

**“Desentrañando la historia evolutiva de la especie
Orestias agassii: un estudio filogeográfico
considerando su rango de distribución actual.”**

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Viviana Iveth Araya Enero

Noviembre, 2024

Director de Tesis Dr.: Marco A. Méndez

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

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

Viviana Iveth Araya Enero

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de Octubre del 2024.

Director de Tesis:
Dr. Marco A. Méndez T.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. David Véliz

Dr. Claudio Veloso

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Viviana Iveth Araya Enero, nací el 24 de junio de 1996 en la localidad de San Isidro, Buenos Aires, Argentina. Realicé mi educación básica y media en el Colegio Polivalente El Alborada de Puente Alto y en el año 2014 entré a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, motivada por el vínculo cercano entre la genética y las enfermedades metabólicas, además de una gran fascinación por la biología durante la enseñanza media. Dentro de mi paso por la universidad, tuve la oportunidad de tomar los ramos de Ecología y Biología Evolutiva, en donde conocí al Dr. Marco Méndez Torres, quien en el año 2018 me recibió en el Laboratorio de Genética y Evolución, encontrando una gran afición por la biología evolutiva. Aquí, tuve la oportunidad de mi tesis de pregrado, con la cual me titulé a inicios del 2022. Continué mis estudios en la misma línea de investigación realizando el magíster en ciencias biológicas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi tutor, Dr. Marco Méndez, por la confianza depositada en mí, y por todas las oportunidades que me han entregado.

Agradecer a mis padres, que me han ayudado siempre a lograr cada uno de mis sueños y metas. Sin su apoyo incondicional, definitivamente no hubiese llegado hasta donde estoy. Gracias por ser los mejores siempre.

Al laboratorio de genética y evolución, quienes han sido parte de mi largo recorrido y me han sido de ayuda cuando me he visto atascada en las cosas más sencillas. Mención especial a Sophie De Bona, gracias por todo.

A Hernán Campos, por ser un apoyo incondicional hasta en los días más difíciles.

A mis amigos, por su preocupación constante. Son un bálsamo para el alma.

A los biólogos del Museo Nacional de Historia Natural de La Paz, Bolivia: Soraya Barrera y Jaime Sarmiento.

Al profesor Edmundo Morales de la Universidad del Altiplano; A Rene Chura e Hilda Ninaraqui del Instituto del Mar Peruano; Aldemar Acevedo, Fran Torres y Jack Rodríguez, quienes fueron de mucha ayuda en el proceso de coleccionar muestras en Perú.

Este trabajo contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1200419 y FONDECYT 1221214.

ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de materias	iv
Lista abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
El género <i>Orestias</i>	1
<i>Orestias agassii</i>	3
Historia paleohidrológica del Altiplano	5
Antecedentes	7
Predicciones	8
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Materiales y Métodos	10
1. Área de estudio y recolección de muestras	10

2. Extracción de DNA y amplificación de marcadores moleculares	13
3. Alineamiento y edición de secuencias	14
4. Análisis filogenéticos	14
5. Redes de haplotipos	15
6. Diversidad genética	15
7. Estructuración y diferenciación genética	16
8. Delimitación de especies	16
Resultados	18
1. Marcadores mitocondriales	18
2. Reconstrucción de relaciones filogenéticas	18
3. Redes de haplotipos	23
4. Diversidad genética	26
5. Estructuración y diferenciación genética	28
6. Delimitación de especies	33
Discusión	35
Conclusiones	42
Bibliografía	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades del estudio.....	12
Tabla 2. Índices de diversidad genética.....	26
Tabla 3. Análisis de Varianza Molecular.....	30
Tabla 4. Test de F_{ST} pareado.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Límites del área de distribución conocida del género <i>Orestias</i>	3
Figura 2. Perfil topográfico del Altiplano peruano-boliviano.	5
Figura 3. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo.	11
Figura 4. Reconstrucción filogenética para <i>Orestias agassii</i> obtenido mediante el método de Máxima Verosimilitud para los marcadores concatenados.	20
Figura 5. Reconstrucción filogenética para <i>Orestias agassii</i> caracterizado en función de las cuencas hidrográficas.	21
Figura 6. Reconstrucción filogenética para <i>Orestias agassii</i> caracterizado en función de la altitud.....	22
Figura 7. Median-Joining Network inferido a partir de los marcadores concatenados de <i>Orestias agassii</i>	24
Figura 8. Median-Joining Network caracterizado en función de las cuencas hidrográficas.	25
Figura 9. Mapa de los grupos formados por AMOVA..	30
Figura 10. Resultados de GENELAND para K=3 de <i>Orestias agassii</i>	32
Figura 11. Resumen de las especies candidatas.....	34

LISTA ABREVIATURAS

IB	Inferencia bayesiana
ML	Maximum Likelihood
s.n.m	Sobre el nivel del mar
Cytb	Citocromo b
Dloop	Región control Dloop
TDPS	Titicaca-Desaguadero-Poopó-Salares
pb	Pares de bases
ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
ASAP	Assemble Species by Automatic Partitioning
mPTP	Multi-rate Poisson Tree Processes

RESUMEN

Orestias agassii Valenciennes, 1846 corresponde a la especie con la distribución más amplia del género *Orestias*, describiéndose en ambientes acuáticos alto andinos desde la provincia de Ancash en el norte de Perú hasta Antofagasta en el norte de Chile, incluyendo la región oeste de Bolivia.

Para el género *Orestias*, se han realizado diversos estudios taxonómicos, tanto a nivel de género como de especie, que han llegado a propuestas disímiles, abriendo así la discusión sobre la validez de las especies descritas.

Para el caso de *O. agassii*, debido a su amplia distribución y la fragmentación de su hábitat en las diferentes cuencas hidrográficas, se espera que los individuos que se asignan a *O. agassii* pertenezcan a más de una especie o linaje, tal como se ha observado en diversos estudios donde se sugiere que las poblaciones chilenas asignadas a la especie corresponderían a unidades independientes.

En este trabajo se evalúa la filogeografía de *Orestias agassii* en todo su rango de distribución, determinando sus patrones de estructuración y diversidad genética mediante el uso de los marcadores mitocondriales D-loop y Cytb. Nuestros resultados nos permiten inferir que las poblaciones del Cusco (Perú) no corresponderían a *O. agassii*, y se infieren tres especies candidatas para esta

cuenca. Por otro lado, las poblaciones de Chile, Bolivia y de la cuenca del Titicaca forman una especie candidata, la cual correspondería a *Orestias agassii*, ya que es en este grupo se ubican los individuos de Corocoro, localidad tipo de la especie.

ABSTRACT

The species *Orestias agassii* Valenciennes, 1846 has the widest distribution within the *Orestias* genus. It is described in high Andean aquatic environments from the province of Ancash in northern Peru to Antofagasta in northern Chile, including western Bolivia. Numerous taxonomic studies have been conducted on the genus *Orestias*, both at the genus and species levels, resulting in different proposals and leading to discussions on the validity of the described species.

Due to the extensive distribution of *O. agassii* and the fragmentation of its habitat in various hydrographic basins, it is anticipated that the individuals assigned to *O. agassii* may belong to more than one species or lineage. Several studies have suggested that the Chilean populations assigned to the species may represent independent units.

In this study, we assess the phylogeography of *Orestias agassii* across its entire distribution range and determine its structuring patterns and genetic diversity using the mitochondrial markers D-loop and Cytb. Our findings indicate that the populations of Cusco (Peru) do not correspond to *O. agassii*, and three candidate species are inferred for this basin. Additionally, the populations of Chile, Bolivia, and the Titicaca basin form a candidate species, which likely corresponds to

Orestias agassii, as the individuals from Corocoro, the type locality of the species, are found within this group.

INTRODUCCIÓN

El género *Orestias*

El género *Orestias* Valenciennes, 1839, perteneciente a la Familia Cyprinodontidae, es endémico de la zona de altura en los Andes centrales, siendo el Lago Titicaca donde se observa la mayor diversidad de especies del género. Los peces pertenecientes a este género son conocidos como carachis, ispis o bogas, y habitan una diversidad de ecosistemas propios de la región altoandina, como lo son extensos humedales y salares, grandes lagos, ríos y lagunas de diversas características, generando así el desarrollo de adaptaciones a ambientes extremos presentes en estos ecosistemas, como la hipersalinidad y cambios bruscos diarios y estacionales de temperatura (De La Barra y *col.*, 2020). El género *Orestias* fue descrito por Valenciennes en 1839, con individuos provenientes del Lago Titicaca y otros lagos de los Andes peruanos y bolivianos, entre los 14° y 19° de latitud sur y entre los 3.900 a 4.200 m s.n.m. (Valenciennes, 1846). Posteriores expediciones (Eigenmann & Allen, 1942) permitieron ampliar la distribución del género desde el lago Junin (Perú) hasta el lago Ascotán (Chile) (Fig. 1)

Valenciennes (1839), al describir el género reconoció diez especies, y posteriormente varios autores (Tchernavin, 1944; Lauzanne, 1981; Arratia, 1982) realizaron reasignaciones y nuevas descripciones para el género, aumentando así el número de especies. Parenti (1984), realizó una de las revisiones taxonómicas más completas del género y agrupó 43 especies en cuatro complejos monofiléticos: a) *cuvieri*, b) *mulleri*, c) *gilsoni*, todas endémicas del Lago Titicaca, y d) *agassii*. Posteriormente, tres nuevas especies descritas en Chile fueron incluidas en el complejo *agassii* (Vila & Pinto, 1986; Vila, 2006; Vila y col., 2011). Esquer-Garrigos (2013) realizó nuevamente una revisión del género, manteniendo los complejos *cuvieri* y *agassii* descritos por Parenti (1984), pero sugiere que el complejo *mulleri* no existe y, además, sugiere un nuevo complejo, el complejo *luteus*.

Si bien se han realizado diversos estudios taxonómicos para las distintas especies del género tanto a nivel morfológico (Valenciennes, 1839; Tchernavin, 1944; Arratia, 1982; Parenti, 1984; Vila & Pinto, 1986; Vila, 2006; Vila y col., 2011) como a nivel genético (Lüssen y col., 2003; Vila y col., 2013; Esquer-Garrigos y col., 2015). Estos estudios, en lugar de dilucidar el estado taxonómico del género, han generado un panorama más incierto.

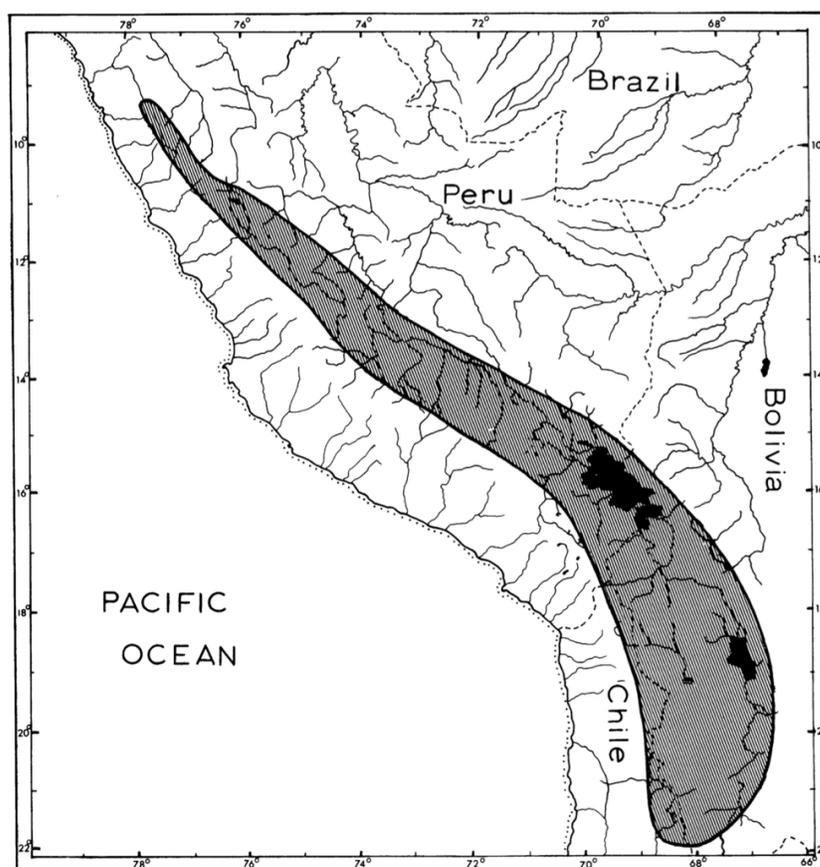


Figura 1. Límites del área de distribución conocida del género *Orestias* (Extraído de Parenti (1984)).

Orestias agassii

Orestias agassii fue descrita por Valenciennes (1846), quien utilizó individuos de casi diez centímetros de longitud corporal pertenecientes al arroyo Corocoro para describir la especie, y acotando que sería una variedad de la misma especie reportada en el lago Chinchero y el lago Antonio, al oriente del Cusco a 14.500 pies (4.419 m s.n.m., aproximadamente) sobre el nivel del mar (Valenciennes, 1846).

Orestias agassii corresponde a la especie con la distribución más amplia del género, descrita desde la provincia de Ancash en el Norte de Perú hasta Antofagasta en el norte de Chile, entre los 10° y 22° de Latitud Sur, siendo la única especie presente en los tres países en los que se distribuye el género (Sarmiento, 1991; De La Barra y col., 2020), lo que incluye la zona Andes del Sur de Perú y el sistema TDPS (Lago Titicaca-Desaguadero-Lago Poopó-Salares). Sin embargo, la distribución de esta especie ha sido cuestionada por Vila y col. (2013) y Cruz-Jofré y col. (2014) quienes sugieren que las poblaciones chilenas asignadas a *O. agassii* corresponden a unidades independientes. Vila y col. (2013) con base en análisis genético sugieren que *O. agassii* corresponde a un grupo polifilético y que las tres poblaciones de *O. agassii* descritas para Chile serían tres linajes diferentes distribuidos en dos diferentes clados: agrupando a las poblaciones del Río Collacagua y el Salar de Huasco en un clado, y a las poblaciones del Río Isluga en un grupo diferente. Cruz-Jofré y col. (2014), utilizando comparaciones morfológicas entre ejemplares de *O. agassii* descritas para Perú y Bolivia, sugiere que las poblaciones chilenas asignadas a *O. agassii* son unidades independientes, coincidiendo con los resultados filogenéticos de Vila y col. (2013) y, proponen que el linaje de Isluga es el que presenta mayor similitud morfológica con las poblaciones de Bolivia, pero que queda en duda si la especie está presente en Chile.

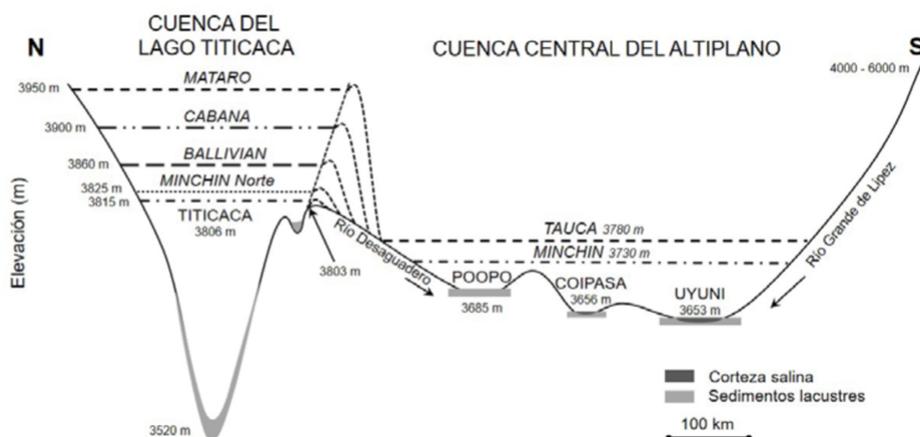


Figura 2. Perfil topográfico del Altiplano peruano-boliviano. Se muestran las diferentes fases lacustres y las relaciones fisiográficas entre lagos y salares. (Extraído de De la Barra y *col.*, 2020).

Historia paleohidrológica del Altiplano

La zona de los Andes Centrales posee una compleja historia geológica y paleoclimática. Durante el límite Plioceno-Pleistoceno, además del levantamiento de la cordillera, se observó un cambio climático dando lugar a un sistema de glaciares en las cordilleras y en las faldas de esta, donde en los periodos interglaciares fueron sustituidos por extensiones lacustres en el Altiplano (Lavenu, 1992, 1995). Para este sistema se reconocen al menos cinco fases hidrológicas principales (Fig. 2), conocidas como “paleolagos”: el lago Mataro que correspondería a la Formación Purapurani (interglaciar Calvario/Kaluyo – S₅) con una altitud máxima de 3.950 m s.n.m hace 1.6 Ma; el lago Cabana (interglaciar Kaluyo/Sotara – S₄) con una altitud máxima de 3.900 m s.n.m hace 1.1-1.0 Ma; el lago Ballivián (interglaciar Sotara/Choqueyapu I – S₃/t₃) con una altitud máxima

de 3.860 m s.n.m hace 0.5 Ma; el lago Minchin (interglaciar Choqueyapu I/Choqueyapu II – t_2) con una altitud máxima de 3.825 m s.n.m; y el lago Tauca (post-glacial Choqueyapu II (t_1) con una altitud máxima de 3.815 m s.n.m (Figura X; Lavenu, 1995; Lavenu y col., 1989). En Lavenu (1995) se evidencia que tanto el lago Mataro como el lago Cabana, formaban cada uno un solo plano de agua en el Altiplano Norte y, como se puede observar, la altura de estos lagos fue disminuyendo hasta llegar al paleolago Tauca, el cual debió tener unos 43.000 km² de superficie en el sur del Altiplano y unos 9000 km² en el norte. Posteriormente, en este sistema se redujeron las capas de agua, dando origen al Sistema TDPS, el cual corresponde al lago Titicaca a 3.810 m s.n.m., el río Desaguadero con un recorrido de más de 300 km, el lago Poopó a 3.686 m s.n.m y los salares a 3.655 m s.n.m en promedio (Lavenu, 1995).

Actualmente, la distribución de la especie *O. agassii*, se encuentra presente dentro de diversas cuencas: en Perú se distribuye en la zona de la cuenca del Río Vilnacota-Urubamba y la Cuenca del Río Yavero, las cuales son partes de la Vertiente del Amazonas, y están constituidas por los ríos que vierten sus aguas en el río Amazonas y que, por lo tanto, desagua en el Océano Atlántico, ocupando la zona Este de Perú; y también se distribuyen en la zona de la Cuenca del Titicaca, la cual está constituida por el Lago Titicaca y los ríos que desembocan en esta, ocupando la porción Sureste de Perú incluyendo parte del territorio boliviano. En Bolivia, *O. agassii* se distribuye en la Cuenca del Altiplano, incluyendo las subcuencas del Lago Titicaca, del Río Desaguadero y del Lago

Poopó, y en la Cuenca del Amazonas, la que incluye a la subcuenca del Río Beni. Mientras que, en Chile, la especie se distribuye en la cuenca altiplánica, incluyendo las subcuencas: entre límite Perú-Bolivia y Río Lauca; del Río Lauca; entre Estero Sencata y Río Sacaya; y del Salar de Huasco (Tapia, 2014). Gran parte de estas cuencas son parte del sistema TDPS.

Se ha postulado que los eventos paleohidrológicos (Vila y col., 2013; Victoriano y col., 2015; Valladares y col., 2018) dan forma a la historia evolutiva de la biota acuática del Altiplano debido a las variaciones en los niveles de agua, teniendo como consecuencia la conexión, desconexión y desecación de las diferentes cuencas que se encuentran en la región, lo que implica la conexión y desconexión de las distintas poblaciones que habitan estas áreas. Debido a la fragmentación de los hábitats, es esperable que las especies que habitan estos lugares tiendan a la diferenciación por el proceso de especiación alopátrica y que, por lo tanto, las especies descritas para *Orestias agassii* pertenezcan a más de una especie y/o formen linajes distintos generados por la alta fragmentación en su distribución.

Antecedentes:

Considerando que,

- 1- Las poblaciones asignadas a *Orestias agassii* se distribuyen desde los 10° a los 22° de Latitud Sur, presentando la distribución latitudinal más amplia del género.

- 2- En su distribución, se presentan sistemas altamente fragmentados y cuencas hidrográficas con distinta historia geológica.
- 3- La especie *O. agassii*, presenta una vagilidad reducida.
- 4- En las poblaciones de *O. agassii* presentes en Chile, Vila y col. (2013) evidenciaron que se agrupan en tres linajes independientes.
- 5- Se ha evidenciado que la altura en las diferentes cuencas también podría llevar a la diferenciación de las especies (Cruz-Jofré, 2022; Fabres, 2022).

Se propone la siguiente Hipótesis

Las poblaciones asociadas a *O. agassii* corresponderían a más de una especie, las cuales estarían diferenciadas principalmente en función de la historia geológica de cada cuenca hidrográfica y el nivel de altura que separa a sus poblaciones.

Predicciones

- 1- En el sector de la región del Cusco, se espera encontrar linajes específicos de *O. agassii* asociados a cada cuenca y que estos se encuentren relacionados entre sí por la conexión con el Río Urubamba.
- 2- En el sector de la cuenca del Titicaca, se espera encontrar la mayor diversidad de linajes de *O. agassii* en comparación a las poblaciones de otras cuencas debido a la presencia del Lago Titicaca.
- 3- En la distribución del altiplano sur (Chile-Bolivia) se espera encontrar que las poblaciones de *O. agassii* de Chile y Bolivia, se observen los mismos tres

linajes que se sugieren en Vila y col. (2013), esto como consecuencia de la influencia del paleolago Tauca en su distribución.

Objetivo general

Evaluar los patrones de estructuración genética y la filogeografía de las poblaciones de peces pertenecientes a la especie *Orestias agassii*.

Objetivos específicos

1. Determinar si *Orestias agassii* corresponde a una entidad natural considerando todo su rango de distribución.
2. Caracterizar la diversidad genética poblacional de *Orestias agassii* en todo su rango de distribución.
3. Evaluar la existencia de patrones filogeográficos en todo el rango de distribución de *Orestias agassii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio y recolección de muestras

El área de estudio corresponde a las cuencas hidrográficas presentes dentro de la distribución descrita para la especie *Orestias agassii* por Parenti (1984), es decir, desde la provincia de Ancash en el Norte de Perú hasta la región de Antofagasta en el norte de Chile, entre los 10° y 22° de Latitud Sur.

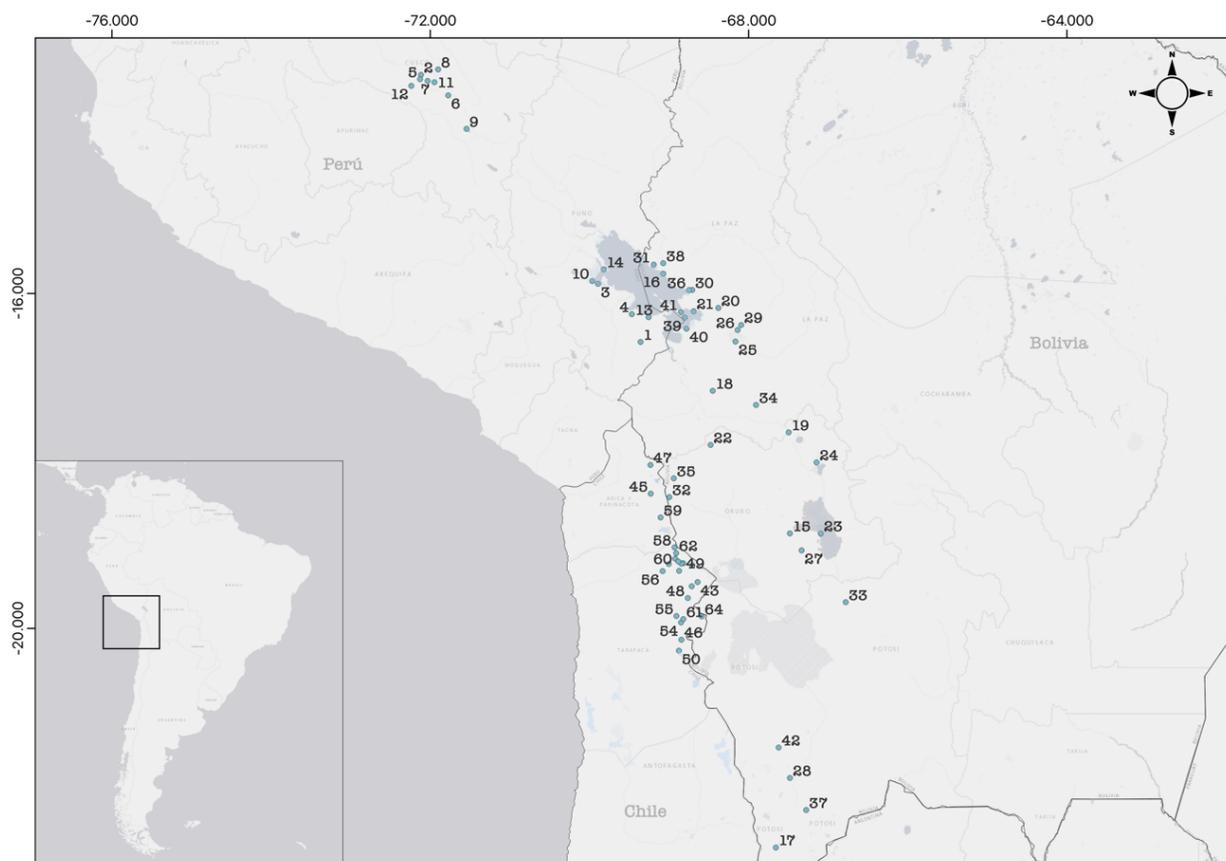


Figura 3. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo de la especie *Orestias agassii*. Los números de las localidades corresponden a los de la tabla

Para este estudio se muestrearon 65 localidades con un total de 710 individuos, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 1 y Figura 3. Los muestreos utilizados en este estudio se han llevado a cabo por el equipo del Laboratorio de Genética y Evolución desde el año 2014 hasta el año 2023.

Tabla 1. Localidades del estudio, señalando país, su georreferencia (latitud y longitud) y marcadores moleculares Citocromo b (Cytb) y Región control (Dloop) obtenidos para cada una.

	Localidad	Cuenca	País	Latitud	Longitud	Cytb	Dloop
1	Callacami	Titicaca	Perú	-16.584444	-69.357222	6	7
2	Canal Canallas	Amazonas	Perú	-13.343000	-72.116917	1	10
3	Chucuito	Titicaca	Perú	-15.882611	-69.892778	21	19
4	Juli	Titicaca	Perú	-16.249500	-69.467167	2	4
5	Lago Huaypo	Amazonas	Perú	-13.396333	-72.128028	3	4
6	Oropesa	Amazonas	Perú	-13.593722	-71.774139	3	3
7	Laguna Piuray	Amazonas	Perú	-13.416986	-72.033231	5	4
8	Pocchin	Amazonas	Perú	-13.276961	-71.900972	4	5
9	Pomacanchi	Amazonas	Perú	-14.001947	-71.544449	4	4
10	Puno	Titicaca	Perú	-15.848900	-69.964100	6	6
11	Laguna Qoricocha	Amazonas	Perú	-13.433611	-71.947783	5	5
12	Tambo Real	Amazonas	Perú	-13.477694	-72.237778	5	18
13	Villa Santiago	Titicaca	Perú	-16.285889	-69.256694	12	8
14	Yapura	Titicaca	Perú	-15.709139	-69.820694	17	18
15	Avaroa	Desaguadero	Bolivia	-18.874931	-67.481233	2	9
16	Carabuco	Titicaca	Bolivia	-15.761008	-69.071772	6	6
17	Chalviri	Uyuni	Bolivia	-22.564972	-67.657344	1	5
18	Corocoro	Desaguadero	Bolivia	-17.171389	-68.450278	6	6
19	Desaguadero	Desaguadero	Bolivia	-17.669514	-67.496031	3	3
20	Hichukhota	Titicaca	Bolivia	-16.174200	-68.380000	2	2
21	Huatajata	Titicaca	Bolivia	-16.213700	-68.690100	14	21
22	Khancoyo	Desaguadero	Bolivia	-17.819950	-68.477194	4	8
23	Lago Poopó	Desaguadero	Bolivia	-18.876000	-67.092600	0	1
24	Lago Uru Uru	Desaguadero	Bolivia	-18.029206	-67.145697	13	20
25	Laguna Achocaya	Beni	Bolivia	-16.579322	-68.164378	5	21
26	Laguna Luis Espinal	Beni	Bolivia	-16.439614	-68.138022	5	23
27	Lakajahuira	Desaguadero	Bolivia	-19.076281	-67.333761	10	13
28	Malku Villamar	Uyuni	Bolivia	-21.755694	-67.480139	7	10
29	Río Caluyo	Beni	Bolivia	-16.379964	-68.092667	1	13
30	Río Chinta	Titicaca	Bolivia	-15.957228	-68.707919	7	8
31	Río Huaycho	Titicaca	Bolivia	-15.650758	-69.191239	6	7
32	Río Mogachi	Desaguadero	Bolivia	-18.442600	-68.995700	16	14
33	Río Mulato	Desaguadero	Bolivia	-19.690600	-66.779400	3	4
34	Río Pichu-Pichu	Desaguadero	Bolivia	-17.341014	-67.906425	3	3
35	Sajama	Desaguadero	Bolivia	-18.219028	-68.939861	4	8
36	Santiago de Huata	Titicaca	Bolivia	-15.958117	-68.749375	4	5
37	Sol de Mañana	Uyuni	Bolivia	-22.127800	-67.282300	2	6
38	Suches	Titicaca	Bolivia	-15.633581	-69.072456	2	3
39	Taquiri	Titicaca	Bolivia	-16.289900	-68.801900	4	5

40	Taraco	Titicaca	Bolivia	-16.424936	-68.780336	8	11
41	Tiquina	Titicaca	Bolivia	-16.224636	-68.849061	5	5
42	Villa Alota		Bolivia	-21.400300	-67.622400	6	0
43	Cariquima	Altiplanica	Chile	-19.452356	-68.640672	11	9
44	Chaguane	Altiplanica	Chile	-19.237639	-69.001750	3	22
45	Chureaque	Altiplanica	Chile	-18.401561	-69.229611	0	16
46	Collacagua	Altiplanica	Chile	-20.134000	-68.844028	27	9
47	Colpa	Altiplanica	Chile	-18.059306	-69.232944	0	15
48	Cotaculco	Altiplanica	Chile	-19.641222	-68.763222	23	24
49	Enquelga	Altiplanica	Chile	-19.228944	-68.821889	3	17
50	Huasco	Altiplanica	Chile	-20.262778	-68.875444	25	21
51	Isluga I	Altiplanica	Chile	-19.256361	-68.706306	27	26
52	Isluga II	Altiplanica	Chile	-19.255611	-68.708056	7	8
53	Laguna Arabilla	Altiplanica	Chile	-19.233056	-68.844722	2	4
54	Lagunillas	Altiplanica	Chile	-19.930119	-68.848444	3	14
55	Lirima	Pampa del Tamarugal	Chile	-19.853944	-68.907278	21	18
56	Lupihualla	Pampa del Tamarugal	Chile	-19.322528	-69.080083	3	8
57	Mauque	Altiplanica	Chile	-19.319583	-68.873194	0	3
58	Muco Mucone	Altiplanica	Chile	-19.040861	-68.930278	3	23
59	Paquisa	Altiplanica	Chile	-18.685100	-69.105633	0	21
60	Punto 42	Altiplanica	Chile	-19.175056	-68.921806	7	22
61	Río Llacho	Altiplanica	Chile	-19.890278	-68.820111	3	19
62	Río Todos Los Santos	Altiplanica	Chile	-19.109111	-68.910167	4	7
63	Taipicollo	Altiplanica	Chile	-19.209028	-68.882722	3	9
64	Tambo Cancosa	Altiplanica	Chile	-19.858167	-68.589778	20	19
65	Toroni	Altiplanica	Chile	-19.502222	-68.714389	12	18
Total						450	707

2. Extracción de DNA y amplificación de marcadores moleculares

La extracción de DNA se realizó mediante el método de extracción de sales, modificado de Aljanabi & Martinez (1997). Se verificó la calidad y cantidad del DNA extraído por medio de la cuantificación de este mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

Se realizó la amplificación de dos marcadores moleculares mitocondriales: citocromo b (Cytb) de 1140 pb utilizando los partidores descritos en Xiao y *col.* (2001) y un fragmento de la región control (D-loop) de 920 pb obtenido a partir

de los partidores desarrollados en Morales y col. (2011). La cantidad de secuencias obtenidas se encuentran detalladas en la Tabla 1.

3. Alineamiento y edición de secuencias

Cada secuencia fue editada y alineada en el programa Geneious Prime v.2023.1.2 (<https://www.geneious.com>) utilizando la opción Geneious alignment, resolviendo discordancias visualmente. Posteriormente, ambos marcadores fueron concatenados en el mismo software.

4. Análisis filogenéticos

Para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas se utilizaron las secuencias de los marcadores concatenados, rescatando los haplotipos únicos para cada localidad, obteniendo un total de 261 secuencias.

Se adicionaron tres individuos de la especie *Orestias glorioae* como grupo externo para enraizar los árboles filogenéticos.

El método de Inferencia Bayesiana (IB) fue implementado utilizando el software Mr. Bayes v.3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Los modelos de sustitución nucleotídica fueron seleccionados mediante el programa jModelTest v.2.1.6 (Darriba y col., 2012). Para el soporte de nodo se utilizó bootstrap con 1.000 pseudoreplicas.

Para el método de Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés), se utilizó el programa IQ-TREE (Trifinopoulos y col., 2016) en el portal del mismo

programa. Los modelos de sustitución nucleotídica fueron escogidos por el mismo programa. Para el soporte de nodo se utilizó la opción ultrafast bootstrap con 10.000 repeticiones.

Para la visualización, modificación y enraizamiento de los árboles obtenidos tanto por Inferencia Bayesiana como por Máxima Verosimilitud, se utilizó el programa FigTree V1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5. Redes de haplotipos

Para visualizar las relaciones entre los haplotipos, se construyeron redes de haplotipos para ambos marcadores mitocondriales concatenados empleando el programa PopART v1.7 (Leigh & Bryant, 2014), utilizando el algoritmo Median-joining Network (Bandelt, Foster & Röhl, 1999) con $\varepsilon = 0$. Posteriormente, se caracterizó la red considerando las cuencas hidrográficas presentes en las regiones estudiadas.

6. Diversidad genética

Para analizar la diversidad genética, se utilizaron las secuencias de los marcadores mitocondriales concatenados. Se estimaron los índices de diversidad genética como número de haplotipos (K), sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), diferencia entre pares de secuencias (Π) y diversidad nucleotídica (π) utilizando el programa DNAsp v6.12.03 (Rozas y *col.*, 2017).

7. Estructuración y diferenciación genética

Para identificar la estructura genética, se emplearon dos análisis de agrupamientos con los marcadores mitocondriales concatenados.

El programa SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance), el cual permite detectar grupos genéticamente homogéneos en función del componente geográfico (Dupanloup, Schneider & Excoffier, 2002). El análisis se ejecutó con un número de grupos de 2 a 57, utilizando un número inicial de condiciones igual a 100.

El programa GENELAND, que utiliza la información geográfica y la frecuencia alélica para estimar un número de poblaciones y su organización espacial (Guillot, Mortier & Estoup, 2005), fue ejecutado para las 57 localidades, utilizando un modelo no correlacionado, con 10.000.000 de iteraciones, una frecuencia de muestreo (thinning) de 10.000 y un burn-in del 25%, es decir, 250.

Se estimó la diferenciación genética mediante una prueba de F_{ST} pareado utilizando distancias genéticas y Φ_{ST} en el programa Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), utilizando 1.000 permutaciones.

8. Delimitación de especies

Para la delimitación de especies, se utilizaron las secuencias del gen mitocondrial Citocromo b en tres programas diferentes. Primero, se utilizó el programa Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), el cual clasifica las secuencias en especies hipotéticas basándose en un "Barcode gap" (Puillandre y *col.*, 2012), por lo que es un método basado en distancias genéticas. El análisis se realizó en

el portal del programa (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) con los valores de rango de distancia intraespecífica previa de 0,001 a 0,1 (en 10 Steps), un ancho relativo del gap de 1,0 y el modelo de distancia simple.

El segundo programa utilizado, Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP), es un método para construir particiones de especies a partir de un algoritmo de agrupación jerárquica utilizando distancias genéticas por pares, sin conocimiento biológico previo de la diversidad intraespecífica (Puillandre *y col.*, 2021). El análisis se realizó en el portal del mismo programa (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>), utilizando el modelo de distancia simple.

El tercer programa empleado, “multi-rate Poisson Tree Processes” (mPTP), es un programa para delimitar especies en base a un árbol filogenético enraizado, por lo que puede delimitar especies basándose en el concepto filogenético de especie (Zhang *y col.*, 2013). Para esto, se utilizó un árbol de Máxima Verosimilitud (ML) construido con el programa IQ-TREE (Trifinopoulos *y col.*, 2016) en el portal del mismo programa, y el archivo newick resultante fue utilizado en el portal del programa mPTP (<https://mptp.h-its.org>).

RESULTADOS

1. Marcadores mitocondriales

Se obtuvieron 377 secuencias del marcador Citocromo b (Cytb), con un largo de 1047 pb; y 707 secuencias del marcador de la Región Control (Dloop), con un largo de 852 pb. Debido a la concatenación de los genes mitocondriales, se obtuvieron un total de 379 secuencias, con un largo de 1899 pb.

2. Reconstrucción de relaciones filogenéticas

Para el análisis de Inferencia Bayesiana (IB), se utilizó el modelo TrN más los parámetros Invariante y Gamma (TrN+I+G). Para el análisis de Máxima Verosimilitud (ML), se utilizó el modelo TN más los parámetros Invariante (I), Frecuencias de bases empíricas y Gamma (TN+I+F+G).

Las topologías de los árboles obtenidos resultaron similares. Sin embargo, el método de Máxima Verosimilitud evidenció una menor cantidad de politomías en los nodos terminales, por lo que a partir de este árbol se reportan algunos de los valores de soporte de nodo para ambos métodos (Fig. 4), priorizando los valores sobre 80 para Máxima Verosimilitud y 0,95 para Inferencia Bayesiana.

Se caracterizó el árbol de Máxima Verosimilitud en función de las cuencas hidrográficas a las cuales pertenecen cada una de las localidades (Fig. 5) y en función de la Altitud de cada localidad (Fig. 6).

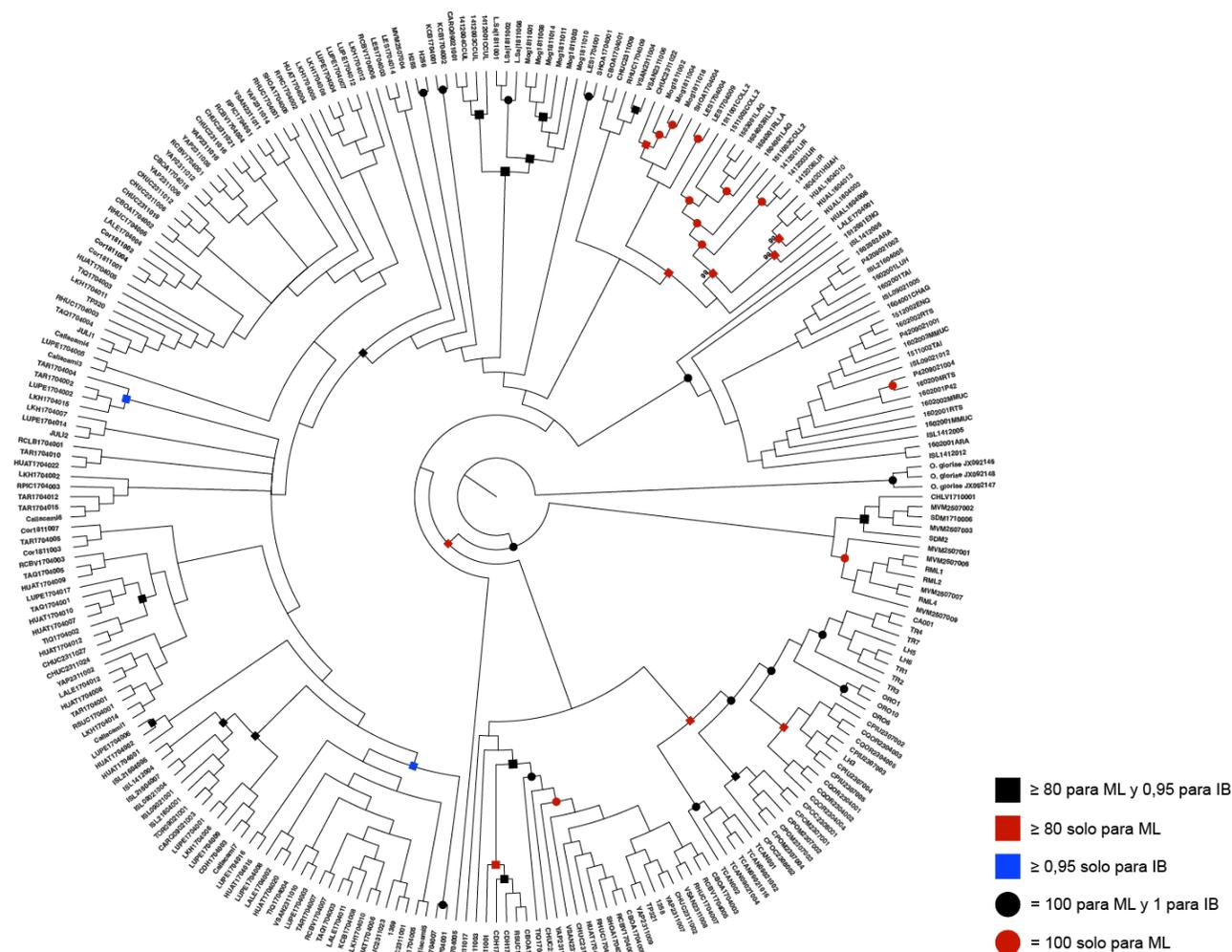


Figura 4. Reconstrucción filogenética para *Orestias agassii* obtenido mediante el método de ML para los marcadores concatenados Citocromo b y región control Dloop. En los nodos se reportan los valores de soporte, donde cuadrados negros representan valores sobre 80 para ML y sobre 0,95 para IB; cuadrados rojos sobre 80 solo para ML; cuadrados azules sobre 0,95 solo para IB; círculos negros valores de 100 para ML y 1 para IB; y círculos rojos valores de 100 solo para ML.

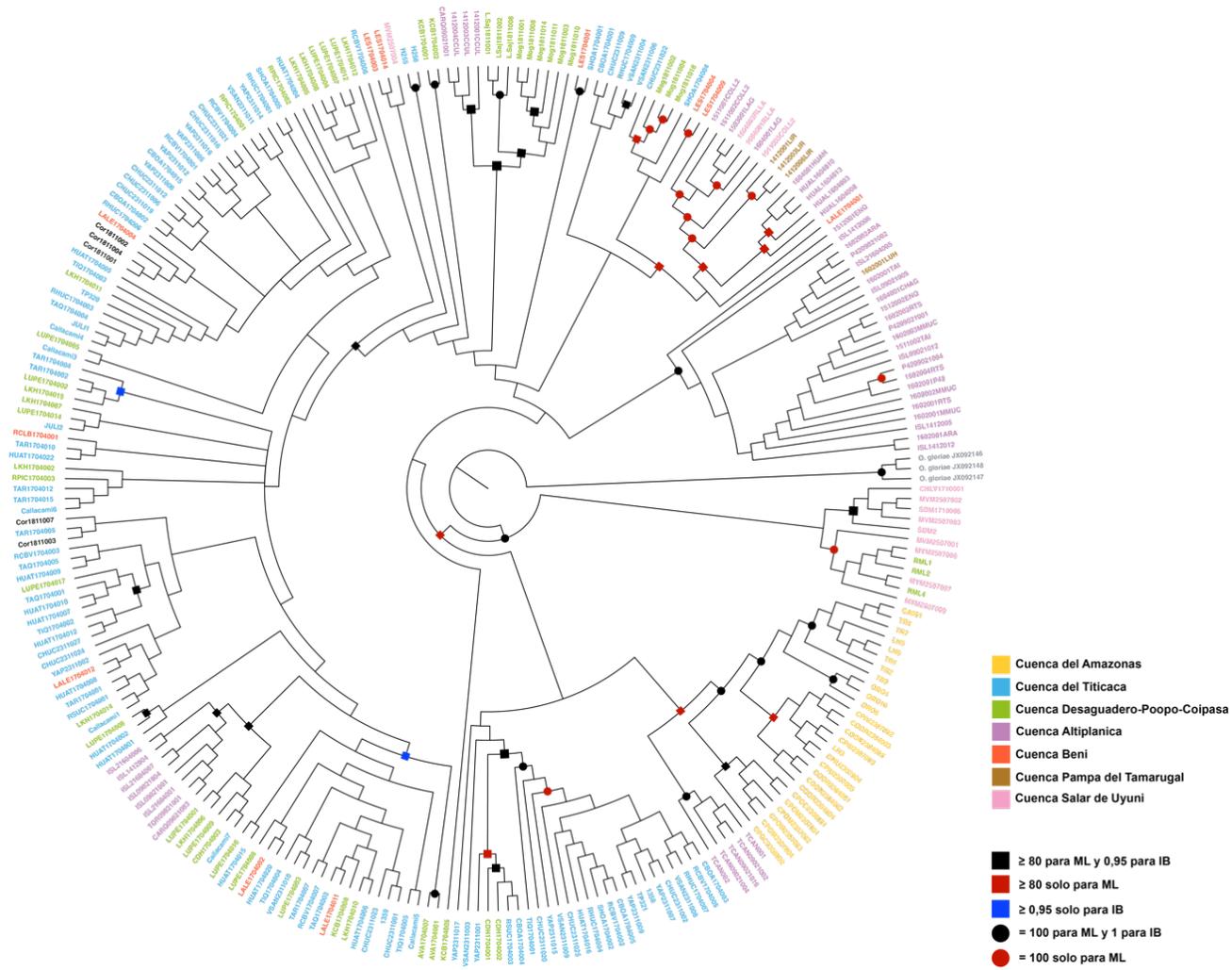


Figura 5. Reconstrucción filogenética para *Orestias agassii* obtenido mediante el método de Máxima Verosimilitud para los marcadores concatenados Citocromo b y región control Dloop caracterizado en función de las cuencas hidrográficas a las que pertenece cada localidad.

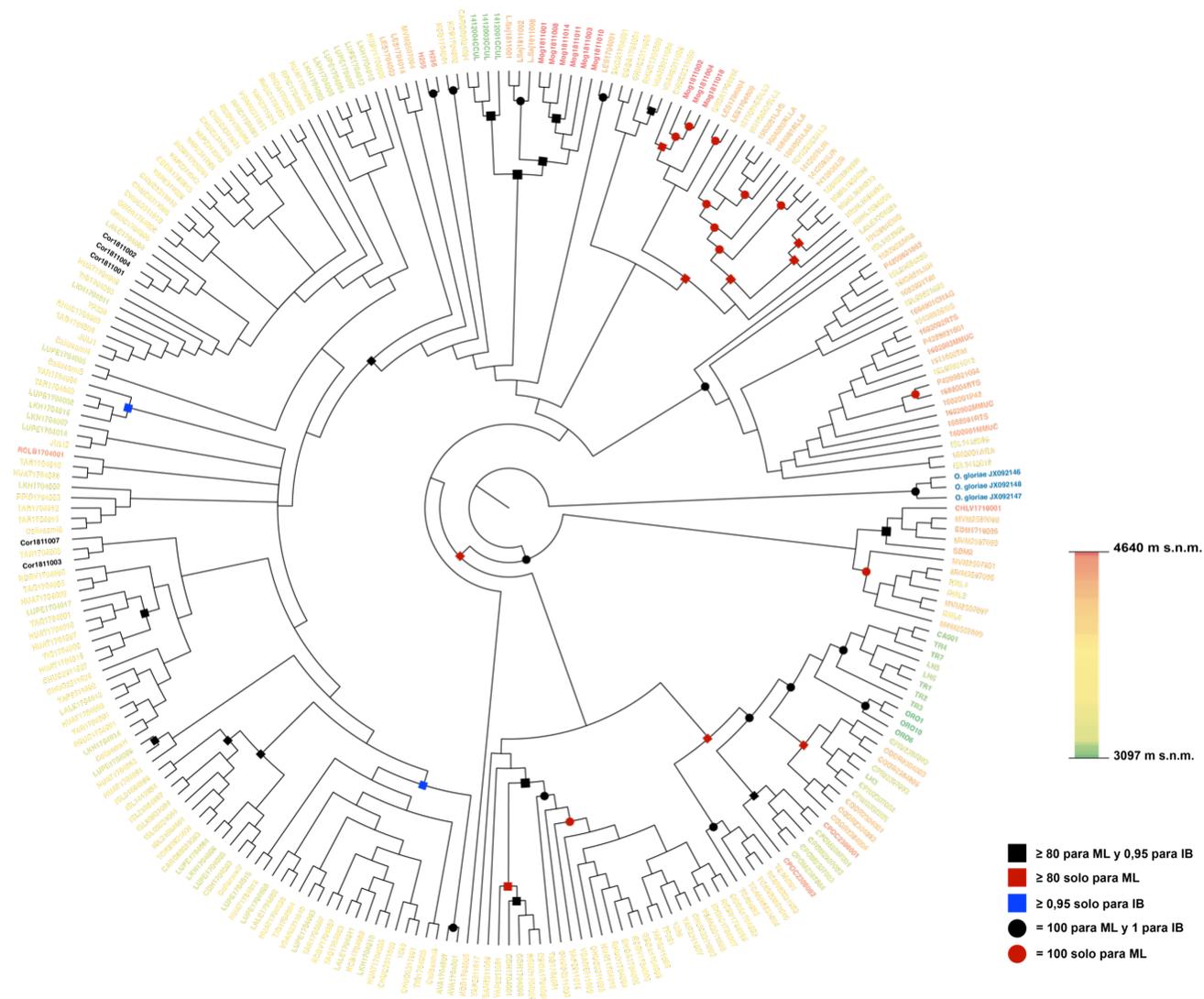


Figura 6. Reconstrucción filogenética para *Orestias agassii* obtenido mediante el método de Máxima Verosimilitud para los marcadores concatenados Citocromo b y Región control Dloop caracterizado en función de la altitud de cada localidad.

3. Redes de haplotipos

Se construyó una red de haplotipos con 376 secuencias de los marcadores concatenados citocromo b y región control Dloop (Fig. 8). Se observa una red con una alta diversidad haplotípica, alta conexión entre haplotipos y gran cantidad de haplotipos únicos. Al analizar la red, se encuentran haplogrupos asociados a las cuencas hidrográficas. La cuenca del Amazonas, correspondientes a las localidades del Cusco, muestra haplotipos separados por varios pasos mutacionales del resto de las cuencas. Un patrón similar se observa para la localidad de Tambo Cancosa, donde los haplotipos están separados por veinticuatro pasos mutacionales y son privados, es decir, no se comparten con ninguna otra localidad.

Se observan haplogrupos tipo estrella tanto para las localidades de la cuenca del Titicaca como para las localidades de la cuenca del Altiplano.

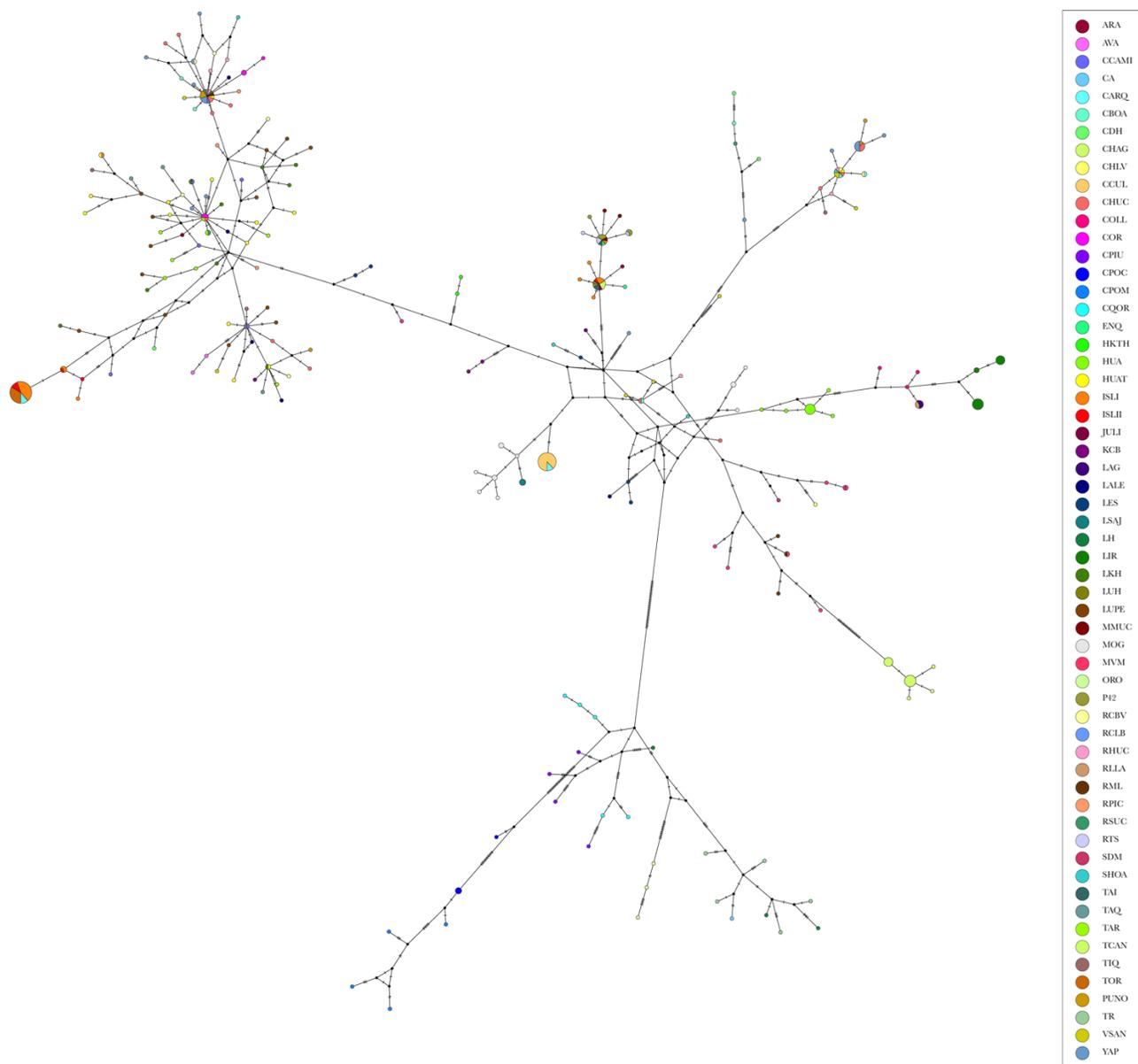


Figura 7. Median-Joining Network inferido a partir de 376 secuencias de los marcadores Citocromo b y Región Control Dloop concatenados de *Orestias agassii*. Los colores representan las localidades estudiadas.

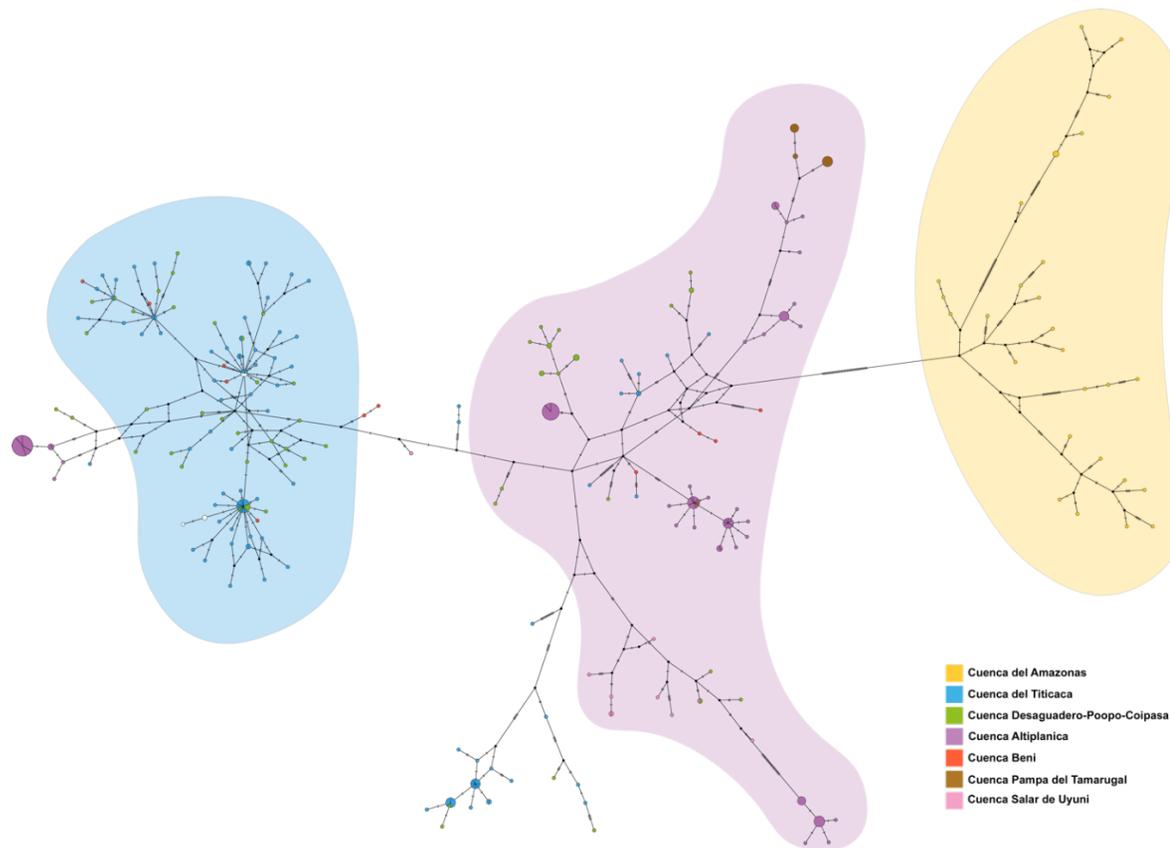


Figura 8. Median-Joining Network inferido a partir de 376 secuencias de los marcadores Citocromo b y Región Control Dloop concatenados de *Orestias agassii*. Los colores representan las cuencas en las que se encuentran cada una de las localidades.

4. Diversidad genética

Para obtener los índices de diversidad genética se utilizaron un total de 376 secuencias de los marcadores mitocondriales concatenados de 57 localidades. Se obtuvo un total de 269 sitios polimórficos y 206 haplotipos, con una diversidad haplotípica total de $\pi = 0,9805$ y el número de diferencias entre pares de secuencias total $\Pi = 22,723$ (Tabla 2). Los valores de diversidad haplotípica en general para todas las localidades son altos, la mayoría alcanzando el valor máximo (1,000), a excepción de seis localidades que tienen valores bajo 0,500.

Tabla 2. Índices de diversidad genética. n es el tamaño de muestra, K es número de haplotipos, S es número de sitios polimórficos, H es Diversidad haplotípica, Π es diferencia entre pares de secuencias y π es diversidad nucleotídica.

Localidad	n	K	S	H	Π	π
Callacami	6	6	14	1,000	5,267	0,00277
Canal Canallas	1	-	-	-	-	-
Chucuito	17	14	47	0,971	15,118	0,00798
Juli	2	2	3	1,000	3,000	0,00158
Lago Huaypo	3	3	23	1,000	15,333	0,00808
Oropesa	3	3	8	1,000	5,333	0,00281
Piuray	4	4	21	1,000	11,167	0,00588
Pocchin	4	2	17	0,500	8,500	0,00448
Pomacanchi	4	4	20	1,000	11,000	0,00580
Puno	6	4	32	0,800	16,000	0,00843
Qoricocha	5	5	16	1,000	8,400	0,00443
Tambo Real	5	5	17	1,000	7,400	0,00390
Villa Santiago	8	7	48	0,964	19,286	0,01018
Yapura	16	12	48	0,942	16,508	0,00870
Avaroa	2	2	1	1,000	1,000	0,00053
Carabuco	6	6	35	1,000	17,533	0,00924
Chalviri	1	-	-	-	-	-

Corocoro	5	3	4	0,800	2,200	0,00116
Desaguadero	3	3	30	1,000	20,000	0,01054
Hichukhota	2	2	1	1,000	1,000	0,00365
Huatajata	14	14	50	1,000	8,670	0,00457
Khancoyo	4	4	21	1,000	11,667	0,00604
Lago Uru Uru	13	13	29	1,000	6,744	0,00355
Laguna Achocaya	5	5	29	1,000	12,200	0,00643
Laguna Luis Espinal	5	5	15	1,000	8,200	0,00432
Lakajahuira	10	10	22	1,000	5,422	0,00286
Malku Villamar	7	7	31	1,000	10,952	0,00577
Río Caluyo	1	-	-	-	-	-
Río Chinta	7	7	33	1,000	14,857	0,00783
Río Huaycho	6	6	34	1,000	16,867	0,00889
Río Mogachi	12	9	22	0,955	8,470	0,00446
Río Mulato	3	3	6	1,000	4,000	0,00211
Río Pichu-Pichu	3	3	8	1,000	5,333	0,00281
Sajama	3	2	1	0,667	0,667	0,00035
Santiago de Huata	4	4	39	1,000	19,500	0,01027
Sol de Mañana	2	2	7	0,250	7,000	0,00369
Suches	2	2	20	1,000	20,000	0,01054
Taquiri	4	4	13	1,000	6,500	0,00342
Taraco	8	8	16	1,000	4,821	0,00254
Tiquina	5	5	31	1,000	12,800	0,00674
Cariquima	7	2	15	0,571	8,571	0,00452
Chaguane	3	1	0	0,000	0,000	0,00000
Collacagua	3	3	4	1,000	2,667	0,00140
Cotaculco	22	1	0	0,000	0,000	0,00000
Enquelga	2	2	2	1,000	2,000	0,00105
Huasco	12	5	4	0,576	0,803	0,00042
Isluga I	26	8	22	0,618	7,092	0,00374
Laguna Arabilla	2	2	1	1,000	1,000	0,00053
Lagunillas	3	1	0	0,000	0,000	0,00000
Lirima	17	3	5	0,618	2,559	0,00135
Lupihualla	1	-	-	-	-	-
Muco Mucone	3	3	2	1,000	1,333	0,00070
Punto 42	7	4	3	0,810	1,048	0,00055
Río Llacho	2	1	0	0,000	0,000	0,00000
Río Todos Los Santos	4	3	2	0,833	1,000	0,00053
Taipicollo	3	2	1	0,667	0,667	0,00035
Tambo Cancosa	19	5	4	0,649	0,772	0,00041
Toroni	12	1	0	0,000	0,000	0,00000
Total	376	206	269	0,9805	22,723	0,01202

5. Estructuración y diferenciación genética

Para identificar la estructura genética, se utilizaron en los análisis los sitios variables de los marcadores mitocondriales Citocromo b y Dloop concatenados (376 secuencias). El análisis estadístico SAMOVA (Spatial Analysis of Molecular VAriance) detectó el mayor valor de F_{CT} para cinco grupos ($F_{CT}=0.70683$). Las localidades pertenecientes al grupo 1 son Callacami, Chucuito, Juli, Puno, Villa Santiago, Yapura, Avaroa, Carabuco, Chelviri, Corocoro, Desaguadero, Hichukhota, Huatajata, Khancoyo, Lago Poopó, Lago Uru Uru, Laguna Achocaya, Laguna Luis Espinal, Lakajahuira, Malku Villamar, Río Caluyo, Río Chinta, Río Huaycho, Río Mogachi, Río Mulato, Río Pichu-Pichu, Sajama, Santiago de Huata, Sol de Mañana, Suches, Taquiri, Taraco, Tiquina, Villa Alota, Cariquima, Chaguane, Chureaque, Collacagua, Colpa, Cotaculco, Enquelga, Huasco, Isluga I, Isluga II, Laguna Arabilla, Lagunillas, Lirima, Lupihualla, Mauque, Muco Mucone, Paqusa, Punto 42, Río Llacho, Río Todos Los Santos, Taipicollo, Tambo Cancosa y Toroni; el grupo 2 está compuesto por Canallas, Lago Huaypo y Tambo Real; el grupo 3 corresponde a Piuray y Qoricocha; el grupo 4 está compuesto solo por Oropesa; y el grupo 5 está compuesto por Pocchin y Pomacanchi. Los grupos 2, 3, 4 y 5 corresponden a localidades del Cusco, Perú; mientras que el grupo 1 está compuesto por las localidades pertenecientes a la cuenca del Lago Titicaca, Desaguadero, La Paz, Uyuni y localidades chilenas altiplánicas (Fig. 9). En la tabla 3 se detalla el AMOVA (Analysis of Molecular VAriance) obtenido para los grupos detectados por el análisis.

Posteriormente al revisar los anteriores resultados, se repitió el análisis sin las localidades de la cuenca del Amazonas del Cusco para eliminar una posible polarización de los datos, obteniendo el mayor valor de F_{CT} para dos grupos ($F_{CT}=0,60294$) donde todas las localidades se encuentran en el grupo 1, a excepción de Tambo Cancosa que es la única localidad del grupo 2.

A partir de los grupos formados por el primer SAMOVA, se realizó un análisis de diferenciación genética mediante el test de F_{ST} pareado (Tabla 4) donde todas las comparaciones fueron significativas.

Tabla 3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los grupos detectados por el análisis SAMOVA.

Fuente de variación	d.f.	Suma de los cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de variación (%)	Índice de fijación	p-valor
Entre grupos	4	1234,973	20,70678	70,68	0,70683	0,0001
Entre poblaciones dentro de grupos	54	1906,740	4,89324	16,70	0,56973	0,0001
Entre poblaciones	317	1171,457	3,69545	12,61	0,87386	0,0001
Total	375	4313,170	29,29546			

Tabla 4. Test de F_{ST} pareado realizado en base a los agrupamientos obtenidos por el programa SAMOVA utilizando marcadores mitocondriales Citocromo b y Región control Dloop concatenados. * = p-valor < 0,005.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Grupo 1	0				
Grupo 2	0,73885*	0			
Grupo 3	0,71210*	0,46730*	0		
Grupo 4	0,73603*	0,67674*	0,65848*	0	
Grupo 5	0,70819*	0,79915*	0,77508*	0,80923*	0

El algoritmo GENELAND identificó tres clústeres, de los cuales el primero y el segundo reúne localidades del Cusco (Perú) al igual que el SAMOVA, pero sumando la localidad Tambo Cancosa (Chile); y el tercer grupo agrupa las localidades del Lago Titicaca, Desaguadero y localidades chilenas detalladas en la Figura 9.

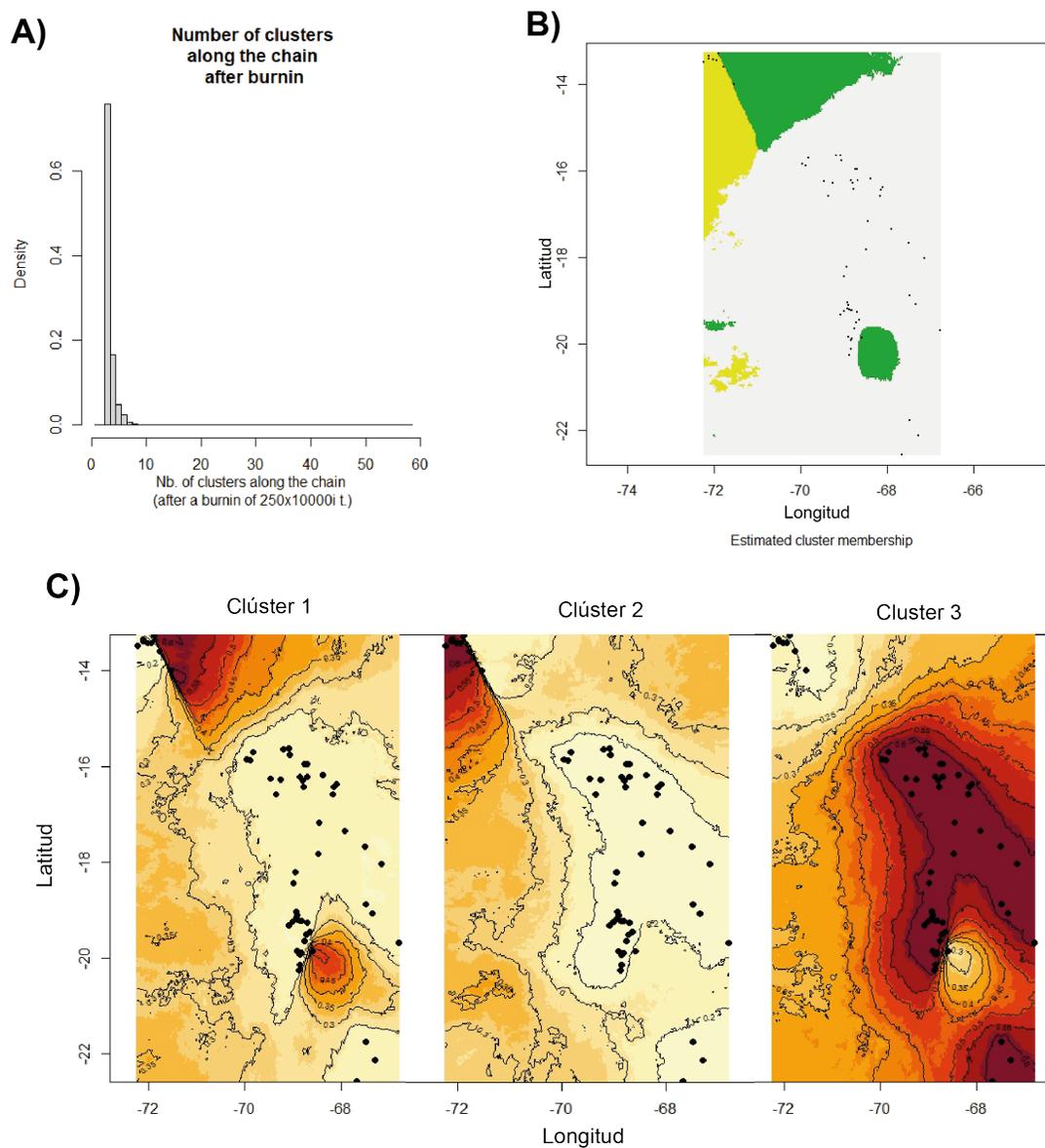


Figura 10. Resultados de GENELAND para $K=3$ de *Orestias agassii* utilizando marcadores Citocromo b y Región control Dloop concatenados. A) Número de clústeres; B) Mapa de pertenencia de las localidades a los clústeres; C) Mapas de probabilidad posterior de pertenecer a cada uno de los clústeres. Los valores de pertenencia más altos se encuentran en rojo.

6. Delimitación de especies

Los resultados obtenidos en los distintos análisis de delimitación de especies se encuentran resumidos en la Figura 11. Podemos observar que el análisis mPTP obtuvo un total de ocho especies candidatas; mientras que los análisis ABGD y ASAP, se obtuvo un total de cinco especies candidatas. Los tres análisis fueron parcialmente consistentes entre sí, recuperando las mismas cuatro especies candidatas, las cuales pertenecen a la región del Cusco y a la localidad Tambo Cancosa. La diferencia entre los distintos análisis realizados se asocia a las localidades de la cuenca del Titicaca, Desaguadero, Beni, Pampa del Tamarugal, Uyuni y Altiplanica, ya que los análisis ABGD y ASAP las reúnen todas estas localidades en una sola especie candidata, mientras que el análisis mPTP las divide en cuatro especies candidatas.

DISCUSIÓN

Los análisis de estructuración genética realizados para los marcadores mitocondriales Citocromo b y Región control mostraron un patrón de estructuración donde las localidades pertenecientes a la cuenca del Amazonas en la región del Cusco son diferenciadas del resto de las cuencas presentes en el estudio. Este patrón, también pudo ser observado en las redes de haplotipos con cuarenta pasos mutacionales entre los haplotipos de la cuenca del Amazonas con las del resto de la distribución; y también en la topología de los árboles filogenéticos obtenidos (Fig. 5), con las localidades del Cusco formando un clado con valor de soporte de nodo de 100 para ML y 1 para IB, es decir, un valor robusto.

Al examinar este clado formado por las localidades del Cusco (Fig. 5) podemos observar que, tanto el análisis de estructuración como el filogenético muestran patrones similares, donde se distingue que los individuos de las localidades de Canallas, Lago Huaypo y Tambo Real forman un clado, como el grupo 2 de SAMOVA; Piuray y Qoricocha forman otro clado como el grupo 3 de SAMOVA; y Pomacanchi y Pocchin forman otro clado como el grupo 5 de SAMOVA.

Este último grupo, también rescatado parcialmente en el clúster 1 del análisis de

GENELAND, resulta interesante ya que está formado por las localidades que se encuentran más lejanas entre sí en la región del Cusco, estando a una distancia de 100 km lineales aproximadamente. Al analizar la hidrografía de la cuenca se constató que Pocchin y Pomacanchi están conectadas por el río Vilcanota, y Canallas, Lago Huaypo, Tambo Real, Piuray y Qoricocha están conectadas por el río Urubamba. Esto podría explicar la conexión entre las localidades.

La localidad Tambo Cancosa, perteneciente a la cuenca altiplánica de Chile, forma parte del clúster 1 en el análisis de GENELAND junto a las localidades del Cusco, a diferencia de lo observado en el análisis SAMOVA, donde forma parte del grupo 1 junto a las localidades más sureñas de la distribución de *O. agassii*. Pese a esto último, en algunas pruebas del análisis de SAMOVA sin las localidades del Cusco, el mayor valor de F_{CT} obtenido ($F_{CT}=0,60294$) fue para 2 grupos, donde el primero tenía todas las localidades de *O. agassii* sin el Cusco, a excepción de Tambo Cancosa, que componía el segundo grupo. Por otra parte, en los análisis filogenéticos (Fig. 5), la localidad Tambo Cancosa forma un clado con un valor de soporte de nodo igual a 100 para ML y 1 para IB; y en las redes de haplotipos forman un haplogrupo solo de esta localidad separándola con veinticuatro pasos mutacionales. Por lo que los individuos de esta población serían diferentes a todo el resto de las localidades estudiadas.

Debido a la fragmentación del hábitat y los antecedentes propuestos por Vila y *col.* (2013) y Cruz-Jofré y *col.* (2014), esperábamos que las localidades del lago

Titicaca y las localidades de la cuenca altiplánica de Chile estuviesen diferenciadas, y en la cuenca Altiplánica encontrar al menos tres linajes. Pero al contrario de lo que esperábamos, tanto el análisis SAMOVA como el GENELAND, agrupa las localidades de las cuencas del Titicaca, Desaguadero, Beni, Uyuni, Altiplánica y de la Pampa del Tamarugal en un solo grupo (Fig. 9 y Fig. 10).

Lo anterior, podría estar relacionado con la historia paleohidrológica e hidrográfica del lugar, ya que como se mencionó anteriormente, los paleolagos Tauca y Minchin cubrieron todo el sector del lago Titicaca, Desaguadero, Poopó y salares ubicados en el sector sur del altiplano (Sistema TDPS) (Lavenue, 1995). Esto explicaría por qué los análisis de estructuración y por qué los análisis filogenéticos reúnen estas localidades en un clado separado a lo que es el Cusco. Por otra parte, al analizar los árboles filogenéticos (Fig. 5) podemos observar que sí existe un patrón asociado a las cuencas hidrográficas. En el árbol filogenético (Fig. 5), observamos que las localidades de la cuenca del Titicaca forman clados en su mayoría con localidades de la cuenca de Desaguadero y localidades de la cuenca Beni (La Paz). Y, por otro lado, las localidades de la cuenca altiplánica de Chile forman clados con localidades de la cuenca Pampa del Tamarugal, Uyuni y Desaguadero. Lo anterior, también se puede observar en las redes de haplotipo (Fig. 8), donde se observan haplogrupos tipo estrella solo con localidades de la cuenca del Titicaca, Beni y Desaguadero; y, por otra parte, haplogrupos tipo estrella únicamente en las localidades de la cuenca altiplánica de Chile teniendo algunos haplotipos asociados a haplotipos de localidades de

otras cuencas de Bolivia, como la cuenca de la Pampa del Tamarugal, Desaguadero y Uyuni.

Según lo propuesto por Vila y *col.* (2013), en el norte de Chile se encuentran tres linajes distribuidos en dos clados, uno del río Isluga y el otro del Salar de Huasco y el río Collacagua. Cruz-Jofre y *col.* (2014) propone que las poblaciones de *O. agassii* del altiplano chileno no corresponderían a las del Lago Titicaca y que Isluga estaría más relacionada a las *O. agassii* de Bolivia.

En el árbol filogenético (Fig. 3) podemos observar que las localidades de la cuenca del altiplano chileno no se relacionan con las localidades de la cuenca del Titicaca, se observa un clado formado por los individuos de Huasco y Collacagua, e Isluga forma un clado que se encuentra más relacionado a las localidades de la cuenca de Desaguadero. Al analizar la red de haplotipos (Fig. 8), podemos observar que en el caso de las localidades de la cuenca altiplánica de Chile forman haplogrupos excluyendo a las otras cuencas, y los haplotipos de Isluga se encuentran más relacionados a los haplotipos de la cuenca de Desaguadero y el Titicaca.

En cuanto a la cuenca del Lago Titicaca, al analizar la red de haplotipos (Fig. 8) y los árboles filogenéticos (Fig. 5) podemos observar que existe una conexión con las poblaciones de la cuenca de Desaguadero. Si analizamos la hidrografía del sector, podemos observar que el Río Desaguadero es un efluente del lago Titicaca. Esta conexión de la cuenca del Titicaca con la cuenca de Desaguadero, y la de la cuenca de Desaguadero con la cuenca Altiplánica, podría explicar también porque no se forman clústeres separados para las diferentes cuencas

en los análisis de estructuración.

Otra de las observaciones realizadas por Cruz-Jofré y *col.* (2014) y que también realiza Fabres (2022) y Cruz-Jofré (2022), es la evidencia que la altitud en las diferentes cuencas podría llevar a la diferenciación de las especies. Para esto, se caracterizó el árbol filogenético en función de la altitud de las localidades estudiadas. En este estudio no se encontró ningún patrón en cuanto a las altitudes, incluso en la localidad Isluga, que fue estudiada por Fabres (2022). Lo anterior puede deberse a la cantidad y al tipo de marcadores utilizados en este estudio y la temporalidad que representan estos, ya que en Fabres (2022) utilizan marcadores nucleares microsatélites los cuales podrían mostrar una historia más reciente.

La red de haplotipos (Fig. 8) evidencia la alta diversidad genética encontrada en toda la distribución de *O. agassii*, característica del género (Lüssen y *col.*, 2003; Vila y *col.*, 2013; Esquer-Garrigos y *col.*, 2015), respaldada por los índices de diversidad genética obtenidos, con un valor de diversidad haplotípica total de $\pi = 0,9805$ (Tabla 2). Además, se logra identificar una gran cantidad de haplotipos únicos y haplotipos privados, como es el caso de la cuenca Altiplánica y la cuenca de la Pampa del Tamarugal, las cuales no comparten haplotipos con ninguna otra cuenca del estudio.

Los análisis de delimitación de especies ABGD y ASAP encuentran cinco especies candidatas, mientras que mPTP encuentra ocho. A pesar de esto,

cuatro son iguales en todos los análisis, siendo la especie candidata 1 los individuos de las localidades Pocchin y Pomacanchi, la especie candidata 2 los individuos de Oropesa, la especie candidata 3 los individuos de Qoricocha, Lago Huaypo, Piuray, Tambo Real y Canal canallas, y la especie candidata 4 los individuos de Tambo Cancosa. En el caso de la especie candidata 5 recuperada por los análisis ABGD y ASAP, el análisis mPTP los divide en cuatro especies candidatas más, donde separa a algunos individuos de la cuenca del Titicaca y Desaguadero en una especie candidata, un individuo de la Laguna Achocaya en otra especie candidata y a un individuo de Yapura y Villa Santiago en otra especie candidata. Este último resultado llama la atención, puesto que propone especies candidatas con uno o dos individuos. Sukumaran & Knowles (2017), evidencian que análisis de delimitación de especie con modelos de coalescencia delimita realmente estructuración, sin distinción entre procesos a nivel de población o límites entre especies, teniendo una sobre estimación de especies. Esto podría explicar que el análisis de mPTP, debido a que está basado en un árbol filogenético enraizado, pueda sobreestimar el número de especies candidatas. Los resultados obtenidos de delimitación de especies son consistentes a los resultados de filogenia y estructuración genética obtenidos anteriormente, donde las localidades del Cusco se diferencian de todas las demás y las cuencas del Titicaca, Desaguadero, Beni, Pampa del Tamarugal, Uyuni y Altiplánicas quedan juntas en un solo grupo, a excepción de Tambo Cancosa. Valenciennes (1846) describió la especie *Orestias agassii* a partir de individuos pertenecientes a la localidad de Corocoro, al momento de realizar los análisis de

relaciones filogenéticas, redes de haplotipos y delimitación de especies, podemos observar que los individuos de la localidad tipo comparten haplotipo con las localidades de la cuenca del Titicaca. Por lo que inferimos que las localidades de la cuenca del Titicaca, Desaguadero, Beni, Pampa del Tamarugal, Uyuni y Altiplánicas que forman una especie candidata, corresponden a *Orestias agassii*. Mientras que, las localidades de Cusco y Tambo Cancosa asignadas a *O. agassii* corresponderían a otras especies. Cabe mencionar que en la descripción de la especie que realiza Valenciennes (1846), el menciona que los individuos de Corocoro son similares a los de los lagos Antonio y Chinchero al oriente del Cusco. Los resultados de este trabajo sugieren que se trataría de la especie candidata 3. Si bien no tenemos las coordenadas exactas de estos lagos, encontramos la laguna San Antonio al oriente del Cusco a 4.360 m s.n.m aproximadamente, lo que coincide con las características descritas por Valenciennes, pero de la que no contamos registro. Por otra parte, si registramos la localidad de Chincheros, la cual coincide con la distribución geográfica de las poblaciones de Piuray, Qoricocha, Lago Huaypo, Piuray, Tambo Real y Canal canallas. De este modo, se resuelve una duda presente entre los especialistas acerca de las localidades mencionadas por Valenciennes en la descripción original de la especie.

CONCLUSIONES

Se infiere que la distribución actual asignada a *Orestias agassii* no correspondería a la misma especie y se rescatan cinco especies candidatas.

Para la cuenca del Amazonas, donde se encuentran las localidades del Cusco, se proponen tres especies candidatas filogenéticamente relacionadas. La primera formada por las localidades de Pocchin y Pomacanchi; la segunda formada por la localidad Oropesa; y la tercera formada por las localidades Qoricocha, Lago Huaypo, Piuray, Tambo Real y Canal Canallas. La conexión de estas localidades estaría dada por los ríos Vilnacota y Urubamba, respectivamente.

Las poblaciones de la cuenca del lago Titicaca, Desaguadero-Poopó-Coipasa, Beni, Pampa del Tamarugal y Altiplanica forman una sola especie candidata. Si bien no se observan linajes asociados a la cuenca del Titicaca o a la cuenca Altiplánica, si podemos observar que las poblaciones de la cuenca del Titicaca están más relacionadas a las poblaciones de la cuenca del Desaguadero-Poopó-Coipasa, al igual que las poblaciones de la cuenca Altiplánica están más relacionadas a las poblaciones de la cuenca del Desaguadero-Poopó-Coipasa.

Se encontró el mismo patrón visto en Vila y col. (2013), donde los individuos de Collacagua y Huasco forman un clado, y los individuos de Isluga forman otro clado, más relacionado a las poblaciones de Bolivia. Sin embargo, al realizar los análisis de delimitación de especies, estos pertenecen a la misma especie candidata.

Se propone que la especie candidata formada por los individuos de las localidades de las cuencas del Titicaca (Perú y Bolivia), Beni (Bolivia), Desaguadero (Bolivia), Uyuni (Bolivia), Pampa del Tamarugal (Chile) y Altiplánica (Chile) correspondería a *O. agassii*, ya que es aquí donde se encuentran insertos los individuos de Corocoro, localidad tipo de la especie.

Se infiere que los individuos de localidad Tambo Cancosa no corresponderían a *Orestias agassii*.

BIBLIOGRAFÍA

Aljanabi, S. M., & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.

Arratia F.G. 1982. Peces del Altiplano de Chile. En: A. Veloso, R. Bustos-Obregon (eds.), *El hombre y los ecosistemas de montaña: el ambiente natural y las poblaciones humanas de los Andes del norte grande de Chile*, Vol. de Síntesis Proyecto Mab-6 – UNESCO- UNEP. pp 93-144. Chile.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.

Cruz-Jofré F., Morales P., Esquer-Garrigos Y., Vila I., Hugueny B., Gaubert P., Méndez M.A. 2014. Taxonomic identity of the forms of *Orestias agassii* (Teleostei: Cyprinodontidae) from Chile: a morphological comparison with the syntypes of the species of Peru and Bolivia. *Gayana. Rev.* 78 (1): 25-29.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.

De La Barra E., Maldonado M., Irma Vila., Ibáñez C., Jégu M., Carvajal-Vallejos F.M. 2020. Resumen del conocimiento sobre la biología y taxonomía del género *Orestias Valenciennes 1839* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *Hidrobiología Neotropical y Conservación Acuática* 1 (2): 185-224

Dupanloup, I, S. Schneider, L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-81.

Eigenmann, C. H., & Allen, W. R. 1942. *Fishes of western South America*. I. The intercordilleran and Amazonian lowlands of Peru. II. The high pampas of Peru, Bolivia, and northern Chile.

Esquer-Garrigos, Y. S. 2013. Multi-scale evolutionary analysis of a high altitude freshwater species flock: diversification of the *agassizii* complex (*Orestias*, Cyprinodontidae, Teleostei) across the Andean Altiplano. Tesis doctoral. Paris, Muséum National d'Histoire Naturelle.

Esquer-Garrigos Y., Hugueny B., Ibañez C., Zepita C., Koerner K., Lambourdiere L., Couloux A., Gaubert P. 2015. Detecting natural hybridization between two vulnerable Andean pupfishes (*Orestias agassizii* and *O. luteus*) representative of the Altiplano endemic fisheries. *Conservation Genetics* 16: 717-727.

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Fabres, A. 2022. Descifrando la historia evolutiva de las poblaciones de *Orestias agassizii* valencienas, 1846 (Cyprinodontidae) en Perú, Bolivia y Chile. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/192856>

Guillot, G., Mortier, F., & Estoup, A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes*, 5(3), 712-715.

Lauzanne, L. 1981. Description de trois *Orestias* nouveaux du lac Titicaca, *O. ispi* N. sp, *Forgeti* N. sp et *O. tchernavini* N. sp. (Pisces, Cyprinodontidae)

Lavenu, A., Bonhomme, M. G., Vatin-Perignon, N., & De Pachtere, P. 1989. Neogene magmatism in the Bolivian Andes between 16 S and 18 S: Stratigraphy and K/Ar geochronology. *Journal of South American Earth Sciences* 2(1): 35-47.

Lavenu, A. 1992. Formation and geological evolution. En: C. Dejoux y A. Ittis (eds.), *Lake Titicaca. A Synthesis of Limnological Knowledge*. Kluwer Academic Publishing, pp. 3–15. Dordrecht, Países Bajos.

Lavenu, A. 1995. Geodinámica plio-cuaternaria en los Andes centrales: el Altiplanonorte de Bolivia. *Revista Técnica de Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos* 16: 79-96.

Lüssen, A., Falk, T. M., & Villwock, W. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1), 151-160.

Morales, P., Vila, I. & Poulin, E. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conservation Genetics* 12: 1639–1643.

Parenti L.R. 1984. A taxonomic revision of the Andean Killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bulletin American Museum of Natural History* 107-214.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. J. M. E. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.

Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. 2021. ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.

Rambaut A. 2019. Figtree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*. Rev. 34(12): 3299-3302.

Sarmiento J. 1991. Peces. En: E. Forno & M. Baudoin (eds.), *Historia Natural de un valle de los Andes: La Paz*. pp 469-479. Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Ecología, La Paz, Bolivia.

Sukumaran, J., & Knowles, L. L. 2017. Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(7), 1607-1612.

Tapia Molina, G., & Aguas, C. D. G. d. 2021. *Inventario de cuencas, subcuencas y subsubcuencas de Chile*. DGA. División de Estudios y Planificación.

Tchernavin V. 1944. A revision of the subfamily Orestinae. *Proceedings of the Zoological Society of London*, Rev. 114 (9): 140-233.

Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., Von Haeseler A., Minh B.Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44: W232-W235.

Valenciennes, A. 1839. Rapport sur quelques poissons d'Amérique rapportés par M. Pentland: L'Institut, 7, 118.

Valenciennes, A. 1846. Chapitre XII Des *Orestias* En: Cuvier G. & Valenciennes A. (eds) *Histoire Naturelle des Poissons* (Volume XVIII, Livre XVIII): 221-244. Paris, Francia.

Valladares, M. A., Méndez, M. A., & Collado, G. A. 2018. Influenced but not determined by historical events: genetic, demographic and morphological differentiation in *Heleobia ascotanensis* from the Chilean Altiplano. PeerJ, 6, e5802.

Victoriano, P. F., Muñoz-Mendoza, C., Sáez, P. A., Salinas, H. F., Muñoz-Ramírez, C., Sallaberry, M., Fibla, P., & Méndez, M. A. 2015. Evolution and conservation on top of the world: phylogeography of the Marbled Water Frog (*Telmatobius marmoratus* species complex; Anura, Telmatobiidae) in protected areas of Chile. Journal of Heredity, 106(S1), 546-559.

Vila I., Pinto M. 1986. A new species of killifish (Pisces, Cyprinodontidae) from the Chilean Altiplano. Revue Hydrobiologie Tropicale 19: 233-239.

Vila I. 2006. A new species of killifish in the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the southern High Andes, Chile. Copeia 3: 471-476.

Vila I., Scott S., A.M. Méndez, Valenzuela F., Iturra P., Poulin E. 2011. *Orestias gloriae*, a new species of cyprinodontid fish from saltpan spring of the southern high Andes (Teleostei: Cyprinodontidae). Ichthyological Exploration Freshwaters 22 (4): 345- 353.

Vila I., Morales P., Scott S., Poulin E., Veliz D., Harrod C., Mendez M. 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. Journal of Fish Biology 82 (3): 927-943.

Xiao, W. H., Zhang, Y. P. & Liu, H. Z. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. Molecular Phylogenetics and Evolution 18: 163–173.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics, 29(22), 2869-2876.