poopo y Chungará (Parker y Kornfield, 1995). Además se suma la dificultad de datar las fechas con fósiles del paleógeno de peces óseos, el cual ha sido poco explorado en busca de fósiles de peces teleósteos (Arratia 2004), no reportándose dataciones de fósiles de Cyprinodóntidos en la región. Además de la falta de información acerca de los paleoríos presentes en estas zonas del Altiplano, los cuales podrían aportar información respecto de los hábitats y posibles interconexiones entre los sistemas hídricos.

Los estudios filogenéticos moleculares de organismos endémicos del Altiplano, ofrecen una aproximación muy útil para investigar procesos históricos de eventos geológicos y los cambios ecológicos concomitantes (Peng et al., 2006). El análisis de peces de agua dulce puede proveer una unión entre la evolución biótica y la geología, debido a que su dispersión depende de la formación de conexiones directas entre los sistemas hídricos (Bermingham and Martin, 1998; Lundberg, 1993), cuando la historia de esas interconexiones refleja la geología subyacente. Debido a que en la actualidad la distribución de las especies límnicas están delimitadas a sistemas hídricos aislados, donde el género *Orestias*, en el Altiplano Chileno se presenta como un grupo ideal para investigar la historia de esta región, debido a que su patrón de distribución ha sido influenciado significativamente por los movimientos tectónicos durante el levantamiento de la Cordillera de los Andes (Keller y Soto, 1998).

Debido a los cambios actuales en el número de especies descritas y a la discusión taxonómica existente, se presenta como necesario una revisión de los caracteres morfológicos utilizados en las descripciones originales, que permita evaluar la plasticidad de estos rasgos entre las especies descritas y su calidad de caracteres diagnósticos, analizándolos desde un punto de vista filogenético e incluyendo estudios de forma a través de análisis de morfometría geométrica. Además, de la generación de una hipótesis filogenética de las relaciones entre las especies de *Orestias* presentes en el Altiplano Sur utilizando genes mitocondriales con diversas tasas de evolución como son la Región Control, Citocromo b y la Subunidad 2 de la NADH deshidrogenada (Tang et al. 2005), estimando con los distintos genes las fechas de divergencia de los linajes obtenidos y proponer finalmente la posible existencia de nuevas especies (linajes) como resultado de estos análisis. Además se incorpora en conjunto información morfológica y molecular en éste estudio a través de un análisis de Evidencia Total, el cual se ha

mencionado que entrega un mejor estimado de la filogenia que la obtenida analizando los datos separadamente (Eernisse and kluge, 1993, Hillis and Wiens, 2000), además, permite distinguir homoplasias de homologias verdaderas, donde, los caracteres que representan niveles muy diversos de cambio evolutivo (sustituciones de nucleótidos en un gen y cambios morfológicos complejos posiblemente codificados por múltiples genes) son poco probables de señalar falso en el mismo sentido (Glennner et al. 2004; Doyle, 1992), para así obtener una hipótesis filogenética robusta.

HIPÓTESIS.

Esta tesis somete a prueba la hipótesis que el proceso de especiación de las especies del género *Orestias* presentes en la Puna (Altiplano Sur), habría ocurrido como producto del fraccionamiento de los sistemas lacustres ocurridos por la variación hidrológica durante el Pleistoceno. De acuerdo a la información paleontológica disponible, se espera que las especies presentes en el Titicaca sean ancestrales a las especies del género presentes en la zona centro sur del Altiplano.

En este segundo grupo las *Orestias* del Salar de Uyuni y Lago Poopó corresponderían al grupo hermano de las especies presentes en el Lago Chungará y los Salares de Ascotán y Carcote.

OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General.

El objetivo principal de esta tesis es establecer las relaciones filogenéticas de las especies de *Orestias* descritas para La Puna a través de un análisis comparativo de distintos caracteres (morfológicos, merísticos y DNA mitocondrial).

3.2 Objetivos Específicos.

1.- Una redefinición de los caracteres morfológicos y merísticos de las poblaciones en estudio de *Orestias*, en un contexto filogenético, para lo cual se realizaron estudios morfológicos utilizando las mediciones clásicas de las descripciones de las especies.

2.- Proponer utilizando genes mitocondriales una hipótesis de evidencia total (morfológica y DNA mitocondrial) las relaciones filogenéticas de las especies de *Orestias* de la Puna.

3.- Determinar el tiempo de divergencia de las especies utilizando la hipótesis de reloj molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Colecta de Muestras.

258 ejemplares fueron recolectados entre los años 2005 y 2007 desde 12 diferentes sistemas límnicos del altiplano sur en Chile Andino o puna (**Figura 8**). En estos muestreos se incluyeron tanto las localidades descritas en la literatura para cada especie como nuevas localidades; Las especies incluidas en este estudio fueron *O. parinacotensis* del bofedal de Parinacota, *O. laucaensis* del río Lauca y de la laguna de Cotacotani, *O. chungarensis* del Lago Chungará, *O. ascotanensis* del Salar de Ascotán, *O. piacotensis* de la laguna de Piacota y *O. agassizii* del Salar de Huasco y del río Isluga, *O. sp* del bofedal de Chuviri, *O. sp* del Salar de Carcote, *O. sp* del río Collacagua y *O. sp* de la quebrada de Umaqui. Para la determinación de las especies, se utilizaron las descripciones de Parenti (1984b), Vila y Pinto (1987), Vila (2006). Todo el material recolectado fue preservado en etanol puro al 100% y mantenido en la colección del Laboratorio de Limnología de la Universidad de Chile.

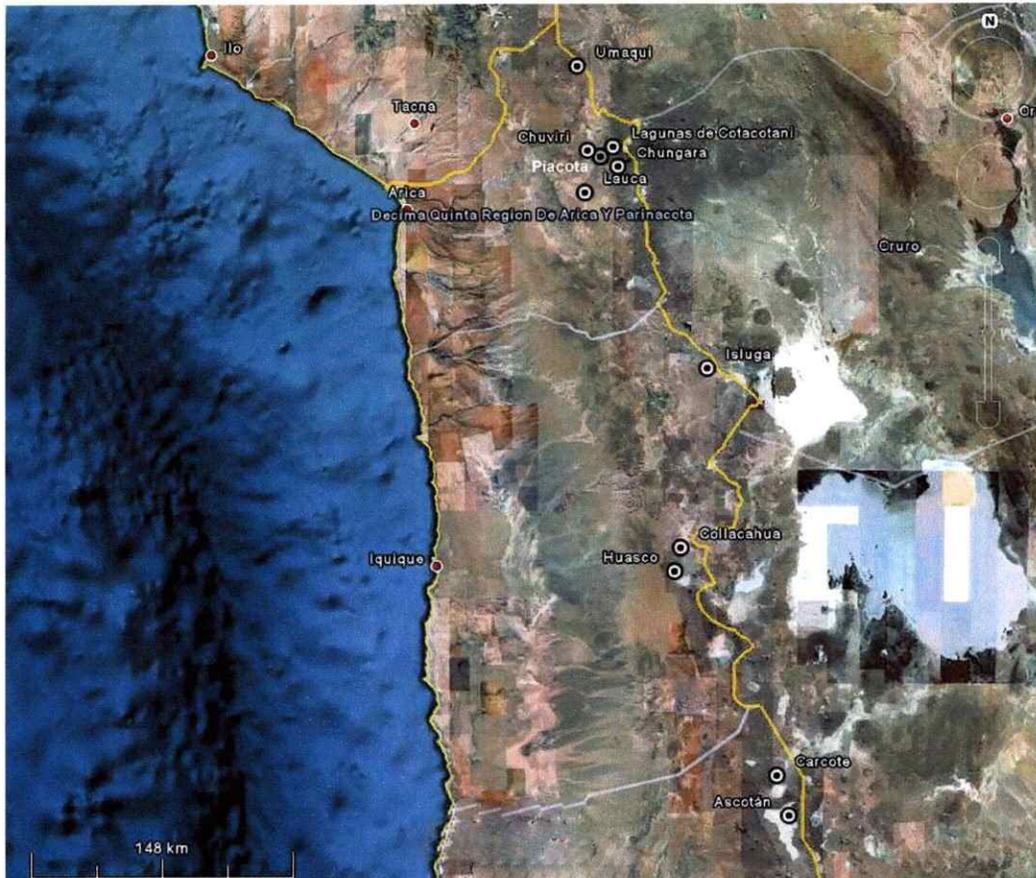


Figura 8. Mapa de Distribución de las localidades donde existe la presencia de *Orestias* utilizadas en este estudio.

4.2 Análisis Morfométrico y Merístico.

Las siguientes medidas fueron tomadas, utilizando una serie ontogenética de individuos, y utilizadas estandarizadas con la longitud estándar: longitud predorsal, longitud preanal longitud de la cabeza, altura de la cabeza, altura máxima, longitud del pedúnculo caudal, altura del pedúnculo caudal, diámetro de la orbita ocular ancho bucal y distancia preorbital (**Figura 9**). Para los análisis merísticos se utilizaron los mismos individuos realizándose un recuento del número escamas de la línea lateral, y el número de rayos de las aletas dorsal, anal, pectoral y caudal, en todos los análisis se utilizaron individuos adultos y juveniles. El análisis de datos incluyó un análisis de varianza

multivariado (MANOVA) utilizando todas las medidas morfométricas, agrupando los individuos por localidades muestreadas y por tipo de ambiente, clasificándolos en Lóticos, Lagos y Bofedales, los cuales se diferencian entre sí por sus características físicas y químicas. Los sistemas lóticos se refieren a ríos, sistemas de aguas corrientes, en que el flujo está determinado por la pendiente y es unidireccional y que presenta una mayor heterogeneidad espacial y temporal en cuanto a las variables físicas y químicas. A su vez los Lagos se refieren a sistemas de aguas quietas (de escaso caudal), en las cuales el flujo esta regulado por el viento y la temperatura, siendo este flujo turbulento, presentando una mayor homogeneidad de las variables físicas y químicas, en su zona pelágica, y finalmente los bofedales son áreas donde el suelo está saturado de agua o inundado parcialmente, con extremas variaciones anuales de agua. Los sistemas lóticos son los ríos Lauca, Isluga, vertientes de Huasco, Ascotán y Carcote; Lagos, Chungará, Piacota, Cotacotani; y finalmente los bofedales de Parinacota y de Chuviri. Se realizó además un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando el programa MVSP 3.12 (www.kovcom.com); un análisis discriminante (LDA) fue llevado a cabo utilizando el software Statistica 6.0 (Statsoft), utilizando cada especie como variable clasificadora. La función discriminante fue evaluada en una matriz de clasificación utilizando la opción de Jackknife. Además para determinar la correlación entre la diferenciación morfométrica y merística con la distancia geográfica se realizó un test de Mantel, utilizando el software Mantel 2.0 (Liedloff, 1990).

Con el objetivo de incorporar la información morfométrica y merística a los análisis filogenéticos, la cual aporte mayor cantidad de datos y un tipo diferente de evolución, que permita tener una visión mas completa de las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas, los datos recopilados fueron incorporados en una matriz y posteriormente codificados utilizando el software Morphocode (Schols et al. 2004), con

estos datos se confeccionó una matriz de datos de evidencia total, en conjunto con los datos moleculares.

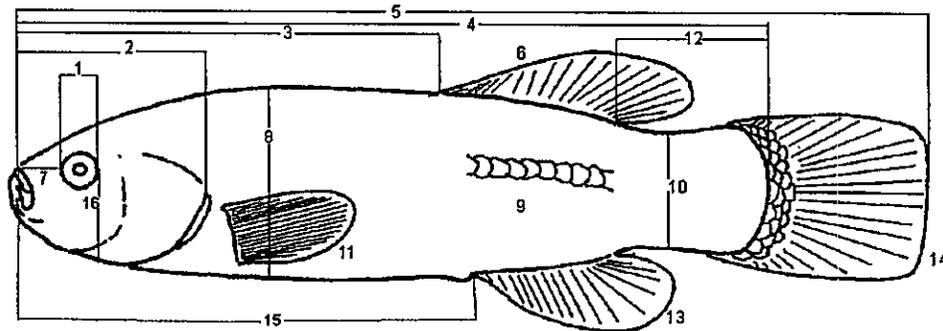


Figura 9. Mediciones Morfológicas y merísticas utilizadas en este estudio. 1 distancia interorbital. 2 largo cabeza. 3 longitud predorsal. 4 Largo estándar. 5 largo total. 6 rayos aleta dorsal. 7 largo narina. 8 profundidad del cuerpo. 9 escamas de la línea lateral. 10 profundidad pedúnculo caudal. 11 rayos aleta pectoral. 12 largo del pedúnculo caudal. 13 rayos aleta anal. 14 aleta caudal. 15 Longitud preanal. 16 Altura de la cabeza.

4.3 Extracción de DNA, amplificación y alineamiento.

La obtención de DNA genómico total se realizó a través de una muestra de músculo o aleta, para cada uno de los cuatro o cinco individuos de cada localidad utilizados en este trabajo (**Tabla III**). El tejido obtenido fue preservado en etanol al 100%. La extracción de DNA fue realizada utilizando el protocolo de fenol/cloroformo (Hillis et al. 1990). Los fragmentos de los genes Citocromo b, ND2 y Región Control del DNA mitocondrial fueron amplificados utilizando la técnica estándar de PCR en 50 uL, utilizando 1 uL del templado de DNA extraído. Las siguientes condiciones de PCR fueron utilizadas para la amplificación del fragmento ND2: primers ND2B-L (AAG CTT TCG GGC CCA TAC CC) y ND2E-H (TTC TAC TTA AAG CTT TGA AGG C), (Broughton and Gold, 2000). El programa térmico utilizado fue un precalentamiento a 94°C por 2 min. Seguido de 30 ciclos, denaturación a 94°C por 35 seg., annealing 50°C por 35 seg., extensión a 72 °C por 90 seg. y finalmente una extensión a 72°C por 1 min.

Para citocromo b los partidores L14724 (GACTTGAAAAACCACCGTTG) y H15915 (CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC) (Xiao et al. 2001). El programa térmico utilizado fue un precalentamiento a 94°C por 2 min. Seguido de 30 ciclos, denaturación a 94°C por 1 min., annealing 51°C por 1 min., extensión a 72 °C por 30 seg. y finalmente una extensión a 72°C por 10 min. Para la Región Control se utilizaron los siguientes partidores (ACCCCTAACTCCCAAAGCT) y (TGATAGTAAAGTCAGGACCAA) (Morales, 2009) el programa térmico utilizado fue un precalentamiento a 94°C por 2 min. Seguido de 30 ciclos, denaturación a 94°C por 35 seg., annealing 63°C por 90 seg., extensión a 72 °C por 90 seg. y finalmente una extensión a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, luego enviados a purificar y secuenciar a MacroGen Inc. (Korea). Los cromatogramas obtenidos fueron editados y las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Bioedit 7.0.1 (Hall, 1999). Los alineamientos obtenidos fueron posteriormente revisados de forma visual.

ESPECIE	LOCALIDAD	LATITUD (S)	LONGITUD(W)	NUMERO DE ESPECIMENES		
				ND2	Cytb	dLoop
<i>O. agassizii</i>	Río Isluga	19° 15' 22.9" S	68° 42' 22.7" W	5	4	5
<i>O. agassizii</i>	Salar de Huasco	20° 15' 46.0" S	68° 52' 31.6" W	5	5	5
<i>O. ascotanensis</i>	Salar de Ascotán	21° 29' 07.7" S	68° 15' 21.5" W	5	4	4
<i>O. sp</i>	Salar de Carcote	21° 16' 46.3" S	68° 19' 20.8" W	5	5	5
<i>O. chungarensis</i>	Lago Chungará	18° 15' 01.8" S	69° 10' 34.6" W	5	5	5
<i>O. parinacotensis</i>	Bofedal de Parinacota	18° 12' 02" S	69° 16' 04" W	4	5	4
<i>O. piacotensis</i>	Laguna de Piacota	18° 12' 01.5" S	69° 16' 02.1" W	5	5	5
<i>O. laucaensis</i>	Río Lauca	18° 22' 50.4" S	69° 20' 56.0" W	4	5	5
<i>O. sp</i>	Bofedal de Chuviri	18° 10' 09" S	69° 20' 05" W	4	3	4
<i>O. laucaensis</i>	Laguna Cotacotani	18° 12' 38.9" S	69° 14' 02.1" W	5	5	4
<i>O. sp</i>	Bofedal de Umaqui	17° 44' 12.6" S	69° 23' 26.2" W	5	5	4
<i>O. agassizii</i>	Río Collacagua	20° 08' 47.6" S	68° 50' 36.8" W	5	5	4
<i>O. puni</i>	Lago Titicaca	15° 50' 02.6" S	70° 01' 56.5" W	5	4	5

Tabla III. Localidades estudiadas y número de especímenes analizados para cada uno de los genes.

4.4 Análisis Filogenéticos.

Los análisis filogenéticos fueron realizados con el software PAUP* 4b10 (Swofford, 2003), para Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud. Se utilizó MrBayes v3.01 para estimar las relaciones filogenéticas utilizando Inferencia Bayesiana (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Huelsenbeck et al., 2002). Los datos fueron analizados utilizando cada partición por separado y en un análisis combinado de los genes Citocromo b, ND2 y Región Control del DNA mitocondrial.

Se realizan los tres análisis para el mismo set de datos, debido a que presentan diferencias en sus algoritmos y en la metodología utilizada en la optimización de las relaciones filogenéticas, el método de Máxima Parsimonia en términos generales se puede definir como “Un criterio científico para elegir entre hipótesis competentes que explican los datos del modo más simple y eficiente” (Kitching et al, 1998). En sistemática filogenética es análogo al principio auxiliar de Hennig “nunca asuma convergencia siempre asuma homología en ausencia de evidencia contraria”. Esto nos lleva a siempre elegir aquella hipótesis que involucre el menor número de pasos (“la más parsimoniosa”). En cambio el método de Maxima Verosimilitud y el de Inferencia Bayesiana, son métodos estadísticos que requieren de un modelo particular, ad-hoc a las secuencias utilizadas, para optimizar e inferir la hipótesis filogenética, en este caso “la más probable”. Así si se presenta una congruencia entre las hipótesis filogenéticas obtenidas con los distintos algoritmos, para una misma matriz de datos, se asumiría una mayor robustez en las interpretaciones basadas en esta hipótesis filogenética.

El análisis de Máxima Parsimonia se realizó a través de búsqueda heurística utilizando el algoritmo TBR (tree bisection and reconnection) con adición de secuencias aleatorias, la topología de los árboles fue examinada con bootstrapping (1000

pseudorélicas) (Felsenstein, 1985). Se realizó un análisis de homogeneidad de matrices (ILD) (Farris et al. 1995 a y b) para combinar las secuencias de los genes y realizar los análisis de datos combinados, favorecidos debido a que los genes mitocondriales son heredados como un locus único sin recombinación suponiendo que han experimentado historias de ramificación similares (Knudsen et al. 2007).

Para los análisis de Máxima Verosimilitud y Bayesiano, el modelo apropiado de sustitución molecular fue determinado por el uso del Criterio Información de Akaike (AIC) implementado en el programa Modeltest v3.06 (Posada and Crandall, 1998). Para el análisis de ML la topología de los árboles fue examinada con bootstrapping (500 pseudorélicas). Para MrBayes v3.06 la reconstrucción de la filogenia se utilizó los parámetros implementados para ML junto a valores por defecto de cuatro cadenas Markovianas. Se corrieron 5.000.000 de generaciones realizándose un muestreo de árboles cada 1000 generaciones. Para el análisis final se quemaron los primeros 500 árboles, obteniendo un total de 4500 árboles. Las probabilidades *a posteriori* fueron obtenidas para los grupos en un árbol de consenso de la mayoría construido a partir de los 4500 árboles retenidos. Para el análisis de Evidencia Total, las matrices obtenidas fueron analizadas con Máxima Parsimonia y análisis Bayesiano utilizando particiones moleculares (Citocromo b, ND2 y Región Control del DNA mitocondrial) y morfológicas, para esta última se utilizó el modelo Markov k model descrito por Lewis (2001) y para los caracteres moleculares se obtuvo el mejor modelo con el programa Modeltest v3.06 (Posada and Crandall, 1998).

En todos los análisis se utilizó como grupo externo a *Orestias puni*, material recolectado en el lago Titicaca debido a que Parenti (1984 a) sitúa a *O. puni* en un grupo monofilético contiguo al grupo donde están presentes las especies del Altiplano Sur, dentro del complejo *agassizii*, descrito por esta autora (Figura 2), el cual es un grupo

externo más cercano a las especies en estudio que el género *Aphanius* propuesto por Parker y Kornfield (1995).

4.5 Tiempos de divergencia.

Para estimar los tiempos de divergencia se usó el programa Beast v 1.5.3. Estos análisis fueron realizados utilizando el método bayesiano y con un reloj molecular relajado lognormal, el cual permite una variación en la tasa específica para cada rama utilizando una distribución lognormal (Drummond et al., 2006) con los parámetros por defecto y los modelos de evolución obtenidos para cada gen, en el caso del gen citocromo b se utilizó una tasa de sustitución molecular, 0,005 sustituciones/sitio/my (Zardoya y Doadrio, 1999) y 0,0152 sustituciones/sitio/my (Zardoya y Doadrio, 1998), en el caso de la región control se utilizó una tasa de 0,028 sustituciones/sitio/my, mientras que para el gen ND2, se usó una tasa de de sustitución molecular, 0,0013 sustituciones/sitio/my (Bermingham et al. 1997).

RESULTADOS.

5.1 Morfometría y Merística.

La **Tabla IV** presenta los datos merísticos para las series ontogenéticas analizadas. Los valores obtenidos en la merística no difieren entre juveniles y adultos de cada especie estudiada y son similares a los resultados entregados por Parenti (1984b). Además hay que hacer notar que existe una sobreposición en el rango de los caracteres examinados entre las especies.

Localidad	Rayos dorsal	Rayos pectoral	Rayos anal	Rayos caudal	Escamas Lateral	largo estándar	long. Predorsal	long preanal	Long cabeza	h cabeza	h máxima	long ped. caudal	h ped. Caudal	diámetro orbita	Ancho bucal	Dist Preorbital
Carcote	13-15	14-19	13-16	23-27	30-37	21,9-58,92	12,3-36,06	12,8-39,46	6,75-16,16	4,37-13,98	4,82-16,32	5,19-16,17	3,69-8,71	2,14-5,09	1,53-5,06	1,68-4,23
Chungará	12-14	12-16	12-14	24-27	33-37	39,53-82,1	20,62-46,4	23,75-53,89	10,39-20,69	8,67-20,52	8,59-21,86	10,35-21,31	5,5-12,54	3,3-5,8	3,3-6,84	2,86-7,12
Ascotan	12-16	14-17	15-15	21-25	30-34	58,65-75	48,32	38,1-49,67	16,21-22,48	12,19-18,6	14,25-19,65	11,13-17,25	8,67-12,33	3,86-6,83	3,11-8,17	4,2-6,98
Chuviri	12-16	14-16	12-15	22-25	29-34	84,35	49,73	41,04	12,03-21,35	7,79-16,63	10,7-12,5	9,06-18,2	7,2-12,8	3,22-5,79	2,67-6,11	2,04-4,43
Parinacota	12-16	16-18	11-14	19-25	26-36	56,41	15,5-35,18	36,17	7,47-14,56	5,18-10	6,42-12,69	5,62-12,12	3,86-8,04	2,35-3,93	1,87-4,59	1,24-3,6
Isluga	14-17	14-18	12-15	21-25	30-35	41,48-69,23	23,73-42,05	25,17-44,65	10,83-18,24	7,1-11,72	10,7-19,51	1,5-15,79	6,7-12,07	2,72-4,21	3,54-5,85	1,69-3,93
Piacota	14-16	15-17	14-16	21-27	30-36	37,4-71,72	22,62-41,92	24,59-47,41	10,35-18,73	6,13-11,84	8,6-17,17	7,8-16,27	4,82-10,74	2,93-4,07	2,19-4,99	1,46-3,98
Lauca	11-17	15-17	10-17	24-28	33-40	41,79-90,02	23,56-55,54	26,9-59,88	10,15-20,79	6,34-14,05	8,76-20,52	9,06-21,24	6,1-12,76	3,09-4,84	2,37-5,95	1,9-4,8
Huasco	14-15	14-17	14-16	22-26	32-34	36,7-53,79	21,2-33,26	34,73	9,48-14,61	6,17-8,94	9,25-14,87	7,62-12,12	5,6-8,07	2,61-3,84	2,52-4,26	1,86-3,07
Cotacotani	14-16	15-17	14-16	21-25	29-34	32,3-56,22	12,45-32,79	19,24-37,64	7,73-13,86	5,88-9,17	7,2-13,3	7,23-12,41	4,3-8,25	2,74-4,02	1,98-3,91	1,08-3,06

Tabla IV. Variación de las mediciones morfológicas y mensúricas utilizadas en este estudio, en milímetros.

El Análisis de Componentes Principales muestra que los dos primeros ejes dan cuenta del 99,6% de la varianza (**Figura 10**). En el primer eje la distancia pre orbital y el número de rayos de la aleta caudal y en el segundo eje el diámetro de la orbita, los rayos de las aletas dorsal, anal y caudal dan cuenta del mayor peso de la varianza. Este análisis muestra patrones poco claros tales que *O. ascotanensis* se encuentra agrupado en valores negativos en el espacio morfométrico, para ambos ejes, al igual que *O. chungarensis*, no encontrándose una clara diferenciación entre el resto de las especies en el espacio morfométrico.

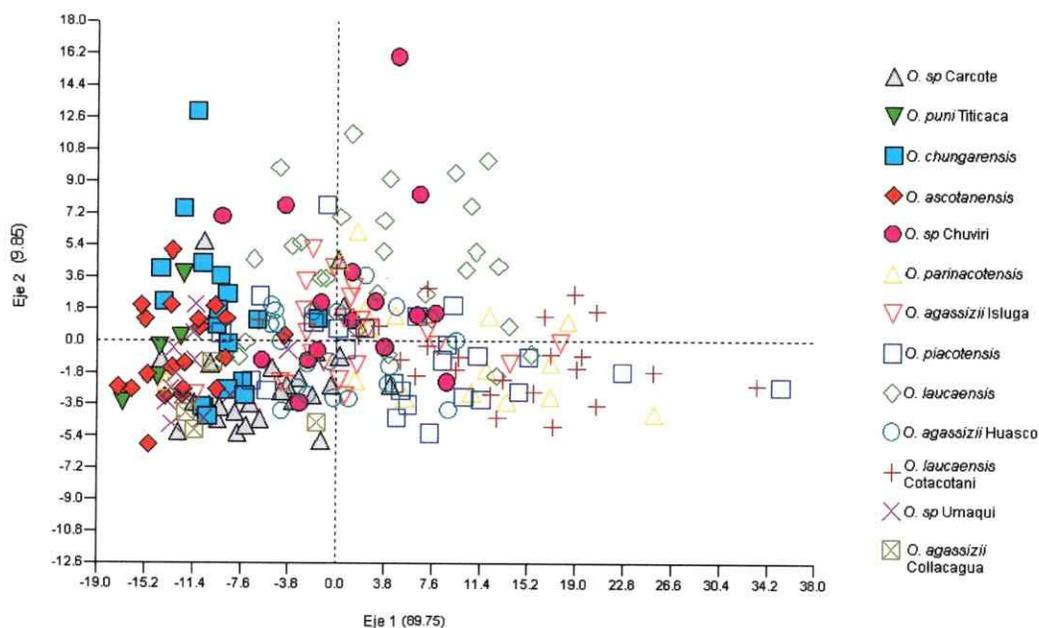


Figura 10. Análisis de Componentes Principales de 16 caracteres morfológicos y merísticos medidos en especies del complejo agassizii del Altiplano Sur. Los valores junto a los ejes corresponden al porcentaje de varianza explicado por cada uno de ellos.

El Análisis de Varianza Multivariado mostró diferencias significativas entre las localidades para los caracteres analizados (Wilks' Lambda = 0.0026 F= 12.32, df= 135 p-tail < 0.01), asimismo se encuentran diferencias significativas para cada uno de los

caracteres medidos en los análisis univariados (ANOVA) realizados entre las localidades analizadas ($p < 0.01$), además se observa que existen diferencias entre localidades para cada carácter, en el test a posteriori de Tukey para muestras desiguales, que permiten una diferenciación la especies entre si (**Tabla V**).

	<i>O. sp</i> Carcote	<i>O.</i> <i>chungarensis</i>	<i>O.</i> <i>ascotanensis</i>	<i>O. sp</i> Chuviri	<i>O.</i> <i>parinacotensis</i>	<i>O. agassizii</i> Isluga	<i>O.</i> <i>piacotensis</i>	<i>O.</i> <i>laucaensis</i>	<i>O. agassizii</i> Huasco
<i>O. chungarensis</i>	LC/RD/ RP/RA /EL	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. ascotanensis</i>	DP/RP /RC	LPD/LC/ LPC/RD /RP/RC /EL	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. sp</i> Chuviri	LC/HC /DO/RP /RC	LPA/HC/ LPC/DP/ RD/RP/ RC/EL	LPD/LC/ HC/DO /DP	-	-	-	-	-	-
<i>O.</i> <i>parinacotensis</i>	HC/DP /RC/EL	HC/LPC/ DP/RD/ RP/RC/ EL	LPD/HC /DP/ RP/EL	LPA	-	-	-	-	-
<i>O. agassizii</i> Isluga	LC/HC/ HM/HPC /AB/RD /RP/RC	HC/HM/ LPC/HPC /DP/RD/ RP/RA/ RC/EL	HC/HM/HPC /DP/RD	LPA/HM/ HPC/RD	HM/HPC /EL	-	-	-	-
<i>O. piacotensis</i>	LC/HC /HM/DP /RD	HC/LPC/ AB/DP/ RD/RP/ RA/EL	HC/AB/DP/ RD/RP/RA	RD/RA /RC	RD/RA/ EL	HM/HPC/ AB /RA/RC	-	-	-
<i>O. laucaensis</i>	LPD/LC/ HC/HM/ DO/AB/ DP/RD/EL	HC/LPC/ DO/AB /DP/RD/ RP/RA	LPD/LC/ HC/HM/ DO/AB/ DP/RD /RP/ RA/EL	LC/HC/AB /RD/RP /RA/RC /EL	LC/RD/ RA/RC/ EL	LC/HC/ HM/HPC /DO/AB /RP/RA /RC/EL	LC/HC/ DO/EL	-	-
<i>O. agassizii</i> Huasco	LC/HC/ RP/RC	HC/LPC/ DP/RD/ RP/RA/EL	LC/HC/ DP/RC	LPA/RA	HM/RA/ EL	HM/HPC	HM/HPC /RC	HC/HM/ DO/ AB/RD/ RC/EL	-
<i>O. laucaensis</i> Cotacotani	LPD/LC/ HC/HM /DP/RD/ RC/EL	HC/HM/ LPC/AB /DP/RD/ RP/RA/EL	LPD/LC/ HC/HM/ HPC/AB/ DP/RD/ RP/RC	LPA/HC /HM/HPC /DP/RD/ RP	LC/RA	LPD/LC/ HC/HM /HPC/AB /DP/RP	LPD/LC /RC	HPC/DO/ DP/ RC/EL	LPD/LC/ HM/HPC /DP/RP

Tabla V. Análisis de Tukey para muestras desiguales, para las diferenciaciones morfológicas entre localidades estudiadas. Las siglas que se muestran corresponden a los caracteres que presentan diferencias significativas entre las especies. LPD: Longitud Predorsal; LPA: Longitud Preanal; LC: Longitud Cabeza; HC: Altura Cabeza; HM: Altura Máxima; LPC: Longitud Pedúnculo Caudal; HPC: Altura Pedúnculo Caudal; DO: Diámetro Orbita; AB: Ancho Bucal; DP: Distancia Preorbital; RD: Rayos Dorsal; RP: Rayos Pectoral; RA: Rayos Anal; RC: Rayos Caudal; EL: Escamas Línea Lateral.

Además se exploró la diferenciación morfológica en los diferentes tipos de ambientes, para lo cual se clasificaron las localidades en sistemas lóticos, lagos y bofedales. Este análisis multivariado (MANOVA) mostró diferencias significativas entre los tipos de ambientes analizados (Wilks' Lambda = 0,39378, F= 7.60, df= 30 p-tail< 0.01), el análisis univariado de los datos (ANOVA) muestra diferencias significativas para todos los caracteres excepto para la Longitud preanal, Diámetro de la Órbita, Ancho bucal, y el número de rayos de las aletas Pectoral y Caudal, en la **Tabla VI** se muestran los caracteres morfológicos y merísticos que mostraron diferencias entre los sistemas.

	Lótico	Lago
Lótico	-	
Lagos	LPD/LC/HM/HPC/DP	-
Bofedal	DP/RD/RA/EL	LPC/HPC/RA/EL

Tabla VI. Análisis de Tukey para muestras desiguales, para las diferenciaciones morfológicas entre tipos de ambientes de las localidades estudiadas. Las siglas que se muestran corresponden a los caracteres que presentan diferencias significativas entre las especies. LPD: Longitud Predorsal; LPA: Longitud Preanal; LC: Longitud Cabeza; HC: Altura Cabeza; HM: Altura Máxima; LPC: Longitud Pedúnculo Caudal; HPC: Altura Pedúnculo Caudal; DO: Diámetro Orbita; AB: Ancho Bucal; DP: Distancia Preorbital; RD: Rayos Dorsal; RP: Rayos Pectoral; RA: Rayos Anal; RC: Rayos Caudal; EL: Escamas Línea Lateral.

El LDA mostró que existen diferencias significativas entre las especies (Wilks' Lambda: 0.00265 $F_{(135,1454)}=12.322$ $p<0.01$), con altos valores de clasificación para *O. chungarensis* y *O. ascotanensis* con un 100% de clasificación correcta, *O. sp* Carcote, *O. agassizii* de Isluga y Huasco, *O. laucaensis* con valores sobre el 90%, *O. sp* Chuviri, *O. parinacotensis*, *O. laucaensis* Cotacotani con valores sobre el 80% y solamente *O. piacotensis* presenta valores bajos de clasificación con un valor de 68% (**Tabla VII**). El análisis de Mantel muestra una correlación no significativa entre la distancia geográfica y la diferenciación morfológica ($r= 0.42$, $p = 0.089$).

	% Correcto	Carcote	Chungará	Ascotan	chuviri	Parinacota	Isluga	Piacota	Lauca	Huasco	cotacotani
<i>O. sp</i> Carcote	96,1	25	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>O. chungarensis</i>	100	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>O. ascotanensis</i>	100	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
<i>O. sp</i> Chuviri	87,5	0	0	0	14	0	1	0	0	1	0
<i>O. parinacota</i>	84,6	2	0	0	0	11	0	0	0	0	0
<i>O. agassizii</i> Isluga	90,4	1	0	0	0	1	19	0	0	0	0
<i>O. piacotensis</i>	68	1	0	0	1	0	0	17	3	2	1
<i>O. laucaensis</i>	92,5	0	0	0	1	0	0	1	25	0	0
<i>O. agassizii</i> Huasco	90	0	0	0	0	0	0	1	0	18	1
<i>O. laucaensis</i> Cotacotani	87,5	0	0	0	1	1	0	1	0	0	21
Total	89,5	29	17	21	17	13	20	20	28	21	23

Tabla VII. Análisis Discriminante. Número de Individuos correctamente clasificados basado en sus caracteres morfométricos y merísticos.

5.2 Análisis Molecular.

5.2.1 Región Control.-

La amplificación de la Región Control resultó en un fragmento de 972 pares de bases. El análisis de Máxima Parsimonia entregó en 2597 árboles igualmente parsimoniosos (no mostrados), con un largo de 175 pasos, un índice de consistencia (CI) = 0,4286, un índice de retención (RI) = 0,8084 y un índice de consistencia reescalado (RC) = 0,3465. El análisis de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica TRN+I, asumiendo las frecuencias nucleotídicas, A=0.31400 C=0.15750 G=0.29960 T=0.22890, y la proporción de sitios invariables = 0.6795, encontró un árbol más probable con un valor de $-\ln = 2861.63968$, árbol mostrado en

la **Figura 11**. El análisis Bayesiano fue realizado utilizando el mismo modelo y los parámetros obtenidos para el análisis de Máxima Verosimilitud, obteniéndose a partir de los 4500 árboles retenidos un árbol de consenso (no mostrado) donde la topología fue similar al análisis de ML.

Todos los análisis filogenéticos realizados muestran tres linajes principales, en un primer linaje se encuentran las poblaciones presentes en el Parque Nacional Lauca (cuenca del Río Lauca), *O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis*, *O. sp* Chuviri (*/*/1), en la región norte del Altiplano Sur, las especies pertenecientes a este linaje no presentan resolución al interior de este grupo; como un grupo hermano a este se encuentra *O. sp* (Carcote) que conforma un linaje bien definido con valores de respaldo para MP, ML e IB de 98/98/1, respectivamente (este orden será utilizado en el texto).

Un segundo linaje agrupa *O. agassizii* del río Collacagua, *O. ascotanensis* y *O. agassizii* Salar de Huasco (79/*/1) junto a *O. sp* de Umaqui. Finalmente, ubicándose como tercer linaje, *O. agassizii* del Río Isluga en una posición de grupo hermano al anterior (92/78/1).

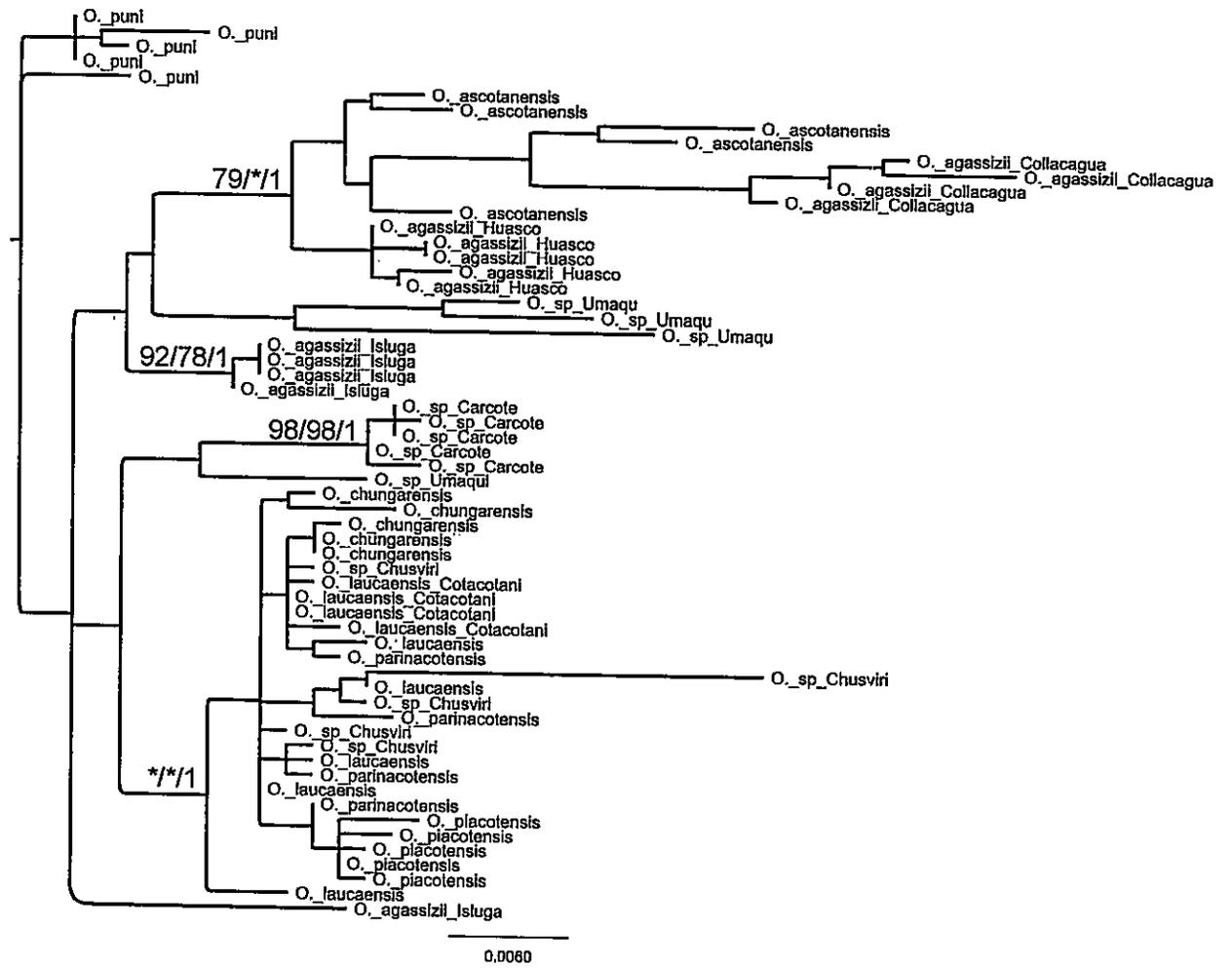


Figura 11. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud del gen Mitocondrial Región Control. 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.

5.2.2 Citocromo b.-

La amplificación del gen citocromo b resultó en un fragmento de 1137 pares de bases. El análisis de Máxima Parsimonia resultó en 144 árboles igualmente parsimoniosos (no mostrados), con un largo de 40 pasos, un índice de consistencia (CI) = 0.8000, un índice de retención (RI) = 0.9638 y un índice de consistencia reescalado (RC) = 0.7710. El análisis de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I, asumiendo las frecuencias nucleotídicas, A=0.31830 C=0.16190 G=0.28220 T=0.23760, y la proporción de sitios invariables = 0.8356, produjo un árbol más probable con un valor de $-\ln = 1998.72818$ (Figura 12). El análisis Bayesiano fue realizado utilizando el modelo y parámetros obtenidos para el análisis de Máxima Verosimilitud, obteniéndose a partir de los 4500 árboles un árbol de consenso con los valores de probabilidad a posteriori de cada uno de los nodos (no mostrado).

En todos los análisis filogenéticos realizados se puede observar un linaje conformado por las especies presentes en el Parque Nacional Lauca, *O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis* y *O. sp* Chuviri, en la región norte del Altiplano Sur (93/93/1) no presentando resolución en las relaciones al interior de éste, junto a éste se observa un segundo linaje (73/81/0.99) conformado por *O. ascotanensis* y *O. agassizii* del río Collacagua junto a este se encuentra *O. agassizii* Salar de Huasco, encontrando como grupo hermano de este a *O. sp* de Carcote (96/95/1), y algunos individuos de *O. sp* de Umaqui. Finalmente como un tercer linaje encontramos a *O. agassizii* del Río Isluga en una posición como grupo hermano al resto de las especies de este estudio.

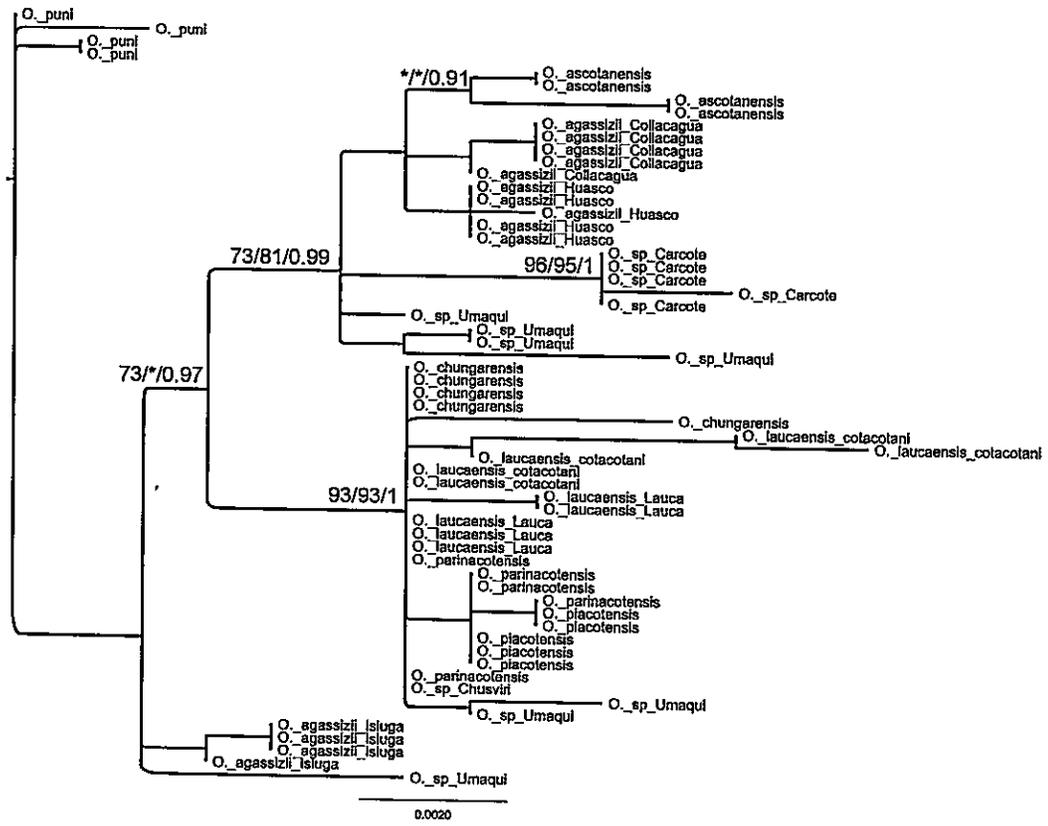


Figura 12. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud del gen Mitochondrial Citocromo b. 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.

5.2.3 Gen ND2.-

La amplificación del gen ND2 resultó en un fragmento de 1041 pares de bases. El análisis de MP para el gen ND2, resultó en 18096 árboles igualmente parsimoniosos (no mostrados), con un largo total de 25 pasos, un índice de consistencia (CI) = 0.8000, un índice de retención (RI) = 0.9640, y un índice de consistencia reescalado (RC) = 0.7712. Mientras que el análisis de máxima verosimilitud utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR+H+G, asumiendo las frecuencias nucleotídicas, A=0.30360 C=0.15300 G=0.31950 T=0.22390, la proporción de sitios invariables = 0.6304 y el parámetro de forma (alpha) = 1.0378, encontró un árbol más probable con un valor de $-\ln = 1889.90569$ (Figura 13). El análisis Bayesiano fue realizado utilizando el mismo modelo y los parámetros obtenidos para el análisis de Máxima Verosimilitud, obteniéndose un árbol de consenso (no mostrado). Los tres análisis realizados muestran topologías similares donde se puede observar que en un primer linaje se encuentran las especies presentes en el Parque Nacional Lauca (*O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis*, *O. sp* Chuviri) (91/91/1), en la región norte del Altiplano Sur, como un grupo hermano a este se observa un linaje conformado por *O. sp* de Carcote presentando valores de soporte de nodos altos (96/93/1), como un segundo linaje las especies *O. agassizii* Salar de Huasco y Collacagua junto a *O. ascotanensis* (86/78/0.88). Junto a este linaje encontramos a *O. sp* Umaqui. Finalmente *O. agassizii* del Río Isluga no presenta una diferenciación de *O. puni* del Lago Titicaca.

5.3 Análisis de Evidencia Total.-

5.3.1 Caracteres Moleculares.-

La incorporación de los tres genes utilizados resultó en un fragmento de 3150 pares de bases. El análisis de MP para la matriz, resultó en 6048 árboles igualmente parsimoniosos (no mostrados), con un largo total de 269 pasos, un índice de consistencia (CI) = 0.4907, un índice de retención (RI) = 0.8474, y un índice de consistencia reescalado (RC) = 0.4148. Mientras que el análisis de máxima verosimilitud utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G, asumiendo las frecuencias nucleotídicas, A=0.30280 C=0.18470 G=0.25670 T=0.25580, la proporción de sitios invariables = 0.8467 y el parámetro de forma (alpha) = 0.9037, encontró un árbol más probable con un valor de $-\ln = 7016.64$ (Figura 14). El análisis Bayesiano fue realizado utilizando el mismo modelo y parámetros obtenidos para el análisis de Máxima Verosimilitud, resultando un árbol de consenso de la mayoría (no mostrado).

Los tres análisis realizados muestran que en un primer clado se encuentran las especies presentes en el Parque Nacional Lauca (*O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis*, *O. sp* Chuviri) (99/99/1), en la región norte del Altiplano Sur, como un grupo hermano a éste se observa en un segundo linaje las especies *O. agassizii* Salar de Huasco y Collacagua junto a *O. ascotanensis* (99/98/1), donde podemos observar que *O. agassizii* de Huasco conforma un linaje diferenciado, robusto estadísticamente (98/98/1). Junto a este linaje encontramos a *O. sp* Umaqui y *O. sp* de Carcote conformándose nuevamente como un linaje robusto (100/100/1). Finalmente *O.*

agassizii del Río Isluga se presenta como grupo hermano al resto de las especies del grupo en estudio..

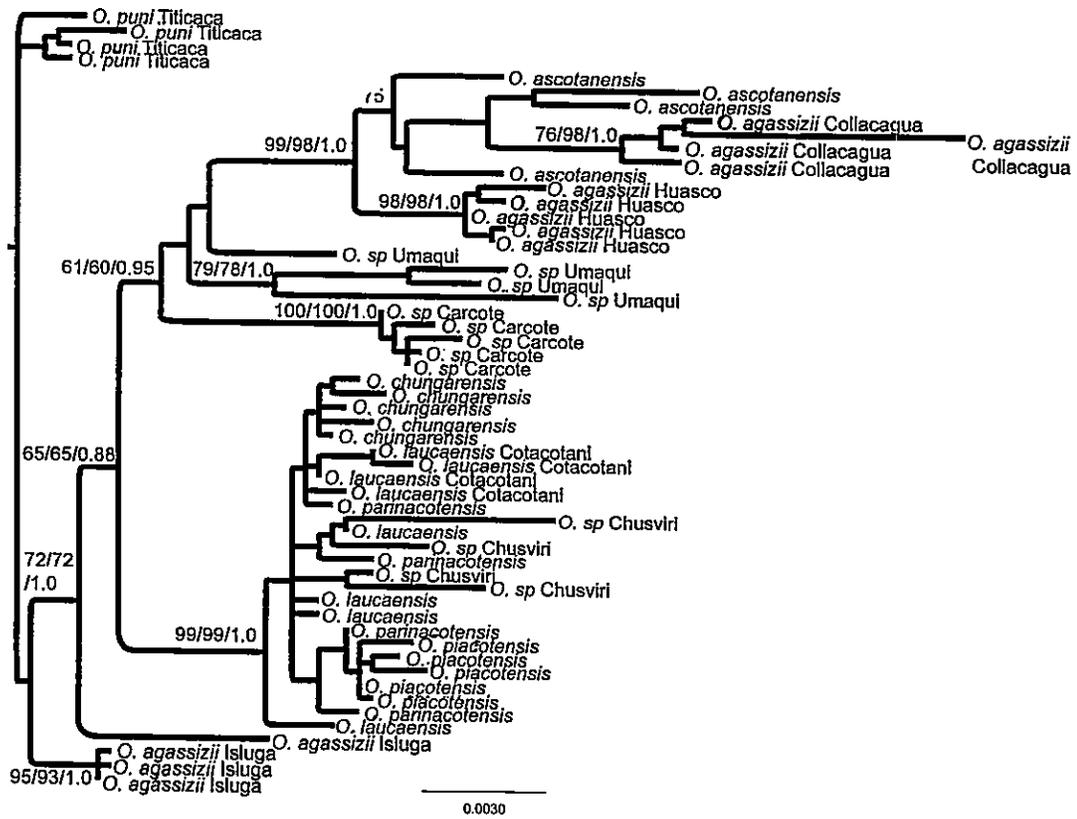


Figura 14. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud de los tres genes Mitocondriales incorporándose en una matriz de Evidencia Total (ND2; Región Control; Citocromo b). 1000 réplicas de bootstrap, Los valores de soporte de los nodos corresponden: arriba parsimonia, medio máxima verosimilitud, abajo probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados o con asterisco (*) corresponden a valores menores al 70%.

5.3.2 Caracteres Moleculares y Caracteres Morfológicos.

El análisis de Máxima Parsimonia para la matriz de evidencia total resultó en 4 árboles igualmente parsimoniosos, con un largo de 302 pasos, un índice de consistencia (CI) = 0.4338, un índice de retención (RI) = 0.4956 y un índice de consistencia reescalado (RC) = 0.2150. El análisis Bayesiano realizado obteniéndose a partir de los 4500 árboles los valores de probabilidad a posteriori de cada uno de los nodos.

La **Figura 15** muestra uno de los cuatro árboles más parsimoniosos, el cual es congruente con el análisis Bayesiano (**Figura 16**). Este árbol presenta tres linajes: en el primero se observa a *O. agassizii* del Río Isluga no diferenciada de *O. puni* del Lago Titicaca, en un segundo linaje se encuentran las especies presentes en el Parque Nacional Lauca, *O. chungarensis*, *O. laucaensis*, *O. parinacotensis*, *O. piacotensis* (93/1.0), presentándose como el grupo hermano a este el conformado por los individuos de *O. sp* de Carcote (*0.99). El tercer linaje agrupa a *O. ascotanensis*, *O. agassizii* Salar de Huasco y del Río Collacagua y *O. sp* de Umaqui.

Para los tres genes en todos los análisis y en el análisis de evidencia total, *O. ascotanensis* y *O. sp* (Carcote), se presentan en linajes separados, así mismo como en el caso de *O. agassizii* de las vertientes del Salar de Huasco y del Río Isluga.

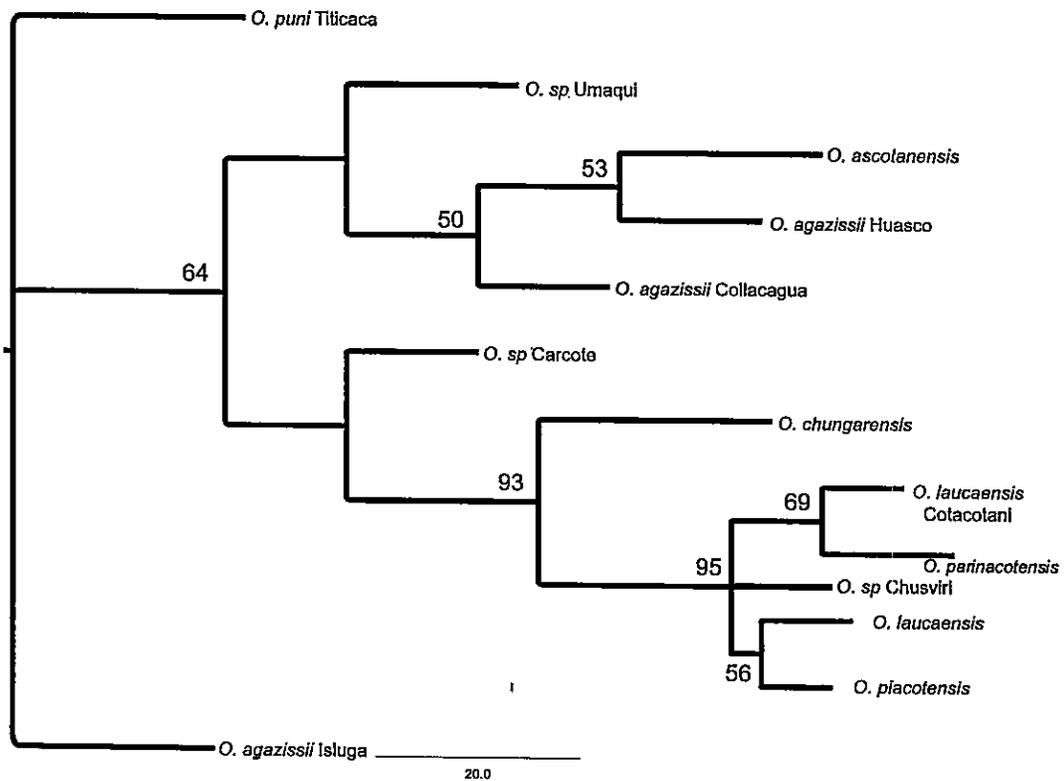


Figura 15. Árbol Filogenético de Máxima Parsimonia de la Matriz de Evidencia Total. 1000 réplicas de bootstrap, los valores no mostrados corresponden a valores menores al 50%.

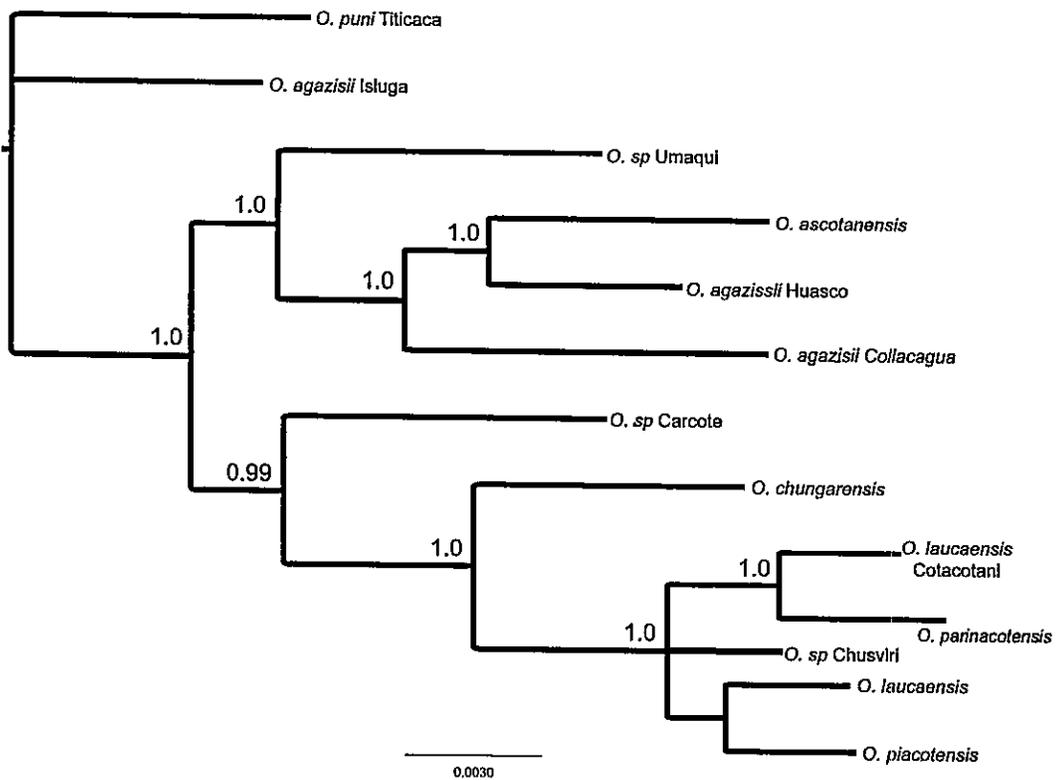


Figura 16. Árbol Filogenético Bayesiano de la Matriz de Evidencia Total. Los soportes de los nodos corresponden a la probabilidad posterior Bayesiana, los valores no mostrados corresponden a valores menores al 0.95.

5.4 Reloj Molecular.-

Los resultados del análisis de reloj molecular se muestran en la **Tabla VIII**. Este análisis muestra que el gen citocromo b presenta valores de divergencia en los nodos soportados por el análisis bayesiano para todos los linajes resultantes en el análisis filogenético, disminuyendo en el número de nodos con soporte para entregar datos confiables de divergencia para la Región Control y el gen ND2, además la Región control y ND2 no fueron utilizados para la discusión debido a que las tasas de divergencias (y sus intervalos de confianza) aparecen altamente variables relativos al gen Citocromo b.

En primer lugar observamos que *O. puni* y *O. agassizii* del Río Isluga (Nodo F, **Figura 17**) se habrían separado hace 1,225 Myr, siendo una diferenciación más tardía entre estos dos linajes que su diferenciación con el resto de los linajes encontrados en el altiplano sur, ocurrido hace 1,263 Myr (Nodo A), contemporáneos a la existencia del Paleolago Mataro y Cabana. La diferenciación entre el linaje del Parque Nacional Lauca y los linajes ubicados más al sur (*O. sp* Carcote; *O. agassizii* de Huasco y Collacagua; *O. ascotanensis* y *O. sp* Umaqui), fue aproximadamente hace 1.105 Myr, entre los episodios lacustres Mataro y Cabana. *O. agassizii* de Collacagua presenta un tiempo de divergencia de su especie hermana, *O. ascotanensis* de 0.843 Myr, el cual podría coincidir con el Paleolago Ballivian (aprox 0,7 Myr); este linaje aparece diferenciado hace 0.881 Myr (Nodo E) de *O. agassizii* del Salar de Huasco. El linaje formado por *O. agassizii* de Collacagua, *O. ascotanensis* y *O. agassizii* de Huasco se diferenciaron 0.966 Myr atrás (Nodo D) de *O. sp* Umaqui, datación que coincide al período previo del paleolago Ballivián, finalmente *O. sp* Carcote, el grupo hermano de este linaje (Nodo

C), se diferenci6 de este hace 0.992 Myr dataci6n coincidente con las fechas entre los paleolagos Cabana y Ballivi6n.

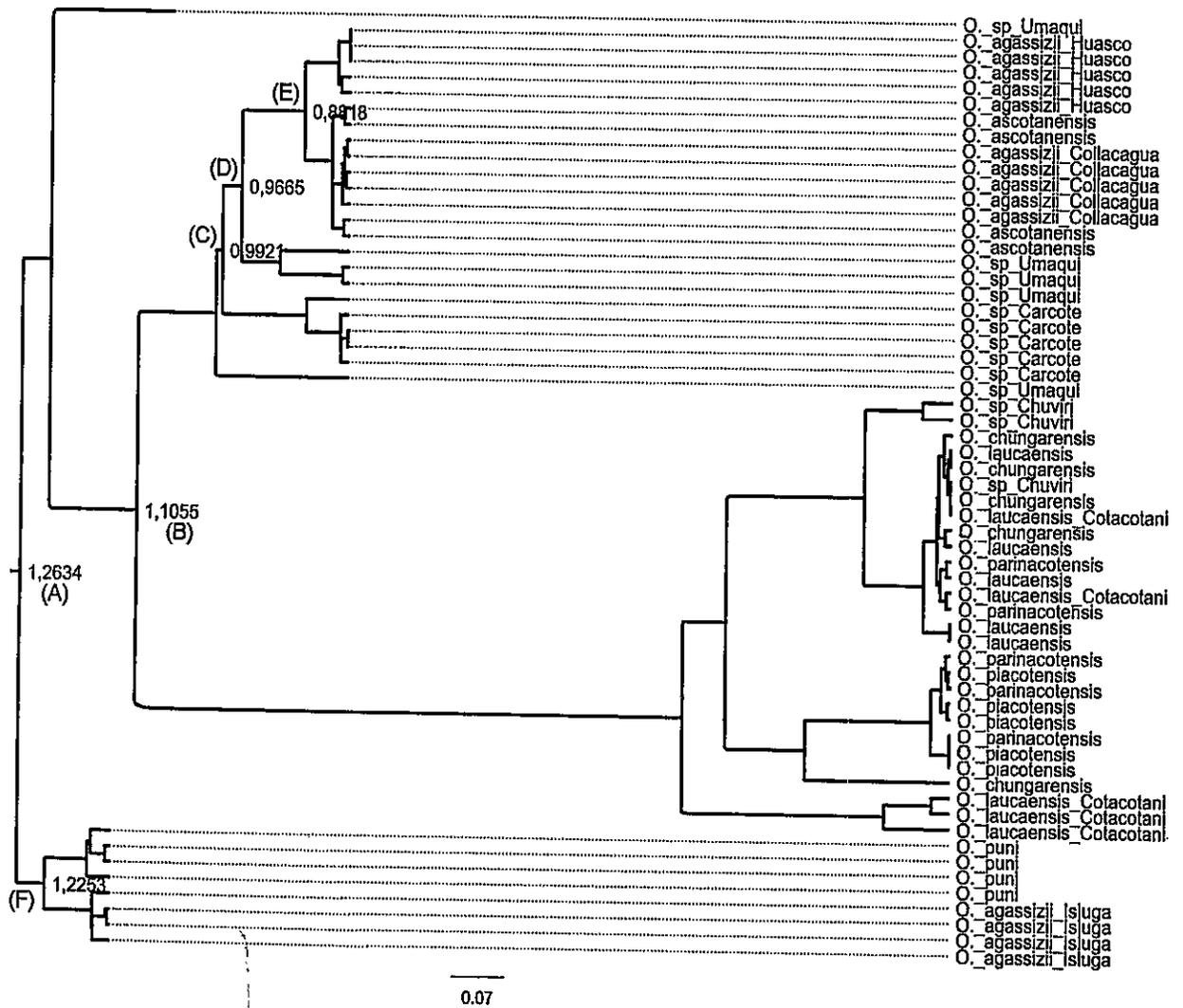


Figura 17. Reconstrucci6n del tiempo de divergencia de los nodos, utilizando el gen Citocromo b, realizados por Inferencia Bayesiana, El valor sobre el nodo es el tiempo de divergencia estimado.

Nodo	Citocromo b (1.52%)	Citocromo b (0.5%)	Región Control (2.8%)	ND2 (1.3%)
A	1,263	2,278	0,980	
B	1,105	1,424	0,716	2,136
C	0,992	0,712	0,633	
D	0,966	0,948		
E	0,881	0,468	0,508	0,568
F	1,225	0,431	1,066	0,188

Tabla VIII. Tiempo de divergencia de los distintos linajes de la figura 14, para cada uno de los genes utilizados. Los tiempos de divergencia utilizados para cada reconstrucción se encuentran es paréntesis.

Discusión.

Los sistemas acuáticos de la zona neotropical de América presentan la ictiofauna más diversa del mundo, cerca de 6000 a 13,000 especies (Reis *et al.* 2003). Esta diversidad de especies muestra un alto grado de endemismos, con relaciones zoogeográficas interesantes, con ejemplos de radiaciones adaptativas y antiguas relaciones con África, Europa y Asia, las cuales datan desde el período Eoterciario (Hrbek and Meyer, 2003 Ringuelet 1975; Arratia 1997).

La fauna íctica de los sistemas acuáticos de la meseta de altura o Altiplano, como es el caso de *Orestias*, un Cyprinodontiforme, género endémico de la sub región Brasilica y del dominio de los Andes (Ringuelet, 1975), donde sus especies ancestrales estaban presentes previo el levantamiento de los Andes, y los cuales están actualmente distribuidas desde el Lago Lacsha in Perú al Salar de Ascotán en el norte de Chile.

Parenti (1984 a, b), describe que *Orestias* habría experimentado una especiación explosiva en el Lago Titicaca, a su vez las especies descritas para el Altiplano Sur indican un alto grado de endemismo, con especies únicas en cada sistema hidrográfico.

Los sistemas acuáticos de la zona de la Puna Andina (17° a 22°S) representan los remanentes de importantes lagos y ríos Plio-Pleistocénicos, los cuales con la posterior aridización han evolucionado en lagunas y salares a través de la evaporación y del uso de sus aguas (Chong, 1988).

6.1 Caracteres morfológicos y merísticos de las poblaciones de *Orestias*.

El análisis de los caracteres merísticos y morfológicos muestran concordancia con las descripciones originales de las especies (Parenti 1984b; Arratia, 1982; Vila & Pinto 1986; Vila 2006).

Los resultados muestran que no existen caracteres diagnósticos únicos, entre los analizados, presentando un alto grado de sobreposición entre ellos, la diferenciación obtenida entre las especies, en concordancia a los trabajos de descripciones originales, se presenta para el conjunto de estos caracteres, los que logran clasificar correctamente las especies (Parenti 1984b; Arratia, 1982; Vila & Pinto 1986; Vila 2006). Tanto los análisis univariados como multivariados muestran una diferenciación entre las especies estudiadas, siendo *O. piacotensis* la única en no ser clasificada correctamente en el análisis discriminante, estos resultados concuerdan con análisis de morfometría geométrica realizados (datos no mostrados) llegandose, por esta vía, a las mismas conclusiones. Nuestros datos muestran que los análisis morfológicos y morfométricos presentan un poder discriminatorio entre las diferentes especies de *Orestias*, mostrando que cada especie presenta una combinación de valores de los caracteres analizados que permite discriminarlas correctamente unas de otras. Estos resultados muestran concordancia con lo reportado en las descripciones originales de Parenti (1984b), Arratia (1982), Vila & Pinto (1986) y Vila (2006).

Al realizar el análisis en relación a las características hídricas de los diferentes ambientes, esto es diferenciando sistemas lóticos, lagos y bofedales, se encuentran diferencias significativas asociadas a las características ambientales propias de cada uno de estos sistemas límnicos, esto puede ser debido a que muchos ambientes acuáticos sustentan hábitats que varían en la velocidad de sus aguas (régimen hídrico), y es

conocido que algunos peces varían su morfología entre ambientes lótico y de lagos (Robinson & Wilson, 1994; Taylor et al., 1997; Hendry et al., 2000; Pakkasmaa & Piironen, 2000; Brinsmead & Fox, 2002), ya que cuerpos más fusiformes reducen el roce, disminuyendo el gasto energético necesario para la natación (Keast & Webb, 1966; Blake, 1983; Webb, 1984; Videler, 1993; Vogel, 1994). Estos patrones morfológicos pueden reflejar respuestas adaptativas a hábitats alternativos, la morfología funcional de la natación de los peces y de su alimentación sugieren roles adaptativos para las diferencias morfológicas en cada uno de los tipos ambientales.

6.2 Establecimiento de una hipótesis filogenética de las especies de *Orestias* de la Puna.

El resultado de los análisis filogenéticos moleculares utilizando los genes del DNA mitocondrial: Región Control, Citocromo b y ND2, revelan consistentemente la existencia de un linaje perteneciente a la zona del Parque Nacional Lauca, en la región de Parinacota, el cual se presenta bien diferenciado del resto de las especies de *Orestias* presentes en el Altiplano Sur, aun cuando no se observa una resolución entre las especies que allí habitan el cual no señala resolución en la diferenciación entre las especies previamente descritas para esta zona. Un segundo linaje bien definido y robusto es el integrado por *O. sp* del Salar de Carcote, la posición de éste en los análisis filogenéticos varía al estar como grupo hermano a las especies del Parque nacional Lauca, en los análisis utilizando la Región Control y el análisis de Evidencia Total, por el contrario este linaje pasa a ser el grupo hermano del segundo clado (*O. ascotanensis*, *O. agassizii* Salar de Huasco y del Río Collacagua) para los genes Citocromo b y ND2.

En todos los análisis se observa a *O. agassizii* del Salar de Huasco junto a *O. agassizii* del Río Collacagua, el cual está ubicado aproximadamente 50 Km. al noreste del Salar de Huasco, y *O. ascotanensis*, la especie que presenta la distribución más austral del género y *O. sp* Umaqui junto a este segundo clado. En el análisis de la Región Control encontramos que *O. agassizii* del Río Isluga se presenta como grupo hermano al linaje ubicado en el Parque Nacional Lauca, en cambio para los genes Citocromo b y ND2 y también en el análisis de Evidencia total, se observa a *O. agassizii* del Río Isluga formando un grupo más cercano a *O. puni* del Lago Titicaca, siendo el grupo hermano del resto de *Orestias* del Altiplano Sur.

Para la totalidad de los análisis realizados se observa que *O. agassizii* del Río Isluga y *O. agassizii* del Salar de Huasco, descritos por Mann en 1954 como *O. agassizii* se presentan como linajes distintos, bien diferenciados, lo que sugeriría que corresponden a especies distintas.

Nuestros análisis muestran que las topologías obtenidas de tanto los análisis de cada gen o de evidencia total, son muy similares, evidenciando la existencia de tres clados, 1) el primero agrupa a *O. agassizii* del Río Isluga, cercano a *O. puni* del Titicaca, 2) un segundo clado corresponde a *O. ascotanensis*, *O. agassizii* del Río Huasco presentándose como un grupo hermano a este a *O. sp.* del Salar de Carcote, y 3) un clado que agrupa a las especies del Parque Nacional Lauca, en este clado no fue posible obtener una resolución clara entre las especies con los genes evaluados.

Estos resultados son similares a los reportados por Lüßen et al. (2003) quienes, utilizando la zona D-Loop del DNA mitocondrial (385 pb), encuentran un clado entre los 17 °S- 20°S (nuestro clado 3) y otro clado entre los 21°S-22°S (que incluye nuestros clados 1 y 2). Estos autores plantean además que, dada la baja diversidad genética observada entre las especies del complejo *agassizii* entre los 17 °S- 20°S, afirman que

estas muestras corresponderían a la misma especie. Debe considerarse, sin embargo que estas conclusiones están basadas en un fragmento parcial de la zona D-Loop del DNA mitocondrial (385 pb), evidencia que es insuficiente para afirmar que se trata de variación a nivel de la misma especie. Por otra parte, los análisis morfométricos y merísticos muestran que las especies de esta región presentan diferencias que permiten distinguirlas como distintas unidades. Con relación a los otros dos clados detectados, en nuestros análisis es evidente que las poblaciones del Salar de Ascotan y del Salar de Carcote, ambas consideradas como *O. ascotanensis*, corresponderían a especies distintas. Asimismo, para el caso de *O. agassizii*, descrita para las localidades de Río Isluga y Salar de Huasco, se encontró que no corresponderían a un mismo linaje, siendo *O. agassizii* del Río Isluga más cercana a *O. puni* del Lago Titicaca y *O. agassizii* del Salar de Huasco se ubicó en el clado más cerca a *O. ascotanensis* y *O. sp* (Carcote).

De las especies descritas para el Parque Nacional Lauca: *Orestias piacotensis* Vila 2006, *O. parinacotensis* Arratia 1982, *O. laucaensis* Arratia 1982, *O. chungarensis* Vila & Pinto 1986, la especie previamente descrita que se valida en este estudio es *O. ascotanensis* Parenti (1984).

Como resultado adicional de este estudio se propone la existencia de nuevas especies, las cuales se presentan como linajes diferenciados en la reconstrucción filogenética serían *O. sp* Umaqui, *O. sp* Salar de Carcote, *O. sp* Isluga, *O. sp* Huasco, *O. sp* Collacagua.

6.3 Tiempos de Divergencia.

El análisis de Reloj Molecular, utilizando marcadores que presentan diferentes ventanas temporales a nivel evolutivo (**Figura 18**), muestra que la diferenciación de *O. ascotanensis* y *O. agassizii* del Río Collacagua habría ocurrido hace 843 Kyr previo los últimos paleolagos que abarcaron gran parte del área Altiplánica, según las dataciones podría coincidir con el Paleolago Ballivian (700 Kyr) (Fornari et al, 2001; Placzek et al., 2006; Figura 15). Para el caso de *O. laucaensis*, *O. chungarensis*, *O. parinacotensis* y *O. piacotensis*, los datos moleculares muestran que la diferenciación con el clado 2 habría ocurrido hace 1105 Kyr coincidiendo con los períodos de los Paleolagos Mataro – Cabana. La falta de resolución al interior del linaje del Parque Nacional Lauca podría deberse a una divergencia reciente, esto es posible de observar a nivel morfológico donde *O. laucaensis* y *O. chungarensis* presentan diferenciación, mientras que entre *O. parinacotensis* y *O. piacotensis*, son muy similares morfológicamente, esta hipótesis es apoyada por la información disponible en cuanto el origen descrito de los lagos de esta zona (James 1973; Spotorno and Veloso 1990; Schwalb et al, 1999) (**Figura 19**).

La divergencia de los dos clados anteriores con *O. agassizii* del Río Isluga habría ocurrido en 1263 Kyr contemporáneo a las dataciones del Paleolago Mataro. La separación de *O. agassizii* del Río Isluga con *O. puni* tiene una datación de 1225 Kyr. Parker y Kornfield (1995) propusieron que el ancestro Cyprinodontido habitó el oeste del Mar de Tetis entre el Jurásico Tardío y el Cretácico Temprano (146 – 100 Ma), proponiendo una colonización del norte de Sudamérica durante Albiano tardío y el Turoniano (100 – 88 Ma).

Nuestras dataciones son anteriores a las obtenidas por Lüssen et al. (2003), quien encuentra que el “complejo *agassizii*” evolucionó entre 530 y 880 Kyr, durante el

cuaternario tardío, además hace una subdivisión entre lo que llama “Southern Chilean lineage”, compuesto por el Río Collacahua, Salar de Ascotán y Salar de Huasco y encontrando una divergencia de las especies chilenas entre 370 a 600 Kyr (Cuaternario Tardío), esta diferencia podría deberse, en primer lugar al marcador utilizado, en ese estudio no se incorporó toda la información potencial entregada por este marcador, debido a que se secuenció sólo una porción de 385 pb del gen mitocondrial D-Loop, en cambio en el presente trabajo se utilizaron tres marcadores mitocondriales con un tamaño mucho mayor de información. Una segunda fuente de diferencia con el trabajo de Lüssen *et al.* Es la metodología utilizada en la reconstrucción de la datación de los nodos, estos autores no dan cuenta de la metodología utilizada en su reconstrucción, en cambio en este trabajo utilizamos estimaciones bayesianas que utiliza modelos probabilísticos para describir los cambios en la tasa evolutiva a través del tiempo, utilizando el procedimiento de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para calcular a posteriori la distribución de las tasas evolutivas y los tiempos de divergencia de cada nodo del árbol, incorporando distribuciones lognormales de estas tasas.

Esta evidencia junto a la reportada en el presente trabajo nos sugiere que para el clado asociado al Parque Nacional Lauca, la divergencia entre las especies que la conforman sería más reciente, y muy probablemente vía factores cromosómicos y/o factores ecológicos. En contraste para las especies de distribución más al sur como *O. agassizii*, *O. ascotanensis* y *O. sp* (Carcote) se habrían visto mayormente afectadas por las fluctuaciones que se presentaron en los niveles hidrológicos durante el Pleistoceno en la cuenca altiplánica, encontrándose en este período una sucesión de períodos secos y períodos húmedos, evidenciado por la existencia de distintos paleolagos de diferente extensión y profundidad, este hecho habría gatillado la diferenciación vía procesos alopátricos en este clado (Lavenu *et al.* 1984; Fornari *et al.* 2001, Risarher *et al.* 2003).

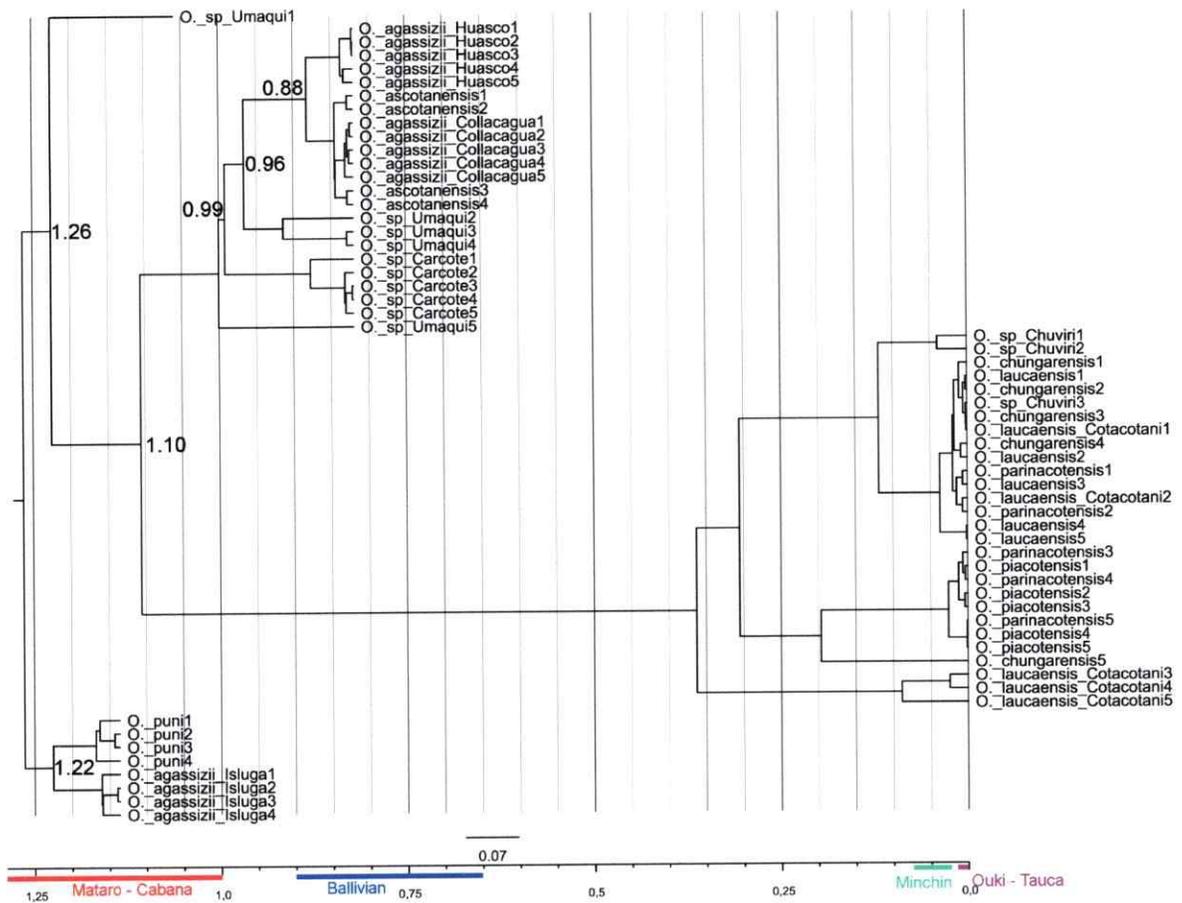


Figura 18. Reconstrucción del tiempo de divergencia de los nodos, utilizando el gen Citocromo b. El valor sobre el nodo es el tiempo de divergencia, se grafican los tiempos aproximados en que estuvieron presentes los principales eventos lacustres en el Altiplano.

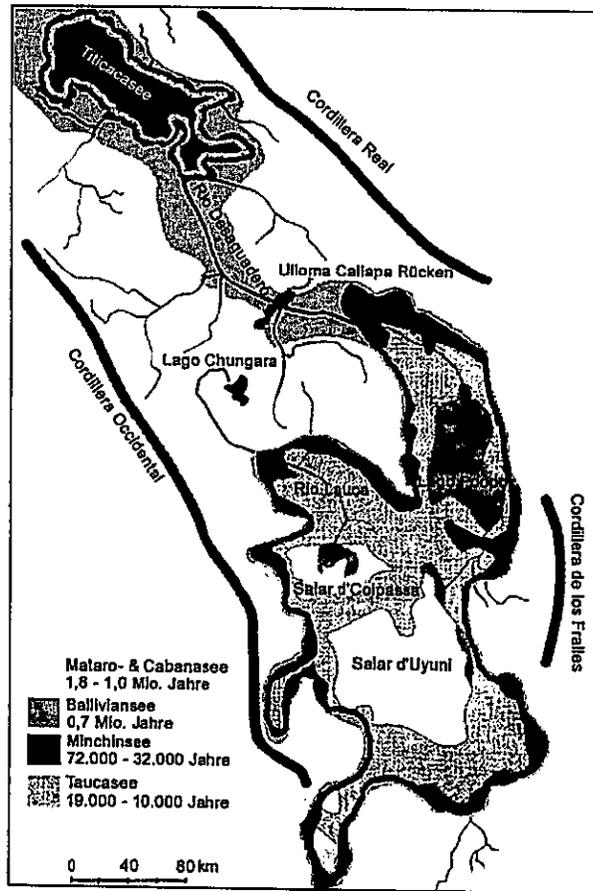


Figura 19. Reconstrucción de las áreas de paleolagos y las fechas de estos eventos lacustres. (Lavenu, 1992, Wirmann et al. 1992, Villwock et al. 2000)

Se ha postulado que la especiación de *Orestias* sería el resultado de un proceso de fragmentación de una o más poblaciones durante el Pleistoceno (Northcote; 2000; Costa, 2003; Placzek 2006), así aunque las especies pudieron estar unidas por los grandes paleolagos presentes en la zona más meridional del Altiplano, dado que las dataciones obtenidas de las especiaciones son previas al último gran paleolago, no necesariamente las especies se interrelacionaron, pudiendo permanecer con una fuerte filopatria, lo que impidió su entrecruzamiento y la presencia de una mezcla de especies en los sistemas hídricos del Altiplano Sur (Fraser et al. 2004). Otra fuente de variabilidad puede estar dado por la diferenciación de los sistemas hídricos durante los períodos secos del Pleistoceno, teniendo una importante participación los paleoríos presentes en la zona y sistemas con calidades de aguas diferentes como pueden ser la salinidad o las variaciones de temperatura, que en la actualidad presentan una alta diversidad desde sistemas muy salinos a otros con baja salinidad, lo cual es muy diferente entre sistemas.

Los resultados muestran la importancia de los eventos vicariantes en esta zona del Altiplano, la cual ha sufrido una gran cantidad de cambios en su morfología y en la distribución de los sistemas hídricos, los cuales son importantes para determinar el estatus taxonómico de las especies, como es el caso de poblaciones de peces cíclidos Africanos (Genner et al., 2004). Esto en contraste con los resultados observados en otros grupos especiosos de peces, como es el caso de especiación simpátrica en peces Cíclidos africanos en los lagos Victoria o Tanganica (Greenwood, 1964, Seehausen, 2006, Turner, 2007), Lago Baikal (Kozhow, 1963), o el mismo caso de *Orestias* presentes en el Lago Titicaca, las cuales presentan una gran diversificación, posiblemente por diversificación del uso de hábitat, selección sexual, etc. (Parenti, 1984 a, b; Villwock, 1986).

La importancia de estudios de filogenias moleculares de organismos acuáticos, endémicos, del Altiplano ofrecen una aproximación alternativa para investigar procesos históricos de eventos geológicos y sus cambios ecológicos concomitantes (Peng et al. 2006). Nueva evidencia a nivel molecular (marcadores nucleares) es necesaria para evaluar y comprender el proceso de especiación que originó a *O. parinacotensis*, *O. piacotensis*, *O. chungarensis* y *O. laucaensis*, donde posiblemente los eventos ocurridos durante el Pleistoceno unidos a un complejo escenario de procesos geológicos como son el volcanismo y la tectónica pudieron promover la especiación alopátrica del grupo. Para esta tarea, además de utilizar mayor cantidad de información a nivel genético, se requiere el considerar nuevos métodos asociados a árboles de genes (“gene trees”, sensu Templeton, 2001) desarrollados especialmente para determinar el status de especie a nivel filogeográfico, además de incorporar una mayor cantidad de grupos externos como podrían ser *O. ispi*, *O. crawfordii* y *O. gilsoni*, para darle una mayor robustez a la polarización de caracteres en los análisis.

Finalmente estos resultados sugieren que la sistemática del grupo debería ser revisada de modo de dar cuenta de los nuevos hallazgos reportados en nuestro trabajo.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran tres clados bien diferenciados, 1) el primero agrupa a *O. agassizii* del Río Isluga, cercano a *O. puni* del Titicaca, 2) un segundo clado corresponde a *O. ascotanensis*, *O. agassizii* del Río Huasco presentándose como un grupo hermano a este *O. sp.* del Salar de Carcote, y 3) un clado que agrupa a las especies del Parque Nacional Lauca; en este clado no fue posible obtener una resolución clara entre las especies con los genes evaluados. Los cuales presentan dataciones de divergencia previos al último gran Paleolago, el Lago Tauca. Además las poblaciones de *O. agassizii* de los ríos Huasco e Isluga son linajes bien diferenciados posiblemente siendo especies distintas. *O. sp.* del Salar de Carcote, que presentaba una clara diferenciación morfológica y los análisis filogenéticos las mostraba como un linaje distinto la cual está siendo descrita.

Desde el punto de vista morfológico, la diferenciación fenotípica en las poblaciones de *Orestias* muestra un claro poder diferenciador del conjunto de datos morfológicos analizados, sin embargo no existen, entre estos caracteres, alguno que presente características diagnósticas.

En relación al estado taxonómico de las especies de *Orestias* en este estudio encontramos que de las especies previamente descritas: *O. parinacotensis* Arratia 1982, *O. laucaensis* Arratia 1982, *O. chungarensis* Vila & Pinto 1986, *O. ascotanensis* Parenti 1984, *Orestias piacotensis* Vila 2006, *O. agassizii* (sensu Mann, 1954) Isluga y Salar de Huasco, solo podemos validar *O. ascotanensis*. Para *O. parinacotensis* Arratia 1982, *O. laucaensis* Arratia 1982, *O. chungarensis* Vila & Pinto 1986, *Orestias piacotensis* Vila 2006, no logramos resolución a nivel de los análisis filogenéticos, sin embargo si existe

una clara diferenciación de estas especies a nivel morfológico. Finalmente como resultado de esta Tesis se proponen nuevas especies para esta región *O.sp* del Salar de Carcote, *O. sp* Umaqui, *O. sp* Isluga, *O. sp* Huasco, *O. sp* Collacagua (estas últimas descritas como *O. agassizii*; Mann, 1954).

PREGUNTAS	RESPUESTA
<p>¿Los caracteres morfológicos y merísticos, de las poblaciones en estudio de <i>Orestias</i>, presentan características diagnósticas de las especies, desde un contexto filogenético?</p>	<p>El análisis de los caracteres morfológicos no permiten discriminar un único carácter diagnóstico para las especies, pero el conjunto de caracteres analizados permiten realizar una correcta clasificación de las especies descritas de <i>Orestias</i>.</p>
<p>¿Cuáles son las relaciones filogenéticas de las especies de <i>Orestias</i> de la Puna?</p>	<p>Los resultados obtenidos en este estudio muestran tres clados principales bien diferenciados, 1) el primero agrupa a <i>O. agassizii</i> del Río Isluga, cercano a <i>O. puni</i> del Titicaca, 2) un segundo clado corresponde a <i>O. ascotanensis</i>, <i>O. agassizii</i> del Río Huasco presentándose como un grupo hermano a este <i>O. sp.</i> del Salar de Carcote, y 3) un clado que agrupa a las especies del Parque Nacional Lauca</p>
<p>¿Cual es el tiempo de divergencia de los linajes de <i>Orestias</i> de la Puna?</p>	<p>Entre 1,263 y 0,88 Ma. Estas fechas son previas al último gran Paleolago, Lago Tauca, que ocupó la zona sur de la cuenca Altiplánica.</p>
<p>¿Los linajes diferenciados corresponden a nuevas especies no descritas?</p>	<p>Sí, podrían corresponder a nuevas especies que requieren de un estudio más acabado para su descripción.</p>

Tabla IX. Resumen, principales interrogantes y sus respuestas, en los capítulos que consta esta Tesis.

BIBLIOGRAFÍA.

Arratia, G. (1982): Peces del altiplano de Chile en El Hombre y los Ecosistemas de Montaña. – 1: 93-133. Ed. A. Veloso y E. Bustos. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la Unesco para América Latina y el Caribe. Montevideo, Uruguay.

Arratia, G. 2004. Mesozoic halecostomes and the early radiation of teleosts.– In Arratia, G. and A. Tintori (eds.): Mesozoic Fishes 3 – Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity: 279-315, 17 figs., 1 table. Verlag Dr. F. Pfeil, Muenchen.

Bailey K. M., 1997. Structural dynamics and ecology of flatfish populations, J. Sea Research, vol. 37, pp. 269-280.

Barlow, G. W. 1961. Causes and significance of morphological variation in fishes. Systematic Zoology. 10: 105-117.

Bermingham E, Martin AP . 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. Molecular Ecology Volume: 7 Issue: 4 Pages: 499-517.

Bermingham E., McCafferty S., Martin P. 1997, Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. En: Kocher T. y Stepien C Eds. Molecular Systematics of Fishes. Academic Press. 314 pp.

- Blake, R.W. 1983. Fish locomotion. Cambridge university press, Cambridge.
- Brinsmead, J. & Fox, M. G. (2002). Morphological variation between lake- and streamdwelling rock bass and pumpkinseed populations. *Journal of Fish Biology* 61, 1619–1638.
- Broughton RE, Gold JR. 2000. Phylogenetic relationships in the North American cyprinid genus *Cyprinella* (Actinopterygii : Cyprinidae) based on sequences of the mitochondrial ND2 and ND4L genes *COPEIA* Issue: 1 Pages: 1-10.
- Cardin S. H. and Friedland K. D. 1999. "The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification," *Fisher. Research*, vol. 43, pp. 129-139.
- Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 91-110.
- Castoe, T.C., Doan, T.M., Parkinson, C.L., 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of *gymnophthalmid* lizards. *Syst. Biol.* 53, 448–469.
- Castoe, T.C., Sasa, M., Parkinson, C.L., 2005. Modeling nucleotide evolution at the mesoscale: the phylogeny of the Neotropical pitvipers of the *Porthidium* group (Viperidae: Crotalinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 881–898.
- Chong, G.D. 1988. The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude. In Bahlburg, H., Ch. Breitkreuz & P. Geise (Eds). *The Southern Andes. Lecture Notes in Earth Sciences* 17: 137-151.

Costa, W. 1997. Phylogeny and classification of the Cyprinodontidae revisited (Teleostei: Cyprinodontiformes): are Andean and Anatolian killifishes sister taxa?. *Journal of Comparative Biology* 2(1): 1-17.

Costa, W. 1998. Phylogeny and classification of the Cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha): a reappraisal. Pp. 537-560. -In: L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena and C.A.S. Lucena (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre.

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1:159-187.

de Merona B, Hugueny B, Tejerina-Garro FL, Gautheret E. Diet-morphology relationship in a fish assemblage from a medium-sized river of French Guiana: the effect of species taxonomic proximity. *Aquatic Living Resources* Volume: 21 Issue: 2 Pages: 171-184.

Doyle J J. 1992. Gene Trees And Species Trees - Molecular Systematics As One-Character Taxonomy. *Systematic Botany* Volume: 17 Issue: 1 Pages: 144-163.

Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG & Solomon W, 2002. Estimating Mutation Parameters, Population History and Genealogy Simultaneously From Temporally Spaced Sequence Data. *Genetics* 161, 1307-1320.

Drummond, A., Ho, S., Phillips, M., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, e88.

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

Dyer, B. 2000. Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Est. Oceanol.* 19: 77-98.

Eernisse Dj, Kluge Ag 1993 Taxonomic Congruence Versus Total Evidence, And Amniote Phylogeny Inferred From Fossils, Molecules, And Morphology. *Molecular Biology And Evolution* Volume: 10 Issue: 6 Pages: 1170-1195.

Farris , J. S., M. Källersjö, A. G. Klug E, And C. Bult . 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319.

Farias I., Ortí G. and Meyer A. 2000. Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 288: 76-92.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.

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

Frase D., LIPPÉ C and BERNATCHEZ L. 2004. Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology* (2004) 13, 67–80.

Fritz S., P. Baker, T. Lowenstein, G. Seltzer, C. Rigsby, G. Dwyer, P. Tapia, K. Arnold, T L. Lung Ku, S. Luo. 2004. Hydrologic variation during the last 170000 years in the southern hemisphere tropics of South America. *Quaternary Research* 61: 95-104.

Gayet, M., Meunier, F.J. 1998. Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. In Malabara, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S. (Eds.), *Phylogeny and classification of neotropical fishes*, Porto Alegre, Brazil, pp. 85-110.

Glenner H, Hansen AJ, Sorensen MV, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Willerslev E 2004 Bayesian inference of the metazoan phylogeny: A combined molecular and morphological approach. *Current Biology* Volume: 14 Issue: 18 Pages: 1644-1649.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hall T. and Johnston I. 2003. Temperature and developmental plasticity during embryogenesis in the Atlantic cod. *Gadus morhua* L. *Marine Biology*, 142: 833-840.

Hendry, A. P., J. K. Wenburg, P. Bentzen, E. C. Volk, and T. P. Quinn. 2000. Rapid Evolution of Reproductive Isolation in the Wild: Evidence from Introduced Salmon. *Science* 290(5491):516-518.

Hillis, D. M., A. Larson, S. K. Davis and E. A. Zimmer. 1990. Nucleic Acids III: Sequencing, p.318-370. In: D. M. Hillis and C. Mortiz (Editors), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Hosoya K., Kawamura K. 1997. Osteological Evaluation in Artificial Seedlings of *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). UJNR Tecnica Report N° 24, US Japan Cooperative Program in Natural Resources Technical.

Huelsenbeck JP, Crandall KA 1997 Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood, *Annual Review Of Ecology And Systematics* Volume: 28 Pages: 437-466.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-5.

Huelsenbeck, J.P. B. Larget, R.E. Miller, F. Ronquist. 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology*, 51: 673-688.

Hugueny B, Pouilly M. 1999. Morphological correlates of diet in an assemblage of West African freshwater fishes. *Journal Of Fish Biology* Volume: 54 Issue: 6 Pages: 1310-1325.

Hurlbert, S. and C. Chang. 1984. Ancient ice islands in salt lakes of the Central Andes. *Science*, vol. 224.

James, D. 1973. The evolution of the Andes. *Sci. Amer.* 229:60-69.

Keast, A. And Webb, D. (1966). Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. *J. Fish. Res. Bd Can.* 23, 1845-1874.

Keller, B. and D. Soto. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 147-156.

Kinne O., Kinne E M. 1962. Effects of salinity and oxygen on developmental rates in a Cyprinodont fish. *Nature*, 193: 1097-1098.

Klohn, W. 1972. Hidrografía de las zonas desérticas de Chile PNUD. Proyecto CHI-35. Santiago. Chile, 188 pp. Ed. Jean Burz.

Knudsen S. W., Moller P.R., Gravlund P. 2007. Phylogeny of the snailfishes (Teleostei: Liparidae) based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:649-666.

Kocher T D, Conroy J A, McKaye K R, and Stauffer J R. 1993. Similar morphologies of Cichlid fish in Lake Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2: 158-165.

Kocher, T. D. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat. Rev. Genet.* 5:288–298.

Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L., Kentouri M. 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 139: 817-830.

Lauzanne, L. 1982. Les Orestias (Pisces, Cyprinodontidae) du Petit Lac Titicaca. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 15(1): 38-70.

Lavenu A., M. Fornari, M. Sebrier. 1984. Existence de deux nouveaux épisodes lacustres quaternaires dans l'Altiplano péruvo-bolivien. *Cah ORSTOM, ser. Geol* 14 : 103-114.

Lewis, P. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50:913--925.

Losos JB, Jackman TR, Larson A, de Queiroz K, Rodriguez-Schettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science* Volume: 279 Issue: 5359 Pages: 2115-2118.

Lundberg, J.G. 1997. Fishes of the La Venta Fauna: additional taxa biotic and paleoenvironmental implications. In: Kay, R.F (Ed.), Vertebrate paleontology in the Neotropics: The Miocene fauna of La Venta Colombia. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. pp. 67-91.

Lundberg, J.G., Machado-Allison, A., Kay, R.F. 1986. Miocene characid fishes from Colombia: evidence for evolutionary stasis and extirpation in the South American ichthyofauna. *Science* 234, 208-209.

Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabara, M.C.S.L. Wesselingh, F. 1998. The stage of neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabara, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S. (Eds.), Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre, Brazil, pp. 13-48.

Lüssen A., T.M. Falk and W. Villwock. 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.

MacGregor R. and MacCrimmon H. R. 1977. Evidence of genetic and environmental influences on meristic variation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Environmental Biology of Fishes*, 2 (1): 25-33.

Magallón, S. A. 2004. Dating lineages: Molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. *Int. J. Plant Sci.* 165:7-21.

Maldonado E, Hubert N, Sagnes P, De Merona B. 2009. Morphology-diet relationships in four killifishes (Teleostei, Cyprinodontidae, *Orestias*) from Lake Titicaca. *Journal Of Fish Biology* Volume: 74 Issue: 3 Pages: 502-520.

Mann G. 1954. Vida de los peces en aguas chilenas. Ministerio de Agricultura y Universidad de Chile. Santiago, Chile, 342 pp.

Marshall, L.G., Sempere, T., 1993. Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic, and tectonic context. In: Goldblatt, P. (Eds.), *Biological relationships between Africa and South America*, Yale University Press, New Haven, CT, pp. 329–392.

Morales, P. 2009. Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: El caso de *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) de los salares de Ascotán y Carcote en el Altiplano chileno. Tesis de Magíster, Universidad de Chile.

Montti, S., y H. Henríquez. 1972. Interpretación hidrogeológica de la génesis de salares y lagunas del Altiplano chileno. *Actas II Congreso Geol. Chile*. 3: 69-81.

Moyle, P., J. Cech. 2000. *Fishes: An introduction to ichthyology – fourth edition*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.

Niemeyer H & P Cereceda. 1984. Hidrografía. *Geografía de Chile*. Tomo VIII. Instituto Geográfico Militar, Chile, 320 pp.

Northcote TG. 2000. Ecological interactions among an orestiid (Pisces : Cyprinodontidae) species flock in the littoral zone of Lake Titicaca. *Advances In Ecological Research*, Vol 31. Book Series: *Advances In Ecological Research*. Volume: 31. Pages: 399-420.

Norton Sf, Luczkovich Jj, Motta Pj. 1995. The Role Of Ecomorphological Studies In The Comparative Biology Of Fishes. *Environmental Biology Of Fishes*. Volume: 44. Issue: 1-3. Pages: 287-304.

Pakkasmaa S. and Piironen J., 2000. Water velocity shapes juvenile salmonids. *Evol. Ecol.*, 14, 721-730.

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

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

Parenti, L. R. 1984b. Biogeography of the Andean killifish genus *Orestias* with comments on the species flock concept. pp. 85-92, 5 figures, In: *Evolution of fish species flocks*, A.A. Echelle & I. Kornfield (eds.), University of Maine Press.

Parker, A. & Kornfield, I. 1995. Molecular perspective on evolution and zoogeography of Cyprinodontid killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1995:8-21.

Pinto M., Vila I., Relaciones tróficas y caracteres morfofuncionales de *Orestias laucaensis* Arratia 1982 (PISCES: CYPRINODONTIDAE). An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso, 18: 77-84.

Placzek, C., Quade, J. & P.J. Patchett. (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 (5/6): 515–532.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution BIOINFORMATICS Volume: 14 Issue: 9 Pages: 817-818.

Pouilly M, Lino F, Bretenoux JG, Rosales C. 2003. Dietary-morphological relationships in a fish assemblage of the Bolivian Amazonian floodplain. Journal Of Fish Biology Volume: 62 Issue: 5 Pages: 1137-1158.

Poulet N., Reyjol Y., Collier H., and Lek S., 2005. "Does fish scale morphology allow the identification of *populatio leuciscus burdigalensis* in river Viaur (SW France)," Aquat. Sci., vol. 67, pp. 122-127.

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

Renner, S. S. 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. Trends. Plant Sci. 10:550–558.

Retzer, M.E., 1994. Systematics of the stick catfishes (Farlowella, Loricariidae). Ph.D. thesis, The University of Illinois, USA.

Robinson, B.W. and D.S. Wilson. 1994. Character release and displacement in fishes: A neglected literature. *The American Naturalist* 144: 596-627.

Sanderson, M. J., Thorne, J. L., Wikström, N., Bremer, K., 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *Am. J. Bot.* 91:1656–1665.

Schols P., D'hondt C., Geuten K., Merckx V., Janssens S., Smets E.. 2004. MorphoCode: coding quantitative data for phylogenetic analysis. *PhyloInformatics* 4: 1-4

Schluter D. 1993. Adaptive Radiation In Sticklebacks - Size, Shape, And Habitat Use Efficiency. *Ecology* Volume: 74 Issue: 3 Pages: 699-709.

Schluter D. 1996. Ecological causes of adaptive radiation. *American Naturalist* Volume: 148 Pages: S40-S64 Supplement: Suppl. S.

Schluter D. 2000. Ecological character displacement in adaptive radiation. *American Naturalist* Volume: 156 Pages: S4-S16 Supplement: Suppl. S.

Schluter D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends In Ecology & Evolution* Volume: 16 Issue: 7 Special Issue: Sp. Iss. SI Pages: 372-380.

Schwalb A., S. Burns, K. Kelts. 1999. Holocene environments from stable isotope stratigraphy of ostracods and authigenic carbonate in Chilean Altiplano lakes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 148: 153-168.

Sempere, T., Butler, R.F., Richards, D.R., Marshall, L.G., Sharp, W., Swisher, C.C. 1997. Stratigraphy and chronology of upper Cretaceous-lower Paleogene strata in Bolivia and northwest Argentina. *Bull. Geol. Soc. America* 109, 709-727.

Servant, M., Fontes, J.C. 1978. Les lacs quaternaires des hauts plateaux des Andes boliviennes. Premières interprétations paléoclimatiques. Cahiers, OSTORM, Paris, *Géologie* 10, 1, 9-23.

Sneath, P.H. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy* San Francisco: Freeman.

Spotorno, A. & A. Veloso. (1990). Flora and Fauna of the altiplano" in pp. 19-32, In: W. J. Schull and F. Rothhammer (eds.) "Strategies in human adaptation to a rigorous environment: the Aymara, , Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 265 pp.

Spier T. 2003. Effect of temperature on the identification of larval Black Crappies, White Crappies, and F₁ Hybrid Crappies. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133(3): 789-793.

Sturmbauer C. and Meyer A. 1993. Mitochondrial phylogeny of the endemic Mouthbrooding lineages of Cichlid fishes from lake Tanganyika in Eastern Africa. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 751-768.

Swanson C. 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) *Journal Of Experimental Biology* Volume: 201 Issue: 24 Pages: 3355-3366.

Swofford, D.L. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Ver. 4. [Computer software and manual]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Sylvestre F., M. Servant, S. Servant-Vildary, C. Causse, M. Fournier, J P. Ybert. 1999. Lake-level chronology on the southern Bolivian Altiplano (18°-23°S) during late-glacial time and the early Holocene. *Quaternary research* 51:54-66.

Taylor, E.W., Egginton, S, Taylor, S.E. and Butler, P.J. (1997). Factors which limit swimming performance at different temperatures. In: *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*. (C.M. Wood and D. G. McDonald, Eds.) Cambridge University Press. 105-133.

Templeton AR. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* Volume: 10 Issue: 3 Pages: 779-791.

Thorne, J. L., Kishino, H., 2002. Divergence time and evolutionar y rate estimation with multilocus data. *Syst. Biol.* 51:689–702.

Thorne, J. L., Kishino, H., Painter, I. S., 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15:1647–1657.

- Vari, R.; Weitzman, S. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America.
- Videler, J.J. 1993. Fish swimming. Chapman and Hall, London. 260 p.
- Vila, G. 1975. Geología de los depósitos salinos andinos, Provincia de Antofagasta, Chile: Revista Geológica de Chile, N° 2, p. 41-55.
- Vila, I. & M. Pinto. 1986. A new species of killifish (Pisces, Cyprinodontidae) from the Chilean Altiplano. Revue d'Hydrobiologie Tropicale 19: 233-239.
- Vila, I. 2006. A new species of killifish (Teleostei; Cyprinodontiformes) from the southern Altiplano, Chile. -Copeia 3:471-476.
- Villwock, W. & U. Sienknecht. 1995 Intraspezifische variabilität im genus *Orestias Valenciennes 1839* (Teleostei: Cyprinodontidae) and zum problem der artidentität. - Mitt. Hamburg. Zool. Mus. Inst. 92: 381-398.
- Villwock, W. & U. Sienknecht. 1996. Contribución al conocimiento e historia de los peces chilenos. Los Cyprinodontidos del genero *Orestias* Val. 1839 (Teleostei: Cyprinodontidae) del Altiplano chileno. Medio Ambiente 13(1): 119-126.
- Villwock, W. 1986. Speciation and adaptive radiation in Andean *Orestias* fishes, in: High altitude tropical biogeography (Vuilleumier F. Monasterio M, eds.): 387-402. Oxford Univ. Press, New York, Oxford.

Vogel, S. 1994 *Life in moving fluids: the physical biology of flow*, 2nd ed.: Princeton University Press.

Wainwright, P. C. (1991). Ecomorphology: experimental functional anatomy for ecological problems. *American Zoologist* 31, 680–693.

Wainwright, P. C. (1996). Ecological explanation through functional morphology: the feeding biology of sunfishes. *Ecology* 77, 1336–1343.

Webb, P.W. 1984. Form and function in fish swimming. *Sci. Am.* 251:58-68.

Welch, J. J., Bromham, L., 2005. Molecular dating when rates vary. *Trends Ecol. Evol.* 20:320–327.

West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. New York, NY:

West-Eberhard, M. J. 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6543–6546.

Winemiller, K.O. 1992. Ecological divergence and convergence in freshwater fishes. *National Geographic Research* 8:308-327.

Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in

east Asia Molecular Phylogenetics And Evolution Volume: 18 Issue: 2 Pages: 163-173.

Yoder, A. D., and Z. H. Yang. 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* 17:1081–1090.

Zardoya R, Doadrio I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* Volume: 49 Issue: 2 Pages: 227-237.

Zreda, M., C. Clapperton, C., Argollo, J., and Shanahan, T., 2001, Evidence for Contemporary Lakes and Glaciers in the Southern Altiplano During Late Glacial Time (Extended abstract): Fifth Iberian Quaternary Meeting, Lisboa, Portugal, July 23rd-27th, 2001.