

ESTUDIO GENÉTICO DE LAS ESPECIES ÍCTICAS NATIVAS DEL LAGO TITICACA. CARACTERIZACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL

INFORME FINAL



Adolfo de Sostoa
Ignacio Doadrio
Claudia Patricia Ornelas
Nuno Caiola
Carlos Pedraza
Orieta Flores
Mario Monroy
Alberto Maceda

Febrero 2010



PERÚ

Ministerio
de la Producción

Despacho Viceministerial
de Pesquería



ESTUDIO GENÉTICO DE LAS ESPECIES ÍCTICAS NATIVAS DEL LAGO TITICACA. CARACTERIZACIÓN Y ESTRUCTURA POBLACIONAL

Dr. Adolfo de Sostoa

Lic. Mario Monroy

Lic. Alberto Maceda

Dp. Biología Animal. Facultad de Biología.
Universidad de Barcelona.

Dr. Ignacio Doadrio

Lic. Claudia Patricia Ornelas-García

Lic. Carlos Pedraza-Lara

Museo Nacional de Ciencias Naturales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dra. Orieta Flores

Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca (PELT)
Puno

Dr. Nuno A. Caiola

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
Generalitat de Catalunya

Con la colaboración de:

Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca (PELT)

Autoridad Binacional Autónoma del Lago Titicaca (ALT)

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Objetivos.....	7
1.2.1. Objetivos generales.....	7
1.2.2. Objetivos específicos.....	7
1.2.2.1. Caracterización genética de las especies nativas del lago Titicaca.....	7
1.2.2.2. Caracterización y estructura poblacional.....	8
1.3. Estaciones de muestreo.....	9
2. Estudio genético de las especies ícticas nativas del lago Titicaca.....	12
2.1. Introducción.....	13
2.1.1. Situación geográfica.....	13
2.1.2. Diversidad íctica del altiplano.....	15
2.1.3. Ictiofauna presente en el lago Titicaca.....	16
2.1.4. Relaciones filogenéticas de las especies del género <i>Orestias</i>	24
2.2. Objetivos.....	27
2.2.1. Objetivos generales.....	27
2.2.2. Objetivos específicos.....	27
2.3. Métodos.....	28
2.3.1. Colecta de material biológico.....	28
2.3.2. Extracción de ADN y amplificación de genes mitocondriales y un gen nuclear.....	31
2.3.3. Análisis de los datos	32
2.3.4. Análisis de clados anidados.....	33
2.3.5. Datación de la cladogénesis con reloj molecular relajado.	34
2.3.6. Redes haplotípicas.....	35
2.4. Resultados y discusión.....	36
2.4.1. Caracterización molecular del género <i>Orestias</i>	36
2.4.1.1. Especies estudiadas del género <i>Orestias</i> en el lago Titicaca.....	39
2.4.1.2. Análisis filogenéticos del género <i>Orestias</i> basado en la secuencia del <i>Cytb</i>	81
2.4.1.3. Análisis filogenéticos del género <i>Orestias</i> basado en la secuencia de tres genes <i>Cytb</i> , D-LOOP y Rho (2,851pb).....	83
2.4.1.4. Evidencia genética de hibridación entre diferentes especies de <i>Orestias</i>	89
2.4.1.5. Híbridos dentro del género <i>Orestias</i>	91
2.4.1.5.1. Identificación de haplotipos nucleares.....	91
2.4.1.6. Redes de haplotipos del <i>Cytb</i> y su correspondencia morfológica y geográfica.....	104
2.4.1.7. Datación molecular de la cladogénesis dentro del género <i>Orestias</i>	108
2.4.2. Caracterización molecular del género <i>Trichomycterus</i>	110
2.4.2.1. Análisis filogenéticos del género <i>Trichomycterus</i> basado en la secuencia del gen <i>Cytb</i>	111
2.4.2.2. Implicaciones filogenéticas del género <i>Trichomycterus</i> en el lago Titicaca.....	113
2.4.2.3. Implicaciones taxonómicas respecto al género <i>Trichomycterus</i> en el lago Titicaca.....	114
2.5. Conclusiones.....	116
2.6. Bibliografía.....	119
3. Caracterización y ecología poblacional de las comunidades de peces litorales del lago Titicaca.....	122
3.1. Introducción y objetivos.....	122
3.2. Métodos.....	124
3.2.1. Análisis de datos.....	125
3.3. Resultados y discusión.....	127
3.3.1. Diversidad de las especies.....	127
3.3.2. Selectividad de los artes de pesca.....	135
3.3.2.1. Zona de totoral.....	136
3.3.2.2. Zona de aguas abiertas.....	138
3.3.2.3. Medidas de conservación.....	141
3.4. Bibliografía.....	143
4. Anexos.....	145

1. Introducción

1.1. ANTECEDENTES

El altiplano andino posee una reducida diversidad íctica debido a razones históricas y ecológicas con sólo tres géneros de especies nativas, *Orestias*, *Astroblepus* y *Trichomycterus*, y un total de unas 58 especies descritas. El género *Orestias* es autóctono de los lagos de gran altitud y de los ríos tributarios de los Andes del Perú, Bolivia y Chile. Más de la mitad de las 43 especies de *Orestias* son originarias de la cuenca del Titicaca, y 23 de ellas sólo se conocen en el lago Titicaca (Parenti, 1984), además del género *Trichomycterus*.

A partir de 1939 se introdujeron especies foráneas al lago Titicaca tales como: la trucha común (*Salmo trutta*), trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*), la trucha de fontana (*Salvelinus fontinalis*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*); y en 1955-56 el pejerrey argentino *Odontesthes bonariensis*. Dichas especies fueron introducidas con el fin de mejorar la pesca comercial, lo que ha generado cambios en las cadenas tróficas de la zona al modificar la diversidad de los ecosistemas naturales. La competencia y depredación han podido ser las causas, entre otros factores como la sobrepesca y la alteración del medio, de la disminución de las poblaciones de peces nativos (Hanek, 1982). Por ejemplo, *Orestias cuvieri*, especie relativamente abundante, desapareció al ser introducidas las truchas y *O. pentlandii* después de la introducción del pejerrey argentino. Además, otras especies han disminuido significativamente su población por efecto de la introducción de las especies foráneas, los impactos ambientales y la explotación de recursos.

A finales de los años 70 se aprobaron la incorporación de jaulas para cultivo de truchas. En las primeras etapas del cultivo artesanal no existían grandes regulaciones respecto al manejo del pienso o de los desechos, que motivó el uso, por su bajo costo y gran disponibilidad, de especies autóctonas, como por ejemplo *O. ispi* y otras de pequeño tamaño (*O. mulleri*, *O. imarpe*, etc.), para alimentar las trucha.

A la introducción de salmónidos y aterínidos siguió una epizootia del parásito protozoo *Ichthyophthirius multifiliis*, que, según las estimaciones, en diciembre de 1981 causó la muerte de 18 millones de *Orestias spp.* El 93 por ciento de los peces muertos que se recogieron eran ejemplares adultos de *O. agassii*, que es una especie importante desde el punto de vista comercial que abunda en la zona litoral (Wurtsbaugh y Tapia, 1988).

Un gran número de personas dependen directa o indirectamente de la pesca del lago y aproximadamente dos tercios de las capturas totales del lago Titicaca corresponden al género *Orestias*. Por tales razones, es necesario caracterizar genéticamente las especies nativas del lago Titicaca y conocer el estado actual de las poblaciones ícticas, sus ciclos biológicos y estrategias alimentarias para implementar medidas de conservación que eviten la extinción de las especies nativas y ayuden a solucionar la problemática ambiental y social relacionada con la pesca mediante el uso sostenible de los recursos.

El frágil ecosistema del lago Titicaca, como se ha comentado, ha sufrido diversos impactos. Uno de los principales factores de éste desequilibrio fue la comentada introducción de la trucha y el pejerrey. La trucha tuvo su apogeo en la década del 60, en la que los volúmenes de producción sustentaron el funcionamiento de 5 plantas conserveras en la región; actualmente, la población de truchas en estado silvestre es insignificante; mientras que los pejerreyes sembrados en el lago Poopó, ingresaron al lago Titicaca aproximadamente en 1955-56, llegando a ocupar todos los afluentes de la

cuenca, esta especie en los últimos años ha tenido un valor ambivalente, ya que al mismo tiempo que afecta gravemente a la biodiversidad íctica nativa, es una especie que brinda beneficios significativos a los pescadores, aunque actualmente las capturas han decrecido mucho.

La pesca en la cuenca del lago Titicaca, tiene una gran importancia en la vida y la economía de la región, constituyendo una fuente de trabajo o de recursos para un importante sector de pobladores circunlacustres peruano-bolivianos, quienes obtienen con ello alimento de bajo costo, rico en proteínas y de fácil acceso. La explotación de los recursos hidrobiológicos está expuesta a una serie de problemas que limitan el normal desarrollo de una actividad pesquera sostenible y respetuosa con la conservación de la biodiversidad. El presente trabajo pretende a corto plazo mejorar sensiblemente el conocimiento que se tiene sobre la taxonomía de las especies nativas del lago Titicaca y aportar información sobre el estatus de las comunidades de peces. Mientras que a medio plazo se abordará el estudio de los ciclos biológicos de algunas de las principales especies de uso pesquero, así como su ecología poblacional, redes tróficas, niveles de contaminación por metales pesados y efectos sobre su estado sanitario y conservación.

1.2. Objetivos

Los objetivos propuestos para el presente trabajo son los siguientes:

1.2.1. OBJETIVOS GENERALES

- Completar el estudio genético de los géneros *Orestias* y *Trichomycterus* recolectados.
- Realizar nuevas campañas de recolección en las localidades no muestreadas anteriormente.
- Capturar representantes de todas las especies nativas de peces que habitan el lago Titicaca.
- Caracterización taxonómica mediante ADN-mitocondrial las diferentes especies de los géneros *Orestias* y *Trichomycterus* del lago Titicaca.
- Caracterización y estructura poblacional de las comunidades de peces litorales del lago Titicaca.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.2.1. Caracterización genética de las especies nativas

- Llevar a cabo un muestreo de la diversidad íctica representativa tanto de las especies descritas como de los morfotipos presentes en el lago Titicaca
- Elaborar una colección de tejidos y especímenes de referencia
- Caracterizar mediante el uso de marcadores moleculares las relaciones filogenéticas de las especies presentes en el lago Titicaca

- Realizar una propuesta taxonómica

1.2.2.2. Caracterización y estructura poblacional

- Ampliar el número de localidades muestreadas a todo el lago y a los diferentes hábitats presentes.
- Caracterización de las comunidades y distribución batimétrica.
- Realizar una colección de escamas de las especies comunes para estudios de la edad y crecimiento para posteriores estudios.
- Recolección de tejidos gonadales para el estudio de la reproducción de las especies representativas para posteriores estudios.
- Estudio de las redes tróficas mediante el uso de isótopos estables.

1.3. Estaciones de muestreo

Además de las localidades muestreadas en el año 2000 (Coata, Bahía de Puno, Islas de Uros, Laguna de Umayo (Sillustani), Río Ramis, Capachica; zona Chiflón-Ilata, llave, Cajje, Juli, Pusi, Amantani, Laguna de Alonso, Santa Lucía, Laguna de Arapa, Saman, Río de San Bartolomé, Llanchón, Laguna Saracucho, Cuyo-Cuyo), en el presente proyecto y en las campañas de noviembre de 2008 y septiembre de 2009 se han muestreado 71 localidades de la cuenca del lago Titicaca (Mapa 1):

Achacachi, UTM: 527912, 8236108
Ajllata, UTM: 522804, 8228578
Amacati
Atuncolla, UTM: 377533, 8265616
Bahía de Cohana, UTM: 534339, 8191987
Bahía de Moho, UTM: 444179, 8299858
Bahía de Tamán (Península de Capachica), UTM: 412672, 8272784
Bahía de Uruni, UTM: 413808, 8271223
Barco (Chucuito), UTM: 404219, 8243928
Charcas (Nueva Alianza), UTM: 420927, 8241139
Coata, UTM: 402749, 8275194
Conima, UTM: 450963, 8291034
Copancara, UTM: 539968, 8209021
Cotos (Península de Capachica). UTM: 412791, 8271348
Escoma, UTM: 482727, 8264926
Estrecho de Tiquina, UTM: 516577, 8205963
Guaqui, UTM: 515071, 8166857
Huancané, UTM: 407503, 8306875
Huatajata, UTM: 531681, 8207514
Huatta, UTM: 404582, 8271472
Huencalla (Nueva Alianza), UTM: 422599, 8240311
Inka-Chaka (Copacabana), UTM: 490798, 8218168
Iscata, UTM: 432255, 8235130
Iscaya, UTM: 506167, 8204600
Isla de Amantani, UTM: 422935, 8269378
Isla de Anapia, UTM: 514764, 8196041
Isla de Jamithi, UTM: 516198, 8200807
Isla de Pariti, UTM: 527938, 8192891
Isla de Taquile, UTM: 427436, 8255149
Isla de Taquiri, UTM: 519026, 8199234
Isla de Uros, UTM: 396675, 8248544
Isla del Sol, UTM: 481004, 8231522
Kazani
Laguna de Arapa. UTM: 381334, 8325343
Laguna de Saracocha, UTM: 434389, 8396525

Ojherani. UTM: 398767, 8245901
Ojelaya. E. de Tiquina
Península de Soto (Copacabana)
Pilcuyo. UTM: 447018, 8217410
Pomata. UTM: 467731, 8203022
Puerto Acosta. UTM: 467305, 8280012
Puerto Carabuco (Chayapata). UTM: 493134, 8255176
Puerto Pérez. UTM: 542985, 8199808
Quejón. Laguna de Arapa
Río Coata UTM 401629, 8278519
Río Desaguadero. UTM: 496053, 8167256
Río llave (desembocadura). UTM: 452790, 8229943
Río Lampa, UTM: 372047,8291787
Río Zapatilla, UTM: 44681,8214984
Río Ramis, UTM: 3900441, 8309279
Saman, UTM: 390630, 8309701
Santa Ana, Copacabana, UTM: 490280, 8213207
Santa Clara, Copacabana, UTM: 489402, 8211913
Santiago de Huata, UTM: 517767, 8225071
Santiago de Ojje, UTM: 512991, 8201759
Siale, UTM: 412991, 8271777
Sillustani (Iago Umayo), UTM: 376450, 8260805
Socca, UTM: 424951, 8242003
Sorejapa, UTM: 537623, 8206748
Sotalaya, UTM: 504551, 8241708
Sucuni, UTM: 458369, 8289223
Tejepe, UTM: 489527, 8223198
Titicachi, UTM: 486792, 8222926
Tito Yupanqui. UTM: 505246, 8209309
Tilali. UTM: 459629, 8284583
Umasuyo, Bolivia
Vilquechico, UTM: 426199, 8314753
Vilurcuni, UTM: 501284, 8201986
Visalaya, Bolivia
Yampupata, UTM: 486116, 8224031
Yapura (Península de Capachica), UTM: 416828, 8260962



Mapa 1. Localidades muestreadas en la cuenca del lago Titicaca entre noviembre de 2008 y septiembre de 2009.

2. Estudio genético de las especies ícticas nativas del lago Titicaca



Claudia Patricia Ornelas-García*

Carlos Pedraza-Lara*

Ignacio Doadrio*

Orieta Flores**

Adolfo de Sostoa***

***Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)**

****Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca**

*****Universidad de Barcelona**

2.1. Introducción

2.1.1. SITUACIÓN GEOGRÁFICA



Figura 1. Localización de las cuencas de Titicaca (Lago Titicaca y cuerpos adyacentes) y del Altiplano Central; el Altiplano Central forma una cuenca endorreica que incluye el lago Poopó, Salar de Coipasa, Salar de Uyuni y otras planicies salinas. La línea punteada indica el límite actual entre la cuenca del Titicaca y la del Altiplano Central (tomado de Fornari et al., 2001).

El Altiplano andino es una cuenca hidrológica endorreica de ~200,000 km² localizada entre las cordilleras andinas del Este y Oeste (Figura 2).

Con una altitud por arriba de 3,800 m se caracteriza por un clima de árido a semiárido, la precipitación anual va de 700 mm en el Norte a menos de 10 mm en el Sur. La temperatura aérea va de -20°C por las noches en invierno a 20°C durante el día en verano. Hoy en día, el Altiplano

contiene un conjunto de cuencas evaporíticas. La parte Central del Altiplano está dominado por dos grandes segmentos salinos: el Salar de Uyuni (10,000 km²) y el Salar de Coipasa (2,500 km²). Al norte, el lago Titicaca (8,560 km²) se encuentra a

una elevación de ~3,806 m, con una profundidad máxima alrededor de 285 m, lo que lo hace el punto más bajo del altiplano.

Varios estudios han sido llevados a cabo por más de un siglo y han documentado que el Altiplano ha sido cubierto en distintas ocasiones por extensos paleolagos. Estos lagos se han caracterizado por episodios alternativos de expansión y desecación, comúnmente relacionados con cambios climáticos (como cambios en la circulación atmosférica y deglaciación) (Hastenrath y Kutzbach, 1985; Blodgett *et al.*, 1997; Sylvestre *et al.*, 1999). Entre los paleolagos andinos el lago Ballivián en el Altiplano Norte (Cuenca del Titicaca) y el lago Minchin en el Altiplano Central (Cuencas de Uyuni, Coipasa y Poopó) han sido descritos (Minchin 1882) y datados (Fornari *et al.*, 2001).

Se ha llevado a cabo un estudio de datación de las capas lacustres del Altiplano Central (y se han identificado dos episodios llamados lago Tauca (12,000-10,000 C₁₄ años; 14,100-11,400 cal años AP) (Fornari *et al.*, 2001). Un episodio posterior, correspondiente con el lago Escara fue observado en el Altiplano, pero no datado. En el Altiplano Norte, Sevant y Fontes (1978) identificaron tres episodios lacustres, Titicaca-Tauca (~3,815 m), Titicaca_Minchin (~3,825 m) y Ballivián (~3,960 m). Lavenu *et al.* (1984), describió dos paleolagos previos a Ballivián en la cuenca de Titicaca, nombrándolos Cabana (~3,900 m) y Mataro (3,950 m). Los trabajos de investigación recientes se han enfocado en el estudio de los sedimentos del lago Titicaca (Wirrmann y Mourguiart, 1995; Rowe *et al.*, 1998) y en reconstrucciones paleoclimáticas y modelos climáticos (Hastenrath y Kutzbach, 1985; Blodgett *et al.*, 1997). El Salar de Uyuni también ha sido estudiado a detalle (Rettig *et al.*, 1980; Risacher y Fritz, 1991).

El lago Tauca se divide hoy en día en tres fases lacustres llamadas Tauca (19100-15600 años AP), Ticaña (15600-13400 años AP) y Coipasa (13400-12300 años AP) (Sylvestre *et al.*, 1999) (Figura 2).

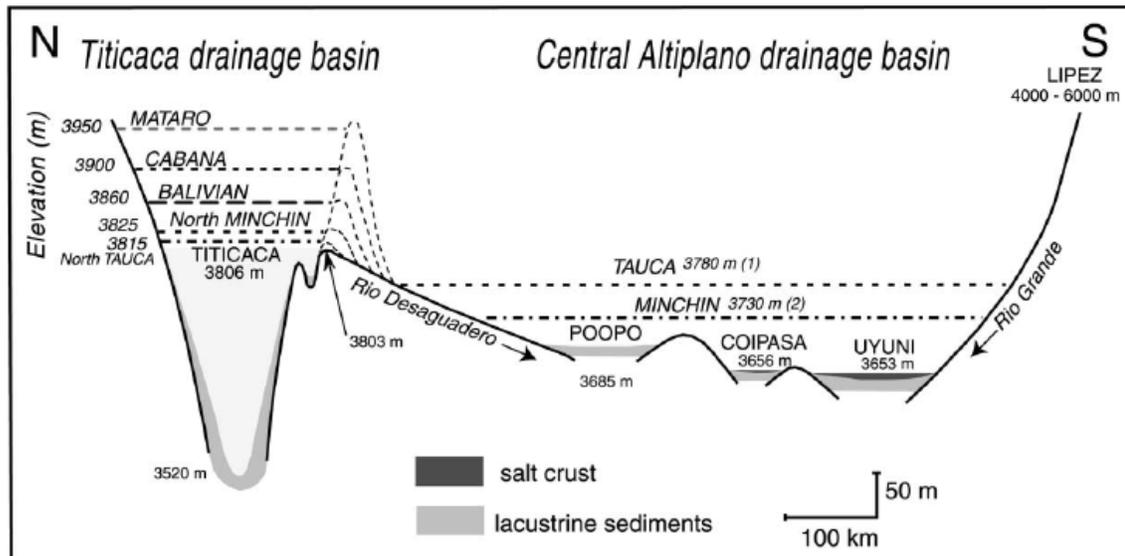


Figura 2. Sección esquemática NS del Altiplano mostrando una reconstrucción de los niveles de los paleolagos en las cuencas del Norte y del Centro (tomado de Fornari *et al.*, 2001).

2.1.2. DIVERSIDAD ÍCTICA DEL ALTIPLANO

Las cuencas hidrográficas del Altiplano son en su mayoría endorreicas y algunas de ellas presentan una alta salinidad. Estas también presentan una marcada diferenciación en los biotipos disponibles, siendo desde pantanosos a ríos y lagos profundos. Algunos de estos sistemas hidrológicos han permanecido aislados desde el último levantamiento de los Andes en el Mioceno (Antonelli *et al.*, 2009). Es posible aislamiento geográfico aunado con la diversidad de hábitats ha influenciado en la alta tasa de especiación en el género *Orestias* descrita para Perú y Bolivia. Desde el establecimiento del género por Valenciennes, 1846 cuando describió 10 especies hasta Parenti

(1984) que reconoce 43, la taxonomía del grupo ha estado en una constante modificación, siendo el lago Titicaca el sitio de mayor diversificación para el género (Vila y Pinto, 1986).

2.1.3. ICTIOFAUNA PRESENTE EN EL LAGO TITICACA

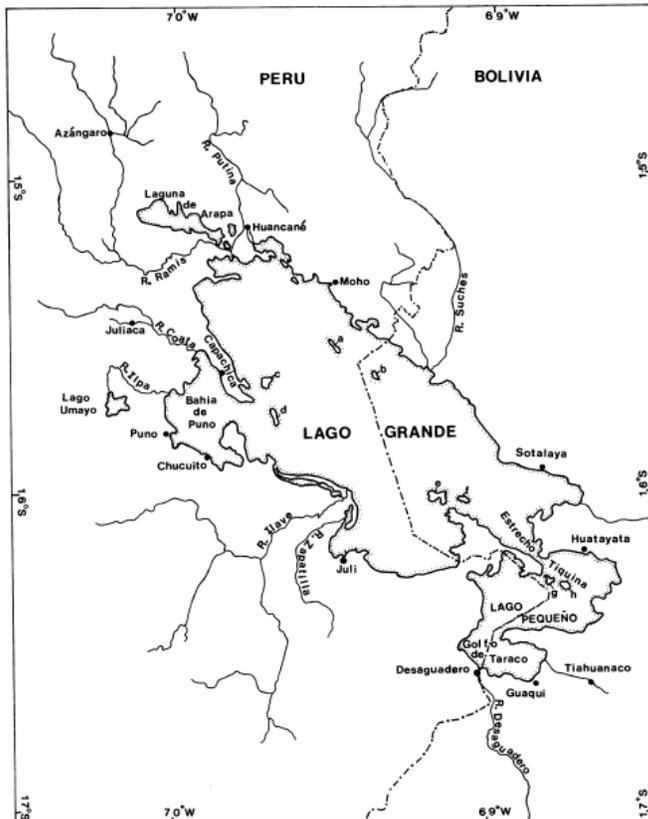


Figura 3. Mapa del Lago Titicaca tomado de Parenti (1984). La línea punteada indica de división entre Perú y Bolivia. Las principales islas están indicadas por letras. A) Soto, B) Chiquipa, C) Amantaní, D) Taquile, E) Titicaca, F) Coati, G) Taquiri y H) Paco.

La ictiofauna del lago Titicaca (Figura 3) está representada principalmente por dos géneros: *Orestias* y *Trichomycterus*, siendo el primero el más diverso (Lauzanne, 1992). Sin embargo, la caracterización de la diversidad de estos dos géneros dista mucho de estar completa. En particular la taxonomía dentro del género *Orestias* ha sido objeto de múltiples estudios y revisiones por diversos grupos de ictiólogos y lo sigue siendo

hoy en día.

Desde su descripción por Valenciennes (1839), el número de especies reconocidas dentro del género *Orestias* ha ido en aumento, comenzando con

Tchernavin (1944) que reconoce 20 especies (16 para el lago Titicaca), Parenti, 1984 reconoce 43 especies (28 para el lago Titicaca) y Lauzanne 1992 que reconoce 24 para el lago Titicaca (Figura 4 y Tabla 1).

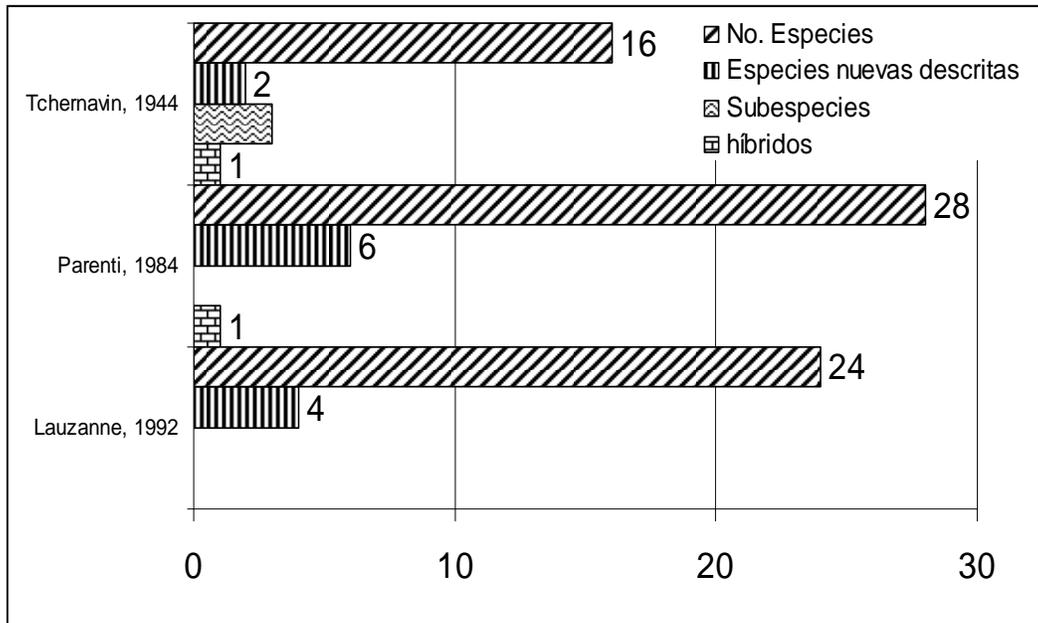


Figura 4. Relación histórica del número de especies reconocidas para el género *Orestias* en el lago Titicaca.

La última revisión taxonómica extensiva en el género *Orestias* llevada a cabo en el lago Titicaca fue por Lauzanne (Lauzanne, 1992), que deja de manifiesto que la plasticidad fenotípica del género *Orestias* en el lago ha derivado en una mala determinación de las especies.

Tabla 1. Especies reconocidas por diferentes autores para el Altiplano y el lago Titicaca dentro del género *Orestias*.

Autor	No. de especies	Especies reconocidas
Tchernavin (1944)	<p>20 en el Altiplano 5 subespecies 2 híbridos 2 especies nuevas</p> <p>16 en el lago Titicaca 3 subespecies 1 híbrido 2 especies nuevas</p>	<p><i>O. cuvieri</i> Valenciennes, 1846 <i>O. pentlandii</i> Valenciennes, 1846 <i>O. agassii tschudii</i> Castelnau, 1855 <i>O. agassii pequeni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. jussiei</i> Valenciennes, 1846 <i>O. jussiei puni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. olivaceus</i> Garman, 1895 <i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. albus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. uruni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. minutus</i> Tchernavin, 1944 <i>O. minimus</i> Tchernavin, 1944 <i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. tutini</i> Tchernavin, 1944 <i>O. taquiri</i> Tchernavin, 1944 <i>O. mulleri</i> Valenciennes, 1846 <i>O. cf. incae</i> Garman, 1895 <i>O. crawfordi</i> Tchernavin, 1944 <i>O. mooni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. sp. 1</i> <i>O. sp. 2</i> <i>O. cuvieri</i> X <i>O. pentlandii</i></p>
Parenti (1984)	<p>43 en el Altiplano 14 especies nuevas 28 en el lago Titicaca 6 especies nuevas 1 híbrido</p>	<p><i>cuvieri</i> complex <i>O. cuvieri</i> Valenciennes, 1846 <i>O. pentlandii</i> Valenciennes, 1846 <i>O. ispi</i> Lauzanne, 1981 <i>O. forgeti</i> Lauzane, 1981 <i>mulleri</i> complex <i>O. gracilis</i> Parenti, 1984</p>

		<p><i>O. mulleri</i> Valenciennes, 1846</p> <p><i>O. crawfordi</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. tutini</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. incae</i> Garman, 1895</p> <p><i>gilsoni</i> complex</p> <p><i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. taquiri</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. mooni</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. uruni</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. minimus</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. minutus</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. tchernavini</i> Lauzanne, 1981</p> <p><i>O. tomcooni</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. imarpe</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. robustus</i> Parenti, 1984</p> <p><i>agassii</i> complex</p> <p><i>O. agassii</i> Valenciennes, 1846</p> <p><i>O. empyraeus</i> Allen, 1942</p> <p><i>O. frontosus</i> Cope, 1876</p> <p><i>O. polonorum</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. elegans</i> Garman, 1895</p> <p><i>O. jussiei</i> Valenciennes, 1846</p> <p><i>O. puni</i> Tchernavin, 1944</p> <p><i>O. parinacotensis</i> Arratia, 1982</p> <p><i>O. laucaensis</i> Arratia, 1982</p> <p><i>O. tschudii</i> Castelnau, 1855</p> <p><i>O. gymnotus</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. hardini</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. ctenolepis</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. ascotanensis</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. cf richersoni</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. multiporis</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. mundus</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. ututo</i> Parenti, 1984</p> <p><i>O. silustani</i> Allen, 1942</p>
--	--	--

		<p><i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. rotundipinnis</i> Parenti, 1984 <i>O. farfani</i> Parenti, 1984 <i>O. albus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. olivaceus</i> Garman, 1895 <i>O. rospigliosii</i> Eigenmann and Allen, 1942 <i>O. pentlandi</i> var. <i>fuscus</i> Garman, 1895 ? <i>O. cuvieri</i> X <i>O. pentlandii</i></p>
Lauzanne (1992)	24 en el lago Titicaca	<p><i>cuvieri</i> complex <i>O. cuvieri</i> Valenciennes, 1846 <i>O. pentlandii</i> Valenciennes, 1846 <i>O. ispi</i> Lauzanne, 1981 <i>O. forgeti</i> Lauzanne, 1981</p> <p><i>mulleri</i> complex <i>O. gracilis</i> Parenti, 1984 <i>O. mulleri</i> Valenciennes, 1846 <i>O. crawfordi</i> Tchernavin, 1944 <i>O. sp.</i> (<i>O. olivaceus sensu</i> Lauzanne, 1982) <i>O. tutini</i> Tchernavin, 1944 <i>O. incae</i> Garman, 1895</p> <p><i>gilsoni</i> complex <i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. taquiri</i> Tchernavin, 1944 <i>O. mooni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. uruni</i> Tchernavin, 1944 <i>O. minimus</i> Tchernavin, 1944 <i>O. tchernavini</i> Lauzanne, 1981 <i>O. tomcooni</i> Parenti, 1984 <i>O. imarpe</i> Parenti, 1984 <i>O. robustus</i> Parenti, 1984</p> <p><i>agassii</i> complex <i>O. agassii</i> Valenciennes, 1846</p>

		<i>O. jussiei</i> Valenciennes, 1846 <i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. albus</i> Valenciennes, 1846 <i>O. olivaceus</i> Garman, 1895
--	--	---

Por lo anterior propone que algunas de las especies han sido asignadas a formas juveniles o ligeras variaciones morfológicas poblaciones como es el caso de los *O. agassii tschudii* Castelnau, 1855, y *O. agassii pequeni*, las cuales propone considerarlas como sinónimos de *O. agassii*. Así mismo cuestiona la validez de otras especies debido a que su descripción ha sido basada en un muestreo escaso, como *O. minutus* Tchernavin, 1944, del que sólo se conocen dos ejemplares y por lo tanto propone que debería ser incluida dentro *O. minimus* Tchernavin, 1944. Por último Lauzanne (1992), no reconoce a *O. jussiei puni* Tchernavin, 1944, propone que debe ser incluida en *O. jussiei* y cuestiona el reconocimiento de *O. tutini*, *O. taquiri*, *O. uruni* y *O. inace* debido a que no habían sido colectadas desde 1984, a pesar de un intenso muestreo.

En la revisión llevada a cabo por Parenti (1984), no reconoce a *O. jussiei* Valenciennes, 1846 para el lago Titicaca, esto es debido a que había un error en la localidad de procedencia de dicha especie cuya localidad era el río Guasacona del Perú. Sin embargo y en contraparte con Lauzanne (Lauzanne, 1982), Parenti (1984), sí reconoce a *O. cf. puni* y no como subespecie de *O. jussiei*, como inicialmente había sido descrita por Tchernavini, 1944.

Además también reconoce a *O. frontosus* Cope, 1876 como especie válida, dicha especie había sido sinonimizada por Tchernavini 1944 con *O. agassii*

tschudii y por el contrario no reconoce a *O. pequeni* Tchernavin 1944, misma que sinonimizó con *O. frontosus* Cope 1876.

El otro componente de la ictiofauna autóctona del lago Titicaca está conformado por los peces del género *Trichomycterus* (llamados comúnmente suches y mauris de acuerdo generalmente a su tamaño). Siendo el género más extenso de la familia, con más de 100 especies, es un grupo de especial dificultad taxonómica y reconocido como no monofilético. Perteneciente a la familia Trichomycteridae, el género *Trichomycterus* agrupa a buena parte de las especies con relaciones filogenéticas menos claras de la familia ya que ha sido conformado por aquellas que no cuentan con los caracteres diagnósticos del resto de géneros reconocidos (generalmente géneros monotípicos con caracteres especializados), pero que tampoco comparten caracteres apomórficos que les unifique en un grupo concreto (Costa y Bockmann, 1993, de Pinna y Wosiacki, 2003). Si bien los esfuerzos de colecta recientes han resultado en la descripción de varias especies del género especialmente en localidades de alta elevación, su conocimiento en el altiplano es aún insuficiente (Fernández y Vari, 2002, Fernández y Schaefer, 2003, Fernández y Vari, 2009). Es por lo anterior que toda aseveración al respecto de la posición taxonómica de las especies de la cuenca del lago Titicaca debe ser tomada con especial cautela hasta no contar con una revisión detallada de la variación morfológica poblacional y cómo ésta se corresponde con las especies descritas para el género.

Dos especies han sido reportadas para el lago desde los primeros estudios faunísticos en la zona: *T. dispar* y *T. rivulatus* (Tschudi 1845, Cuvier y Valenciennes 1846), al día de hoy sin embargo, no hay un estudio que caracterice adecuadamente la variación morfológica y haga posible la asignación de los ejemplares colectados en el lago a una de ambas especies, o la posible identificación de otros grupos. Desde sus respectivas descripciones, *T. dispar* y *T. rivulatus* han experimentado constantes cambios taxonómicos en los diferentes estudios del género, identificando diferentes características diagnósticas muchas veces solapantes, contradictorias o incluso opuestas (Günther 1864, Garman 1875, Pellegrin 1907). El presente trabajo está basado en el listado taxonómico más reciente de la familia (de Pinha y Wosiacki, 2003) mismo que reconoce las especies aceptadas por Eigenmann y Allen (1942), quienes a su vez encuentran a *T. dispar* y *T. rivulatus* entre muestras provenientes del lago Titicaca (Figura 5).



Figura 5. Figura de las especies de *Trichomycterus* reportadas para el lago Titicaca. 2: *T. rivulatus*, 5: *T. dispar*. Modificado de Eigenmann (1918) Pl. XLV.

2.1.4. RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Orestias*

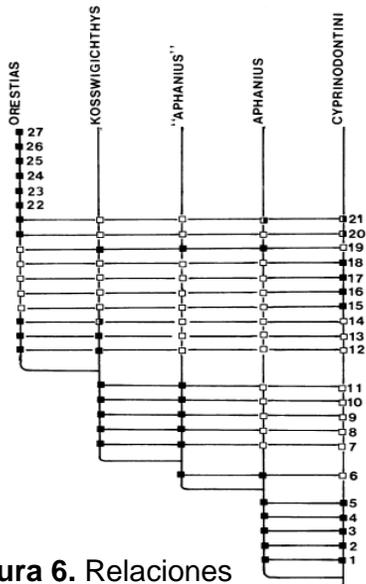


Figura 6. Relaciones filogenéticas basadas en caracteres morfológicos dentro de los Orestiini. Tomado de Parenti (1984).

El género *Orestias* está incluido, *sensu* Parenti, (Parenti 1981) en la Tribu Orestiini, la cual incluye cuatro géneros *Aphanius*, "*Aphanius*", *Kosswigichthys* y *Orestias* (Figura 6). Todos, a excepción de las *Orestias* están distribuidos a lo largo del Mediterráneo y Anatolia (Figura 7).

La Tribu Orestiini se caracteriza entre otras cosas, por presentar un patrón de neuromastos en la superficie dorsal de cabeza muy distintivo.

Según Parenti (1981), *Orestias*, *Anatolichthys* y *Kosswigichthys* forman un grupo monofilético. *Aphanius fasciatus* es considerado como un miembro primitivo de los Cyprinodontinos.

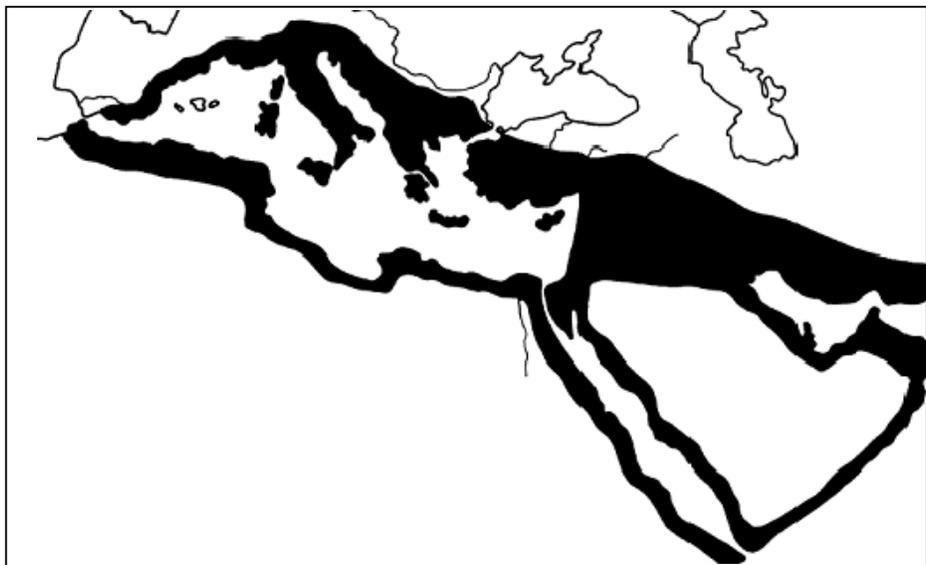


Figura 7. Distribución de los Ciprindontiformes de Anatolia, imagen tomada de Parenti (1981) p.458, figura 86.

Los peces de la subfamilia Cyprinodontinae forman, por los siguientes caracteres, un grupo monofilético, 1) el segundo faringobranquial está superpuesto al tercero, 2) el cartílago de Merkel está expandido posteriormente, 3) el proceso transversal de las vértebras esta reducido y tiene forma de taza, 4) los parietales están ausentes y 5) la línea externa de dientes generalmente está formada por una sola fila. El carácter 3 se encuentra en toda la subfamilia con la excepción de algunas especies de *Orestias*, por lo que la presencia de un proceso transversal alargado en las vértebras se considera un carácter derivado. Parenti determinó que el estado más primitivo del quinto carácter era la presencia de dientes tricúspides en la tercera fila, lo cual se encuentra en todos los Cyprinodontinii y dentro de los Orestinii, excepto en dos especies de *Kosswigtchys* y en *Orestias*. En las *Orestias* la fila externa de dientes puede ser unicúspide o bicúspide y estar dispuestos de forma irregular, lo que ha sido erróneamente interpretado como diferentes filas en algunas especies y constituye un carácter derivado para ambos géneros. El género *Orestias* presenta los siguientes caracteres derivados: carecen de aletas pélvicas, no tienen vómer, ni el primer postcleithrum.

La reducción o pérdida de caracteres es un fenómeno común entre los Cyprinodontidae y dentro de los Orestinii en particular se presentan reducciones en la escamación, en el número de cúspides en los dientes y en el desarrollo de alteas pélvicas. Por ejemplo se ha reportado para *Aphanius* que viven en cuerpos de agua lénticos y con altos contenidos de sulfatos, un alto grado de reducción en la escamación y alteraciones en los radios de las aletas o incluso ausencia total de aletas pélvicas y la reducción parcial de las

cúspides de los dientes. La reducción en la escamación o ausencia de las aletas pélvicas ha sido propuesta por Parenti (1984) como un carácter derivado.

Las *Orestias* comparten con los Cyprinodontiformes de Anatolia el tener expandido el proceso medio del dentario que en *Orestias* forma un escudo óseo en la mandíbula inferior. Esta característica da la apariencia de una mandíbula inferior robusta. Además presentan un carácter sinapomórfico que es la presencia de glándulas genitales únicas. El mesetmoide es cartilaginoso en todos los Cyprinodontiformes de Anatolia y osificado en *Orestias*. Las especies de *Orestias* presentan un patrón característico de poros de la cabeza arreglados en series de neuromastos diminutos formando la silueta de una lira. Los neuromastos cefálicos dorsales están en una o dos líneas a lo largo del hocico y continúan posteriormente en posición media a los orificios nasales a lo largo de la superficie dorsal de la cabeza y laterales a las escamas dorsales. La serie de neuromastos continúan lateralmente a lo largo del preopérculo y la mandíbula. No presentan poros preorbitales, en cambio presentan una serie de neuromastos que circulan el ojo.

2.2. Objetivos

2.2.1. OBJETIVOS GENERALES

- Caracterización genética de especies del género *Orestias* Valenciennes (1839) del lago Titicaca.
- Caracterización genética del género *Trichomycterus* Valenciennes (1832) del lago Titicaca

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo un muestreo de la diversidad íctica representativa tanto de las especies descritas como de los morfotipos presentes en el lago Titicaca.
- Elaborar una colección de tejidos y especímenes de referencia.
- Caracterizar mediante el uso de marcadores moleculares las relaciones filogenéticas de las especies presentes en el lago Titicaca.
- Realizar una propuesta taxonómica.

2.3. Métodos

2.3.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se efectuaron dos campañas de muestreo durante los meses de Noviembre de 2008 y Febrero de 2009 para la colecta de material biológico, considerando prioritario la colecta en aquellas localidades tipo reportadas previamente por Parenti (1984), con el fin de tener una representatividad taxonómica de las especies descritas para el género *Orestias* en el lago Titicaca. Las artes de pesca utilizadas para las capturas de los organismos fueron redes multifilamento de diferentes aperturas de malla.

El reconocimiento taxonómico de los ejemplares colectados se llevó a cabo en las instalaciones prestadas por el PELT, mediante el uso de las claves taxonómicas de Parenti (1984). Las muestras para la extracción de ADN fueron obtenidas de trozos de aletas (pectorales o pélvicas), los cuales se preservaron en alcohol al 70%, y posteriormente la mayoría de los peces fueron devueltos al lago, en los casos en donde no fue posible su identificación cuando fue requerido con fines de la verificación taxonómica, se fijaron individuos de referencia en formol al 10% y se ingresaron a la colección ictiológica del Museo de Ciencias Naturales de Madrid, España (MNCN). En los casos cuando la obtención de peces fue en mercados o con pescadores de la zona éstos fueron fijados en Formol a 10%, e incorporados a la colección del MNCN.

Con el fin de corroborar la determinación taxonómica fueron solicitados los tipos de las especies del género *Orestias* al Museo de Historia Natural de Londres (Natural History Museum) 122 individuos la mayoría tipos para diferentes especies fueron proporcionados en 24 lotes en préstamo al Museo Nacional de Ciencias Naturales en Madrid, España (Tabla 2).

Tabla 2. Individuos solicitados en préstamo al Museo de Historia Natural de Londres

No. Individuos	Especie	Localidad	Descripción
7	<i>O. tschudii</i>	Bahía de Puno	
9	<i>O. agassii</i>		
1	<i>O. albus</i>	Lago Titicaca	
1	<i>O. albus</i>	Ojherani	
2	<i>O. crawfordi</i>	Bahía de Tamán	Sintipos
10	<i>O. crawfordi</i>	Ojherani	
5	<i>O. cuvieri</i>	Capachica, Bahía de Puno	
1	<i>O. gilsoni</i>	Taquiri	Lectotipo
8	<i>O. gilsoni</i>	Taquiri	Paralectotipos
1	<i>O. gilsoni</i>	Taquiri	Paralectotipo
1	<i>O. cf. incae</i>	Moho	Sintipo
10	<i>O. ispi</i>	Isla Taquile orilla Este	
1	<i>O. cf. puni</i>	Bahía de Puno	Sintipo
2	<i>O. cf. puni</i>	Bahía de Puno	Sintipos

9	<i>O. luteus</i>	Lago Titicaca	
1	<i>O. minimus</i>	Sucune	Paratipo
1	<i>O. minimus</i>	Molinopampa	Holotipo
1	<i>O. minutus</i>	Bahía de Urune	Sintipo
1	<i>O. mooni</i>	Bahía de Puno	Holotipo
2	<i>O. mooni</i>	Tamán	Paratipos
4	<i>O. mooni</i>	Bahía de Puno	Paratipos
4	<i>O. mulleri</i>		
1	<i>O. olivaceus</i>	Lago Umayo	Sintipo
2	<i>O. olivaceus</i>	Lago Umayo	
5	<i>O. pentlandi</i>	Bahía Puno	
2	<i>O. cf. robustus</i>	Ojherani	Paratipos
2	<i>O. rotundipinnis</i>	Lago Titicaca	
7	<i>O. taquiri</i>	Taquiri	Paratipos
1	<i>O. taquiri</i>	Taquiri	Paratipo
1	<i>O. taquiri</i>	Taquiri	Holotipo
3	<i>O. tutini</i>	Taquiri	Paratipos
1	<i>O. tutini</i>	Taquiri	Holotipo
4	<i>O. uruni</i>	Bahía de Urune	Paralectotipos
1	<i>O. uruni</i>	Bahía de Urune	Lectotipo

2.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES Y UN GEN NUCLEAR

Previo a la extracción del ADN, los tejidos fueron lavados con agua destilada para retirar restos de etanol. Para la extracción de ADN se utilizó el método estándar del fenol – cloroformo de Sambrook *et al.* (1989).

El ADN extraído fue almacenado a 4°C. Para los análisis de ADN se amplificaron vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki *et al.*, 1988) dos genes mitocondriales: el gen completo del Citocromo *b* (con un total de 1140 pb) y la región control D-LOOP (928 pb). También se amplificaron 759 pb del gen nuclear Rodopsina (Rho) (Tabla 3), el cual ha sido indentificado como relevante en especies que presentan patrones de coloración compleja.

La reacción de amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 1 µl de DNA, Buffer 10 X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0.2 mM, 0.2 mM de cada uno de los cebadores correspondientes para cada gen, Taq Polimerasa 0.06 U/µl (Promega) y H₂O para ajustar el volumen final.

Para obtener mayor resolución taxonómica dentro del género *Orestias* fueron amplificados dos genes Rodopsina (DNA nuclear) y Citocromo *b* (DNA mitocondrial) y de la región Control (D-LOOP DNA mitocondrial). Para el género *Trichomycterus* se llevo a cabo la amplificiación y secuenciación del gen *Cytb*. Las condiciones de amplificación para la mayoría de los cebadores fueron las siguientes: una temperatura inicial de 94° C (5 min.), 35 ciclos de 94° C (45 seg.), Tm° C (1 min.) y 72° C (90 seg.) y una extensión final a 72° C (10

min.) y 4° C ∞. Los productos de PCR fueron visualmente analizados en geles de agarosa al 1.5%, y los positivos fueron purificados con EXOSAP-IT PCR Product Clean – Up (Usb) o precipitados con etanol. Las secuencias fueron obtenidas utilizando el kit de secuenciación Big Dye Deoxy Terminator cycle (Applied Biosystems), cuyos cebadores específicos para cada gen se describen en la tabla 3. El secuenciador utilizado para todas las muestras fue Applied Biosystems 3700, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación (a) y secuenciación (s) de los genes: *Cytb*, Región Control y Rodopsina.

Gen	Cebadores	Secuencia (5´- 3´)	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
Rodopsina (Rho)	Rh193 (a, s) Rh1073r (a, s)	CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC CCR CAG CAC ARC GTG GTG ATC ATG	55	759	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
Región Control (D-LOOP)	LN20 (a, s) HN20 (a, s)	ACCACTAGCACCCAAAGCTA GTGTTATGCTTAGTTAAGC	50	928	(Suárez <i>et al.</i> , 2001)
Citocromo <i>b</i> (<i>Cytb</i>)*	Glu-F (a, s) Thr- R (a, s)	GAAGAACCACCGTTGTTATT CAA ACCTCCRATCTYCGGATTACA	48	1140	(Zardoya y Doadrio, 1998)

* Para el género *Trichomycterus* se llevó a cabo la secuenciación para el gen mitocondrial *Cytb*

2.3.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los cromatogramas fueron visualmente revisados y verificados y los alineamientos fueron llevados a cabo con el programa MEGA v4. La saturación de nucleótidos considerando los cambios de transiciones y transversiones fue revisada graficando el número de cambios absolutos para cada posición por codón contra las distancias patrísticas para todos los genes.

Las reconstrucciones filogenéticas fueron llevadas a cabo mediante Inferencia Bayesiana utilizando el programa Mr.Bayes versión 1. 3.01 (Huelsenbeck y

Ronquist, 2001). Se utilizó el Modeltest 3.07 con el fin de encontrar el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a la matriz de datos utilizando la Información del Criterio Bayesiano (Bayesian Information Criterion, BIC) (Posada y Crandall, 1998). Para el análisis bayesiano del “set” de datos combinado del género *Orestias* utilizando dos genes *Rho* y *Cytb* y la región control D-LOOP, se calculó el modelo evolutivo que mejor que se ajustaba para cada uno (*Cytb*, D-LOOP y *Rho*) utilizando el BIC (Tabla 4). Para llevar a cabo el análisis bayesiano dentro del género *Trichomycterus* el modelo elegido fue GTR+I+ Γ , sin particionar por codones.

Tabla 4. Parámetros de Likelihood y caracterización del conjunto de datos considerando el criterio de Parsimonia para cada codon para el gen *Cytb* y por fragmentos para el D-LOOP y Rodopsina en el análisis del género *Orestias*.

<i>Gen</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Modelo*</i>	<i>Gamma</i>	<i>SV</i>	<i>CPI</i>
<i>Cytb</i> 1ras	380	K80+G	0.3159	56	29
2das	380	K81uf	Igual	25	8
3ras	380	GTR+G	1.3009	136	137
D-LOOP	928	HKY+G	0.6015		
Rho	759	HKY+G	0.3125	28	9

SV= Sitios Variables y CPI = caracteres parsimoniosamente informativos.

*Modelo que mejor se ajustaba al “set” de datos utilizando el Criterio de Información Bayesiana (BIC) en el Modeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998).

Para la identificación de patrones en la variación genética se estimó una red de haplotipos del *Cytb*, D-LOOP y *Rho*. Se determinaron los distintos haplotipos con el programa DnaSP v4.20.2 y se estimó una red de distancias con el programa NetWork 4.5.

2.3.4. ANÁLISIS DE CLADOS ANIDADADO

Para probar la hipótesis de posibles patrones geográficos asociados a la diversidad genética observada, se llevó a cabo la inferencia de clados anidados

con soporte estadístico, estimando una red de haplotipos basada en el criterio de Parsimonia (P=95%). Este esquema permite identificar posibles asociaciones geográficas en los datos de variación haplotípica cuando la estructura resultante es proyectada geográficamente (Garrick *et al.*, 2008). Se utilizó el programa TCS para la estimación de los haplotipos y la agrupación de los clados anidados con base en la matriz del gen *Cytb*.

2.3.5. DATACIÓN DE LA CLADOGÉNESIS CON RELOJ MOLECULAR RELAJADO

Se propuso un esquema de reloj molecular relajado para inferir las fechas de separación de los diferentes clados en el árbol filogenético utilizando métodos coalescentes con la matriz de datos combinada. Este modelo fue preferido debido a que se ha mostrado que los modelos de reloj relajado no correlacionado son más adecuados que los relojes estrictos, al permitir que las tasas de mutación varíen entre los taxa dentro de ciertos parámetros (Drummond *et al.*, 2006). Un método de Inferencia Bayesiana de reloj molecular log-normal no correlacionado fue implementado en el programa BEAST v 1.5.1 (Drummond y Rambaut, 2007). Se utilizaron los diferentes modelos de evolución para cada partición (Tabla 4) con los parámetros correspondientes como priors y se permitió que las tasas de mutación fueran estimadas por el método de coalescencia. En el caso del *Cytb*, se determinó una tasa de mutación media de un 1% para las primeras posiciones, 0.8% para las segundas y 1.2% para las terceras posiciones (Zardoya y Doadrio, 1999), en un espacio muestral con distribución normal y determinados intervalos de varianza. Se corrieron 20 millones de simulaciones en Cadenas de Markov

Monte Carlo tras lo cual se observó la convergencia y el comportamiento de los parámetros estimados. La obtención de valores de Tamaño Efectivo de Muestra (ESS) superiores a 200 se consideró como mínimo para estimar que un parámetro estaba siendo muestreado adecuadamente. El programa Tracer v1.4.1 fue utilizado para resumir y visualizar el efecto de las simulaciones y el burning. De esta forma, en todos los casos fue observado que un burning de 10% de las generaciones era adecuado para estabilizar las estimas. El programa FigTree v.1.2.3 fue utilizado para la visualización del árbol resultante.

2.3.6. RELACIONES HAPLOTÍPICAS

Las redes de haplotipos a menudo son más adecuadas que los árboles filogenéticos para observar relaciones intraespecíficas o de especies muy cercanas porque el flujo génico puede dar lugar a estructuras reticuladas más que estructuras jerárquicas. Además, en una red de haplotipos los nodos internos tienen un sentido biológico más claro como haplotipos ancestrales persistentes hoy en día (Posada y Crandall, 2001). En el caso de genes mitocondriales, en los que por lo general la recombinación no toma lugar, la reticulación se interpreta como vías evolutivas alternativas originadas por señales filogenéticas contrastantes. El método de Median Joining (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999) se aplica particularmente en estos casos. El programa Network v4.5.1 (www.fluxus-engineering.com) se utilizó para inferir la solución más probable de la red median joining con las matrices de los genes Cytb, D-loop y Rodopsinas.

2.4. Resultados y Discusión

Durante las dos campañas, noviembre de 2008 y febrero de 2009, fueron colectados un total de 2,160 tejidos para llevar a cabo la reconstrucción filogenética de las especies de los géneros *Orestias* y *Trichomycterus* en el lago Titicaca.

2.4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *ORESTIAS*

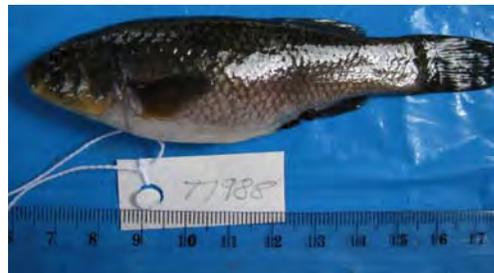
En la figura 9 se muestra la distribución de la frecuencia de los tejidos colectados por especie para el género *Orestias* (Figura 8, representantes de los complejos dentro del género *Orestias*). La identificación de estas especies está basada en las características morfológicas mediante la utilización de las claves y caracteres diagnósticos mencionados por Parenti (1984), así como su comparación con ejemplares de series tipo facilitados por el Museo Británico de Historia Natural (Tabla 2).

Algunas de las especies aceptadas por Parenti no fueron encontradas en estos dos campañas de muestreo, entre ellas están las siguientes: *Orestias olivaceus* Garman 1895, *O. tutini* Tchernavin, 1944, *O. minutus* Tchernavin, 1944, *O. tchernavini* Lauzanne, 1981, *O. tschudii* Castelnau, 1855 y *O. mooni* Tchernavin, 1944. En el presente estudio retomamos la propuesta de Parenti, (1984) de considerar *O. cf. puni* Tchernavin, 1944, *O. farfani* Parenti, 1984, *O. rotundipinnis* y *O. frontosus* como especies válidas para el lago Titicaca, con la finalidad de evaluar la correspondencia entre de la variación morfológica y filogenética.

En caso de especies conocidas a partir de un número muy limitado de ejemplares tipo, es posible que como ha sido mencionado por varios autores (Lauzanne, 1992; Müller, 1993), estas especies no representen grupos taxonómicos discretos. Tal es el caso de *O. minimus* y *O. minutus*, ambas especies han sido descritas a partir de dos ejemplares y no han vuelto a ser colectadas. En este estudio reportamos la presencia de *O. minimus*.



Complejo *cuvieri*
O. ispi



Complejo *agassii*
O. agassii



Complejo *gilsoni*
O. gilsoni



Complejo *agassii*
O. albus



Complejo *mulleri*
O. mulleri

Figura 8. Fotos de las especies representativas de los complejos reconocidos por Parenti (1984).

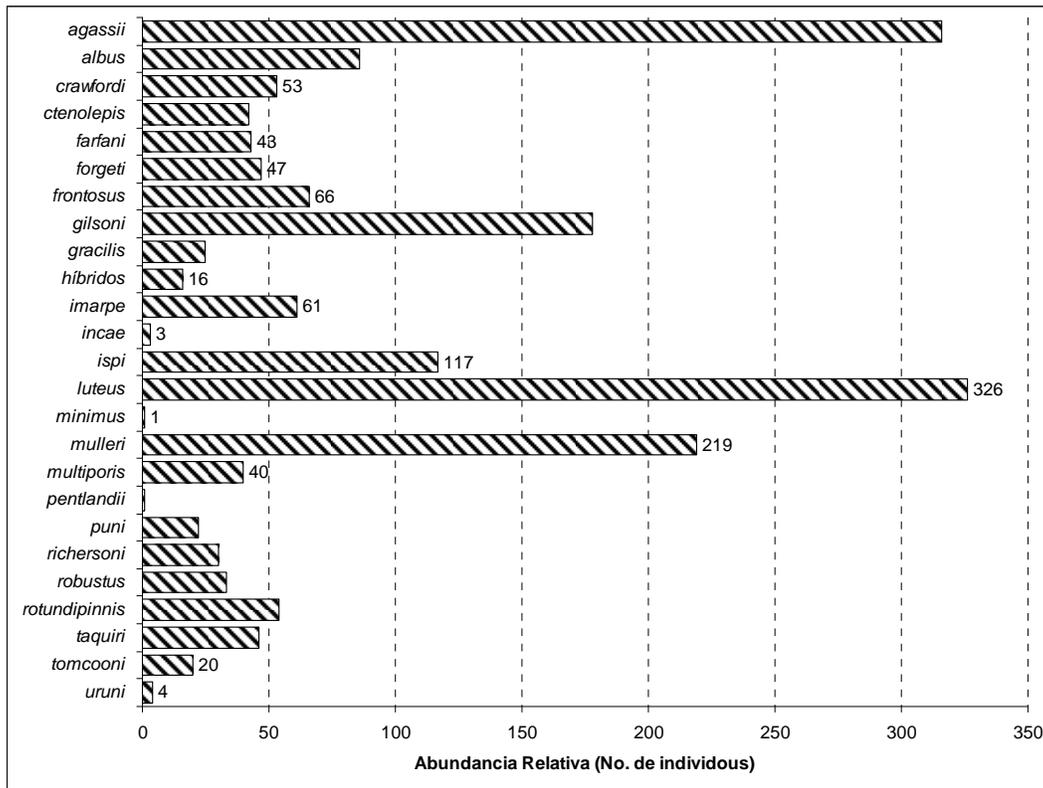


Figura 9. Distribución de la frecuencia de especies para las dos campañas de colecta, Noviembre 2008 y Febrero 2009.

Como se observa en el gráfico las especies con una mayor representación en la colección de tejidos llevada a cabo corresponden a cuatro: *O. agassii*, *O. gilsoni*, *O. luteus* y *O. mulleri*, las cuales también presentaron una mayor distribución y abundancia en el lago, junto con *O. ispi*. Estas cuatro especies alcanzan un 56% del total de tejidos colectados. En contraparte cinco especies fueron muy poco abundantes, registrando sólo un ejemplar en algunos casos (*O. minutus*, *O. pentlandii*).

2.4.1.1. Especies estudiadas del género *Orestias* en el lago Titicaca

Se llevó a cabo la determinación de los ejemplares con la utilización de las claves taxonómicas de Parenti (1984), a continuación se enumeran las especies encontradas en el lago, enumerando aquellos caracteres diagnósticos para cada especie Tabla 5.

En la tabla 5 se muestra tanto si las especies descritas para el lago fueron colectadas durante las dos campañas de colecta, así como si una vez con los análisis llevados a cabo, fue posible su recuperación como especie válida taxonómicamente, o si sería necesario llevar a cabo estudios particulares para cada caso.

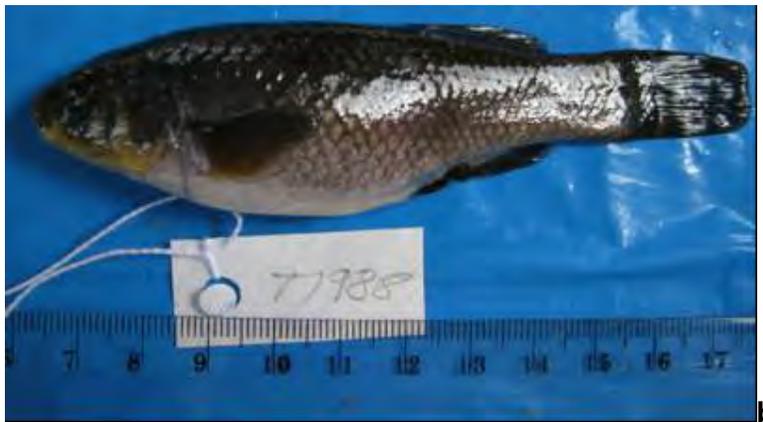
Tabla 5. Especies reconocidas en las principales revisiones y su comparación con la propuesta taxonómica derivada de este estudio

Especies descritas	Tchernavin, 1944	Parenti, 1984	Lauzanne, 1992	Colectada	Válida	Nombre propuesto
<i>O. cuvieri</i> Valenciennes, 1846	Sí	Sí	Sí	No	Sí	<i>O. cuvieri</i> Valenciennes, 1846
<i>O. pentlandii</i> Valenciennes, 1846	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. pentlandii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. ispi</i> Lauzanne, 1981	-	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. ispi</i> Lauzanne, 1981
<i>O. forgeti</i> Lauzane, 1981	-	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. forgeti</i> Lauzane, 1981
<i>O. gracilis</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	Sí	<i>O. gracilis</i> Parenti, 1984
<i>O. mulleri</i> Valenciennes, 1846	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Morfotipo generalista
<i>O. crawfordi</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	Sí	Si	<i>O. crawfordi</i> Tchernavin, 1944
<i>O. tutini</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	No	?	<i>O. tutini</i> Tchernavin, 1944
<i>O. incae</i> Garman, 1895	Sí	Sí	Sí	Sí	Si	<i>O. cf. incae</i> Garman, 1895
<i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944
<i>O. taquiri</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	Sí	No	<i>O. gilsoni</i> Tchernavin, 1944
<i>O. mooni</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	No	?	<i>O. mooni</i> Tchernavin, 1944
<i>O. uruni</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. uruni</i> Tchernavin, 1944
<i>O. minimus</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	Sí	Sí	No	<i>O. minutus</i> Tchernavin, 1944
<i>O. minutus</i> Tchernavin, 1944	Sí	Sí	No	No	?	<i>O. minutus</i> Tchernavin, 1944
<i>O. tchernavini</i> Lauzanne, 1981	-	Sí	Sí	No	?	<i>O. tchernavini</i> Lauzanne, 1981
<i>O. tomcooni</i> Parenti, 1984	-	Sí	Sí	Sí	Si	<i>O. tomcooni</i> Parenti, 1984
<i>O. imarpe</i> Parenti, 1984	-	Sí	Sí	Sí	No	Morfotipo generalista
<i>O. robustus</i> Parenti, 1984	-	Sí	Sí	Sí	No	Morfotipo generalista

Especies descritas	Tchernavin, 1944	Parenti, 1984	Lauzanne, 1992	Colectada	Válida	Nombre propuesto
<i>O. agassii</i> Valenciennes, 1846	-	Sí	Sí	Sí	Si	<i>O. aff. agassii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. frontosus</i> Cope, 1876	No	Sí	No	Sí	No	Posibles híbridos
<i>O. jussiei</i> Valenciennes, 1846	Sí	No	Sí	No	?	<i>O. jussiei</i> Valenciennes, 1846
<i>O. puni</i> Tchernavin, 1944	Sí (subespecie)	Sí	No	Sí	No	<i>O. aff. agassii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. tschudii</i> Castelnau, 1855	No	Sí	No	No	?	<i>O. tschudii</i> Castelnau, 1855
<i>O. ctenolepis</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	No	Caracteres de la descripción no válidos probablemente <i>O. aff. agassii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. richersoni</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	No	Caracteres de la descripción no válidos probablemente <i>O. aff. agassii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. multiporis</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	No	Caracteres de la descripción no válidos probablemente <i>O. aff. agassii</i> Valenciennes, 1846
<i>O. silustani</i> Allen, 1942	No	Sí	No	No	?	<i>O. silustani</i> Allen, 1942
<i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846
<i>O. rotundipinnis</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	No	Caracteres de la descripción no válidos probablemente <i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846
<i>O. farfani</i> Parenti, 1984	-	Sí	No	Sí	No	Caracteres de la descripción no válidos probablemente <i>O. luteus</i> Valenciennes, 1846
<i>O. albus</i> Valenciennes, 1846	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>O. albus</i> Valenciennes, 1846
<i>O. olivaceus</i> Garman, 1895	Sí	Sí	Sí	No	?	<i>O. olivaceus</i> Garman, 1895

aff = Una especie muy relacionada a la descrita pero que muestra caracteres que son de una entidad distinta. *cf* = El espécimen se asemeja muy cercanamente a los tipos pero carece de alguno o algunos de los caracteres de los especímenes tipo.

***Orestias aff. agassii* Valenciennes 1846**



Orestias aff. agassii, a) Sintipo MCZ 27698 Puno, lago Umayo Garman, S. Determinó: L. Parenti, 1981. b) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto.

Según Parenti 1984 esta especie es una de las más ampliamente distribuidas del género *Orestias*, la cual se encuentra en Urubamaba, la cuenca del Titicaca y el región norte de Chile. La diversidad morfológica en tal intervalo de distribución es muy amplia y es posible que dentro de esta especie se encuentren incluidas más unidades taxonómicas del complejo aún por reconocer. A espera de un estudio que integre la variación morfológica de *O. agassii* en conjunto, por ahora parece razonable concluir que las formas del grupo *agassii* encontradas en el lago son similares pero con rasgos no

necesariamente conferibles a *O. agassii*. Es por esto que se adopta el término *Orestias aff. agassii*.

En el presente estudio *O. aff. agassii* fue una de las especies con distribución más amplia en el lago, además de ser una de las más abundantes. Si bien es cierto que *O. agassii* fue descrita para una localidad fuera del lago, la especie que puede ser colectada en el lago presenta muchos caracteres que coinciden con los de ésta, si bien hay que considerar que presenta una plasticidad que no está incluida en su descripción. Lauzanne (1982), determinó que las especies *O. tschudii* Castelnau, 1855 y *O. pequeni* Tchernavin, 1944 son parte de la plasticidad fenotípica de *O. agassii*, dentro del lago. De forma similar, en este estudio consideramos que otras especies del grupo *agassii* como *O. ctenolepis*, *O. frontosus*, *O. multiporis*, *O. puni* y *O. richersoni* bien pueden estar incluidas en la plasticidad fenotípica de la especie, en todo caso se requiere llevar a cabo una revisión taxonómica que redefina los intervalos de variación de la especie.

***Orestias albus* (Valenciennes 1846)**



Orestias albus a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Tilali, lago mayor. b) Radiografía BMNH 19446651.

La especie *O. albus* se distingue del resto por presentar tres autopomorfías: una mandíbula inferior robusta, una cabeza relativamente larga que alcanza cerca del 40% de la longitud estándar y una forma corporal única caracterizada por un perfil dorsal del cuerpo sin una transición abrupta de la parte anterior de la aleta dorsal a la base de la caudal. Esta especie ha sido generalmente reconocida como válida, aunque en este trabajo no se recupera como grupo monofilético y la forma *O. albus* se observa en diferentes linajes del Clado I (Figura 11).

Parte de la singularidad de esta especie puede estar relacionada con la ecología trófica de la misma, siendo previamente reportado un cierto grado de diferenciación de la dieta para la especie (Maldonado *et al.*, 2009).

***Orestias crawfordi* Tchernavin 1944**

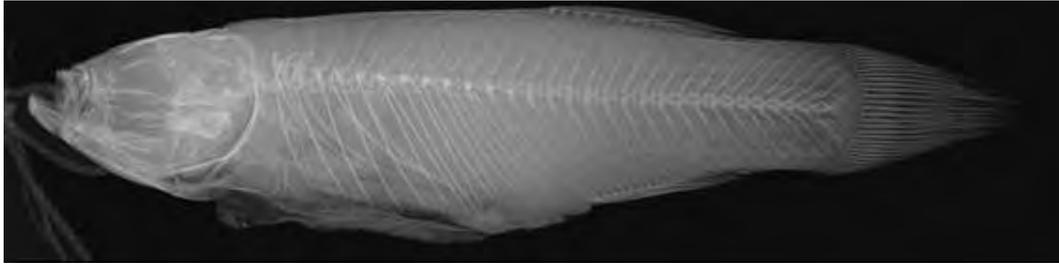


Orestias cf. crawfordi a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto T1749. b) Radiografía del sintipo BMNH 19446651.

Las características más distintivas de esta especie son un cuerpo alto, lateralmente comprimido y dentro del complejo *mulleri* esta completamente escamada, además de manera similar a *O. cf. incae* presenta un elevado número de radios en la aleta dorsal (15-18), con un pedúnculo caudal ancho y dientes faringeos molariformes. Con cúspides redondeadas, y con cuatro huesos epibranchiales con una fuerte proyección posterior y asociado un abductor VI largo.

De manera similar a la especie *O. albus*, *O. crawfordi* no fue recuperada como monofilética en el Clado I (Figura 10).

***Orestias ctenolepis* Parenti, 1984**

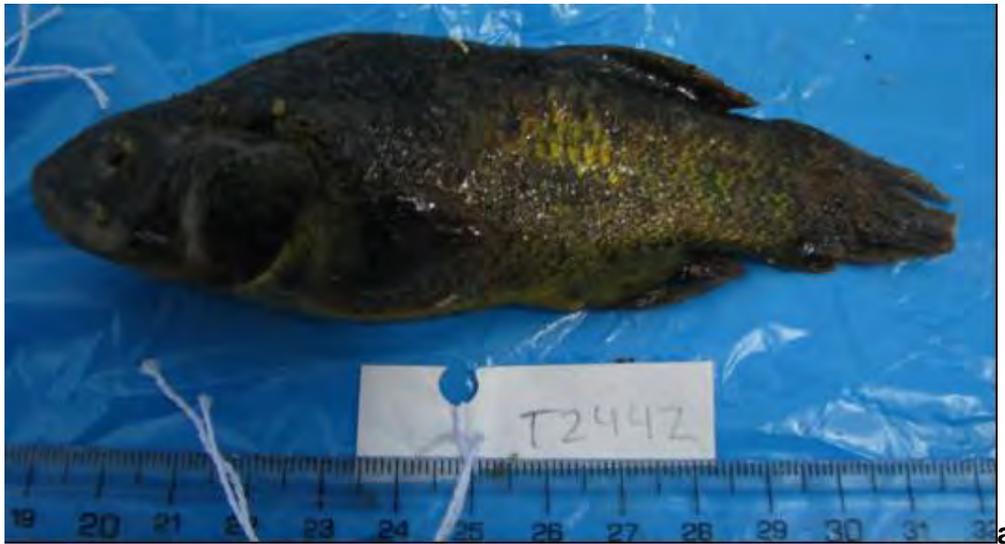


Orestias ctenolepis. Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto T1637.

Es una de las especies más delgadas del complejo *agassii*, en la cual los machos presentan un extremado número de cteni en las escamas (10 cteni por escama) para la mayor parte del cuerpo, incluyendo la superficie dorsal de la cabeza y el eje medio dorsal, solamente las escamas inmediatamente posteriores a la base y media de la aleta pectoral son estrictamente cicloides y no se ha observado que presenten cteni. Todas las aletas, en ambos hembras y machos, son delicadas y no están cubiertas por una membrana gruesa. Los márgenes de la mandíbula inferior están cubiertos por delicadas papilas.

La especie fue descrita para el río Zapatilla en Perú, y no ha sido reconocida como válida por algunos autores (Lauzanne, 1992). En el presente estudio la especie no fue recuperada como monofilética y en cambio fueron encontrados diferentes linajes para morfotipos del complejo *agassii* en simpatria para el río Zapatilla.

***Orestias farfani* Parenti, 1984**



Orestias farfani a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto T2442. b) Radiografía del mismo ejemplar.

O. farfani ha sido una especie cuestionada por algunos autores (Lauzanne, 1992; Müller, 1993) debido a su gran similitud con *O. luteus* y *O. rotundipinnis*, la cual se distingue de estas dos especies por presentar un perfil ventral recto y por lo tanto el cuerpo no es tan alto como en *O. luteus*, *O. albus* y *O. rotundipinnis*.

En el presente estudio la especie no fue recuperada como monofilética en el Clado I (Figura 11).

***Orestias forgeti* Lauzane, 1981**



Orestias forgeti a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto T2158. b) Radiografía del mismo ejemplar.

La especie *O. forgeti* está incluida en el complejo *cuvieri* y es una de las especies más pequeñas, junto con *O. ispi*. Como es característico en el complejo presenta un patrón de escamación irregular en el delgado vientre. Se distingue del resto de las especies del complejo por unas largas aletas pectorales con un incrementado número en los radios de las aletas pectorales 19, con un intervalo entre 18 y 20 mientras que el resto de las especies presentan una moda de 17 y un intervalo de 15 a 20.

Esta especie en conjunto con el resto del complejo *cuvieri* fueron recuperadas en la topología obtenida dentro del Clado I (Figura 11), siendo todas monofiléticas; *O. ispi*, *O. pentlandi* y *O. forgeti*.

***Orestias frontosus* Cope, 1876**

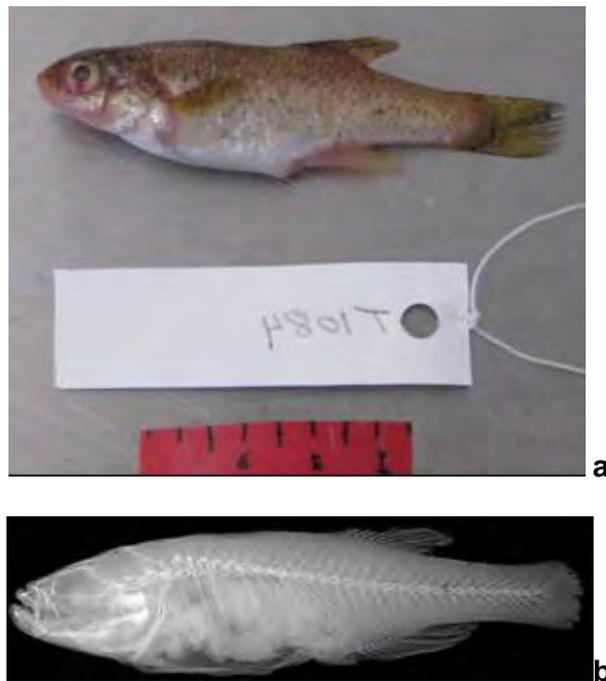


Orestias frontosus a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto T961. b) Radiografía del mismo ejemplar.

La especie *O. frontosus* esta incluida en el complejo *agassii* y morfológicamente esta relacionada con *O. tschudii* y *O. cf richersoni* pero difiere de estas dos especies por presentar una cabeza muy redondeada y un hocico muy abrupto.

En el presente estudio la especie *O. frontosus* no fue recuperada como monofilética dentro del Clado II (Figura 11). En adición la mayoría de los ejemplares analizados que presentaron este morfotipo eran de naturaleza híbrida entre el Clado I y II.

Orestias gilsoni Tchernavin 1944

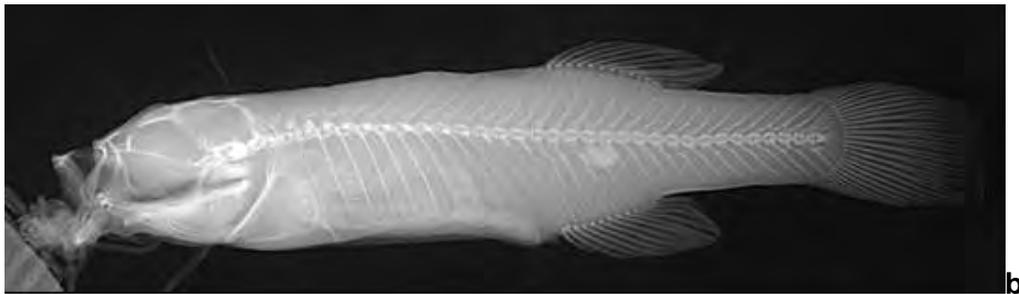


Orestias gilsoni a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Titihue, Huancané T1084. b) Radiografía del ejemplar T1084.

La especie *O. gilsoni* esta comprendida en el complejo que lleva su nombre, y *O. taquiri* es la especie más cercana. Esta especie se distingue del resto de las especies del complejo por una ancha cabeza que alcanza cerca del 23% de la longitud estándar y la cual esta aplanada dorsalmente. Otra de las características distintivas del grupo es su pedúnculo caudal estrecho, el cual no alcanza 10% de la longitud estándar.

La especie *O. gilsoni* fue una de las más abundantes en el lago Titicaca y también una de las más ampliamente distribuida. En el presente estudio la especie no fue recuperada como monofilética, ni tampoco las especies que comprenden el complejo (Clado I, Figura 11).

***Orestias gracilis* Parenti, 1984**



Orestias gracilis a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Inca Chaka, Copacabana T1431. b) Radiografía del ejemplar T1431.

Orestias gracilis es una de las especies más delgadas del complejo *mulleri*, con la base de las aletas dorsal y anal proyectadas ligeramente por encima del perfil primario corporal. Con melanóforos dispersos siendo más abundantes en la superficie dorsal. Las aletas van de relativamente transparentes a ligeramente moteadas. Las aletas pectorales son pequeñas en su base, con radios alargados. Además presenta un número modal de radios de las aletas pectorales menor 15, con un rango entre 14 a 15, a diferencia de una moda de 19 para otras especies del complejo *mulleri*.

En el presente estudio la especie es considerada como válida, aún así es necesario llevar a cabo una revisión de la misma, dado que se incluye dentro del complejo *cuvieri* en el análisis filogenético.

***Orestias imarpe* Parenti, 1984**



Orestias imarpe a) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Chucuito, Sector Barco T517. b) Radiografía del ejemplar T517.

Orestias imarpe es una de las especies más robustas del complejo *gilsoni*, la cual se distingue del resto de especies por presentar labios gruesos y carnosos, con una aleta dorsal pequeña con 11 radios de moda y con un intervalo de 10 a 14. Con las órbitas oculares grandes y proyectadas por encima del perfil dorsal primario de la cabeza extendiéndose más que para las especies *O. cf. robustus*, *O. tchernavini*, y *O. uruni*.

Orestias cf. incae Garman 1895





Orestias cf. incae a) Sintipo MCZ 3948 Bahía de Moho, lago Titicaca Garman, S. Determinó: L. Parenti, 1981. b) Radiografía del ejemplar MCZ 3948. c) Ejemplar BMNH 19397172. d) Radiografía, BMNH 19397172.

O. cf. incae es miembro del complejo *mulleri*, porque las aletas dorsal y anal están ligeramente proyectadas del perfil primario corporal, la especie *O. crawfordi* es la especie más cercana morfológicamente, de la cual se distingue por la presencia de dos caracteres derivados: el primero es la especie más comprimida lateralmente, con la superficie ventral casi en forma de quilla en los adultos. Además es una especie con dimorfismo sexual, ya que los machos adultos presentan de cuatro a cinco barras verticales medias de color marrón oscuro, en un fondo marrón claro, las cuales en las hembras son apenas perceptibles.

En la reconstrucción filogenética no fue posible recuperar a esta especie en la topología como monofilética (Clado I, Figura 11).

***Orestias ispi* Lauzanne 1981**



Orestias ispi a) Ejemplar BMNH 1982.12.6.51 de la localidad de Isla Taquile, lago Titicaca. b) Radiografía del ejemplar BMNH 1982.12.6.51. c) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Estrecho de Tiquina, Camacati T2163. d) Radiografía del ejemplar T2163.

Orestias ispi junto con *O. forgeti* corresponden a las dos especies más pequeñas dentro del complejo *cuvieri*. Esta especie se distingue del resto del complejo por presentar un patrón de escamación complejo, con escamas muy pequeñas y delgadas. Un carácter diagnóstico más es su mandíbula inferior a 90° del eje principal del cuerpo.

***Orestias luteus* Valenciennes 1846**

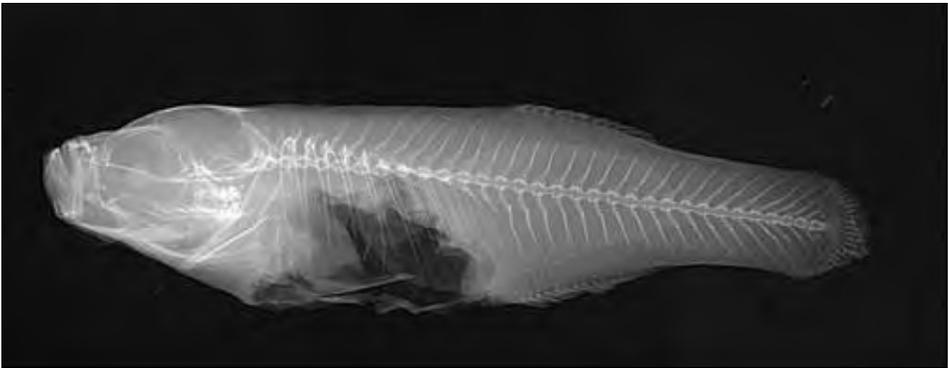


Orestias luteus a) BMNH, lago Titicaca. b) ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto. c) Radiografía, BMNH 194466425.

Orestias luteus fue incluido por Parenti (1984) en el complejo *agassii*, cuya especie más cercana morfológicamente y difiere de esta en que los radios medios de las aletas pectorales están alargados. Se define principalmente porque el ancho de la cabeza alcanza un 40% de la longitud estándar, y de manera similar el largo de la cabeza alcanza un 40% de la longitud estándar.

En el presente estudio *O. luteus* no pudo ser recuperada como del complejo *agassii*, sino en un linaje independiente, más cercano a las especies de los complejos *mulleri*, *gilsoni* y *cuvieri* (Clado I, Figura 11).

Orestias minimus Tchernavin 1944





d



e



f



g

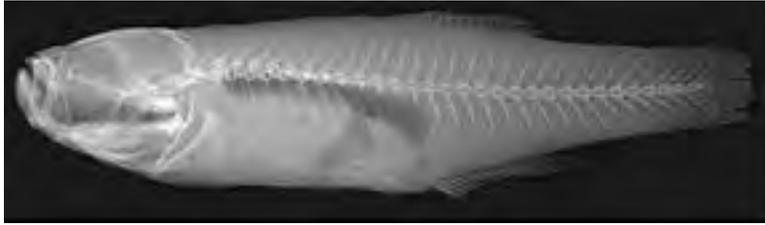
Orestias minimus a) Holotipo BMNH 1944.6.6.532 de la localidad Molinopampa. b) Radiografía del Holotipo BMNH 1944.6.6.532 de la localidad Molinopampa. c) Sintipo de la localidad de Urune BMNH 1944.6.6.159, lago Titicaca. d) Radiografía del Sintipo de la localidad de Urune BMNH 1944.6.6.159. e) Radiografía del ejemplar Paratipo BMNH 194466533 de la localidad de Sucuné. f) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Sucuné T1851, lago Titicaca. g). Radiografía del ejemplar T1851.

O. minimus es una de las especies más diminutas del complejo *gilsoni*, conocida sólo por dos ejemplares de 23 y 28 mm de longitud estándar. La especie con la que está más relacionada morfológicamente es *O. minutus*, sin

embargo Tchernavin 1944 propone que tanto *O. minutus* como *O. minimus* sean incluidas en la misma especie. Por otro lado hemos observado que tanto para el holotipo BMNH 1944.6.6.532 como el sintipo BMNH 1944.6.6.159 se pueden observar rastros de presencia de escamas, una aseveración similar ya se había hecho en una revisión relativamente reciente (Müller 1993) Por lo tanto siendo esta una de las diferencias con *O. minutus* posiblemente sea necesario llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la validez de la especie *O. minutus* y también de las características diagnósticas de *O. minimus*.

El ejemplar que hemos colectado coincide con todas las características diagnósticas para la especie sin embargo uno de los caracteres que no se cumplía era que nuestro individuo sí que presentaba escamas, aún así es evidente que presenta una considerable reducción en la escamación siendo mucho más escasa para esta especie. Otra de las características que sirve para diferenciar entre las dos especies es el número de vértebras, siendo 30 para *O. minimus* y 31 en *O. minutus*.

***Orestias minutus* Tchernavin 1944**



Orestias minutus. Radiografía, Sintipo BMNH 194466159. Bahía de Uruni, lago Titicaca.

A pesar del esfuerzo de colecta no fue posible obtener ejemplares de *O. minutus*. Esta especie está incluida en el complejo *gilsoni* y sólo se conocen dos ejemplares para la misma, dos hembras adultas de 24 a 28 mm de longitud estándar, entre las diferencias mencionadas previamente otra de las características que la distinguen de su especie más cercana (*O. minimus*) es el incremento en el número de radios de la aleta anal de 16 a 17, mientras que para *O. minimus* que van de los 14 a 15. Sin embargo como se ha mencionado previamente parte de las características aquí propuestas como diagnósticas deben tomarse con cautela debido al escaso número de ejemplares colectados para la especie y aún más porque el carácter de la escamación (ausentes en *O. minimus*) no ha sido posible verificarla porque al menos para el holotipo y el sintipo de *O. minimus* existen evidencias que contradicen este carácter.

***Orestias mooni* Tchernavin 1944**



Orestias mooni. Radiografía, Paratipo BMNH 194466504. Bahía de Uruni, lago Titicaca.

Esta especie está caracterizada por estar completamente escamada, está incluida en el complejo *gilsoni* cuya especie más cercana es *O. tomcooni*, presenta una mandíbula en 90° con respecto al eje corporal. Además de la escamación es distinguible por presentar un incremento en el número de vértebras de 32 a 33, con un intervalo observado entre los 32 a 34, en contraparte de 31 vértebras para *O. tomcooni*.

En el presente estudio no fue posible coleccionar individuos que correspondieran con esta especie.

***Orestias mulleri* Valenciennes 1846**



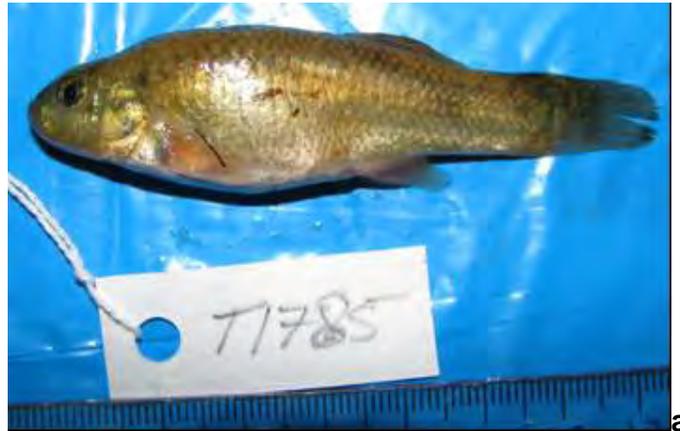
Orestias mulleri a) BMNH 1862111532, lago Titicaca. b) Radiografía, BMNH 1862111532. c) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en Puerto Acosta, lago Mayor T2401.

O. mulleri es la especie más larga dentro del complejo *mulleri*, alcanzando 92mm de longitud estándar, está completamente escamado, con un patrón de escamación irregular cubriendo el vientre. Se distingue del resto de especies del complejo, debido a que está comprimido lateralmente, además tiene un incremento en el número de escamas en una serie lateral de 36, con un

intervalo de 33 a 38, mientras que para el resto de las especies dentro del complejo presentan una moda de 31 a 32 con un intervalo de 30 a 36. Así mismo presenta un decremento en la moda del número de radios de la aleta anal siendo de 13, con un intervalo de 12 a 15, opuesto a los 15 para el resto de especies del complejo, con un intervalo de 13 a 18.

En el presente estudio los ejemplares identificados como *O. mulleri* no pudieron ser recuperados como monofiléticos en la topología (Clado I, Figura 11).

***Orestias multiporis* Parenti, 1984**



Orestias multiporis. a) espécimen colectado en el río Lampa T1785. b) Radiografía del mismo individuo.

O. multiporis representa una especie robusta del complejo *agassii*, con labios gruesos y carnosos, órbitas cercanas a la superficie dorsal de la cabeza y el perfil dorsal presenta una sutil pendiente desde la punta del hocico hasta la base anterior de la aleta dorsal. Se distingue del resto de especies de *Orestias* por su patrón único de neuromastos, el cual está caracterizado por series de dos o más neuromastos agrupados en las escamas de la línea lateral y de la parte media de la cresta dorsal.

***Orestias olivaceus* Garman 1895**

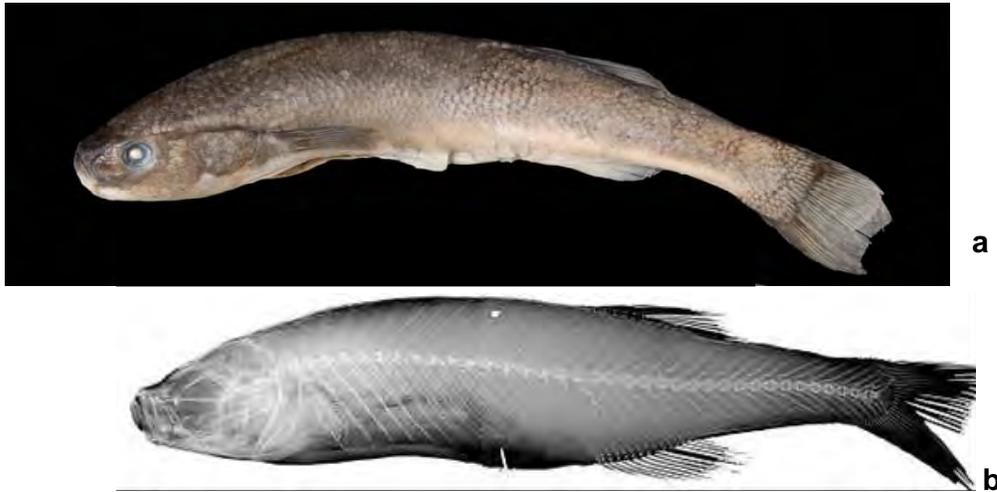


Orestias olivaceus. a) Sintipo MCZ 3946, determinado por: L. Parenti, 1981. b) Radiografía de Sintipo BMNH 19397171.

O. olivaceus pertenece al grupo *luteus*. Se distingue del resto de especies por que sus órbitas están claramente orientadas dorso-lateralmente, de modo que desde la vista dorsal las dos son completamente visibles.

En el presente estudio no fueron colectados ejemplares que coincidieran con las características de esta especie.

***Orestias pentlandii* Valenciennes 1839**

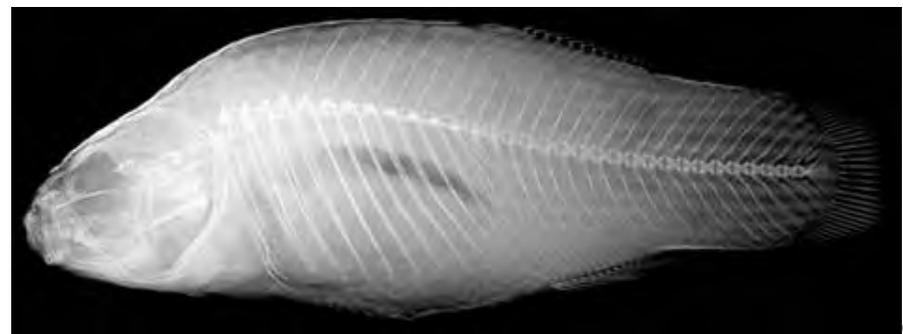


Orestias pentlandii. a) Individuo colectado en Laguna Saracocha (T1578). b) Radiografía de BMNH 19397171. Cuenca de Puno, lago Titicaca. Determinó: L. Parenti, 1981. b) Radiografía, BMNH 19397171.

O. pentlandii esta incluida en el complejo *cuvieri* y se caracteriza por estar completamente escamado. La especie más cercana morfológicamente es *O. ispi*, y como este último, *O. pentlandii* presentan un cabeza pequeña y cónica sin una fila de dientes externos en la mandíbula inferior en los adultos. Una de las características distintivas de esta especie es su gran tamaño siendo una de las más grandes dentro del género *Orestias* alcanzando hasta 200 mm de longitud estándar. Presenta mayor número de vértebras en el género con una moda de 37 con un rango observado de 36 a 38, así mismo presenta el número más elevado de escamas en una serie lateral, con un número modal de 57 y con un intervalo observado entre 51 a 60.

En el presente trabajo se pudo recuperar *O. pentlandii* como monofilética dentro del complejo *cuvieri* (Clado I, Figura 11). Así mismo se pudo comprobar genéticamente la existencia de un híbrido entre *O. pentlandii* y *O. aff. agassii*, el cual además tiene un fenotipo intermedio entre ambas especies (ver apartado de híbridos).

***Orestias cf. puni* Tchernavin 1944**



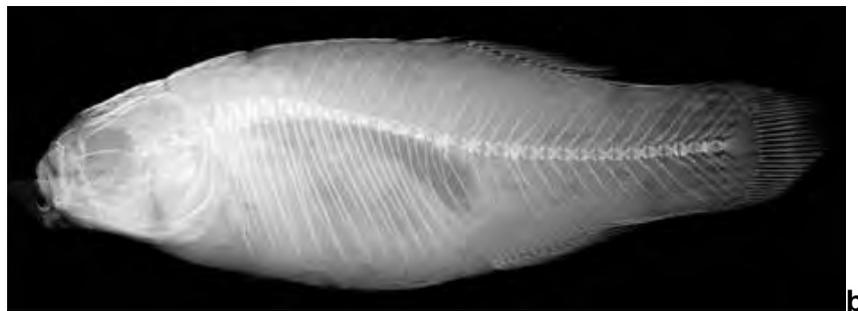
Orestias cf. puni a) Paratipo *O. jussiei puni* BMNH 194466179, Bahía de Puno, lago Titicaca. b) Radiografía, BMNH 194466179. c) Radiografía de ejemplar colectado en este proyecto T1033.

O. puni fue en un principio descrita como una subespecie de *O. jussiei*, sin embargo debido a que *O. jussiei* fue originalmente descrita para una localidad distinta del lago, Parenti (Parenti, 1984), determina que esta (*O. puni*) es una

especie válida para el lago. Las principales características de la especie es que presenta un pedúnculo caudal ancho alcanzando un 22% de la longitud estándar, solamente *O. luteus* presenta un pedúnculo caudal tan ancho. Tchernavin 1944, incluye la subespecie *O. jussiei puni* en *O. jussiei* Valenciennes, 1846, en la revisión de Parenti (1984), *O. puni* se eleva a la categoría de especie válida para el lago y deja a *O. jussiei* como especie válida fuera del lago. Finalmente Lauzane (1992), no reconce la validez de *O. puni* como una especie y propone que sea incluida dentro de *O. jussiei*.

Aunque para el presente estudio hemos colectado individuos que han sido asociados con este morfotipo (*O. cf. puni*), la especie no fue ser recuperada como monofilética en la topología obtenida dentro del Clado II (Figura 11), por lo que no podemos considerarla como válida. En cuanto a la discusión taxonómica de la especie no podemos descartar ni apoyar la inclusión de *O. puni* en *O. jussiei* debido a que no contamos con ejemplares tipo de *O. jussiei*, aún así consideramos que *O. cf. puni* puede estar incluida en la variación fenotípica de *O. aff. agassii*.

***Orestias cf. richersoni* Parenti 1984**



Orestias cf. richersoni. a) Individuo de Huatajata, lago Titicaca T1393. b) Radiografía del espécimen T1393.

Esta especie se caracteriza del resto de las del complejo *agassii*, por un patrón de pigmentación único, el cual presenta una mancha oscura en la base de la aleta pectoral, además de una coloración azabache en el margen dorsal del opérculo y en el margen de la mandíbula. Por último presenta una banda oscura en la base de los radios de las aletas pectorales que se extiende dorsalmente en el escudo lateral de escamas.

Debido a que la principal distinción de esta especie corresponde con patrones de coloración y estos pueden estar afectados por diversos factores, hemos reconocido ejemplares de esta especie, sin embargo tomamos con cautela esta identificación ya que no ha sido posible recuperarla en la topología obtenida.

Orestias cf. robustus Parenti, 1984



a



b



c

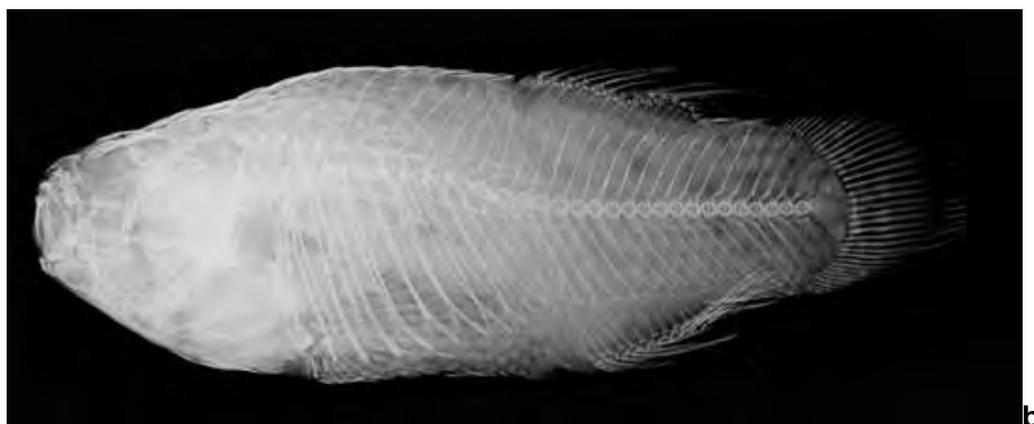


d

Orestias cf. robustus a) Paratipo de Ojherani, lago Titicaca. BMNH 1982.12.6.122 b) Radiografía del mismo espécimen. c) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Sucuni, T1857. d) Radiografía del ejemplar T1857.

Esta es una de las especies más robustas del género *Orestias*, el ancho de la cabeza corresponde a un 23% de la longitud estándar, y la forma del cuerpo esta caracterizada por un gentil incremento en el perfil dorsal desde la punta del hocico a la base de la aleta dorsal; así como un gentil incremento convexo del perfil ventral desde la punta de la mandíbula inferior a la base de la aleta anal. Esta especie no se recupera en la topología obtenida en el presente estudio.

Orestias rotundipinnis Parenti, 1984



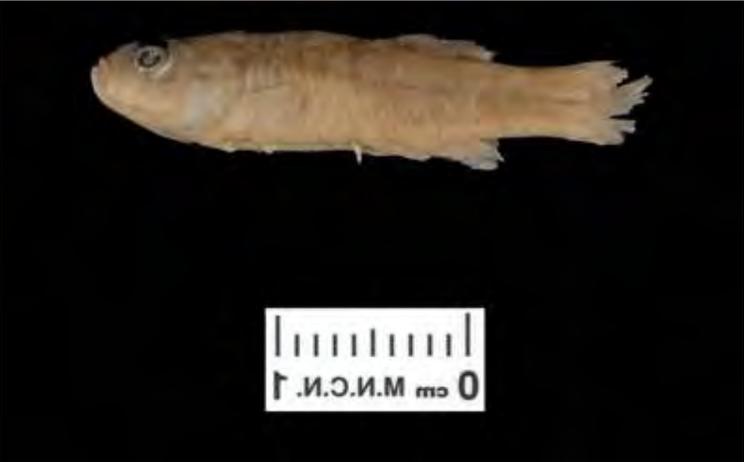
Orestias rotundipinnis a) Ejemplar del lago Titicaca. BMNH 1944.6.6.434. b) Radiografía del espécimen BMNH 1944.6.6.434. c) Radiografía del ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Kella Ahuyo Huancané T753.

La especie *Orestias rotundipinnis* ha sido cuestionada previamente (Lauzanne, 1992) debido a que es una especie fuertemente relacionada con *Orestias luteus* pero difiere de esta por presentar unas aletas pectorales redondeadas, en lugar de tener los radios medios alargados.

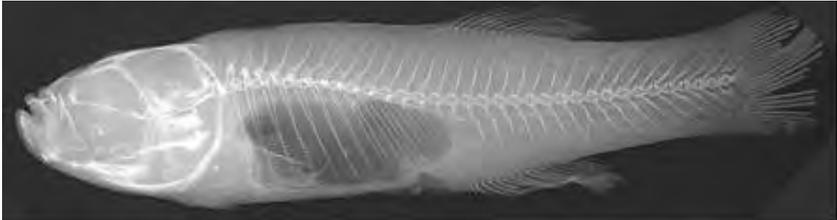
Orestias taquiri Tchernavin, 1944



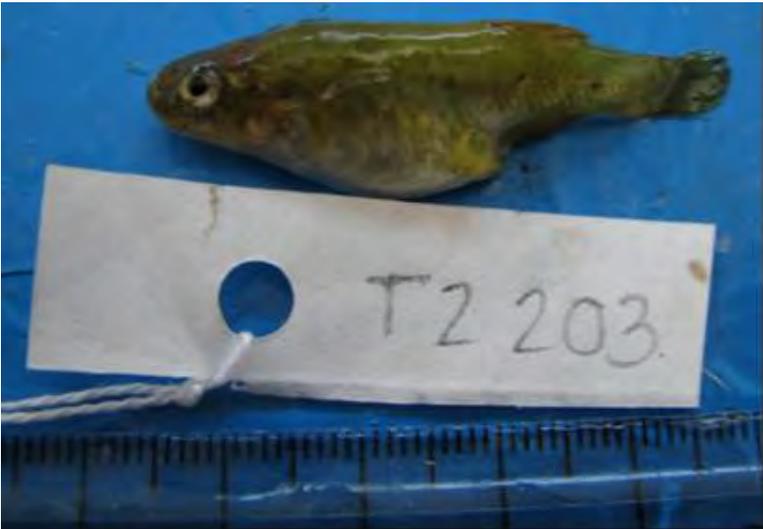
a



b



c



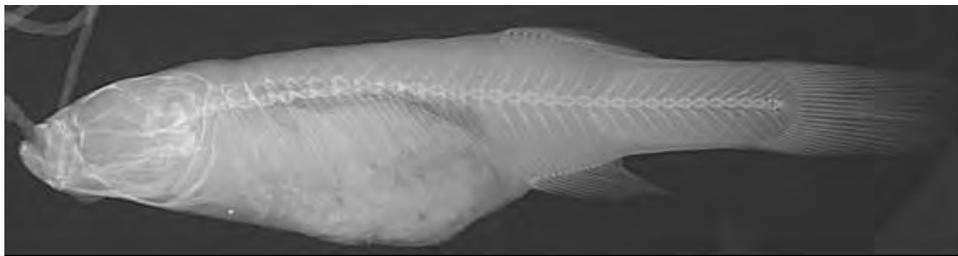
d



Orestias taquiri a) Holotipo BMNH 1944.6.6.534 de la Localidad de Taquiri lago Pequeño, b) Paratipo BMNH 1944.6.6.536 de la Localidad Taquiri, lago Pequeño lago Titicaca. c) Radiografía del paratipo BMNH 1944.6.6.536. d) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Isla Taquire T2203. e) Radiografía del ejemplar T2203.

Una especie cercana a *O. gilsoni*, con quien comparte un incremento en el número de radios de las aletas pectorales a 17 ó 18 y un patrón de coloración de plateado con de seis a nueve bandas irregulares. Se diferencia de *O. gilsoni* por una reducción en el número modal de radios de la aleta dorsal a 12 (de 11-14) y una reducción en el número modal de vértebras a 30 (de 30 a 31). Esta especie fue colectada en el presente trabajo y en muchas ocasiones en las mismas localidades que *O. gilsoni*. Esta especie no se recupera como grupo monofilético en el análisis filogenético.

***Orestias tomcooni* Parenti, 1984**



Orestias tomcooni confer. a) Individuo de Inca-Chaca, Copacabana, lago Titicaca T1937. b) Radiografía del espécimen T1937.

Orestias tomcooni es una especie alargada del complejo *gilsoni*, identificable por una forma corporal característica al tener una cabeza relativamente alta y estrecha así como una transición abrupta entre la parte anterior del cuerpo y el pedúnculo caudal. En este proyecto se pudieron identificar algunos individuos de la especie, pero en este trabajo no ha sido posible recuperarla como grupo monofilético. Ya Lauzanne propone su relación con *O. gilsoni*, al igual que algunas otras especies del complejo, al considerarla parte de la variación existente en la especie, lo cual requiere de un estudio de caracterización morfológica adecuado.

***Orestias tschudii* Castelnau, 1855**



a



b

Orestias tschudii. a) Individuo BMNH 1844.6.6.162 de Puno, lago Titicaca. b) Radiografía del espécimen BMNH 1844.6.6.162.

Se trata de una especie del complejo *agassii* característica por poseer escamas de gran tamaño y gruesas. Los caracteres diagnósticos son: un incremento en el número modal de radios de la aleta pectoral (17) y de vértebras (34). En el presente proyecto esta especie no fue encontrada para el lago, pero la variación morfológica observada en el grupo de *O. aff agassii*, hace pensar que es muy posible que especies como ésta puedan en realidad corresponder a variaciones individuales de un mismo linaje evolutivo.

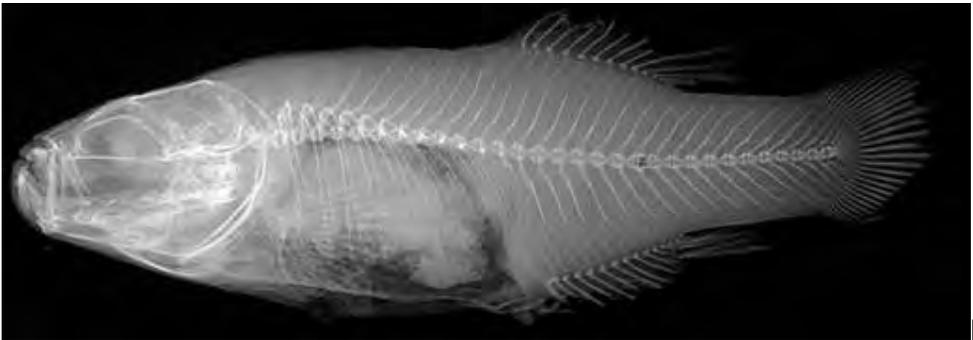
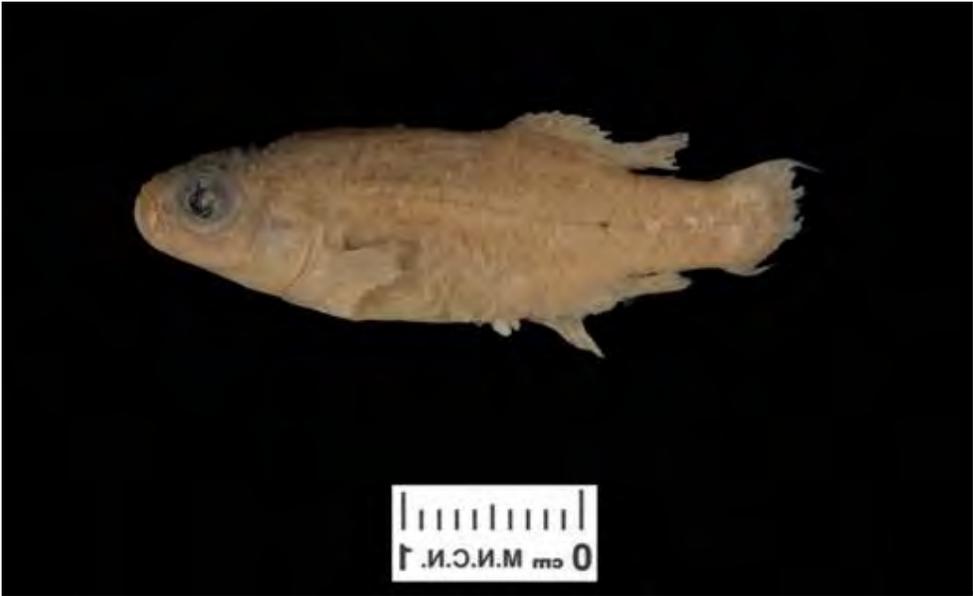
***Orestias tutini* Tchernavin, 1944**

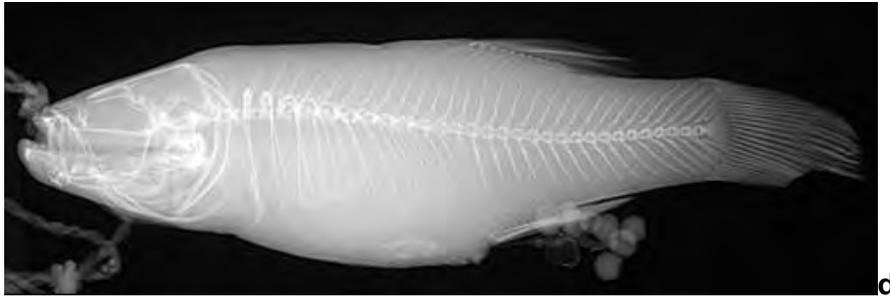


Orestias tutini. a) Holotipo BMNH 1944.6.6.544 Taquiri, lago Pequeño, lago Titicaca. b) Radiografía del espécimen BMNH 1944.6.6.544.

Se trata de la especie más pequeña del complejo *gilsoni* distinguible porque la superficie dorsal de la cabeza de los machos está cubierta por proyecciones con forma de tubérculos que cubren los ctenii, así como por carecer de escamas en la base de las aletas pectoral, dorsal y anal y a lo largo de la cresta dorsal. La validez de la especie es controversial al basarse en una serie de cuatro tipos parcialmente descamados y en un muy pobre estado de conservación. Müller (1993) argumenta que los tubérculos observados son en realidad un artificio de la preservación. En el presente trabajo ésta especie no ha sido encontrada a pesar de haber intentado su obtención en la localidad tipo.

O. uruni Tchernavin, 1944





Orestias uruni a) Lectotipo BMNH 1944.6.6.174 de la Localidad de Uruni, lago Titicaca b) Radiografía del Lectotipo BMNH 1944.6.6.174. d) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Tamán T1729. e) Radiografía del ejemplar T1729. e) Ejemplar colectado en las campañas de muestreo de este proyecto en la localidad de Bahía de Uruni T1740. f) Radiografía del ejemplar T1740.

O. uruni es una de las especies relativamente robustas dentro de complejo *gilsoni*, la cual presenta un patrón de coloración jaspeado y se distingue del resto de especies del complejo debido a que la base de la aleta pectoral prácticamente se encuentra con el margen posterior del opérculo.

2.4.1.2. Análisis filogenético del género *Orestias* basado en la secuencia del *Cytb*

La secuencia completa del gen *Cytb* (1140 bp) fue obtenida para 350 individuos de las diferentes especies identificadas (Anexo 1.1). En el conjunto de datos analizados para el *Cytb* se observó que 435 sitios fueron variables y 254 fueron parsimoniosamente informativos. Las terceras posiciones fueron las más informativas (137 caracteres parsimoniosamente informativos), seguidos de las primeras posiciones (29 caracteres parsimoniosamente informativos). La mayor parte de las diferencias entre pares de nucleótidos fueron detectadas en las terceras posiciones (Tabla 3).

La reconstrucción filogenética utilizando el *Cytb* no presentó una correspondencia con las especies determinadas con base en las características morfológicas (Figura 10). Los cuatro complejos reconocidos por Parenti (1984) no fueron recuperados. Basados en la reconstrucción filogenética del *Cytb* fueron obtenidos dos grupos, en el Grupo I se incluyeron morfotipos de los cuatro complejos propuestos anteriormente por Parenti (1984) (Figura 8). El Grupo II agrupa siete morfo-especies de “carachi negro” distribuidas alrededor del lago: *O. aff. agassii*, *O. ctenolepis*, *O. frontosus*, *O. cf. puni*, *O. multiporis* y *O. cf. richersoni*. Las divergencias genéticas no corregidas (distancias “*p*”), entre ambos grupos son de entre 7 y 8% y dentro de los grupos son entre el 1 y 1.5%. Con la excepción dentro del Grupo II en donde algunos linajes presentaron divergencias mayores al 2%.

- Complejo *cuvieri*
- Complejo *mulleri*
- Complejo *gilsoni*
- Complejo *agassii*
sin *luteus*, *albus*, *farfani* y *rotundipinnis*
- *luteus/ rotundipinnis / farfani*
- *albus*

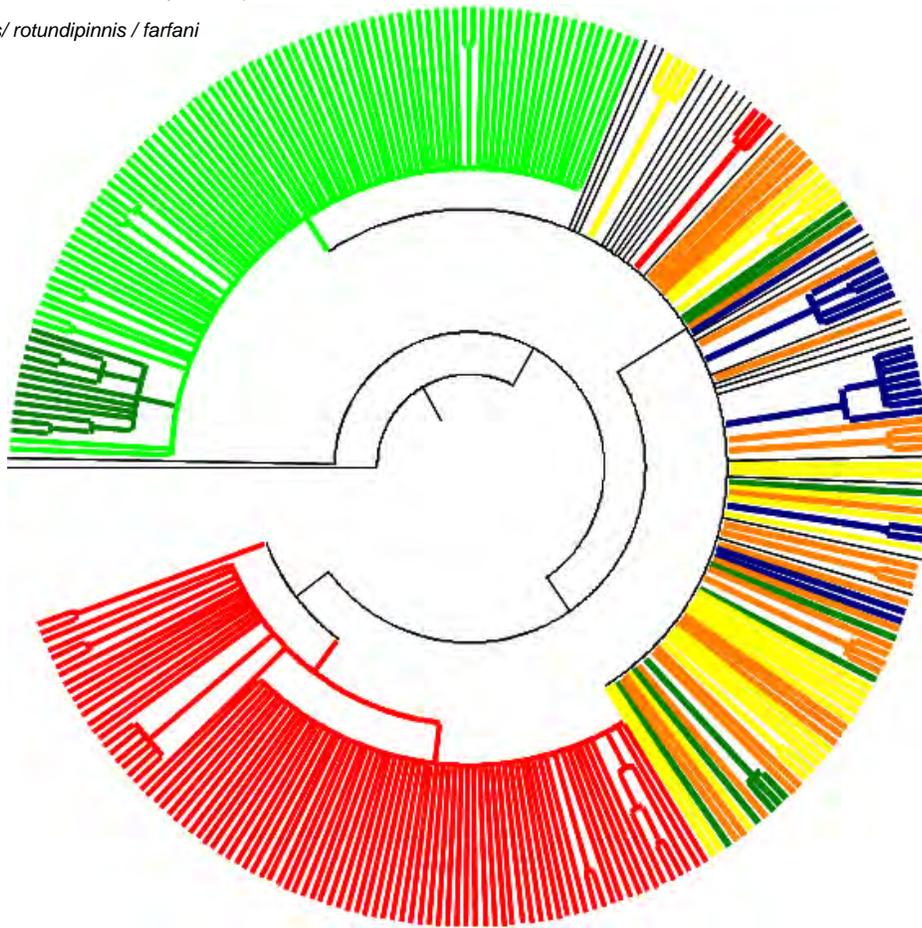


Figura 10. Árbol filogenético basado en análisis bayesianos para los 350 individuos analizados del género *Orestias*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*.

El Grupo I a su vez se conformó por varias politomías, el primero de los linajes agrupa en su mayoría a especies del complejo *gilsoni*, sin embargo en este grupo también se pudo observar morfotipos del complejo *mulleri*, y del grupo *luteus*. El segundo linaje de la politomía y el que más alto soporte presenta

incluye casi exclusivamente individuos del grupo *luteus*, acompañados por unos cuantos del complejo *mulleri*. El resto de linajes de la polotomía corresponden a especies de los complejos *cuvieri* y *mulleri* (figura 10).

2.4.1.3. Análisis filogenético del género *Orestias* basado en la secuencia de tres genes *Cytb*, D-LOOP y *Rho* (2,851 pb)

En la reconstrucción filogenética utilizando los tres genes *Cytb*, D-LOOP y *Rho* (2,851 pb) la mayoría de los linajes presentaron mejores soportes y se pudo resolver, de forma considerable, un mayor número de relaciones entre éstos (Geles de agarosa 1.5% para cada gen, Figuras 11-13). Hacia la base de la topología se observan, de manera similar que para los genes por separado, dos clados bien soportados (Clados I y II, Figura 14), estos grupos separan en términos generales a los “carachis negros” del resto de las especies colectadas en el lago.

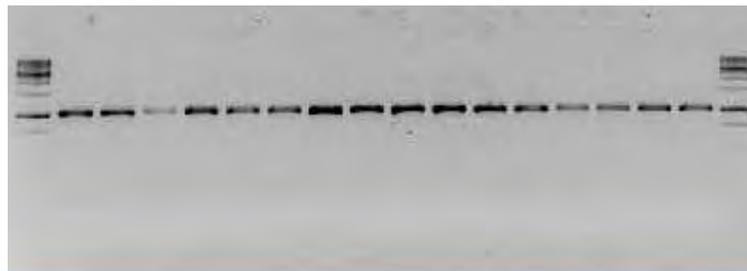


Figura 11. Gel de electroforesis de la amplificación de la región control mitocondrial (D-loop, 928 bp). Marcador molecular de 1000 bp.

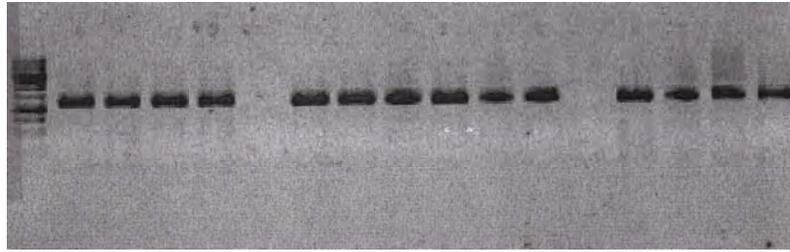


Figura 12. Gel de electroforesis de la amplificación del gen Cytb (1140 bp). Marcador molecular de 1000 bp.

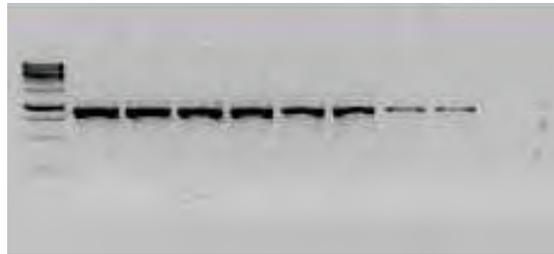


Figura 13. Gel de electroforesis de la amplificación del gen de la rodopsina (759 bp). Marcador molecular de 1000 bp.

El Clado I, incluye a los complejos *gilsoni*, *mulleri*, *cuvieri* y algunas especies que habían sido incluidas por Parenti y Lauzane en el grupo *agassii* (Parenti, 1982; Lauzanne, 1992), que son *O. luteus*, *O. albus*, *O. rotundipinnis* y *O. farfani*. El único complejo que en el presente estudio fue recuperado como monofilético fue el *cuvieri* el cual incluye a las especies *O. cuvieri*, *O. pentlandi*, *O. forgeti* y *O. ispi*. En este grupo fue posible observar un organismo híbrido entre *O. aff. agassii* y *O. pentlandi*. Un ejemplar identificado como *O. uruni* también fue incluido dentro de este grupo, sin embargo debido a que dentro del Clado I la diferenciación con el gen nuclear Rho (ver más abajo red de haplotipos), es muy baja es posible que no sea posible detectar posibles híbridos dentro del mismo clado o también puede deberse a ejemplares juveniles de *forgeti*, algunos caracteres como el número de vertebras (31), y 12 y 14 ródios de la aletas dorsales y anal respectivamente solapan entre ambas especies y fueron observados en el ejemplar de *O. uruni*.

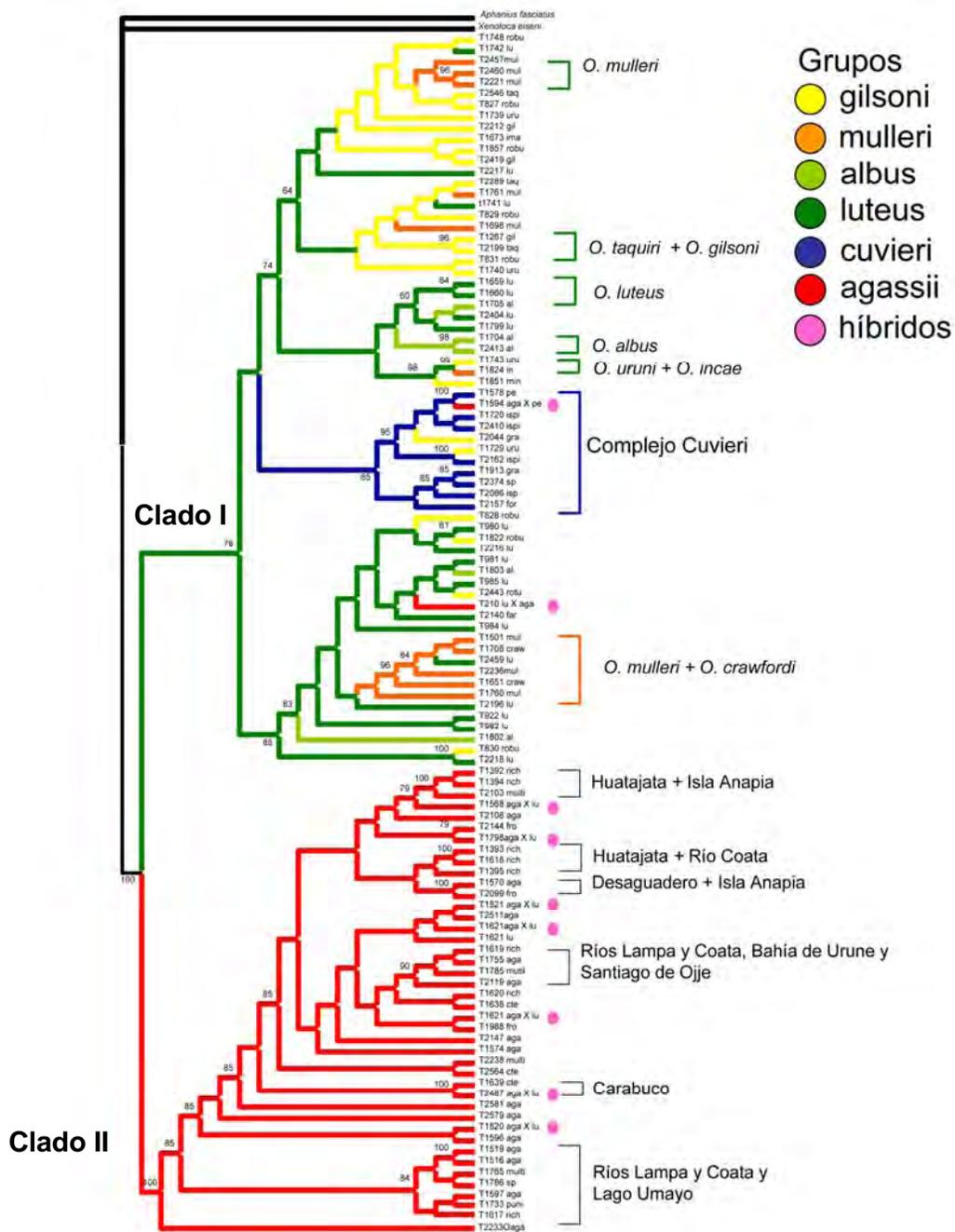


Figura 14. Árbol de Inferencia Bayesiana resumido para 110 individuos utilizando el gen mitocondrial *Cytb*, D-LOOP y un gen nuclear *Rho*, con un total de 2,851 pb. Se indican los individuos cuya información nuclear y mitocondrial es contradictoria correspondiendo con híbridos entre diferentes clados.

El resto de los complejos *gilsoni* y *mulleri* no fueron recuperados como monofiléticos, por el contrario se encuentran distribuidos en todo el clado, salvo en algunas excepciones donde ciertas especies del complejo están agrupadas.

Por último dentro del Clado I, no fue posible recuperar a las especies *O. luteus*, *O. albus*, *O. rotundipinnis* y *O. farfani* como monofiléticas. *O. albus* y *O. luteus* presentaron dos diferentes linajes dentro del Clado I, por lo tanto se puede considerar que posiblemente parte de la diversidad encontrada no sea suficiente para poder distinguir entre estos dos morfotipos.

Por último consideramos que las especies *O. rotundipinnis* y *O. farfani*, descritas por Parenti, 1984 deberían ser revisadas, ya que muy posiblemente no se traten de especies validas. Consideramos esto debido a que durante la colecta del material fue posible observar una amplia gradación de los caracteres que las distinguen de su especie más cercana *O. luteus*, además no ha sido posible recuperarlas en la topología.

En el Clado II se agruparon la mayor parte de las especies del complejo *agassii* sin embargo la agrupación fue más a nivel geográfico que morfológicos, por lo que ninguna de las especies fue recuperada como monofilética. Así mismo dentro Clado II fueron identificados un mayor número de híbridos que dentro del Clado I. Es por esto que basados en nuestros resultados la mayor caracterización dentro del Clado II esta originada por su distribución en el lago, siendo más diferentes los que se presentan en los ríos que llegan al lago como son el Río Lampa y Coata. Así como el lago Umayo el cual no se encuentra

conectado al lago Titicaca. En la figura 14, se muestran cuáles son esas localidades que fueron agrupadas de forma significativa en comparación con el resto de linajes encontrados dentro del lago sin estructura.

Estos resultados resaltan una vez más la controversia generada por la consideración de algunas de las especies descritas en el lago como válidas. Por un lado para el caso de algunos morfotipos resulta evidente su asociación a características tróficas y ecológicas distintivas, como *O. frontosus*, donde es posible que los marcadores utilizados no tengan resolución para distinguirlos. Sin embargo otras especies como *O. cf. richersonii*, la cual se diferencia del resto por el patrón de coloración pueden representar variaciones poblacionales que deberían ser revisadas para corroborar su validez.

Aún así debido a que muchas de las especies descritas dentro del complejo *agassii* (incluyendo solamente los carachis negros), han sido cuestionadas con anterioridad por otros autores (Lauzanne, 1992; Müller, 1993), señalando que muchas de ellas presentan un alto grado de solapamiento entre los caracteres.

Además no puede ser descartado una falta de definición de los marcadores utilizados para poder identificar las diferentes especies o posibles introgresiones que puedan estar interfiriendo en la interpretación y asociación de linajes a especies validas.

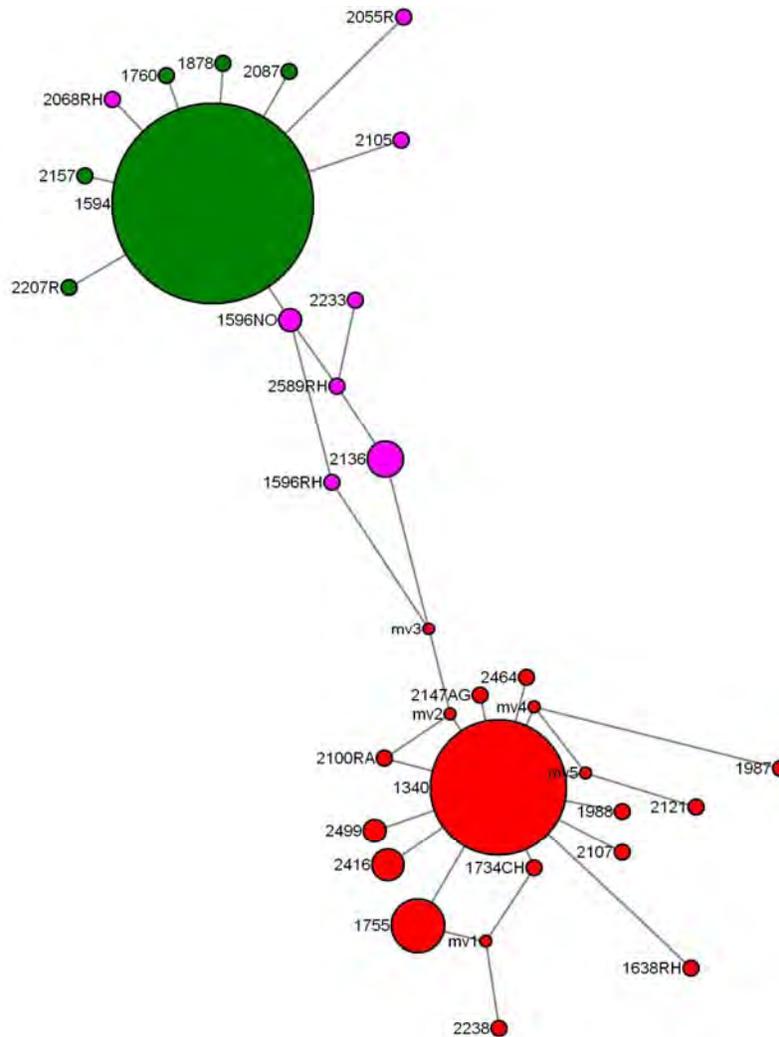


Figura 15. Red de haplotipos del gen de la Rodopsina de los 350 individuos analizados del género *Orestias*.

La red de haplotipos del gen de la rodopsina (Figura 15) muestra una estructura correspondiente a los dos principales linajes evolutivos de *Orestias*, observándose un haplotipo común rodeado de varios haplotipos diferentes en muy pocas mutaciones, lo que se corresponde a una estructura en estrella. Este tipo de estructura es común en estudios en las que las especies o poblaciones son muy cercanas y existen en las poblaciones algunos haplotipos ancestrales en baja frecuencia. Por tratarse de un gen nuclear es difícil establecer que estas variaciones puedan estar relacionadas con un proceso

reciente de radiación, pero una estructura similar puede observarse en la red del *Cytb*.

En un extremo de la red tenemos las poblaciones relacionadas con *O. aff. agassii*. No se observa una estructura geográfica, aunque la mayoría de los haplotipos diferentes al común se encuentran al sureste del lago Mayor/lago Menor.

El segundo grupo de haplotipos se corresponde con el clado 1 en los carboles filogenéticos que agrupa a los complejos *cuvieri*, *mulleri* y *gilsoni*, además de las especies del grupo *luteus sensu* Parenti (1984). Algunos haplotipos que se separan por una o escasas mutaciones del haplotipo común pueden ser localizados relacionados con la zona sur del lago Grande.

2.4.1.4. Evidencia genética de hibridación entre diferentes especies de *Orestias*

Varios haplotipos intermedios de la red del gen nuclear se recuperan entre los dos principales grupos, mismos que son identificados como híbridos y que además se corresponden con morfotipos que comparten características de ambos grupos. Es en este grupo de haplotipos en donde se encuentra el híbrido *O. aff. agassii* x *O. pentlandii*, entre otros.

Se pudieron identificar diferentes secuencias híbridas del gen de la rodopsina. En algunas ocasiones este resultado fue corroborado con la observación de un

individuo colocado en clados diferentes en el análisis mitocondrial y nuclear. Los individuos con características genéticas híbridas son (entre paréntesis la identificación en campo): 2105 (*O. aff. agassii*), 2147 (*O. frontosus*), 2233 (*O. aff. agassii*), 2236 (*O. mulleri*), 2487 (*O. aff. agassii*), 2511 (*O. aff. agassii*), 2512 (*O. aff. agassii*), 2568 (*O. aff. agassii*), 1798 (*O. sp.*), 1621 (*O. cf. richersoni*), 2589 (*O. cf. richersoni*), 1520 (*O. sp.*), 1596 (*O. aff. agassii*), 1521(*O. sp.*), 1568 (*O. aff. agassii*), 1617 (*O. cf. richersoni*), 1574 (*O. aff. agassii*) y 2451 (híbrido *O. aff. agassii* x *O. luteus*). Se observó de igual manera evidencia de la presencia de un híbrido entre *O pentlandii* y *O. aff. agassii*, en la laguna Saracocha (individuo 1594, híbrido entre *O. pentlandii* 1578 y *O. aff. agassii* 1597, ver figura 14), fenómeno no reportado hasta ahora y que podría ser frecuente en los sitios en que ambas especies conviven. La mayoría de los híbridos se recuperaron con mitocondrial del clado de *O. aff. agassii* y suelen tener una apariencia más relacionada con un fenotipo de ese grupo, al haber sido indentificados en campo como tales.

2.4.1.5. Híbridos dentro del género *Orestias*

2.4.1.5.1. Identificación de haplotipos nucleares

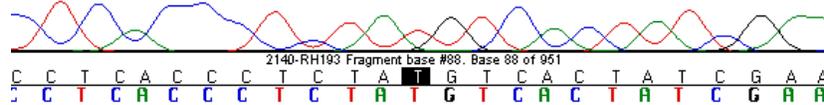
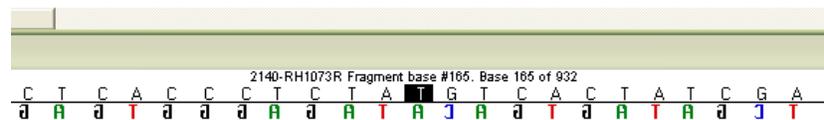
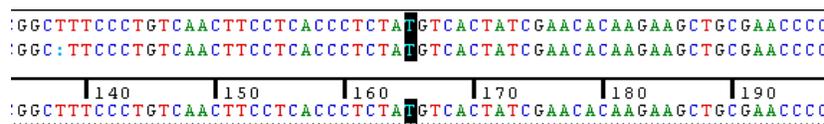
Los haplotipos fueron observados en los cromatogramas de las secuencias forward y reverse de cada individuo. Los haplotipos generados con la información nuclear se compararon con los obtenidos en la filogenia mitocondrial con lo que se pudo determinar su asignación a un linaje en específico.

De esta forma se pudo asociar la presencia de un haplotipo determinado para cada uno de los dos grandes linajes recuperados en la filogenia mitocondrial. Se identificaron siete posiciones variables en el gen de la rodopsina.

En las posiciones variables se observó un patrón de cromatograma característico que normalmente se relaciona como indicativo de hibridación.

1) Haplotipo nuclear del clado 1:

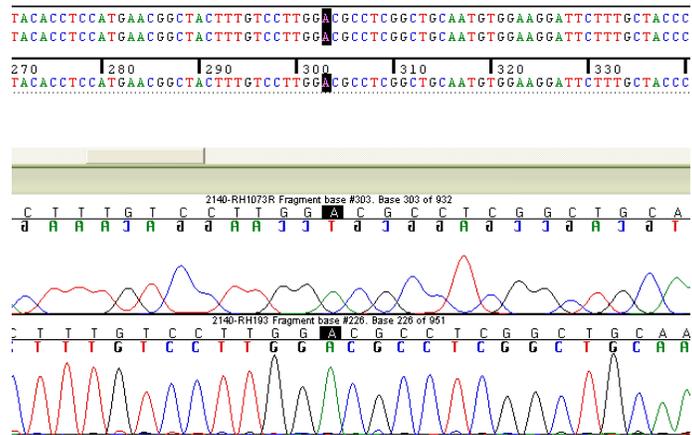
Posición 1)



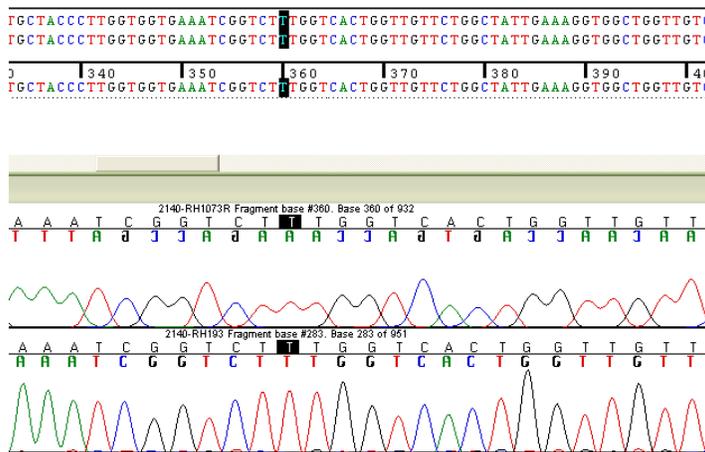
Posición 2)



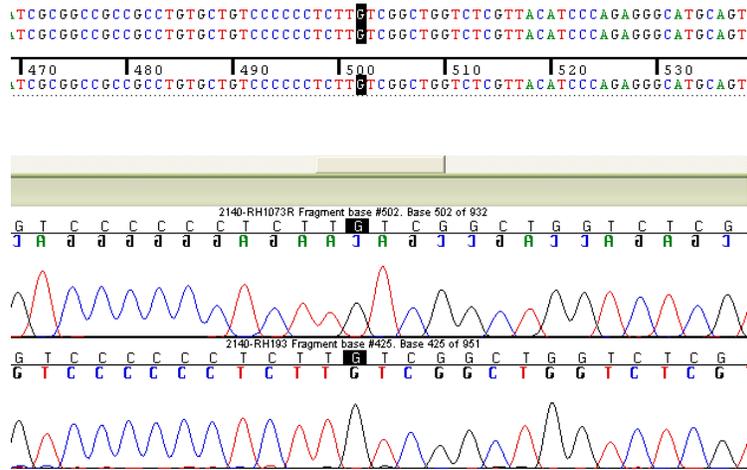
Posición 3)



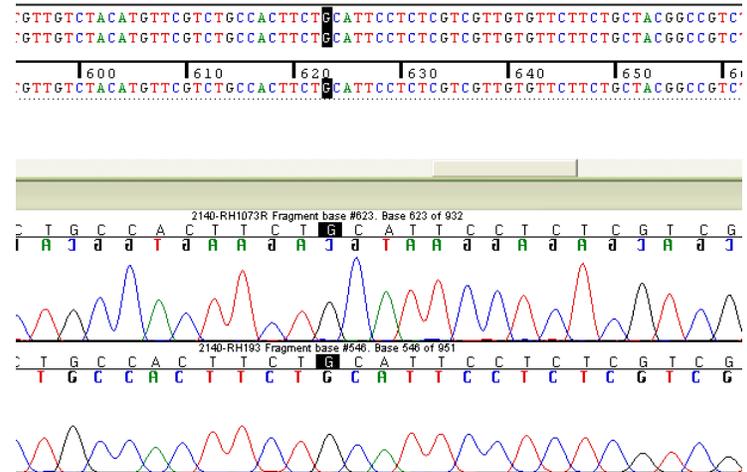
Posición 4)



Posición 5)

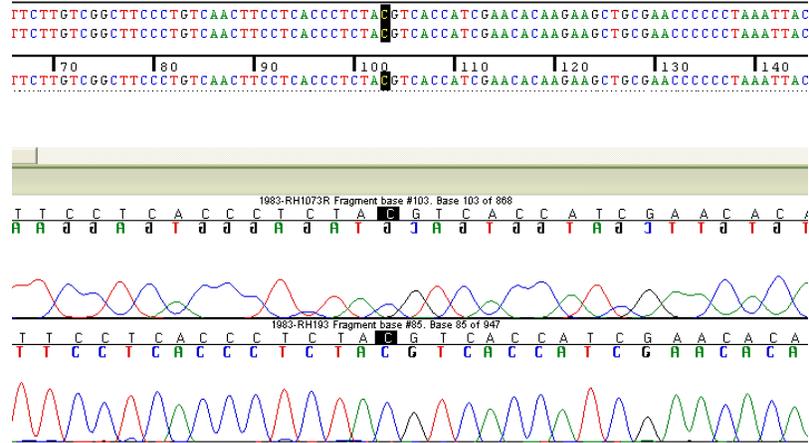


Posiciones 6 y 7)



2) Haplotipo nuclear del clado 2:

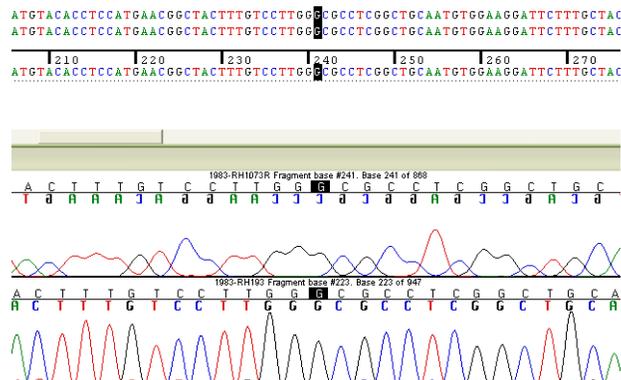
Posición 1)



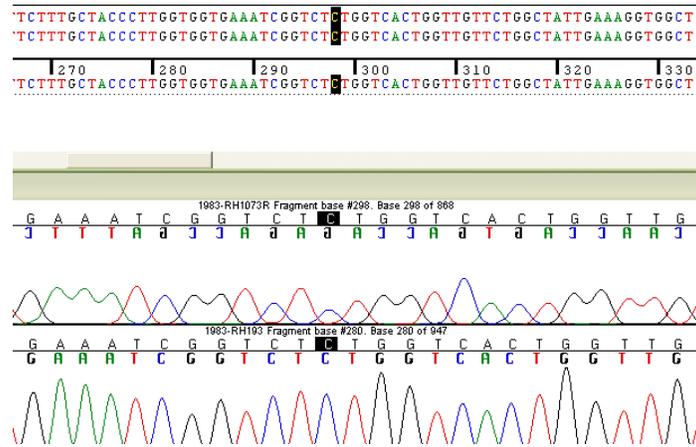
Posición 2)



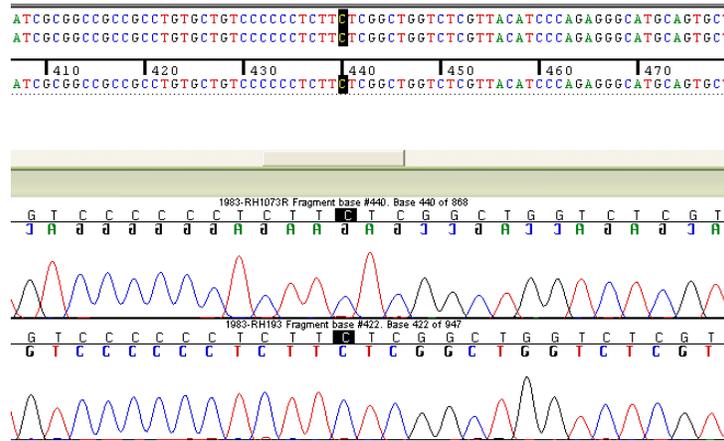
Posición 3)



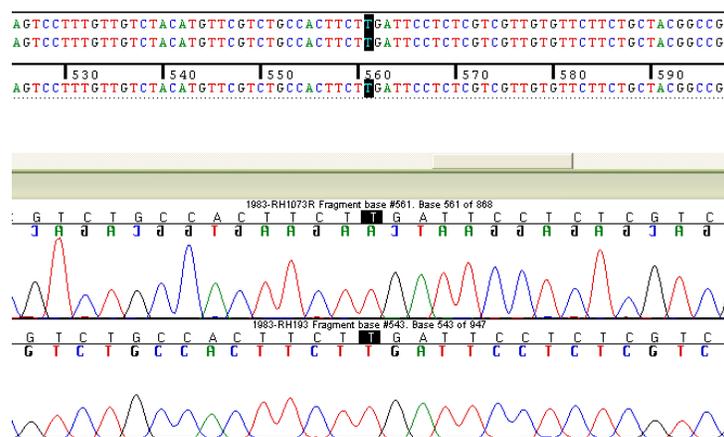
Posición 4)



Posición 5)



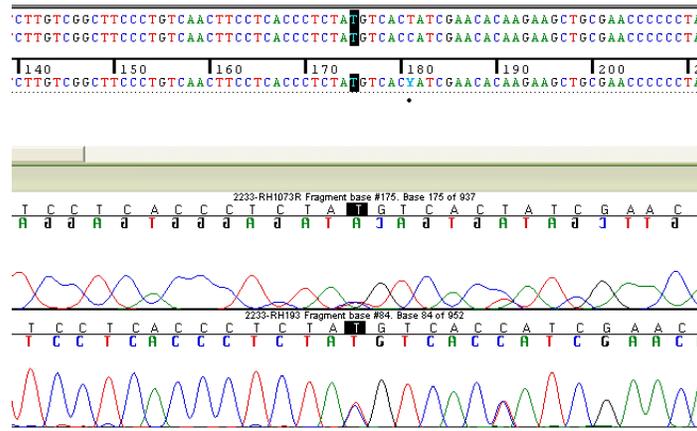
Posiciones 6 y 7)



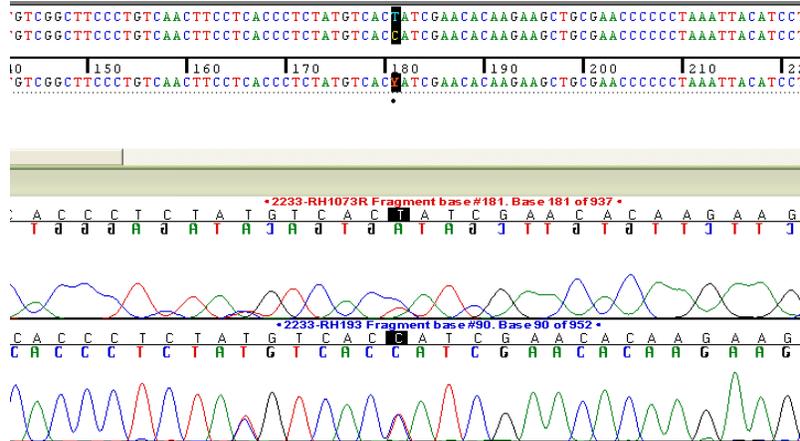
3) Detección de híbridos:

Las posiciones variables en este gen son intermedias en señal cromatográfica, mostrando el aporte de los dos diferentes haplotipos nucleares.

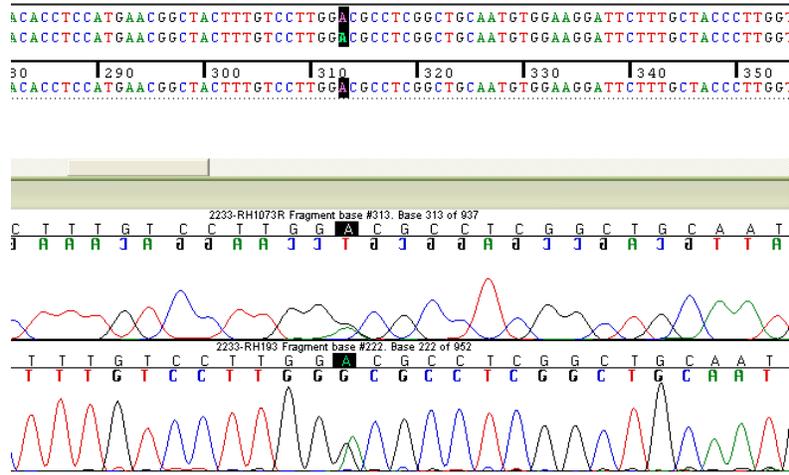
Posición 1)



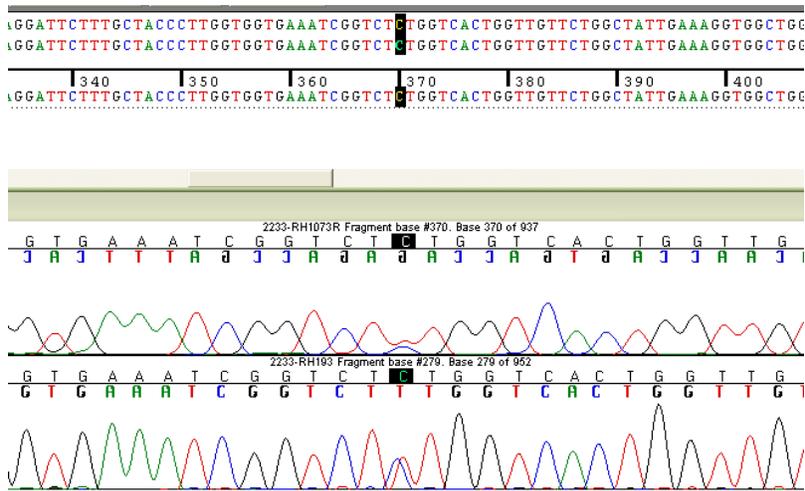
Posición 2)



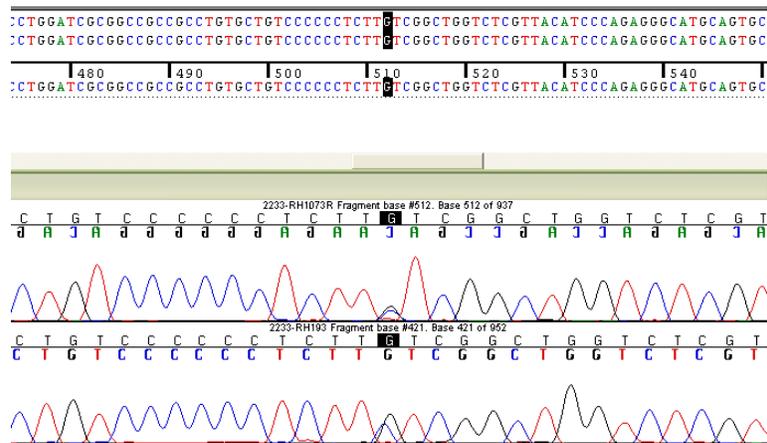
Posición 3)



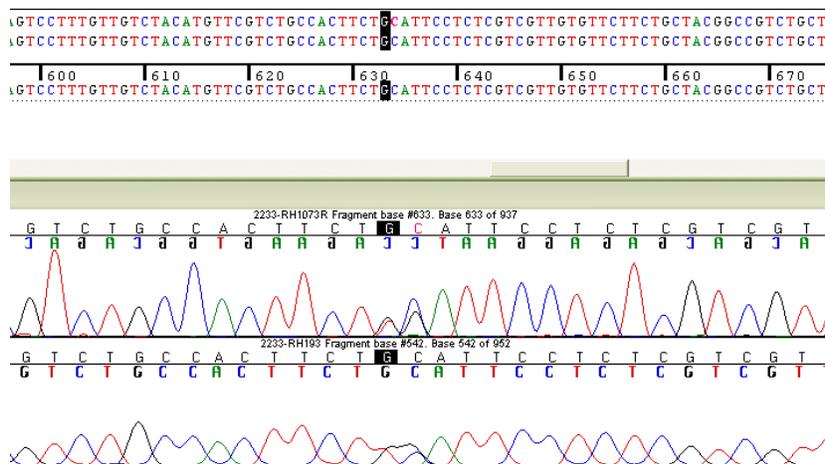
Posición 4)



Posición 5)



Posiciones 6 y 7)



A continuación presentamos una serie de fotografías de algunos ejemplares reconocidos como híbridos en el análisis genético.



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y *O. luteus*



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



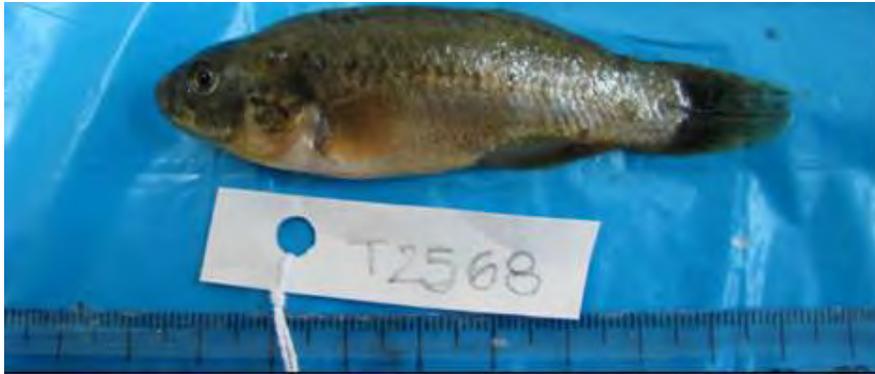
Híbrido entre *O. mulleri* y *O. aff. agassii*



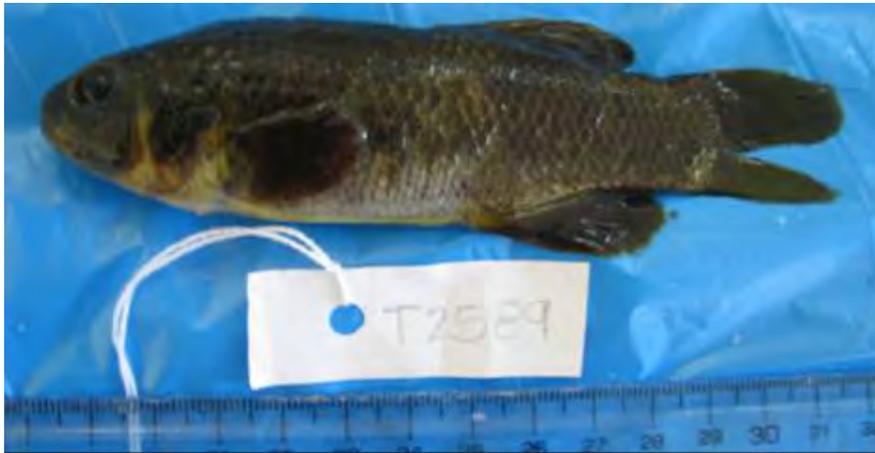
Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



Híbrido entre *O. aff. agassii* y especie no identificada de Clado I



O. pentlandii (arriba), ***O. aff. agassii*** (abajo) e híbrido entre ambas especies (medio). Es posible identificar el morfotipo intermedio entre ambas especies, observación corroborada genéticamente en este estudio. Individuos colectados en la Laguna Saracocha.

2.4.1.6. Redes de haplotipos del *Cytb* y su correspondencia morfológica y geográfica

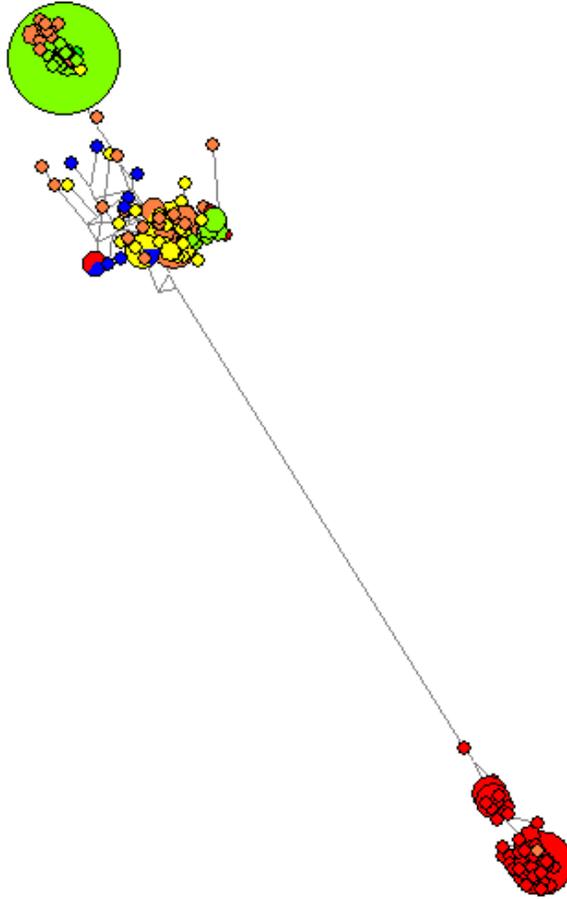


Figura 16. Red de haplotipos de los 350 individuos analizados del género *Orestias*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*

La red de haplotipos mitocondriales muestra la separación de dos complejos distintos que se corresponden con el análisis filogenético, por una parte los morfotipos *aff. agassii* y el resto de los morfotipos por separado (Figura 16). Dentro del grupo *agassii* (Figura 17), se pueden indentificar un primer grupo de haplotipos con una congruencia geográfica y que corresponde a la cuenca del Río Coata (incluyendo a poblaciones del río Lampa y el propio Coata). En el otro grupo de haplotipos se pudo observar la separación de haplotipos

individuales asociados a islas, particularmente de las islas de Anapia y Pariti, a su vez también de la parte Este del lago desde Puerto Pérez a Santiago de Huata, presentó una mayor cantidad de haplotipos únicos. Es importante destacar que un individuo de *O. aff. agassii* de la Laguna de Saracocha presentó una alta diferenciación con respecto al resto de *O. agassii* del lago Titicaca, debido a ser de naturaleza híbrida (con mitocondrial de *O. pentlandii*). A excepción de *O. multiporis*, parcialmente correspondiente a los haplotipos provenientes del río Coata junto con los ríos Lampa y el lago Umayo, el resto de especies del grupo *agassii* no fueron recuperadas en la estructura obtenida con las secuencias del *Cytb*.

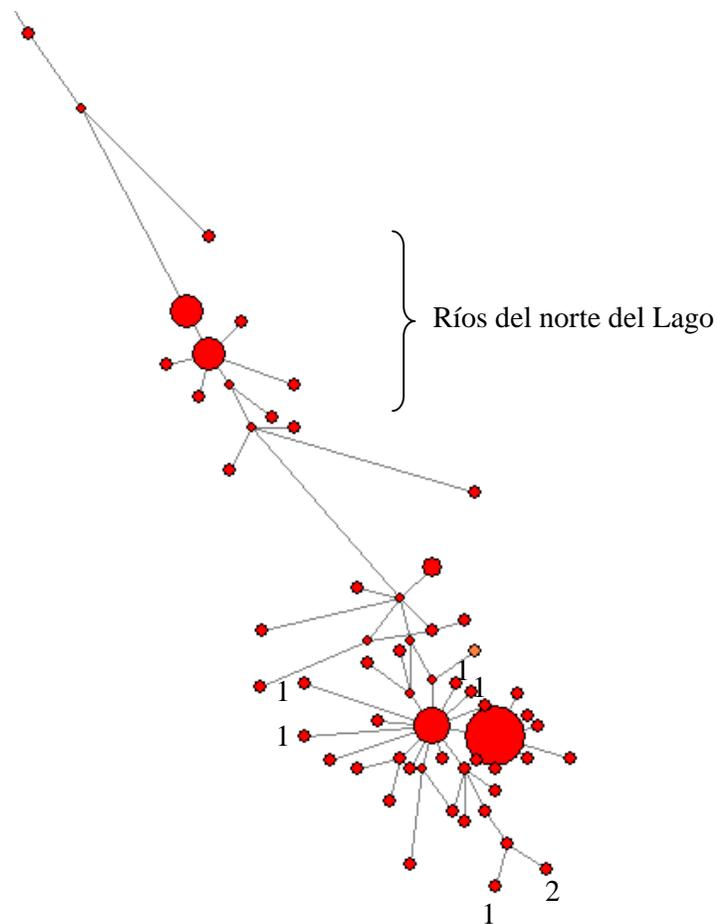


Figura 17. Sub-red de haplotipos para el grupo *agassii*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*. 1) Isla de Anapia, 2) Isla Pariti.

En la red correspondiente al grupo *luteus* (Figura 18) se observa una estructura en forma de estrella, comúnmente asociada a procesos de radiación recientes. En ella se pueden observar todos los morfotipos del grupo *luteus*: *O. albus*, *O. farfani*, *O. luteus*, *O. olivaceus* y *O. rotundipinnis*. Grupos morfológicos pertenecientes a las especies *O. mulleri* y *O. crawfordi* se observan asociados a los haplotipos del grupo *luteus*, mostrando además una mayor riqueza haplotípica.

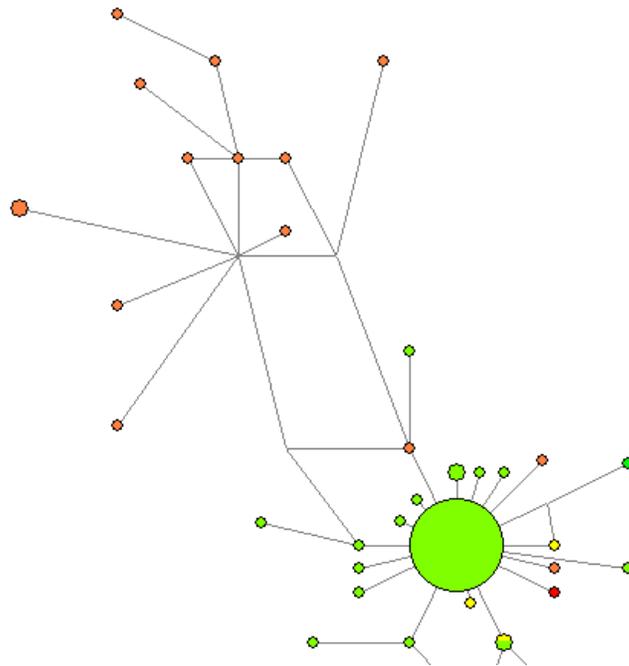


Figura 18. Sub-red de haplotipos para el grupo *luteus*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*.

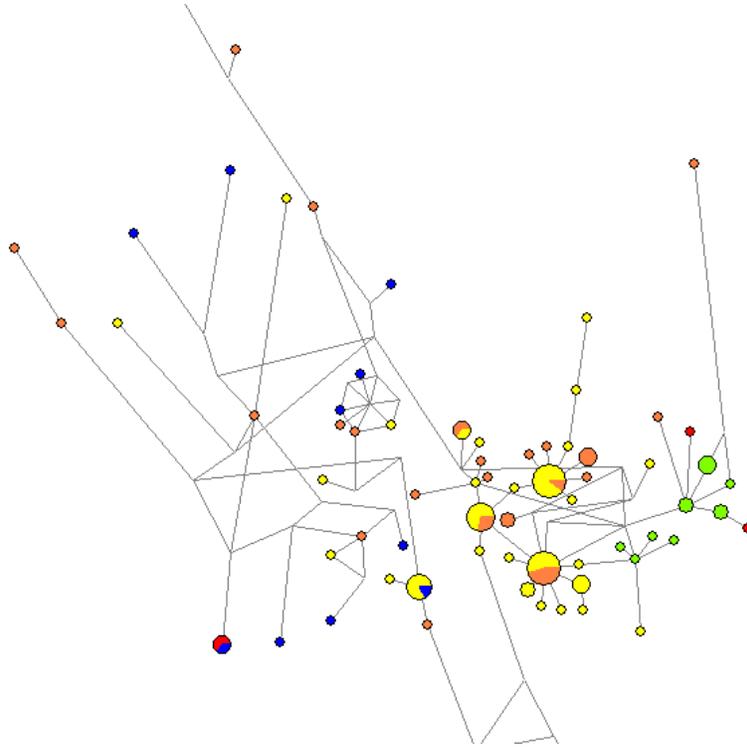


Figura 19. Sub-red de haplotipos para el grupo *luteus*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*.

El tercer grupo de haplotipos (Figura 19), muestra con una estructura fragmentada en la que se presentan muchos haplotipos individuales en los cuales sin una correspondencia taxonómica. Aún así es posible observar haplotipos del complejo *gilsoni* más cercanamente asociados. Es también dentro de este tercer grupo de haplotipos donde se encuentran algunos morfotipos del grupo *luteus*, sobretodo correspondientes a *O. albus* y *O. luteus* de la zona Este del lago. Las especies pelágicas como *O. ispi* u *O. forgeti* son observadas en múltiples partes de la red sin una asociación aparente. Esto se observa de igual manera en las especies del complejo *mulleri*.

2.4.1.7. Datación molecular de la cladogénesis dentro del género *Orestias*

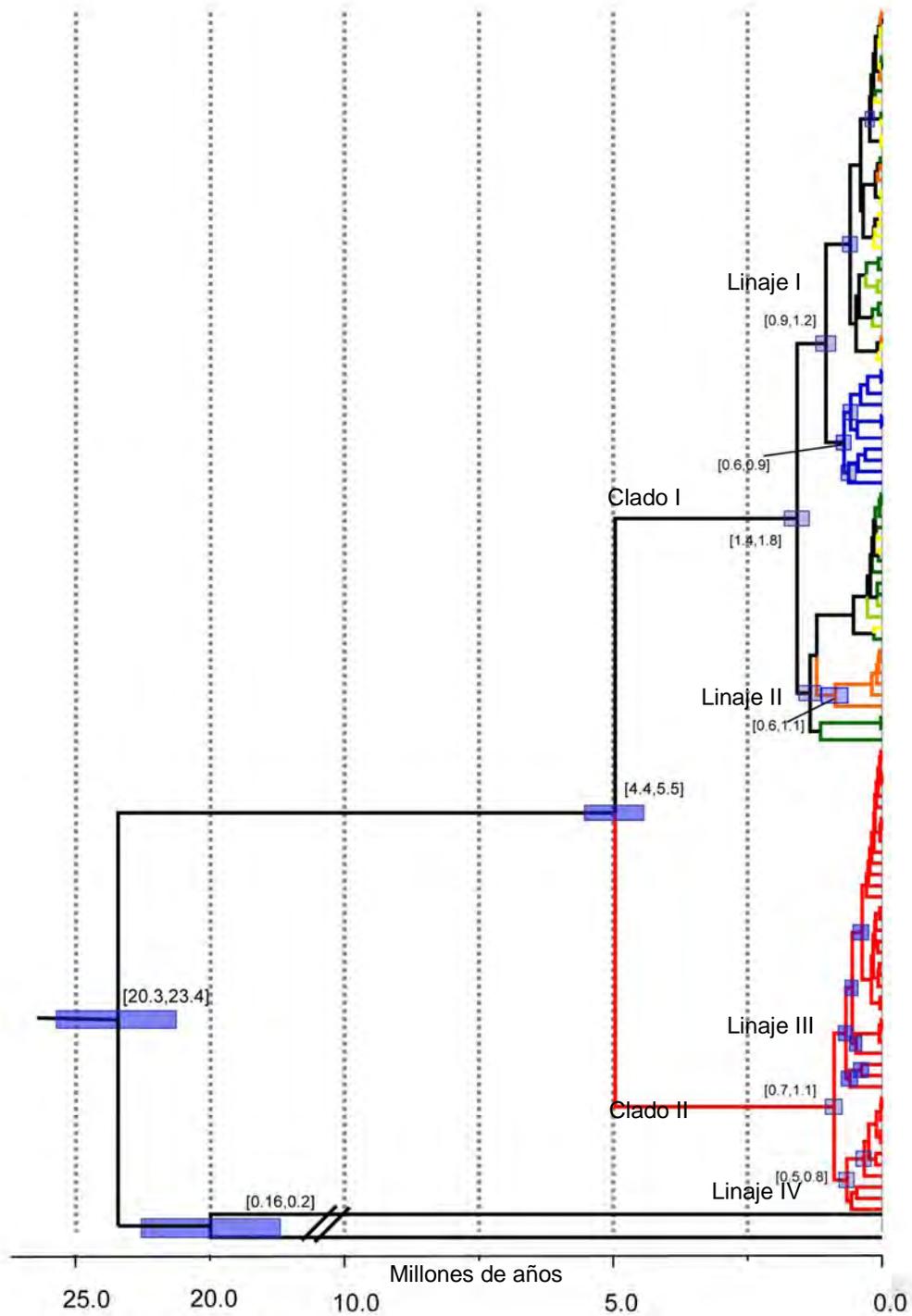


Figura 20. Reloj Molecular utilizando tres genes; *Cytb*, D-LOOP y *Rho*.

La datación molecular mostró que la división entre los dos Clados principales ocurrió durante el Mioceno Tardío, entre 4.4 y 5.5 millones años (Figura 20). Estas fechas coinciden con una época de fuerte actividad geológica en la cordillera de los Andes (Antonelli *et al.*, 2009).

Debido a que las fechas reconocidas para la formación de los diferentes Paleolagos en el Altiplano Medio son relativamente recientes (entre hace 12,000 a 20,000 años) (Sylvestre *et al.*, 1999), es posible que la separación entre ambos Clados preceda a las modificaciones en los niveles de agua en los Paleolagos. El resto de cladogénesis han ocurrido de manera mucho más reciente, y posiblemente han estado vinculadas a esos eventos climáticos. La variación genética encontrada puede ser explicada por eventos de introgresión genética entre diferentes linajes, o una incompleta separación evolutiva de los marcadores utilizados.

2.4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *TRICHOMYCTERUS*

En la figura 21 se muestra la distribución de la frecuencia de los tejidos colectados para el género *Trichomycterus* en las diferentes localidades dentro del lago Titicaca.

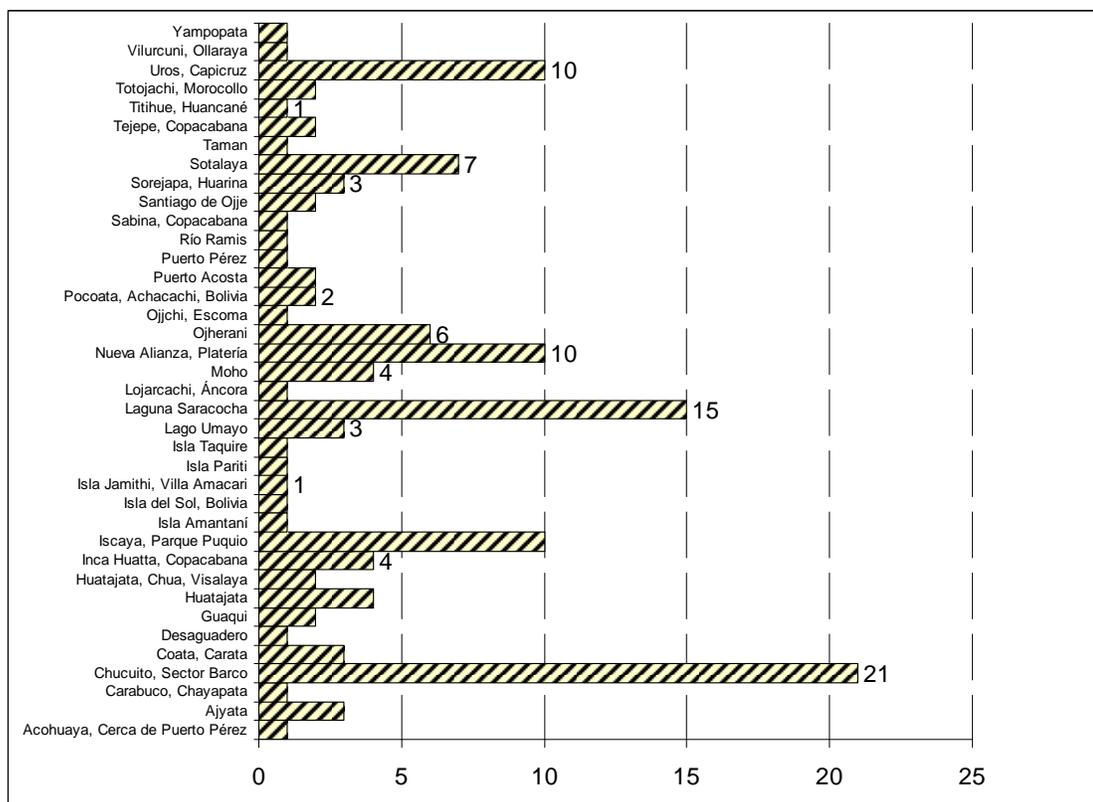


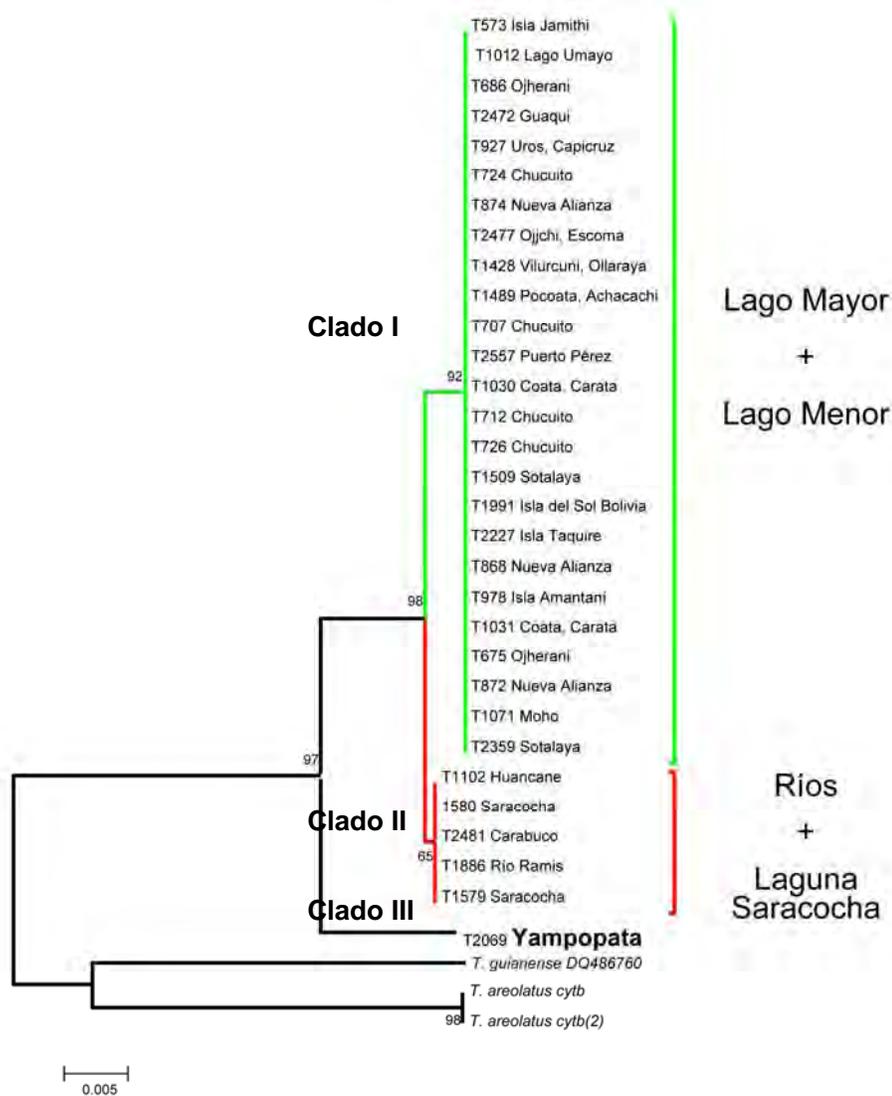
Figura 21. Distribución de la frecuencia de individuos para las campañas de colecta, Noviembre 2008 y Febrero 2009.

Como se observa en el gráfico la abundancia de los ejemplares del género *Trichomycterus* en el lago es mucho menor que lo del género *Orestias*. En total se tienen incluidos en la colección un total de 134 tejidos en 38 localidades. La población que presentó una mayor abundancia en la colección de tejidos corresponde a la de Chucuito, Sector Barco, seguida de la Laguna Saracocha.

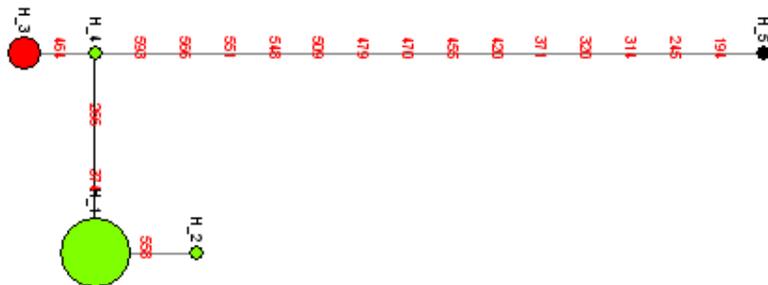
2.4.2.1. Análisis filogenético del género *Trichomycterus* basado en la secuencia del gen *Cytb*

En la reconstrucción filogenética utilizando el gen *Cytb* (Figura 22), se observaron tres linajes con alto soporte, sin embargo dentro de cada uno de estos linajes la diversidad observada fue baja. Hacia la base de la topología el primer linaje que se separa presenta una gran divergencia del resto (7% aproximadamente, distancias del modelo máxima verosimilitud) y corresponde a un ejemplar colectado en la localidad de Yampupata (Clado III, figura 22), este linaje presente un alto soporte (97% de probabilidad posterior). Posteriormente se presentan dos grupos hermanos, el Clado I y II que se separan con un alto valor de probabilidad posterior 98%. El Clado II (figura 22) incluye a las poblaciones del lado este del lago (localidad de Huancane y Carabuco) y del Río Ramis. Así mismo en este grupo esta incluida la laguna de Saracocha. Este grupo se separa de su grupo hermano (Clado I) aproximadamente con un 1 % de divergencia (distancias del modelo de máxima verosimilitud).

En cuanto a la diversidad haplotípica (entendida como el número de haplotipos presentes), cabe destacar que ésta fue nula para el Clado II, presentando sólo un haplotipo (H3, Figura 22b) para las poblaciones antes mencionadas. Esta observación resulta interesante desde el punto de vista biogeográfico ya que es posible que la conexión entre los ríos y la laguna de Saracocha haya sido interrumpida posteriormente a la interrupción con el lago, haciendo posible que se pueda compartir el mismo haplotipo.



a



b

Figura 22. a) Árbol filogenético basado en análisis bayesianos para los individuos 34 analizados del género *Trichomycterus*, basado en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb*. b) Red de haplotipos para el gen *Cytb*. En ésta última se indican los pasos mutacionales entre los haplotipos en números rojos de acuerdo a su posición en el gen.

Las poblaciones del Clado I se encuentran ampliamente distribuidas en el lago, donde no parece haber una estructura geográfica. La diferenciación haplotípica fue muy baja, siendo muestreados únicamente tres haplotipos. El haplotipo1 fue el más abundante incluyendo a la mayor parte de los ejemplares, a excepción de las localidades de Ojerani (T675) y Moho (T1071) presentaron diferentes haplotipos (H2 y 4 respectivamente, Figura 22b).

2.4.2.2. Implicaciones filogeográficas del género *Trichomycterus* en el lago Titicaca

Basados en la divergencia genética entre ambos clados (Clado I y II, Figura 22), su separación es muy reciente y pudo llevarse a cabo alrededor de 1 millón de años atrás. Estas fechas son coherentes con las encontradas para el complejo *cuvieri* de *Orestias* en este mismo trabajo, lo que puede corresponderse con un proceso de separación dentro de la cuenca del Titicaca, entre el lago y algunos de sus alrededores como la Laguna Saracocha.

Probablemente, esta separación habría tenido lugar como resultado de movimientos en los niveles de agua de los diferentes paleolagos descritos para el Altiplano Medio, que habrían mantenido algunas poblaciones tanto de *Orestias* como de *Trichomycterus*, aisladas de las del resto del lago y su influencia. Este escenario explicaría el hallazgo de diferentes linajes cercanos en la cuenca del Titicaca en diferentes grupos como los peces incluidos en este trabajo y las ranas del género *Telmatobius* (Benavides, 2005), en las cuales se

ha encontrado un patrón Filogeográfico muy similar, con un linaje (o clado) básicamente “lacustre” y otro asociado a poblaciones riparias / Lagunas circundantes como la de Saracocha. Es posible que una parte de la cuenca del Titicaca situada al norte del actual lago se mantuviera aislada durante algún tiempo, el suficiente para permitir cierta diferenciación genética de los organismos acuáticos.

Un proceso similar también explicaría la diferenciación de algunas especies de *Orestias* del lago Umayo (*O. olivaceus sensu* Parenti, *O. cf. puni sensu* Parenti y *O. silustani*) posiblemente extintas hoy en día. Una posterior unión de al menos parte de ambos sistemas explicaría la actual configuración en la que en el lago se encuentran representantes del linaje previamente separado. Es posible que la Laguna Saracocha no se haya unido de manera natural y sería entonces vestigio de ese sistema temporalmente separado del lago. Es entonces importante considerar la diferenciación evolutiva de la fauna acuática de la Laguna Saracocha en futuras medidas de conservación.

2.4.2.3 Implicaciones taxonómicas respecto al género

***Trichomycterus* en el lago Titicaca**

La labor de identificación ha permitido corroborar la presencia de la especie *Trichomycterus rivulatus* para la gran mayoría de los ejemplares colectados en el lago. Entre los caracteres diagnósticos de la especie, que además la permiten distinguir de *T. dispar*, se encuentran:

- 1) La aleta caudal situada al menos parcialmente sobre la aleta anal en línea transversal al cuerpo, que en *T. dispar* se encuentra enteramente por delante.
- 2) La longitud de la cabeza es menor o igual a la altura máxima del cuerpo mientras que en *T. dispar* es al menos tanto mayor como el diámetro del ojo.
- 3) La aleta caudal es redonda, mientras que en *T. dispar* es emarginada.
- 4) En comparación, la aleta dorsal están situadas en posición posterior con respecto a *T. dispar*, ya que el origen de la dorsal se encuentra equidistante del “occiput” y la punta de la aleta caudal y en *T. dispar* el origen de la dorsal se encuentra equidistante del margen anterior de los ojos y la punta de la caudal.

Llevar la identificación taxonómica al análisis filogenético de este estudio permite establecer que los clados I y II están conformados por individuos identificados como *T. rivulatus* y que ninguno de los individuos analizados corresponden morfológicamente con *T. dispar*. El clado III lo conforma un individuo de una especie distinta a *T. dispar*, pero determinar si corresponde a una de las especies descritas para el género o se trata de una especie nueva para la ciencia requiere de un estudio morfológico posterior enfocado a la caracterización de la variación poblacional y su comparación con las especies taxonómicamente más relacionadas. Su divergencia genética (aproximadamente 7%) da evidencia de que se encuentra por encima de los valores típicos para diferenciar especies en grupos de peces (normalmente alrededor del 2%) pero su determinación requerirá de trabajos taxonómicos especializados en ello.

2.5. Conclusiones

1. La evidencia genética sustenta un patrón de radiación reciente que se observa en los diferentes linajes de *Orestias* presentes en el lago, sobre todo en el clado I. Existen sin embargo eventos cladogenéticos antiguos que posiblemente se relacionen más con eventos biogeográficos vicariantes, como la formación de los dos grandes clados observados en la filogenia (conformados por un lado del clado de linajes afines a *O. aff. agassii* y por otro del resto de especies). Se ha encontrado de igual manera, evidencia de eventos cladogenéticos que al estar compartidos entre diferentes linajes podrían relacionarse con sucesos climáticos más recientes (como las variaciones en los niveles de los paleolagos antecesores al lago Titicaca).

2. Los resultados obtenidos no muestran una asociación entre las diferentes especies reconocidas morfológicamente y los linajes recuperados. Lo anterior puede ser debido a: I) que muchas de las especies descritas pueden representar variaciones poblacionales o estadios del desarrollo durante su ciclo de vida. II) que el fenómeno observado en el lago esté relacionado con un proceso de especiación incipiente asociado a características ecológicas y por tanto sea necesario un análisis mucho más detallado a nivel poblacional para cada especie.

3. El Clado I incluye a los complejos *gilsoni*, *mulleri*, *cuvieri* y algunas especies que habían sido incluidas por Parenti y Lauzane en el grupo *agassii* (Parenti

1984; Lauzanne 1992), que son *O. luteus*, *O. albus*, *O. rotundipinnis* y *O. farfani*.

4. El complejo *cuvieri*, dentro del Clado I, es el único que se recupera como monofilético e incluye a las especies *O. pentlandi*, *O. forgeti* y *O. ispi*.

5. El Clado II incluyó ejemplares del complejo *agassii sensu stricto* (incluyendo solamente los carachis negros). De manera similar al Clado I, no se observó una correlación de la variación genética con la morfología, sino más parece relacionarse con la distribución geográfica, de manera particular los ejemplares de los ríos del Norte y Este del lago (río Coata, río Lampa, Río Ramis y de Puerto Acosta a Puerto Pérez).

6. Fue posible la identificación de diversos procesos de hibridación entre el Clado I y II, siendo en algunos casos posible la determinación de las especies parentales potenciales. Es posible que este fenómeno sea frecuente y la evidencia surgida de este estudio permitiría su identificación en estudios posteriores.

7. Se corrobora que la gran mayoría de los individuos de “suche” y “mauri” corresponden a la especie *Trichomycterus rivulatus*, si bien existen al menos dos linajes mitocondriales evolutivamente cercanos de esta especie en el lago y sus alrededores. El primero se encuentra ampliamente distribuido por el lago y el segundo es registrado en menor abundancia principalmente en la Laguna

Saracocha y en el Norte y Este del lago (río Ramis, Huancané y Carabuco). La divergencia genética entre ambos no justifica su consideración como diferentes especies pero el linaje de la Laguna Saracocha debería considerarse en un futuro en el caso de llevar a cabo un manejo de sus poblaciones, así como la población del río Ramis para futuras medidas de conservación. Una diferenciación morfológica entre ambos linajes tampoco es evidente. Adicionalmente, se encontró un linaje mitocondrial altamente divergente en el lago (localidad de Yampupata) cuya identidad necesita corroboración mediante un estudio taxonómico pertinente.

2.6. Bibliografía

- Antonelli, A., Nylander, J., Persson, C., Sanmartín, I. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 9749.
- Bandelt, H., Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37.
- Blodgett, T., Lenters, J., Isacks, B. 1997. Constraints on the origin of paleolake expansions in the central Andes. *Earth Interactions* 1, 1-28.
- Chen, WJ, Bonillo C., A Lecointre, G. 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 262-288.
- Cuvier, G., Valenciennes, A. 1846. Histoire naturelle des poissons. Tome XVIII. Suite du livre dix-huitième. Cyprinoïdes. Livre dix-neuvième. Des Éscoces ou Lucioïdes. Ch. Pitois & V.c Levrault, Paris & Strasbourg. xvii + xix + 2 + 505 + 2 p. pls. 520-553.
- de Pinha, M.C.C., 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriforms (Teleostei:Ostariophysi); historical overview and synthesis of hypotheses, p. 279-330. *En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena and C.A.S. Lucena (eds.) EDIPUCRS, Porto AlegreRio Grande do Sul, Brasil.
- de Pinha, M.C.C., Wosiacki, W. 2003. Family Trichomycteridae, p. 270-290. *En: Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*, R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (orgs). EDIPUCRS, Porto AlegreRio Grande do Sul, Brasil.
- Drummond, A., Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, 699-710.
- Eigenmann, C.H. 1918. The Pygidiidae, a family of South American catfishes. *Mem. Carneige Mus.*, 7(5): 259-398, pls. 36-56.
- Eigenmann, C.H., Allen, W.R. 1942. Fishes of Western and South America. I. The intercordillerran and Amazonian lowlands of Peru. II.- The high Pampas of Peru, Bolivia and Northern Chile. With a revision of the Peruvian Gymnotidae, and of the genus *Orestias*. Univ. Kentucky. Xv + 494 p., pls 1-22.
- Fernandez, L., Schaefer, S.A. 2005. New *Trichomycterus* (Siluriformes:Trichomycteridae) from an offshore island of Colombia. *Copeia* 2005: 68-76.
- Fernandez, L., Vari, R.P. 2000. A new species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes :Trichomycteridae) lacking a pelvic girdle from the Andes of Argentina. *Copeia* 2000:990-996.

- Fornari, M., Risacher, F., Feraud, G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 172, 269-282.
- Garrick, R., Dyer, R., Beheregaray, L., Sunnucks, P. 2008. Babies and bathwater: a comment on the premature obituary for nested clade phylogeographical analysis. *Molecular Ecology* 17, 1401-1403.
- Garman. 1875. *Bull. Mus. Comp. Zoöl.* III, 275.
- Günther, A. 1864. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. Xxii + 455 p.
- Hastenrath, S., Kutzbach, J. 1985. Late Pleistocene climate and water budget of the South American Altiplano. *Quaternary Research* 24, 249-256.
- Lauzanne, L. 1981. Description du trois *Orestias* nouveaux du Lac Titicaca, *O. ispi* n.sp., *O. forgeti* n.sp., et *O. tchernavini* n.sp. (Pisces, Cyprinodontidae). *Cybiurn*, ser. 3, vol. 5, no. 3, pp. 71-91.
- Lauzanne, L. 1982. *Orestias* pisces cyprinodontidae in lesser lake titicaca peru bolivia. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 15, 39-70.
- Lauzanne, L. 1992. Lake Titicaca. A synthesis of limnological knowledge. Fish fauna. Native species. The *Orestias*. *Monographiae Biologicae* 68, 405-419.
- 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* 74, 502-520.
- Minchin, J. 1882. Notes of a journey through part of the Andean table-land of Bolivia in 1882, pp. 671-676. Edward Stanford.
- Müller, R. 1993. Kritische Ammerkungen zur Revision der Gattung *Orestias*(Pisces: Cyprinodontidae) durch Parenti(1984). *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 123, 31-58.
- Parenti, L. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 168, 335-557.
- Parenti, L.R. 1982. Killifishes of the Andes: the genus *Orestias*. *Journal of the American Killifish Association* 15, 185-189.
- Pellegrin, J. 1904. Mission G. de créqui-Montfort et E. Sénéchal de la grange. Norte sur les poisons des lacs Titicaca et Poopo. *Bull. Soc. Zoöl. Paris*, XXIX.
- Posada, D., Crandall, K. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50, 580.
- Rettig, S., Jones, B., Risacher, F. 1980. Geochemical evolution of brines in the Salar of Uyuni, Bolivia. *Chemical Geology* 30, 57-79.
- Risacher, F., Fritz, B. 1991. Quaternary geochemical evolution of the salars of Uyuni and Coipasa, central Altiplano, Bolivia. *Chemical Geology* 90, 211-231.
- Rowe, H., Dunbar, R., Baker, P., Grove, M., Fritz, S., Seltzer, G. 1998. Holocene-Pleistocene Paleoenvironments of Lake Titicaca.

- Saiki R. K., Geldfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuch, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239, 487 – 491.
- Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *En: Harbor, C. S. (Ed.)*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sevilla, R.G., Diez, A., Norén, M., Mouchel, O., Jerome, M., Verrez-Bagnis, V., Van Pelt, H.A., Favre-Krey, L., Krey, G. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7: 730-734.
- Sylvestre, F., Servant, M., Servant-Vildary, S., Causse, C., Fournier, M., Ybert, J. 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.
- Tschudi, J.J. Von. 1846. Ichthyologie. Pp. ii-xxx + 1-35, pls. 1-6. In: *Untersuchungen über die Fauna Peruana*. Seitzlin & Zollikofer, St. Gallen. 1844-46, in 12 parts.
- Vila, I., Pinto, M. 1986. A new species of killifish (Pisces, Cyprinodontidae) from the Chilean Altiplano. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 19, 233-239.
- Wirrmann, D., Mourguiart, P. 1995. Late Quaternary spatio-temporal limnological variations in the Altiplano of Bolivia and Peru. *Quaternary Research* 43, 344-354.
- Zardoya, R., Doadrio, I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49, 227-237.

3. Caracterización y ecología poblacional de las comunidades de peces litorales del lago Titicaca: estudio preliminar

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Dentro de los lagos altoandinos, el lago Titicaca es uno de los más profundos, con valores máximos de 150 a 285 m de profundidad y una media en gran parte del lago cercana a los 100 m. A lo largo del año posee en su mayor parte luz y condiciones de temperatura constantes (Dejoux e Ittis, 1991). Respecto a su ictiofauna el género más representativo es *Orestias* (Teleósteo, Cyprinodontidae) que a su vez, es el más extendido por los Andes, con 45 especies endémicas (Parenti, 1984; Vila *et al.*, 2007). Ya que su origen se remonta a unos 5 millones de años, presenta una alta diversidad fenotípica y ecológica, debido a que las especies componentes habitan diferentes nichos y juegan un importante papel en la cadena trófica (Lauzanne, 1982; Dejoux e Ittis, 1991).

Esquematizando podemos caracterizar tres tipos de macrohábitats en el lago: 1. zonas pelágicas, ricas en cladóceros; 2. zonas bénticas, ricas en moluscos y anfípodos; y 3. zonas litorales, ricas en macrófitas y anfípodos (Dejoux e Ittis, 1991). Debido a los hábitos alimenticios de cada especie, existe una división de los recursos y una adaptación fenotípica y genotípica especializada (Lauzanne, 1982; Dejoux e Ittis, 1991; Maldonado *et al.*, 2009). Aunque, la zona pelágica del lago Titicaca presenta pocas especies de peces en comparación con las de la zona litoral, como sucede en otros lagos tropicales (Vaux *et al.*, 1988), pueden ser abundantes como es el caso de *O. ispi* u *O.*

agassii, entre otras. Estas se caracterizan por presentar una forma del cuerpo más fusiforme que las especies bénticas o litorales (Lauzanne, 1982; Parenti, 1984).

La introducción de especies exóticas, como algunos salmónidos y del pejerrey argentino *Odontesthes bonariensis* han cambiado la dinámica poblacional de muchas especies y actualmente se desconoce en gran parte el alcance de sus impactos (Hall y Mills, 2000; Vila *et al.*, 2007). Además, la introducción de nuevas especies produjo la aparición de algunas enfermedades como el protozoo parásito *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich), que como se ha comentado anteriormente, causó mortalidades masivas de peces en 1981, afectando a 7 especies, en especial a adultos de *O. agassii* que en ese entonces representaba el 70% del total de la pesca del lago (Wurtsbaugh y Tapia, 1988). También debe tenerse en cuenta la reducción de algunos de los hábitats más importantes para algunas especies litorales, como las macrófitas, en especial *Schoenoplectus californicus ssp. tatora* (totora), debido a la explotación local.

Además del vacío de información sobre el estado poblacional, pocos estudios proveen evidencia sobre el tipo de dieta de algunas de las especies más abundantes de este género en el lago Titicaca (Lauzanne, 1982; Vaux *et al.*, 1988; Maldonado *et al.*, 2009) dejándose de lado las menos representativas. Debido al insuficiente conocimiento que se tiene sobre las relaciones ecológicas y a la composición actual de la comunidad de peces del lago Titicaca, este capítulo pretende aportar una primera aproximación al estudio de la ecología poblacional que se completará en una fase posterior.

3.2. MÉTODOS

Para capturar los peces se utilizaron artes de tipo pasivo del tipo agalleras monofilamento, que consisten en una red formada por varios paños de red de nylon de diferentes luces de malla, combinados al azar con la finalidad de armonizar la capturabilidad en toda la red. Las capturas posteriormente se expresaron en CPUE por especie (Capturas por Unidad de Esfuerzo) en función del tiempo de pesca y la superficie de la red. Las redes se colocaron a diferentes profundidades en diversas localidades y hábitats para conocer la composición faunística y la estructura poblacional. Las redes fueron puestas en cada sitio de muestreo durante la noche (ya que en premuestreos se observó una mayor capturabilidad) y fueron colectadas después de 12 horas de faena, para estandarizar las CPUEs.

Las redes utilizadas son:

- Redes de captura científica bentónicas multifilamento estandarizadas (MULTIFILAMENTO NORDEN BENTIC) (Lundgrens Fiskredskapsfabrik AB, Stockholm, Sweden), compuestas por una multimalla de monofilamento de nylon (tipo "NORDEN BENTIC"). Tienen una longitud de 30 m y 1.5 m de altura y están armadas con 12 paños de red (de 2.5 m) con luces de malla combinadas al azar de 5, 6.25, 8, 10, 12.5, 15.5, 19.5, 24, 29, 35, 43 y 55 mm.
- Redes de captura científica de muestreo pesquero (PELT) de multimalla de monofilamento de nylon. Tienen 300 m de longitud y 3 m de altura y están

armadas con 8 paños de red con luces de malla: 8, 15, 17, 20, 22, 23, 25 y 30 mm.

- Redes tradicionales de pesca artesanal (ARTESANAL) de 100 m de longitud y 3 m de altura y luces de malla selectiva en función de las especies a capturar.

3.2.1. ANÁLISIS DE DATOS

Para conocer la riqueza de las especies por localidad, tres índices de diversidad alfa (Shannon, H' ; Margalef, D_{Mg} y Berger-Parker, d), fueron calculados para obtener una mejor caracterización de la diversidad (Moreno, 2001). El índice de Shannon mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de un conjunto de muestras. Este índice considera la abundancia relativa de cada especie y es fuertemente influenciado por la presencia de especies raras. El índice de Margalef mide la relación entre la riqueza de las especies y el número total de individuos capturados. Cuando el índice es más alto, existe una mayor diversidad. El índice de Berger-Parker mide la dominancia calculando el ratio entre el número de las especies más abundantes y el número total de individuos en la muestra.

Para caracterizar las comunidades de peces en el lago se realizaron dendrogramas de agrupación por medio del programa SPSS 15.0 para Windows, el cual consistió en análisis "cluster" utilizando la distancia euclídea para crear la matriz de similitud y el enlace simple como método de agrupación.

Para realizar comparaciones de captura media en las localidades se tomó como variable dependiente las CPUE y como factor el tipo de red o la luz de malla, realizándose ambos análisis de manera independiente. Para tal fin, se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas de las CPUEs mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente. Ya que los datos no presentaban normalidad, se hicieron diversas transformaciones tales como raíz cuadrada, logaritmo natural y logaritmo en base 10 (Sokal y Rohlf, 1995).

Dado que no se cumplieron los postulados de la estadística paramétrica se decidió utilizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias en el conjunto de datos y cuando éste dio significativo, se utilizó el test de U Mann-Whitney para detectar diferencias entre cada una de las parejas de datos. Debido a que se realizaron comparaciones múltiples se corrigió el p-valor mediante el procedimiento de Benjamini y Hochberg (1995), implementado en la función “ajuste de p” del paquete estadístico R. A diferencia de otros métodos de ajuste como la corrección de Bonferroni, éste método balancea los errores tipo I y II y tiene más poder estadístico.

Tanto para la realización de los índices de diversidad como para los análisis estadísticos sólo se tuvieron en cuenta los datos cualitativos obtenidos por la red multimalla de tipo PELT y la red multifilamento NORDEN BENTIC. Además se estandarizaron por intervalos las profundidades y las luces de malla para hacer comparables los datos de capturabilidad.

Para comparar las tallas medias de las especies más abundantes en las distintas localidades se realizaron ANOVAs de una vía. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que las comparaciones se hicieron sólo con las especies abundantes y que estuvieran presentes en todas las estaciones. Para los individuos del complejo *imarpe* obtenidos en el mes de septiembre, se realizó una transformación de las longitudes furcales con Lg_{10} para tratar de normalizarlos. Ya que se mejoró la normalidad y se comprobó que los los datos presentaban homocedasticidad de varianzas (test de Levene) se optó por aplicar análisis paramétrico, en concreto ANOVA de una vía, por ser una prueba más robusta, aún asumiendo la no normalidad de los datos. Los valores de ANOVA fueron evaluados mediante una prueba de Tukey y se aceptaban diferencias estadísticamente significativas cuando el $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES

Un total de 4010 ejemplares distribuidos en 30 estaciones (2752 en febrero y 1258 en septiembre), fueron capturados para caracterizar la comunidad de peces del lago Titicaca. El género *Orestias* fue el de mayor riqueza de especies con un 81,25% (11 especies y 2 complejos) seguidas de los géneros *Trichomycterus*, *Odontesthes* y *Oncorhynchus* representado cada uno con el 6,25% (con 1 especie).

Las especies con mayores CPUE fueron el complejo *mulleri* (51,3%), *O. gilsoni* (25,6%) y *O. ispi* (6%) (Figura 23). *O. mulleri*, *O. gilsoni* y *O. ispi* son especies pelágicas generalmente de aguas interiores, aunque es probable que ocupen zonas litorales en épocas de alevinaje y reproducción. Ya han sido reportadas

como dominantes cerca del fondo (Vaux *et al.*, 1988). La CPUE de *O. agassii* puede ser debida a sus hábitos bentónicos y a que esta especie en su etapa de alevinaje habita zonas someras del litoral con gran presencia de vegetación acuática (donde fueron colocadas la mayoría de redes suecas). Además ha sido descrita su capacidad de adaptación a colonizar diversos medios ya que tiene una variada dieta alimenticia (Lauzanne, 1982).

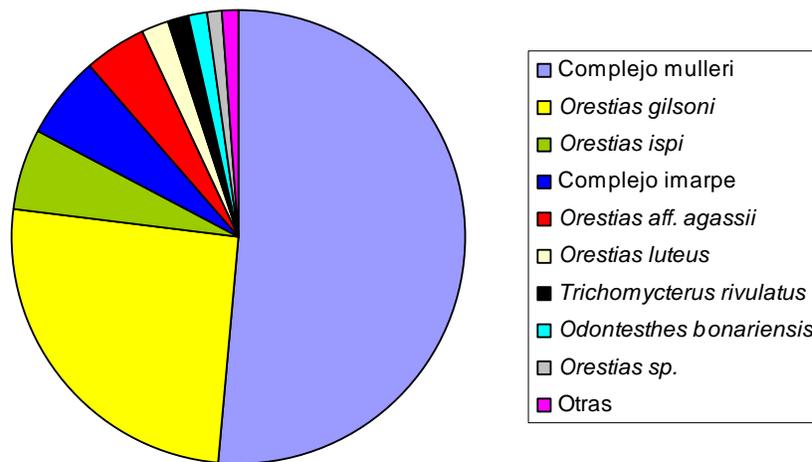


Figura 23. CPUE de las especies dominantes en el lago Titicaca.

En las localidades muestreadas con la red de muestreo pesquero tipo PELT en el mes de septiembre, se forman claramente 3 grupos principales de especies. Uno de ellos está formado por las especies de hábitos demersales y bentónicos *O. aff. agassii*, *T. rivulatus* y un grupo conformado por diferentes especies pertenecientes al género *Orestias*, algunas de ellas híbridos que pueden presentar características diferentes de los parentales. (Figura 24).

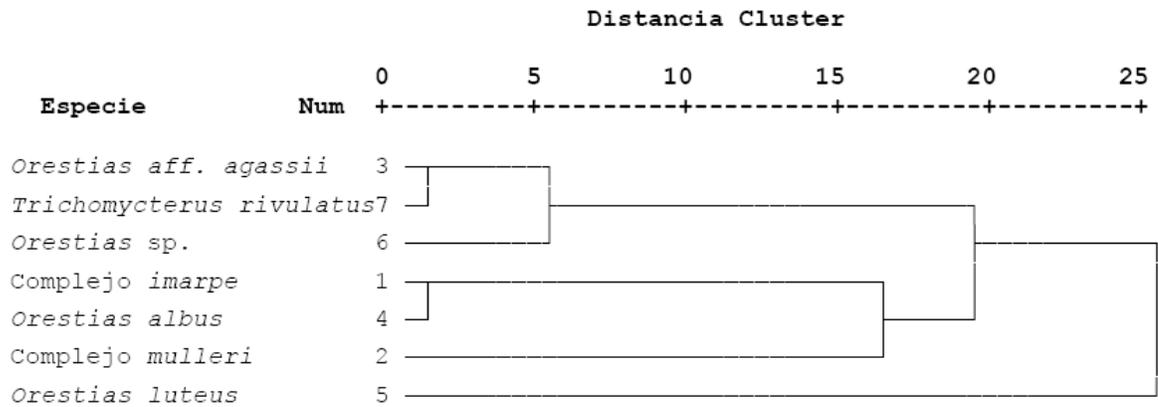


Figura 24. Dendrograma de agrupación de las principales especies del lago Titicaca capturadas (CPUE), con la red de muestreo pesquero tipo PELT en el mes de septiembre.

El otro grupo más estructurado y con afinidades mayores entre las especies, como tener hábitos pelágicos es el formado por el complejo *imarpe*, *O. albus* y *O. mulleri*. Estas especies, por lo general, son unas de las especies más dominantes del lago y de mayor explotación por parte de los pescadores (Alfaro *et al.*, 1982). Sin embargo, *O. albus* es una de las pocas especies del género que incluye peces en su dieta, y habita en fondos más profundos, lo que puede relacionar su distribución con una preferencia por especies de menor tamaño y hábitos litorales como *O. mulleri* y el complejo *imarpe* o simplemente que compartan sus hábitats.

El otro grupo está conformado por *O. luteus*. Esta especie posiblemente está separada de las demás por vivir en la zona bentónica y posiblemente debido a sus hábitos alimenticios, ya que se alimenta principalmente de pequeños moluscos (Maldonado *et al.*, 2009). Estos mismos autores han demostrado que la distribución espacial de peces como *O. luteus* se separa de otras especies con hábitos alimenticios tales como algas y cladóceros.

En las localidades muestreadas con la red sueca ubicada en el totoral se distinguen 4 grupos dominantes (Figura 25). El compuesto por *O. albus*, *O. gilsoni*, *O. luteus*, *T. rivulatus* y *O. aff. agassii*, especies demersales y bentónicas que posiblemente busquen alimento o refugio en la zona litoral. Los tres grupos restantes son el complejo *mulleri* e *imarpe* y *O. ispi*, los cuales son unas de las especies con menor talla asociadas con el totoral ya que además de obtener alimento se benefician del refugio que este hábitat ofrece.

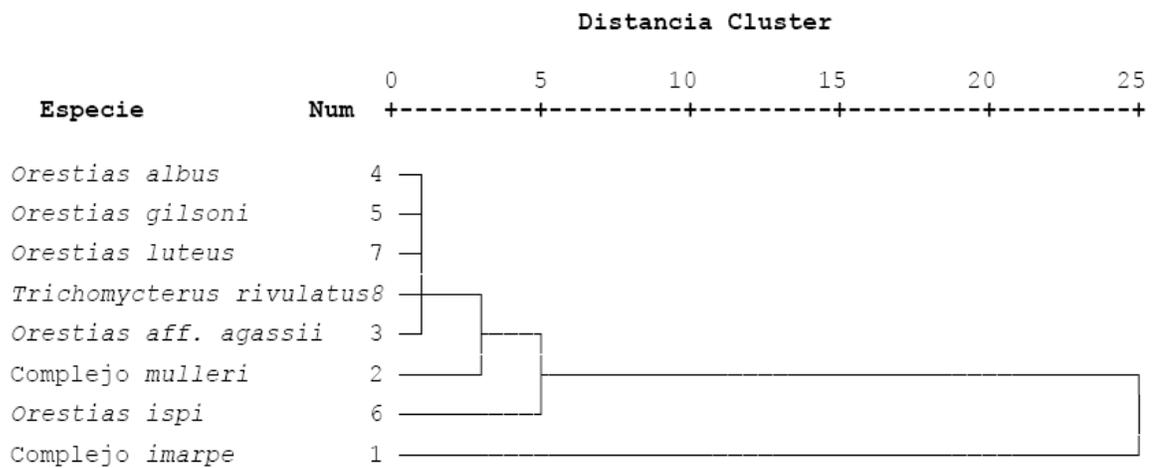


Figura 25. Dendrograma de agrupación de las principales especies del lago Titicaca capturadas (CPUE), con la red multifilamento NORDEN BENTIC en el mes de septiembre.

Las estaciones con mayor presencia de especies fueron Inka-Chaka, Barco (Chuchito) y Charcas (Nueva Alianza) (con 13, 10 y 10 especies respectivamente) (Tabla 6). Estas estaciones se caracterizan por ser bahías con variedad de sustratos lo que proporciona muchos refugios para los peces y zonas de alimentación y resguardo dadas por los diferentes tipos de hábitats, en especial el totoral.

Por el contrario las estaciones con menor presencia de especies en el lago Titicaca fueron Amacati, Sucuni e Isla de Anapia (con una especie cada una), debido posiblemente a la relación existente entre las bajas diversidades de las localidades y la poca profundidad donde se colocaron las redes lo que limitaba las especies de mayor tamaño.

Tabla 6. Distribución de las especies en las estaciones de muestreo del lago Titicaca. (x= Presencia de la especie).

Localidad	<i>Complejo imarpe</i>	<i>Complejo mulleri</i>	<i>Odontesthes bonariensis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Orestias aff. agassii</i>	<i>Orestias albus</i>	<i>Orestias cf. incae</i>	<i>Orestias crawfordi</i>	<i>Orestias forgeti</i>	<i>Orestias gilsoni</i>	<i>Orestias gracilis</i>	<i>Orestias ispi</i>	<i>Orestias luteus</i>	<i>Orestias sp.</i>	<i>Orestias tomcooni</i>	<i>Orestias uruni</i>	<i>Trichomycterus rivulatus</i>
Amacati	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	0
Bahía de Moho	0	x	0	0	x	0	x	0	0	x	0	0	x	0	0	0	0
Bahía de Tamán (Pen. Capachica)	0	x	0	0	x	x	0	x	0	x	0	x	0	0	0	0	0
Bahía de Uruni	0	x	0	0	x	0	0	x	0	x	0	x	0	0	0	x	0
Charcas, Nueva Alianza	x	x	x	0	x	x	0	0	0	x	0	x	x	x	0	0	x
Chucuito (Barco)	x	x	x	x	x	x	0	0	0	x	0	x	x	0	0	0	x
Estrecho de Tiquina	0	0	0	0	0	0	0	0	x	x	0	0	0	0	0	0	0
Guaqui	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	0	x	0	0	0	x
Huancane	x	x	x	0	x	x	0	0	0	0	0	x	x	x	0	0	x
Huatajata	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	x	0	x	0	0	x
Huencalla, Nueva Alianza	0	x	x	x	x	x	0	0	0	x	0	0	x	0	0	0	0
Inka-Chaka	x	x	x	x	x	x	0	x	0	x	x	x	x	x	0	0	x
Isla de Anapia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0
Isla de Taquiri	0	x	x	x	x	0	0	0	0	x	0	0	x	x	0	0	x
Isla del Sol	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	0	x	x	x	0	x
Itzcata	0	x	x	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0
Ojherani	x	x	x	0	x	0	0	0	0	0	0	x	x	0	0	0	x
Pomata (Villa Santiago)	x	x	0	x	x	x	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	x
Puerto Acosta	0	x	0	0	x	x	0	0	0	x	x	x	x	0	0	0	x
Puerto Carabuco (Chayapata)	0	x	0	0	0	x	0	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0
Puerto Perez	0	x	0	0	x	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	x
Río Coata	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Río Zapatillas	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Santiago de Huata	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	x	0	0	0	0	0
Santiago de Oje	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	0	0	x	0	0	0
Silustani (lago Umayo)	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Socca	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	0
Sucuni	0	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vilquechico	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	x	0	x	0	0	0
Yapura (Capachica)	0	x	x	0	x	0	0	0	0	x	0	0	0	0	0	0	x

En cuanto a los índices de diversidad alfa obtenidos con las capturas del mes de febrero, las estaciones de Chuchito (Barco), Viquechico e Inka-Chaka fueron las que tuvieron los valores más altos de diversidad ($H' = 1,59; 1,47$ y $1,38$ respectivamente), coincidiendo con unos de los valores más bajos de dominancia dados por el índice de Berger-Parker (Tabla 7).

Tabla 7. Índices de diversidad y dominancia de las especies capturadas en cada estación de muestreo en el mes de febrero.

Localidad	Shannon_H	Margalef	Berger-Parker
Bahía de Moho	0,6396	0,2042	0,6567
Bahía de Tamán (Pen. Capachica)	0,8169	0,3599	0,6757
Bahía de Uruni	1,115	0,7703	0,5667
Charcas, Nueva Alianza	1,123	0,6382	0,4636
Chucuito (Barco)	1,593	1,801	0,4235
Guaqui	1,22	0,9966	0,5828
Huatajata	0,8558	0,8562	0,657
Inka-Chaka	1,386	1,129	0,4778
Isla de Taquiri	0,7697	1,149	0,7856
Isla del Sol	1,23	2,731	0,7778
Ojherani	0,518	1,056	0,8947
Puerto Acosta	0,9756	1,189	0,5346
Puerto Carabuco (Chayapata)	0,3022	0,3699	0,9238
Puerto Perez	0,6963	0,5567	0,7808
Santiago de Huata	0,8521	0,6604	0,4824
Santiago de Oje	1,168	0,8477	0,6071
Sucuni	-0,1171	0	1
Vilquechico	1,472	1,321	0,3864
Yapura (Capachica)	0,7309	0,8257	0,7638

Del mismo modo, los valores de Isla del Sol de la relación que existe entre el número de especies y el total de individuos capturados son los más altos ($D_{Mg} = 2,731$), al igual que los de las estaciones de Chucuito (Barco) y Vilquechico ($D_{Mg} = 1.801$ y $1,321$). Ya que los valores inferiores o cercanos a 2 son considerados con zonas de baja diversidad y los cercanos a 5 de alta, se puede concluir que, en general, las localidades de muestreo presentaron una baja diversidad. A excepción de Isla del Sol (la cual está influenciada por la

cercanía al estrecho de Tiquina que separa el lago Mayor del Menor, además de ser un sitio bastante expuesto dentro del lago), la baja diversidad puede ser debida a la acción antropogénica, la introducción de especies exóticas y la destrucción de hábitats, en especial el totoral. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la diversidad taxonómica de los peces de los Andes es baja, pero con un alto grado de endemismos (Chocano, 2005).

Los índices alfa de diversidad en las dos épocas de muestreo se mantuvieron similares. Los mayores índices de diversidad obtenidos en el mes de septiembre se presentaron en las estaciones de Huancane e Inka-Chaka ($H' = 1,467$ y $1,135$ respectivamente) lo cual coincide con los más altos valores obtenidos con el índice de riqueza ($D_{Mg} = 1,446$ y $1,512$ respectivamente) y la más baja dominancia observada en Huancane ($d = 0,585$) (Tabla 8).

Tabla 8. Índices de diversidad y dominancia de las especies capturadas en cada estación de muestreo en el mes de septiembre.

Localidad	Shannon_H	Margalef	Berger-Parker
Charcas, Nueva Alianza	1,054	1,202	0,5956
Chucuito (Barco)	0,6153	1,057	0,866
Huancane	1,467	1,446	0,585
Inka-Chaka	1,135	1,512	0,639
Pomata (Villa Santiago)	0,9918	1,196	0,7351

El factor de condición se utiliza como biomarcador para indicar el estado nutricional de los peces y para inferir su estado de salud (Van der Oost *et al.*, 2003, Neff y Cargnelli, 2004). No obstante, está relacionado con muchos factores que dificultan su interpretación tales como sexo, madurez sexual, contaminación, disponibilidad de alimento, etc. En el mes de febrero las estaciones con más bajos coeficientes del factor de condición fueron la

estación de Inka-Chaka para los individuos de *O. mykiss*, *O. aff. agassii*, *O. gracilis*, *O. luteus* y *T. rivulatus* ($k= 0,0005$; $0,0007$; $0,0004$; $0,001$; $0,0004$ respectivamente) y Santiago de Huata para *O. bonariensis* y *O. ispi* ($k= 0,0003$ $0,0002$ respectivamente) (Anexo 2.1). En general en este mes, la localidad que presentó los mejores factores de condición fue Chucuito (Barco) para especies como *O. aff. agassii* y *O. albus*.

En el mes de septiembre la estación de Inka-Chaka volvió a tener los más bajos coeficientes del factor de condición para individuos del complejo *imarpe*, *O. aff. agassii*, *O. ispi* ($k= 0,0006$; $0,001$; $0,00005$ respectivamente) junto a Charcas (Nueva Alianza) para individuos del complejo *mulleri*, *O. albus* y *T. rivulatus* ($k= 0,015$; $0,001$ y $0,0008$ respectivamente) (Anexo 2.2). Los mayores factores de condición se observaron en Huancané para *O. albus*, *O. ispi* y *T. rivulatus* ($k= 0,002$; $0,0002$; $0,001$ respectivamente) y nuevamente en Chucuito (Barco) para el complejo *imarpe* ($k= 0,001$), *O. mykiss* ($k= 0,001$) y *O. luteus* ($k= 0,002$). Por lo tanto, estaciones como Santiago de Huata, Charcas (Nueva Alianza) y en especial Inka-Chaka, deben estar influenciadas por algún tipo de impacto ambiental que afecte negativamente las especies ícticas. Ya que los datos del presente trabajo no permiten aclarar que tipo de factor es el que está influyendo sobre las especies encontradas, se recomienda realizar un estudio de impacto ambiental en estas zonas.

Al comparar las longitudes medias de cada especie por localidad, los análisis muestran que para el complejo *imarpe*, los peces de las localidades de Pomata y Chucuito (Barco) son de talla más pequeña que el resto de localidades (test de Tukey, $p<0,05$). Por otra parte, la localidad de Huancané presenta los

individuos de *O. aff agassii* con tallas más grandes con respecto a las demás localidades (test de Tukey, $p < 0,05$). Dicha variabilidad poblacional puede ser debida a diferencias intraespecíficas, ya que algunas especies presentan una gran plasticidad fenotípica que puede dar lugar a subpoblaciones o a diferencias de tipo taxonómico.

3.3.2. SELECTIVIDAD DE LOS ARTES DE PESCA

La selectividad de los artes de pesca tiene importancia, tanto desde un punto de vista científico (conservación de la ictiofauna) como de sostenibilidad de los recursos pesqueros de la región. La instalación simultánea de redes red multimalla de tipo PELT en aguas abiertas y de las redes de captura científica multifilamento NORDEN BENTIC en la zona de totoral, en cinco localidades, permitió comparar las capturas de cada una de las luces de malla por arte de pesca y también las capturas entre localidades. Por el contrario, no pudieron ser comparadas las capturas entre tipo de redes puesto que los artes de pesca utilizados en totoral y en zonas de aguas abiertas fueron diferentes.

A continuación se detallan las capturas obtenidas por cada uno de los artes y zona muestreada, tanto en términos de capturas medias para el conjunto de las especies como en capturas por especie. Con el fin de facilitar la comprensión al lector, se ha estructurado el presente apartado por zona de muestreo (totoral y aguas abiertas) para el estudio detallado y se reserva un apartado especial para la explicación de las medidas de conservación que se derivan de los resultados obtenidos.

3.3.2.1. Zona de totoral

Las cinco localidades muestreadas en totoral no presentaron diferencias significativas en cuanto a capturas (CPUEs) ($p > 0,05$) (Figura 26). Por este motivo, se utilizó el conjunto de los datos en el análisis de luz de malla sin considerar cada localidad como una unidad independiente. Dicho análisis puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las luces de malla utilizadas, obteniéndose mayores capturas con una luz de malla inferior a 10 mm y no detectándose captura alguna a partir de la luz de malla superior a los 16 mm ($p < 0,05$) (Figura 27). La luz de malla de 8 mm es la que presenta mayor captura de todas las utilizadas, seguida de la luz de malla 6,25 y 5 mm.

En términos de captura por especie, se vuelve a poner de manifiesto que las redes con luz de malla inferior a 10 mm son las que presentan mayores CPUEs (Figura 28). No obstante, este análisis permite conocer cuáles son las especies que están representadas en cada una de las luces de malla. Así pues, se observa claramente como *O. ispi* y los complejos *imarpe* y *mulleri* son las especies que presentan mayores capturas con una luz de malla inferior a 10 mm.

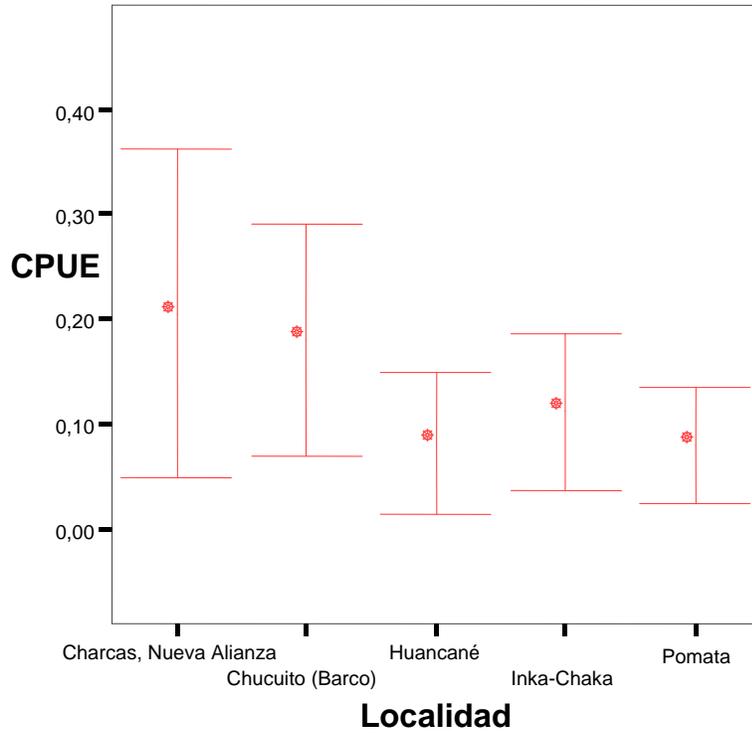


Figura 26. Capturas medias (CPUEs) de peces en las cinco localidades muestreadas en la zona de totoral del lago Titicaca. Se muestran los intervalos de confianza para la media.

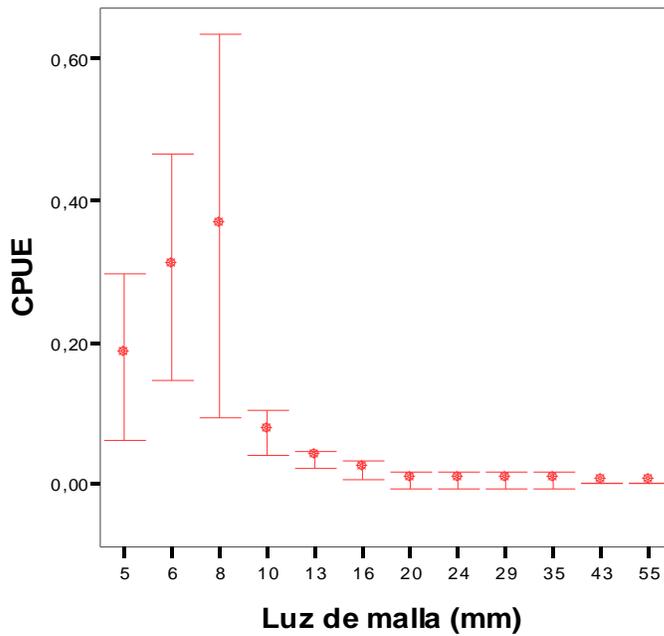


Figura 27. Capturas medias (CPUEs) de peces en las diferentes luces de malla utilizadas durante los muestreos de la zona de totoral del lago Titicaca. Se muestran los intervalos de confianza para la media.

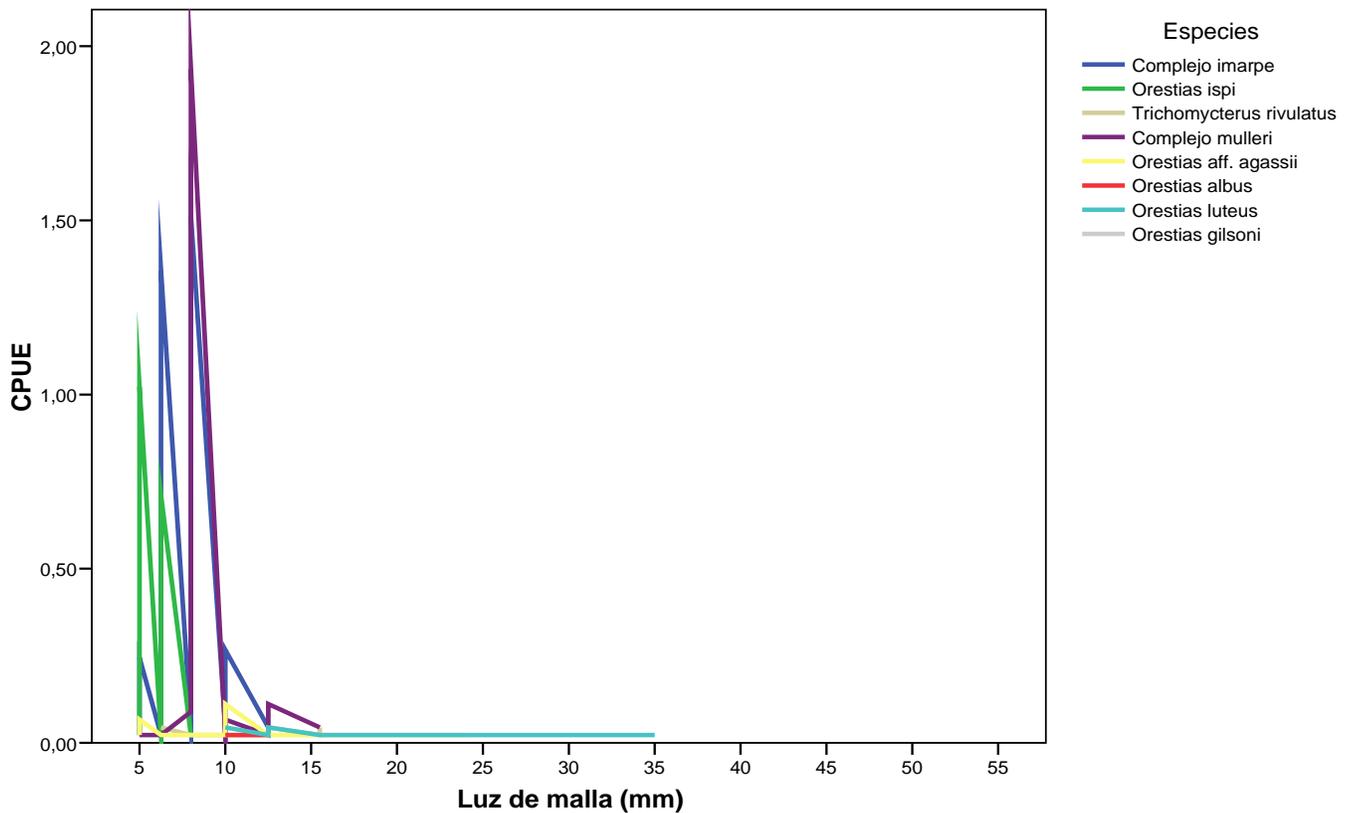


Figura 28. Capturas medias (CPUEs) por especie en las diferentes luces de malla utilizadas durante los muestreos de la zona de totoral del lago Titicaca.

Las redes con luz de malla superior a 10 mm continúan capturando algunas de las especies anteriores (complejos *mulleri* e *imarpe*), si bien las capturas son muy inferiores. En cambio, se capturan otras especies como *O. aff. agassii*, *O. albus* u *O. luteus*, si bien las CPUEs son muy inferiores. Otras especies de captura minoritaria en la zona de totoral son *T. rivulatus* y *O. gilsoni* y se capturarían preferentemente con redes con luz de malla inferior a 6 mm.

3.3.2.2. Zona de aguas abiertas

Las cinco localidades muestreadas en aguas abiertas tampoco presentaron diferencias significativas en cuanto a capturas (CPUEs) ($p > 0,05$) (Figura 29).

No obstante, sí puede observarse desde un punto de vista gráfico, que la

localidades de Huancané y Pomata son las que presentaron mayores y menores capturas en promedio, con respecto al resto de localidades.

Sin embargo, como desde un punto de vista estadístico no se detectaron diferencias entre estaciones de muestreo, se utilizó el conjunto de los datos en el análisis de luz de malla, sin considerar cada localidad como una unidad independiente. Dicho análisis puso de manifiesto también la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en las luces de malla utilizadas ($p > 0,05$) (Figura 30).

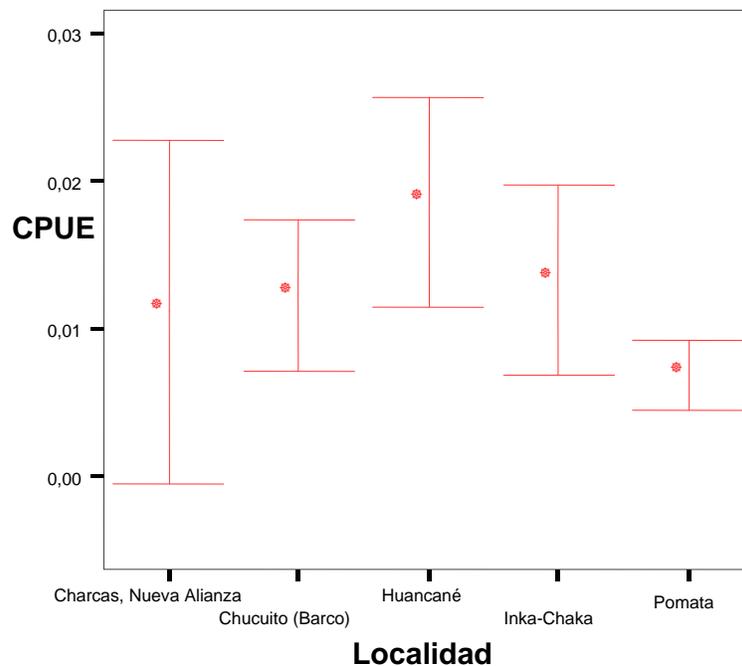


Figura 29. Capturas medias (CPUEs) de peces en las cinco localidades muestreadas en la zona de aguas abiertas del lago Titicaca. Se muestran los intervalos de confianza para la media.

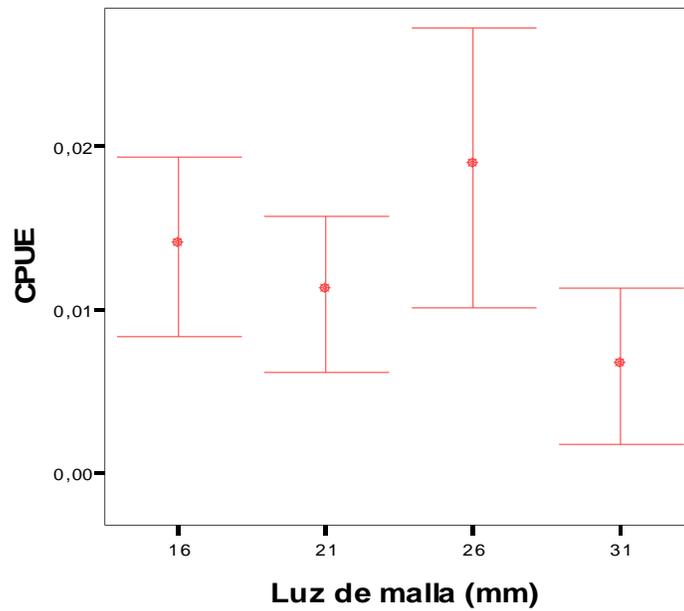


Figura 30. Capturas medias (CPUEs) de peces en las diferentes luces de malla utilizadas durante los muestreos de la zona de aguas abiertas del lago Titicaca. Se muestran los intervalos de confianza para la media.

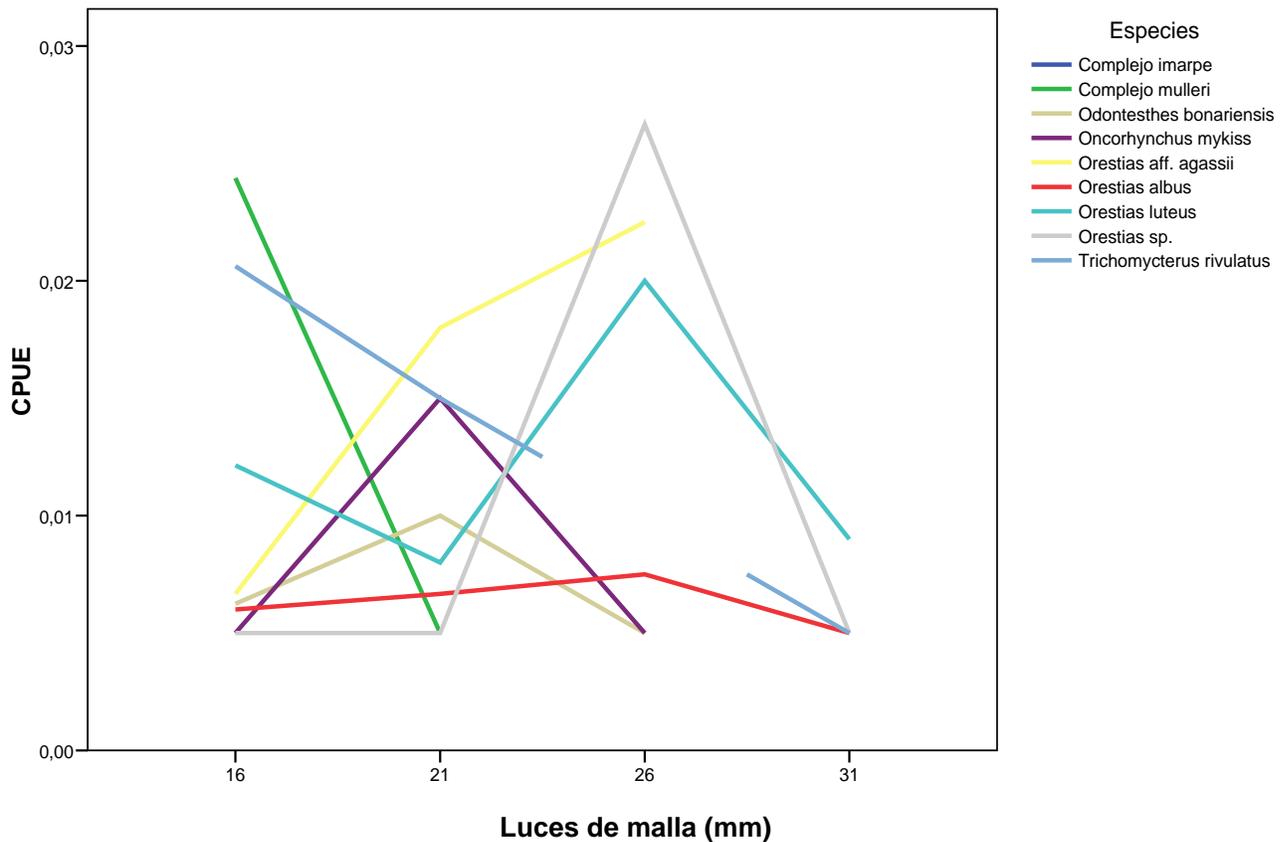


Figura 31. Capturas medias (CPUEs) por especie en las diferentes luces de malla utilizadas durante los muestreos de la zona de aguas abiertas del lago Titicaca.

Debe destacarse que las capturas por especie no fueron muy elevadas (rango 0,01-0,03 CPUEs), hablando por tanto de diferencias mínimas en términos de CPUEs. Este hecho puede deberse a las luces de malla utilizadas, al margen de la presencia o no, de las especies estudiadas en aguas abiertas (Figura 31). Aún así, las luces de malla que presentaron más capturas fueron las de 16 y 26 mm, seguidas de la de 21 mm y, finalmente, la de 31 mm.

Por especie, cabe destacar la mayor captura de *T. rivulatus*, de los complejos *mulleri* e *imarpe* en la luz de malla de 16 mm. Es resaltable también, la mayor captura de las dos especies introducidas (*O. bonariensis* y *O. mykiss*) y la escasa captura de especies autóctonas en la luz de malla de 21 mm a excepción *O. aff. agassii*. Si bien, esta última presenta una mayor captura en la luz de malla de 26 mm.

3.3.2.3. Medidas de conservación

La zona de totoral se comporta como *nursery* o refugio de peces en el lago, de modo que debieran evitarse o minimizarse al máximo las actividades pesqueras en la zona, declararse periodos de veda y establecer un control de capturas en cuanto a los artes de pesca permitidos. La comparación entre artes de pesca y el impacto de los mismos se escapa de los objetivos del presente trabajo, aún pudiéndose extraer unas primeras conclusiones.

El estudio de selectividad de redes llevado a cabo en la zona de totoral pone de manifiesto que la mayoría de los individuos se capturaron con redes de luz de malla pequeña y son, por tanto, los juveniles o las especies de escasa talla las más amenazadas. Las mayores capturas obtenidas son de especies de hábitats litorales generalmente bentónicos o demersales asociados a la costa. Este patrón de más baja riqueza en la comunidad de los peces pelágicos es bastante común en lagos templados y tropicales, aunque muchas veces la biomasa pelágica sea más alta (Moyle y Cech, 1982).

En caso que, por motivos sociales o económicos, deba seguir siendo explotada dicha zona, la recomendación sería la utilización de luces de malla superiores a 10 mm. Aunque seguirán habiendo capturas con esta luz de malla, se minimizaría el impacto sobre las poblaciones de la mayoría de especies, ya que presentan picos de capturas en luces de malla inferiores. De reducirse un poco más la luz de malla a los 8 mm, debe tenerse en cuenta que las especies más afectadas serían los complejos *mulleri* e *imarpe*, pero especialmente el primero, dado que el único pico de captura que presenta la especie se da en esta luz de malla.

Por otro lado, dicha luz de malla tiene un especial interés desde el punto de vista de rendimiento pesquero, ya que el volumen de capturas aumenta notablemente en comparación con la luz de malla de 10 mm. Dado que no se detectaron diferencias significativas en cuanto a volumen de capturas entre localidades, una posibilidad sería la explotación rotatoria de las localidades de pesca, no explotándose todas a la vez y estableciendo refugios de pesca o zonas protegidas. Por motivo de sostenibilidad de la pesca en el lago, debieran evitarse las capturas con artes demasiado selectivos para especies de pequeño tamaño como las “isperas” que ejercen una presión pesquera demasiado fuerte sobre especies de pequeño tamaño, pero también sobre los juveniles y reclutas de otras muchas especies.

En el caso de aguas abiertas, no se observan diferencias significativas en cuanto a las redes de pesca utilizadas ni en cuanto a las localidades muestreadas. Así mismo, dado el reducido número de capturas obtenido, es difícil extraer conclusiones. Sin embargo, es posible que las capturas realizadas no representen la composición de la comunidad pelágica del lago.

3.4. BIBLIOGRAFÍA

Alfaro, R., Bustamante, E., Torres, J., Treviño, H., y Wurtsbaügh, W.A. 1982. La pesca en el Lago Titicaca, presente y futuro. Inf. Final Proyecto FAO. PER-76.022. Roma, 59 pp.

Benjamini, Y., y Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Society. Series B (Methodological)*. 57:289-300.

Chocano, L. 2005. Las zonas altoandinas peruanas y su ictiofauna endémica. *Revista Digital Universitaria* 6(8):1-13
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art82/int82.htm>

Dejoux, C., e Ittis, A. 1991. El lago Titicaca. La Paz, Bolivia: HISBOL.

Hall, S.R. y Mills, E.L. 2000. Exotic species in large lakes of the world. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3(1): 105-135.

Lauzanne, L. 1982. Les *Orestias* (Pisces, Cyprinodontidae) du petit lac Titicaca. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*, 15: 39-70.

Maldonado, E., Hubert, N., Sagnes, P., y De Mérona, B. 2009. Morphology-diet relationships in four killifishes (Teleostei, Cyprinodontidae, *Orestias*) from Lake Titicaca. *Journal of Fish Biology*, 74: 502-520.

Moreno C. E. 2001. Methods to measure biodiversity. M&T – Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.

Moyle, P.B., y Cech, J.J. 1982. *Fishes: an introduction to ichthyology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Neff, B., Cargnelli, L. 2004. Relationships between condition factors, parasite load and paternity in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Environ. Biol. Fishes*, 71: 297-304.

Parenti, L. 1984. A taxonomic revision of the Andean Killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 168: 335-557.

Sokal, R.R., y Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W.H Freeman (Ed.). New York. 650 pp.

Vaux, P., Wurtsbaügh, W., Treviño, H., Marifio, L., Bustamante, E., Tortes, J., Richerson, P., y Alfaro, R. 1988. Ecology of the pelagic fishes of Lake Titicaca, Perú-Bolivia. *Biotrópica*, 20: 220-229.

Wurtsbaügh, W.A., y Tapia, R.A. 1988. Mass mortality of fishes in Lake Titicaca (Peru-Bolivia) associated with the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 117: 213-217.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.

Vila, I., Pardo, R., Scott, S. 2007. Freshwater fishes of the Altiplano. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 10(2): 201-11.

4. Anexos

Anexo 1. Estudio genético de las especies ícticas nativas del lago Titicaca

Anexo 1.1. Relación de Individuos de *Orestias* analizados.

Especies	Localidad	No. Individuos
<i>O. aff. agassii</i>	Laguna Saracocha	3
<i>O. aff. agassii</i>	Sillustani	1
<i>O. aff. agassii</i>	Bahía de Uruni	1
<i>O. aff. agassii</i>	Río Lampa	3
<i>O. aff. agassii</i>	Río Ramis	1
<i>O. aff. agassii</i>	Isla del Sol	2
<i>O. aff. agassii</i>	Isla Taquiri	5
<i>O. aff. agassii</i>	Santiago de Ojje	4
<i>O. aff. agassii</i>	Amacati Corpacitca	1
<i>O. aff. agassii</i>	Isla de Anapia	2
<i>O. aff. agassii</i>	Sotalaya	2
<i>O. aff. agassii</i>	Puerto Acosta	3
<i>O. aff. agassii</i>	Ojjchi - Escoma	2
<i>O. aff. agassii</i>	Carabuco-Chayapata	3
<i>O. aff. agassii</i>	Isla Pariti	4
<i>O. aff. agassii</i>	Puerto Pérez	3
<i>O. aff. agassii</i>	Cuyahue-Kumara-Coana	2
<i>O. aff. agassii</i>	Acohuaya	3
<i>O. aff. agassii</i>	Bahía de Coata	7
<i>O. aff. agassii</i>	Santiago de Huata	2
<i>O. aff. agassii</i>	Lojarcachi-Ancora	2
<i>O. albus</i>	Huencalla, Nueva Alianza	2
<i>O. albus</i>	Tilali	2
<i>O. albus</i>	Río Ramis	3
<i>O. albus</i>	Puerto Acosta	2
<i>O. albus</i>	Carabuco-Chayapata	2
<i>O. crawfordi</i>	Bahía de Tamán	2
<i>O. crawfordi</i>	Bahía de Tamán	5
<i>O. crawfordi</i>	Bahía de Uruni	1
<i>O. crawfordi</i>	Bahía de Uruni	2
<i>O. ctenolepis</i>	Río Zapatilla	6
<i>O. ctenolepis</i>	Acohuaya	3
<i>O. farfani</i>	Isla del Sol	1
<i>O. farfani</i>	Amacati Corpacitca	5
<i>O. farfani</i>	Estrecho de Tiquina	1
<i>O. farfani</i>	Guaqui	4
<i>O. farfani</i>	Isla Pariti	1
<i>O. farfani</i>	Sillustani	2
<i>O. forgeti</i>	Japiasi	1
<i>O. forgeti</i>	Isla del Sol	1
<i>O. forgeti</i>	Yampupata	1
<i>O. forgeti</i>	Estrecho de Tiquina	3
<i>O. frontosus</i>	Isla del Sol	1
<i>O. frontosus</i>	Isla Taquiri	3
<i>O. frontosus</i>	Amacati Corpacitca	3
<i>O. frontosus</i>	Isla de Anapia	1
<i>O. frontosus</i>	Lojarcachi-Ancora	1
<i>O. gilsoni</i>	Iscata	1

<i>O. gilsoni</i>	Huencalla, Nueva Alianza	2
<i>O. gilsoni</i>	Bahía de Uruni	1
	Bahía de Moho-Muelle	
<i>O. gilsoni</i>	Cariquita	2
	Península Soto	
<i>O. gilsoni</i>	Copacabana	1
<i>O. gilsoni</i>	Estrecho de Tiquina	2
<i>O. gilsoni</i>	Isla Taquiri	3
<i>O. gilsoni</i>	Ajllata	3
<i>O. gilsoni</i>	Puerto Acosta	8
<i>O. gilsoni</i>	Puerto Acosta	1
<i>O. gilsoni</i>	Puerto Pérez	2
<i>O. gracilis</i>	Incachaca- Copacabana	4
<i>O. gracilis</i>	Tepeje Copacabana	1
<i>O. gracilis</i>	Puerto Acosta	3
	Península Soto	
<i>O. gracilis</i>	Copacabana	1
<i>O. grupo gilsoni</i>	Yapura	1
<i>O. grupo gilsoni</i>	Yampupata	2
<i>O. grupo luteus</i>	Tilali	4
<i>O. grupo mulleri</i>	Yapura	1
	Península Soto	
<i>O. sp. grupo mulleri</i>	Copacabana	1
<i>O. imarpe</i>	Ojherani, Puno	4
	Bahía de Moho-Muelle	
<i>O. incae</i>	Cariquita	3
<i>O. ispi</i>	Bahía de Tamán	1
<i>O. ispi</i>	Tepeje Copacabana	2
<i>O. ispi</i>	Estrecho de Tiquina	1
<i>O. ispi</i>	Ajllata	2
<i>O. luteus</i>	Río Ramis	2
<i>O. luteus</i>	Isla Taquiri	2
<i>O. luteus</i>	Santiago de Ojje	1
<i>O. luteus</i>	Amacati Corpacitca	1
<i>O. luteus</i>	Estrecho de Tiquina	1
<i>O. luteus</i>	Sotalaya	1
<i>O. luteus</i>	Puerto Acosta	1
<i>O. luteus</i>	Guaqui	1
<i>O. luteus</i>	Ojjchi - Escoma	2
<i>O. luteus</i>	Carabuco-Chayapata	2
<i>O. luteus</i>	Lojarcachi-Ancora	2
<i>O. luteus</i>	Isla Pariti	3
<i>O. luteus</i>	Cuyahue-Kumara-Coana	2
<i>O. luteus</i>	Sillustani	1
<i>O. luteus</i>	Bahía de Coata	3
<i>O. minimus</i>	Sucuni	1
<i>O. mulleri</i>	Iscata	1
<i>O. mulleri</i>	Huencalla, Nueva Alianza	1
<i>O. mulleri</i>	Yapura	1
<i>O. mulleri</i>	Cotos Capachica	1
<i>O. mulleri</i>	Incachaca- Copacabana	1
<i>O. mulleri</i>	Yampupata	5
<i>O. mulleri</i>	Santiago de Ojje	6
<i>O. mulleri</i>	Estrecho de Tiquina	5
<i>O. mulleri</i>	Isla Taquiri	3
<i>O. mulleri</i>	Santiago de Huata	3
<i>O. mulleri</i>	Ajllata	3
<i>O. mulleri</i>	Puerto Acosta	2

<i>O. mulleri</i>	Guaqui	5
<i>O. mulleri</i>	Puerto Pérez	4
<i>O. mulleri</i>	Cuyahue-Kumara-Coana	1
<i>O. mulleri</i>	Tepeje Copacabana	1
<i>O. mulleri</i>	Puerto Acosta	1
<i>O. multiporis</i>	Río Lampa	5
<i>O. pentlandi</i>	Laguna Saracocha	1
<i>O. puni</i>	Sillustani	1
<i>O. puni</i>	Bahía de Uruni	2
<i>O. puni</i>	Guaqui	1
<i>O. richersoni</i>	Río Coata	6
<i>O. richersoni</i>	Uros	2
<i>O. robustus</i>	Sucuni	1
<i>O. rotundipinnis</i>	Tilali	1
<i>O. rotundipinnis</i>	Guaqui	1
<i>O. rotundipinnis</i>	Lojarcachi-Ancora	1
<i>O. sp.</i>	Sillustani	1
<i>O. sp.</i>	Río Lampa	1
<i>O. sp.</i>	Coacia-Vilquechico	4
<i>O. sp.</i>	Guaqui	1
<i>O. sp. Grupo gilsoni</i>	Ajllata	1
<i>O. taquiri</i>	Isla Taquiri	6
<i>O. taquiri</i>	Santiago de Huata	3
<i>O. taquiri</i>	Ajllata	4
<i>O. taquiri</i>	Puerto Pérez	3
<i>O. toomcooni</i>	Inka-Chaka- Copacabana	3
<i>O. toomcooni</i>	Tepeje Copacabana	1
<i>O. tutini</i>	Isla Taquiri	3
<i>O. uruni</i>	Bahía de Tamán	2
<i>O. uruni</i>	Bahía de Tamán	1
<i>O. uruni</i>	Bahía de Uruni	5

Anexo 1.2. Campaña de muestreo noviembre del 2008.

ACTIVIDAD DESARROLLADA	FECHA
Llegada a Lima.	05.11.2008
Llegada al aeropuerto de Juliaca, traslado a Puno	07.11.2008
Muestreo en río Desaguadero Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 20 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> , incluyendo la especie <i>O. agassii</i> . Además de llevarse a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	08.11.2008
Muestreo en Ojherani y en Chuchito, Sector Barco Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 208 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> , incluyendo las especies: <i>O. agassii</i> , <i>O. albus</i> , <i>O. farfani</i> , <i>O. imarpe</i> , <i>O. ispi</i> , <i>O. puni</i> y <i>O. luteus</i> . Del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además de llevarse a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	10.11.2008 y 15.11.2008
Muestreo en Kella-Ahuyo, Huancané y Arapa. Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 22 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i> , <i>O. albus</i> , <i>O. farfani</i> , <i>O. frontosus</i> , <i>O. luteus</i> , <i>O. rotundipinnis</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio.	11.11.2008

Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	
Muestreo en Huencalla (Nueva Alianza) y Socca Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 110 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. robustus</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. tschudii</i> y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	12.11.2008
Muestreo en diferentes punto cercanos a las comunidades de Uros , así como Isla de Taquile e I. de Amantani Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 71 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. olivaceus</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. robustus</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. sp.</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	13.11.2008
Muestreo en Atuncolla, lago Umayo, Huatta, Coata y Capachica. Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 72 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. olivaceus</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. richersoni</i>, <i>O. sp.</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	14.11.2008
Muestreo en Huancané, Moho, Vilquechico, Iscata y Conima Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 174 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. crawfordi</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. olivaceus</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>) y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	16.11.2008
Muestreo en Pilcuayo, Iscata y varias localidades en el distrito de Yunguyo Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 23 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. albus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	17.11.2008
Muestreo en Vilurcuni . Traslado a Bolivia. Muestreo en Titoyupanqui e Iscaya en Parque Unguyo. Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 59 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>) y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	18.11.2008

Muestreo en Visalaya, Huatajata, Ojelaya en el estrecho de Tiquina, Sorejapa y Copancara en Huarina , e Inka Chaka, Inca Huata, Titicachi y Sicuani en Copacabana, Bolivia. Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 172 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. crawfordi</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. imarpe</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. richersoni</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. sp.</i> (grupo <i>luteus</i>) y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	19.11.2008
Muestreo en Kazani, Loq'a, Sabina, Isla Jamithi, Santiago de Ojje, Chicharro, Compuri y Umasuyo . Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 24 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i> y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	20.11.2008
Muestreo en diversas localidades en Morrocollo, Achacachi, Carabuco, Saypampa, Sotalaya, Escoma y Puerto Acosta . Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 72 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> . Incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. sp.</i> (grupo <i>luteus</i>) y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	21.11.2008
Muestreo en Desaguadero . Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 19 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> . incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. sp.</i> (grupo <i>luteus</i>) y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	22.11.2008
Embalaje de muestras para traslado	23.11.2008
Traslado a Aeropuerto y viaje a Lima	24.11.2008
Viaje y llegada a Madrid	25- 26.11.2008

Anexo 1.3. Trabajo de colecciones y laboratorio 2008.

Procesamiento y determinación de los ejemplares colectados en la Colección de Peces del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid y planeación metodológica del análisis genético	1- 12.12.2008
Ensayo de condiciones de amplificación y secuenciación	15- 19.12.2008
Extracción, amplificación y secuenciación de muestras (aproximadamente 150 muestras representativas de morfotipos y de las distintas zonas del lago)	22.12.2008- 9.01.2009
Alineación de secuencias y análisis filogenético	10- 30.01.2009
Identificación de linajes y de zonas a cubrir en el siguiente muestreo	01- 03.02.2009

Anexo 1.4. Campaña de muestreo febrero 2009.

ACTIVIDAD DESARROLLADA	FECHA
Llegada a Lima	05.02.2009
Llegada al Aeropuerto de Juliaca y traslado a Puno	07.02.2009
Estandarización de condiciones de pesca y toma de parámetros ecológicos	08.02.2009
Muestreo en Barco y Chuchito . Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 15 individuos* de la especie <i>Orestias imarpe</i> , además de llevarse a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas	09.02.2009.
Muestreo en Iscata, Socca y diferentes puntos en Nueva Alianza Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 30 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> , incluyendo las especies: <i>O. albus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i> y <i>O. rotundipinnis</i> . Además de llevarse a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas	10.02.2009
Procesamiento del muestreo en la Bahía de Tamán, Río Coata y lago Umayo Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 42 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo del género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. crawfordi</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. multiporis</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. uruni</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas	11.02.2009
Muestreo y procesamiento de las localidades: Bahía de Uruni y Cotos Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 25 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> incluyendo las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. crawfordi</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. puni</i> y <i>O. uruni</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas	12.02.2009
Muestreo en Tilali , Sector Amsta Watasani y río Lampa Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 50 individuos* de especies nativas del género <i>Orestias</i> incluyendo las especies: <i>O. sp.</i> (grupo <i>luteus</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>agassii</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. multiporis</i>, <i>O. olivaceus</i> y <i>O. rotundipinnis</i> . Además del registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	13.02.2009
Muestreo en Sucuni, Conima, Vilquechico, Moho, río Ramis y río Zapatilla Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 91 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. sp.</i> (grupo <i>agassii</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. incae</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. minimus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. robustus</i>, <i>O. rotundipinnis</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. rivulatus</i> . Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	14.02.2009

<p>Traslado a Bolivia y muestreo en InKa Chaka, Copacabana</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 51 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. olivaceus</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. tomcooni</i> y una especie del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.</p> <p>Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.</p>	16.02.2009
<p>Muestreo en Isla del Sol</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 69 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. tomcooni</i> y una especie del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.</p> <p>Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.</p>	17.02.2009
<p>Muestreo en Inka Chaka, Soto, Yampupata y Tejepe, península de Copacabana</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 74 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. crawfordi</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. tomcooni</i> y una especie del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.</p> <p>Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.</p>	18.02.2009
<p>Muestreo en Isla Taquiri, Isla de Anapia, Santiago de Ojje, Amacati y en el Estrecho de Tiquina en Camacati</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 133 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. taquiri</i>, <i>O. tutini</i> y del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. sp.</i> y <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.</p> <p>Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.</p>	19.02.2009
<p>Muestreo en Santiago de Huata, Ajllata y Huatajata</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 100 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. sp.</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. forgeti</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. taquiri</i> y del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.</p> <p>Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.</p>	20.02.2009
<p>Muestreo en Sotalaya, Puerto Acosta, Ojchi en Escoma, Carabuco y Lojarcachi</p> <p>Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 167 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i>, incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. sp.</i> (complejo <i>gilsoni</i>), <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. olivaceus</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. rotundipinnis</i>, <i>O. taquiri</i> y del género <i>Trichomycterus</i>: <i>T. rivulatus</i>. Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico</p>	21.02.2009

del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	
Muestreo en Guaqui, Isla Pariti y varios puntos dentro de la bahía de Puerto Pérez Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 167 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. taquiri</i> y del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. sp</i> y <i>T. rivulatus</i> . Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	22.02.2009
Muestreo en Uros, Bahía de Coata y lago Umayo Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 94 individuos* de especies nativas de los géneros <i>Orestias</i> y <i>Trichomycterus</i> , incluyendo en el género <i>Orestias</i> las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. ctenolepis</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. richersoni</i>, <i>O. taquiri</i> , y una especie del género <i>Trichomycterus</i> : <i>T. sp</i> y <i>T. rivulatus</i> . Además de llevar a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio. Actividades para el estudio genético (por individuo): registro fotográfico, toma de muestra de aleta y observaciones morfológicas.	23.02.2009
Procesamiento y embalaje de muestras	24.02.2009
Traslado a Aeropuerto de Juliaca viaje a Lima	25.02.2009
Viaje a Madrid	26.02.2009

Anexo 1.5. Trabajo de colecciones y laboratorio.

Procesamiento y determinación de los ejemplares colectados durante la última campaña en Colección de Peces del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid y planeación metodológica del análisis genético restante	2- 31.03.2008
Ensayo de condiciones de amplificación y secuenciación de genes mitocondriales y nucleares	01- 10.04.2008
Extracción, amplificación y secuenciación de muestras (447 muestras en total del lago y ríos afluentes)	13.04.2009- 31.06.2009
Alineación de secuencias y análisis filogenéticos	01.07.2008- 31.08.2009

Anexo 2. Caracterización y estructura poblacional de las comunidades de peces litorales del lago Titicaca.

Anexo 2.1. Parámetros biométricos por localidad en relación a la longitud furcal de las especies capturadas en el mes de febrero (DS= Desviación estandar; K= Factor de condición).

Localidad	Especie	Promedio	DS	Mínimo	Máximo	K
Amacati	<i>Orestias luteus</i>	130,8333	20,124	95	147	0
Bahía de Moho	<i>Complejo mulleri</i>	61,7619	13,382	40	82	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	56,825	3,5582	50	66	0
Bahía de Tamán (Pen. Capachica)	<i>Complejo mulleri</i>	67,26316	14,904	37	88	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	68,8	18,301	40	100	0
	<i>Orestias ispi</i>	73,8	9,7616	56	90	0
Bahía de Uruni	<i>Complejo mulleri</i>	64,5	9,8469	40	85	0
	<i>Orestias aff. agassii</i>	80	0	80	80	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	58,25	7,6463	46	70	0
	<i>Orestias ispi</i>	60,47059	9,3148	50	77	0
Charcas, Nueva Alianza	<i>Complejo mulleri</i>	71,5	7,2938	54	84	0,00192
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	61,5	18,253	40	90	0,00051
	<i>Orestias gilsoni</i>	56,73913	4,07	52	70	0,00177
	<i>Orestias ispi</i>	82	0	82	82	0,00071
Chucuito (Barco)	<i>Complejo imarpe</i>	56,2	4,9699	53	65	0,00144
	<i>Complejo mulleri</i>	79,06667	6,3072	68	92	0,00223
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	215	0	215	215	0,00063
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	157,4	7,5697	149	165	0,00064
	<i>Orestias aff. agassii</i>	98,14286	9,1183	85	110	0,00165
	<i>Orestias albus</i>	53,5	55,861	14	93	0,32905
	<i>Orestias gilsoni</i>	59,3	7,2426	52	75	0,00144
	<i>Orestias ispi</i>	83,33333	0,5774	83	84	0,00071
	<i>Orestias luteus</i>	98,5942	15,318	70	125	0,00232
<i>Trichomycterus rivulatus</i>	148	0	148	148	0	
Estrecho de Tiquina	<i>Orestias forgeti</i>	62,6	1,8166	60	65	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	40,18182	4,0452	34	48	0
Guaqui	<i>Complejo mulleri</i>	70	7,4833	60	78	0,00136
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	80	0	80	80	0,00039
	<i>Orestias aff. agassii</i>	94,14286	19,566	55	142	0,0016
	<i>Orestias gilsoni</i>	52,23077	7,7153	41	70	0,00122
	<i>Orestias luteus</i>	96,46667	20,154	74	133	0,002
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	147	9,654	136	157	0,00096
Huatajata	<i>Complejo mulleri</i>	58,58621	6,5922	40	76	0,00155
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	186,25	17,056	162	200	0,00063
	<i>Orestias aff. agassii</i>	80	19,842	45	105	0,00121
	<i>Orestias gilsoni</i>	51,70833	5,7507	40	75	0,00115
	<i>Orestias ispi</i>	62	0	62	62	0,00084
	<i>Orestias sp.</i>	72,85714	28,614	45	145	0,00146
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	133,6667	12,915	111	153	0,0009
Huencalla, Nueva Alianza	<i>Complejo mulleri</i>	82,44444	6,307	70	91	0,00179
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	290	77,405	218	422	0
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	201,2	27,344	154	222	0
	<i>Orestias aff. agassii</i>	163	0	163	163	0,00143
	<i>Orestias albus</i>	124,5556	25,53	84	167	0,00204

	<i>Orestias gilsoni</i>	94,14286	8,9149	81	105	0,00152
	<i>Orestias luteus</i>	136,1111	9,6753	115	145	0,00281
Inka-Chaka	<i>Complejo mulleri</i>	66,12195	13,895	35	97	0,00162
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	114,9231	11,558	95	134	0,00052
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	213,5	77,075	159	268	0,00051
	<i>Orestias aff. agassii</i>	111,1667	27,448	92	149	0,00077
	<i>Orestias crawfordi</i>	59	1,4142	58	60	0,00167
	<i>Orestias gilsoni</i>	49,89189	5,3892	39	62	0,00112
	<i>Orestias gracilis</i>	52,86207	2,9728	47	58	0,00044
	<i>Orestias ispi</i>	68,77419	5,4081	60	78	0,00052
	<i>Orestias luteus</i>	129	0	129	129	0,001
	<i>Orestias sp.</i>	141,25	21,73	108	168	0,00067
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	129,4286	33,11	65	159	0,00041
	Isla de Anapia	<i>Complejo mulleri</i>	55,43396	6,8423	40	77
<i>Odontesthes bonariensis</i>		198,5	32,338	172	270	0,00056
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		158	0	158	158	0,00127
<i>Orestias aff. agassii</i>		96,71429	35,86	57	147	0,00129
<i>Orestias gilsoni</i>		41,14286	5,2894	34	52	0,00109
<i>Orestias luteus</i>		117,3333	8,7369	110	127	0,00253
<i>Orestias sp.</i>		138,7368	29,053	96	195	0,0011
<i>Trichomycterus rivulatus</i>		144,2222	34,095	95	176	0,00094
Isla de Taquiri	<i>Orestias gilsoni</i>	44,3125	6,6805	31	55	0,00118
Isla del Sol	<i>Complejo mulleri</i>	83,5	2,1213	82	85	0,00171
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	190,6667	16,773	180	210	0,00067
	<i>Orestias aff. agassii</i>	106,1628	14,467	87	172	0,0016
	<i>Orestias gilsoni</i>	74,5	2,1213	73	76	0,00217
	<i>Orestias luteus</i>	121,9	17,535	85	162	0,00176
	<i>Orestias sp.</i>	138,6	21,732	99	158	0,00077
	<i>Orestias tomcooni</i>	50,5	0,7071	50	51	0
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	159	0	159	159	0,00051
Itzcata	<i>Complejo mulleri</i>	76	0	76	76	0,00131
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	261	16,823	248	280	0,00089
	<i>Orestias gilsoni</i>	56	0	56	56	0,00147
Ojherani	<i>Complejo imarpe</i>	51,1	2,5144	47	54	0,0019
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	101,7	5,5588	93	109	0,00055
	<i>Orestias ispi</i>	83,8	2,8983	80	90	0,00078
Puerto Acosta	<i>Complejo mulleri</i>	77,9403	8,6074	56	95	0,00182
	<i>Orestias aff. agassii</i>	114	12,356	102	130	0,00153
	<i>Orestias albus</i>	129,6	35,118	90	183	0,00186
	<i>Orestias gilsoni</i>	78,85981	19,296	36	112	0,00137
	<i>Orestias gracilis</i>	49	2,8284	47	51	0,00062
	<i>Orestias ispi</i>	72,2	10,183	56	83	0,00079
	<i>Orestias luteus</i>	130	0	130	130	0,00234
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	145,4	14,792	121	159	0,00113
Puerto Carabuco (Chayapata)	<i>Complejo mulleri</i>	69,41935	6,9585	48	82	0,00188
	<i>Orestias albus</i>	83	0	83	83	0,00157
	<i>Orestias ispi</i>	76,14286	3,2878	70	80	0,00079
Puerto Perez	<i>Complejo mulleri</i>	52,71429	6,6646	36	66	0,00168
	<i>Orestias aff. agassii</i>	64,73333	7,4687	55	84	0,0014
	<i>Orestias gilsoni</i>	46,66667	5,0859	40	55	0,00111
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	75	0	75	75	0,00119
Río Zapatillas	<i>Orestias aff. agassii</i>	67,7	15,6	47	88	0,00147
Santiago de Huata	<i>Complejo mulleri</i>	60,8125	5,9583	40	81	0,00154

	<i>Odontesthes bonariensis</i>	84	0	84	84	0,00034
	<i>Orestias aff. agassii</i>	66,4	17,897	52	94	0,00123
	<i>Orestias gilsoni</i>	51,55556	5,9337	38	67	0,00109
	<i>Orestias ispi</i>	61	0	61	61	0,00022
Santiago de Oje	<i>Complejo mulleri</i>	60,45455	4,5905	54	70	0,00182
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	106,6667	25,146	78	125	0,00059
	<i>Orestias aff. agassii</i>	73,25	7,1822	69	84	0,00142
	<i>Orestias gilsoni</i>	52,03226	5,5826	40	68	0,00142
Sillustani (Iago Umayo)	<i>Orestias aff. agassii</i>	120,1667	5,1153	115	128	0
Socca	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	229	8,4853	223	235	0
	<i>Orestias luteus</i>	141	9,8995	134	148	0,00248
Sucuni	<i>Complejo mulleri</i>	81	0	81	81	0
Vilquechico	<i>Complejo mulleri</i>	64,57143	16,44	53	89	0
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	101	0	101	101	0
	<i>Orestias aff. agassii</i>	87	0	87	87	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	51,125	2,6959	46	55	0
	<i>Orestias ispi</i>	80	0	80	80	0
	<i>Orestias sp.</i>	41,66667	4,7258	38	47	0
Yapura (Capachica)	<i>Complejo mulleri</i>	67,90909	9,6276	55	90	0
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	175	0	175	175	0
	<i>Orestias aff. agassii</i>	90	0	90	90	0
	<i>Orestias gilsoni</i>	70,34091	12,05	40	92	0
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	154	0	154	154	0

Anexo 2.2. Parámetros biométricos por localidad en relación a la longitud furcal de las especies capturadas en el mes de septiembre. (DS= Desviación estandar; K= Factor de condición).

Localidad	Especie	Promedio	DS	Mínimo	Máximo	K
Charcas, Nueva Alianza	<i>Complejo imarpe</i>	54,74163	6,7168	35	78	0,00148
	<i>Complejo mulleri</i>	64,20492	11,939	45	96	0,00151
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	219	63,64	174	264	0,00061
	<i>Orestias aff. agassii</i>	77,3	26,575	44	119	0,0015
	<i>Orestias albus</i>	89,75	13,401	73	102	0,0016
	<i>Orestias ispi</i>	59,5	4,3984	53	69	0,00073
	<i>Orestias luteus</i>	117,75	20,176	93	156	0,00219
	<i>Orestias sp.</i>	104	0	104	104	0,00107
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	95,75	42,492	70	159	0,00082
Chucuito (Barco)	<i>Complejo imarpe</i>	48,93515	7,9725	34	82	0,00154
	<i>Complejo mulleri</i>	70,25	4,9917	66	77	0,00159
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	196	30,177	153	247	0,00056
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	287	67,506	210	336	0,00117
	<i>Orestias aff. agassii</i>	55,05263	18,504	37	100	0,00138
	<i>Orestias albus</i>	79,57143	32,217	47	145	0,00162
	<i>Orestias luteus</i>	93,80556	27,495	18	134	0,00246
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	137	9,8995	130	144	0,00091
Huancane	<i>Complejo imarpe</i>	55,18182	4,8336	44	62	0,00149
	<i>Complejo mulleri</i>	85,71429	18,898	36	113	0,00162
	<i>Odontesthes bonariensis</i>	256,25	45,881	185	314	0,0006
	<i>Orestias aff. agassii</i>	139,4815	12,289	120	167	0,00148
	<i>Orestias albus</i>	137	11,269	130	150	0,00228
	<i>Orestias ispi</i>	58,1791	5,4242	49	68	0,00077
	<i>Orestias luteus</i>	128,3529	14,309	88	146	0,00227

	<i>Orestias sp.</i>	148,625	10,295	135	169	0,00155
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	150,2727	15,389	115	192	0,00111
Inka-Chaka	<i>Complejo imarpe</i>	54,05556	8,9388	33	75	0,0006
	<i>Complejo mulleri</i>	75,11538	13,756	49	110	0,00179
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	224,25	55,187	148	278	0,00106
	<i>Orestias aff. agassii</i>	109,7273	42,261	40	152	0,00114
	<i>Orestias albus</i>	113,25	24,185	84	140	0,00204
	<i>Orestias gilsoni</i>	36	0	36	36	0
	<i>Orestias ispi</i>	54,09174	4,9676	46	74	5,3E-06
	<i>Orestias luteus</i>	124,35	14,887	78	145	0,00232
	<i>Orestias sp.</i>	166,5	12,021	158	175	0,00153
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	183,6	54,178	154	280	0,00108
Pomata (Villa Santiago)	<i>Complejo imarpe</i>	47,86	5,5033	36	59	0,0015
	<i>Complejo mulleri</i>	57,66667	4,0415	53	60	0,00173
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	208	32,527	185	231	0,00104
	<i>Orestias aff. agassii</i>	88,91667	22,968	69	138	0,0014
	<i>Orestias albus</i>	83,83333	17,023	68	115	0,00172
	<i>Orestias luteus</i>	88	15,242	74	116	0,00203
	<i>Trichomycterus rivulatus</i>	150	12,394	131	166	0,00106

Anexo 2.3. Campaña de muestreo febrero 2009.

ACTIVIDAD DESARROLLADA	FECHA
Llegada a Lima	05.02.2009
Coordinación AECID- Fonchip	06.02.2009
Llegada al Aeropuerto de Juliaca y traslado a Puno	07.02.2009
Muestreo en Ojherani . -Estandarización de condiciones de pesca y toma de parámetros ecológicos. -Primeros muestreos cuantitativos. Localidad Ojherani . Especies: Odontesthes bonariensis , Orestias ispi y Orestias imarpe . Total 30 muestras.	08.02.2009
- Muestreo en Barco y Chuchito . - Actividades de gabinete: identificación, medición, etiquetado y fijación de 15 individuos* de la especie Orestias imarpe , además de llevarse a cabo el registro geográfico y fotográfico del sitio.	09.02.2009.
- Muestreo en Iscata , Socca y diferentes puntos en Nueva Alianza (Charcas y Huencalla) y Ojherani . -Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Ojherani, recolección de 24 ejemplares de las especies O. agassii , O. luteus , O. mulleri , O. ispi y T. dispar . - Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Nueva Alianza (Charcas). Recolección de macrófitas, algas filamentosas, zooplancton, perifiton y muestras de peces (Odontesthes bonariensis , Oncorhynchus mykiss , O. gilsoni , O. mulleri , O. agassii , O. albus y O. luteus). En total se tomaron 63 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona. -Muestreo para estudio de biología y ecología de las principales especies ícticas. Localidad Nueva Alianza (Huencalla). 35 ejemplares de las siguientes especies: Odontesthes bonariensis , Oncorhynchus mykiss , O. gilsoni , O. mulleri , O. agassii , O. albus , O. rotundipinnis y O. luteus). -Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Iztcata. 5 ejemplares de las siguientes especies: Odontesthes bonariensis , O. gilsoni y O. mulleri .	10.02.2009

<p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Iztcata. 4 ejemplares de las siguientes especies: <i>O. luteus</i> y <i>Oncorhynchus mykiss</i>. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p> <p>-Muestras para el estudio de la biología de la reproducción y trófica, edad y crecimiento de <i>O. imarpe</i>. Localidad Ojherani. 30 ejemplares. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p>	
<p>Procesamiento del muestreo en Barco (Chucuito), Huencalla (Nueva Alianza), Bahía de Tamán, Río Coata y lago Umayo.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Huencalla (Nueva Alianza). Recolección de macrófitas, algas filamentosas, zooplancton, macroinvertebrados, moluscos, perifiton y muestras de peces (<i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>T. rivulatus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. puni</i>, <i>O. crawfordi</i> y <i>O. uruni</i>). En total se tomaron 48 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Bahía Taman (Península de Capachica), recolección de 137 ejemplares de las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. crawfordi</i> y <i>O. ispi</i>.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Barco (Chucuito) recolección de 172 ejemplares de las especies <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>Trichomycterus rivulatus</i>, <i>O. imarpe</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. crawfordi</i> y <i>O. ispi</i>.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Silustani (lago Umayo). 13 ejemplares de las siguientes especies: <i>O. puni</i> y <i>O. agassii</i>.</p> <p>-Muestras para el estudio de la biología de la reproducción y trófica, edad y crecimiento de <i>O. agassii</i>. Localidad Huencalla. 30 ejemplares. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p>	11.02.2009
<p>Muestreo y procesamiento de las localidades: Barco (Chucuito), Huencalla (Nueva Alianza), Bahía de Uruni y Cotos.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Barco (Chucuito). Recolección de macrófitas, algas filamentosas, zooplancton, macroinvertebrados, moluscos, planarias, perifiton y muestras de peces (<i>Odontesthes bonariensis</i> y <i>Oncorhynchus mykiss</i>) En total se tomaron 21 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Barco (Chucuito) recolección de 39 ejemplares de las especies <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. albus</i> y <i>O. ispi</i>.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Huencalla (Nueva Alianza). 10 ejemplares de las siguientes especies: <i>Oncorhynchus mykiss</i> y <i>Odontesthes bonariensis</i>.</p> <p>-Muestras para el estudio de la biología de la reproducción y trófica, edad y crecimiento de <i>O. albus</i> y <i>O. luteus</i>. Localidad Huencalla. 30 ejemplares. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p>	12.02.2009
<p>Muestreo en Tilali, Sector Amsta Watasani y río Lampa y río Coata.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Río Coata. Recolección de muestras de peces (<i>O. agassii</i>) En total se tomaron 2 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes</p>	13.02.2009

<p>tróficas. Localidad Río Lampa. Recolección de muestras de peces (<i>O. multiporis</i>) En total se tomaron 10 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Río Coata. 10 ejemplares de las siguientes especies: <i>O. agassii</i> y <i>O. multiporis</i>.</p>	
<p>Muestreo en Ojherani, Barco (Chucuito), Sucuni, Conima, Vilquechico, Huancané, Bahía de Moho, río Ramis y río Zapatilla.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Bahía Moho. Recolección de muestras de peces (<i>O. agassii</i>, <i>O. luteus</i> y <i>O. incae</i>) En total se tomaron 7 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Bahía Moho. Recolección de muestras de peces (<i>O. ctenolepis</i>) En total se tomaron 10 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Bahía de Moho, recolección de 68 ejemplares de las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. incae</i> y <i>O. rotundipinnis</i>.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Río Zapatilla. 10 ejemplares de las siguientes especies: <i>O. ctenolepis</i>.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Sucuni. 1 ejemplar de <i>O. mulleri</i>.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Bahía de Moho, recolección de 22 ejemplares de las especies: <i>O. agassii</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i> y <i>Odontesthes bonariensis</i>.</p> <p>-Muestras para el estudio de la biología de la reproducción y trófica, edad y crecimiento de <i>O. ispi</i>. Localidad Ojherani. 30 ejemplares. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p> <p>-Muestras para el estudio de la biología de la reproducción y trófica, edad y crecimiento de <i>O. mulleri</i>. Localidad Barco (Chucuito). 30 ejemplares. Extracción de gónadas, digestivos y escamas para su posterior estudio. Toma de datos biométricos.</p>	14.02.2009
<p>Traslado a Bolivia y muestreo en Inka Chaka, Copacabana.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Inca Chaka. Recolección de muestras de peces (<i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>T. rivulatus</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. agassii</i>, y <i>O. rotundipinnis</i>) En total se tomaron 26 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Inca Chaka, recolección de 111 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>T. rivulatus</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. incae</i> y <i>O. rotundipinnis</i>.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología y ecología. Localidad Inca Chaka. 21 ejemplar de <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>Trichomycterus rivulatus</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. agassii</i>, y <i>O. rotundipinnis</i>.</p>	16.02.2009
<p>Muestreo en Isla del Sol.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Isla del Sol. Recolección de muestras de peces (<i>O. tomcooni</i>, <i>O.</i></p>	17.02.2009

<p>farfani, O. frontosus, y O. rotundipinnis) En total se tomaron 21 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Isla del Sol, recolección de 78 ejemplares de las especies: Odontesthes bonariensis, Oncorhynchus mykiss, T. rivulatus, O. gracilis, O. frontosus, O. agassii, O. ispi, O. mulleri, O. gilsoni, O. incae, O. luteus, O. farfani, O. tomcooni, O. ctenolepis y O. rotundipinnis.</p>	
<p>Muestreo en Inka Chaka, Soto, Yampupata y Tejepe, península de Copacabana.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Inca Chaka, recolección de 96 ejemplares de las especies: Odontesthes bonariensis, T. rivulatus, O. ispi, O. gracilis, O. frontosus, O. gilsoni y O. crawfordi.</p>	18.02.2009
<p>Muestreo en Isla Taquire, Isla de Anapia, Santiago de Ojje, Amacati y en el Estrecho de Tiquina en Camacati .</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Estrecho de Tiquina. Recolección de muestras de peces (O.taquiri y O. forgeti). En total se tomaron 16 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Amacati. Recolección de muestras de peces (O. farfani). En total se tomaron 6 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Isla de Anapia. Recolección de muestras de peces (O. frontosus). En total se tomaron 5 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Santiago de Ojje. Recolección de muestras de peces (O. tutini) En total se tomaron 3 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Estrecho de Tiquina. Recolección de muestras de peces (O.taquiri,) En total se tomaron 10 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología, ecología. Localidad Amacati. 6 ejemplares de O. farfani.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Anapia, recolección de 236 ejemplares de las especies: Odontesthes bonariensis, T. rivulatus, O. mykiss, O. agassii, O. taquari, O. luteus, O. frontosus, O. mulleri, O. gilsoni.</p> <p>-Muestreo para estudio de biología, ecología. Localidad Estrecho de Tiquina. 16 ejemplares de O. forget y O. taquari.</p> <p>-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Santiago de Ojje, recolección de 52 ejemplares de las especies: Odontesthes bonariensis, O. agassii, O. mulleri, O. gilsoni y O. tutini.</p>	19.02.2009
<p>Muestreo en Santiago de Huata, Ajllata y Huatajata.</p> <p>- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Santiago de Huata. Recolección de muestras de peces (O.taquiri,) En total se tomaron 4 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.</p>	20.02.2009

-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Huatajata, recolección de 511 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>T. rivulatus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. taquari</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i> y <i>O. tutini</i>.	
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Santiago de Huata, recolección de 197 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>T. rivulatus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. frontosus</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. taquiri</i>, <i>O. gilsoni</i> y <i>O. ispi</i>.	
Muestreo en Sotalaya, Puerto Acosta, Ojjchi en Escoma, Puerto Carabuco y Lojarcachi.	21.02.2009
- Muestreo para estudio de Isótopos Estables en relación a la estructura de las redes tróficas. Localidad Puerto Acosta. Recolección de muestras de peces (<i>O.gilsoni</i>, grupo .) En total se tomaron 10 muestras que se congelaron y trasladaron a la Universidad de Barcelona.	
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Puerto Acosta, recolección de 261 ejemplares de las especies: <i>T. rivulatus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. gracilis</i>, <i>O. albus</i>,	
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Puerto Carabuco (Chayapata), recolección de 261 ejemplares de las especies: <i>O. mulleri</i>, <i>O. ispi</i> y <i>O. albus</i>,	
Muestreo en Guaqui, Isla Pariti y varios puntos dentro de la bahía de Puerto Pérez.	22.02.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Guaqui, recolección de 198 ejemplares de las especies: <i>T. rivulatus</i>, <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>O. farfani</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. luteus</i> y <i>O. albus</i>.	
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad Puerto Perez, recolección de 99 ejemplares de las especies: <i>T. rivulatus</i>, <i>O. agassii</i>, <i>O. mulleri</i>, <i>O. gilsoni</i>, <i>O. taquiri</i> y <i>O. ctenolepis</i>.	
Muestreo en Uros, Bahía de Coata y lago Umayo.	23.02.2009
Procesamiento y embalaje de muestras	24.02.2009
Traslado a Aeropuerto de Juliaca viaje a Lima	25.02.2009
Viaje a Madrid y Barcelona	26/27.02.2009

Anexo 2.4. Trabajo de colecciones y laboratorio.

Trabajos sobre datación y crecimiento de una selección de las especies dominantes del género Orestias (<i>O. imarpe</i>, <i>O.agassii</i>, <i>O. albus</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O. ispi</i> y <i>O. mulleri</i>. (180 muestras).	2-31.03.2008
Preparación de las muestras y análisis de Isótopos Estables (Carbono, $^{13}C/^{12}C$; Nitrógeno ($^{15}N/^{14}N$)). Estudio de las redes tróficas.(290 muestras)	01-10.04.2008

Anexo 2.5. Campaña de muestreo septiembre 2009.

ACTIVIDAD DESARROLLADA	FECHA
Llegada a Lima	06.09.2009
Reunión coordinación AECID- Fonchip	07.09.2009
Llegada al Aeropuerto de Juliaca y traslado a Puno	08.09.2009
Muestreo en Barco (Chucuito).	08.09.2009
-Estandarización de condiciones de pesca y toma de parámetros ecológicos.	

-Primeros muestreos cuantitativos. Localidad Barco , colocación de redes.	
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Barco (Chucuito) , recolección de 66 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>), <i>O. luteus</i> y <i>O. albus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad de Barco (Chucuito) , recolección de 16 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>Oncorhynchus mykiss</i> y <i>O. luteus</i>.	09.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Charcas (Nueva Alianza) , recolección de 110 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>) y <i>O. luteus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Charcas (Nueva Alianza) , recolección de 30 ejemplares de las especies: <i>Trichomycterus rivulatus</i>, <i>Orestias aff. agassii</i>, <i>O. ispi</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>) y <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>).	10.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Pomata (Villa Santiago) , recolección de 64 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>), <i>O. luteus</i> y <i>O. albus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Pomata (Villa Santiago) , recolección de 22 ejemplares de las especies: <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O.albus</i>, <i>O. aff. agassii</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>.	11.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Huancané , recolección de 93 ejemplares de las especies: <i>O. ispi</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>), <i>O. luteus</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Huancané , recolección de 102 ejemplares de las especies: <i>O. luteus</i>, <i>O.albus</i>, <i>O. aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>Odontesthes bonariensis</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>.	12.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Barco (Chucuito) , recolección de 267 ejemplares de las especies: <i>O. ispi</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>), <i>O. luteus</i>, <i>O. luteus</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Barco (Chucuito) , recolección de 22 ejemplares de las especies: <i>Odontesthes bonariensis</i> y <i>O. luteus</i>.	13.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Inka- Chaka , recolección de 161 ejemplares de las especies: <i>O. ispi</i>, <i>. gilsoni</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>). -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Inka- Chaka , recolección de 61 ejemplares de las especies: <i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>O. luteus</i>, <i>O.albus</i>, <i>O. aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>). y <i>Trichomycterus rivulatus</i>.	15.09.2009
-Muestreo cuantitativo con redes multimalla de captura científica. Localidad: Charcas (Nueva Alianza) , recolección de 314 ejemplares de las especies: <i>O. ispi</i>, <i>O.aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O.imarpe</i> (complejo <i>imarpe</i>), <i>O. luteus</i>, <i>O.albus</i>, <i>O. sp.</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>. -Muestreo cuantitativo con redes tradicionales (PELT). Localidad: Charcas (Nueva Alianza) , recolección de 29 ejemplares de las especies: <i>O. luteus</i>, <i>O.albus</i>, <i>O. aff. agassii</i>, <i>O. mulleri</i> (complejo <i>mulleri</i>), <i>O. sp.</i> y <i>Trichomycterus rivulatus</i>.	17.09.2009
Procesamiento y embalaje de muestras	18-19.09.2009
Traslado Puno-Lima	19.09.2009
Viaje a Madrid y Barcelona	21-22/09-2009

Anexo 3. Asesoría. Protocolo sobre cultivos de algas verdes (*Chlorella vulgaris*) y rotíferos (*Brachionus calyciflorus*) para su uso en la cría de especies de los géneros *Orestias* y *Trichomycterus*.

***Alberto Maceda, Mario Monroy y Adolfo de Sostoa**

***Universidad de Barcelona**

1. Características del género *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris, es un alga verde, unicelular, con forma esférica y de unas 2-10 µm de diámetro. Presenta una membrana celular bastante dura, que le permite proteger su material genético y adaptarse con facilidad a diversos ambientes. Posee un rápido crecimiento y una extraordinaria habilidad reproductiva, pudiendo una célula multiplicarse por 4 aproximadamente cada 20 horas. Contiene una gran concentración y variedad de nutrientes esenciales para la vida, especialmente proteínas (45%), 18 aminoácidos (incluidos aminoácidos esenciales), vitaminas y minerales. Además, constituye la mayor fuente de clorofila que se pueda encontrar en un vegetal.

1.1. Parámetros técnicos y fisicoquímicos para el cultivo de *Chlorella vulgaris*

Existen tres formas de hacer un cultivo de fitoplancton controlado, dependiendo de la metodología y densidad a la que se siembre y de la cantidad de algas necesitadas, éstas son: cultivo estático, continuo y masivo (a gran escala y con volumen no controlado). El primero se refiere al desarrollo del cultivo hasta fase de crecimiento exponencial y la utilización del volumen total del mismo, generalmente con fines de bioensayo para transferencia a volúmenes mayores. Dentro de esta forma de cultivo, el tipo de cultivo batch es una de las técnicas más usadas y consiste en llevar un inóculo de algas hasta que alcancen la máxima población de forma escalada. Por ejemplo, se siembra en bolsas o cilindros de metacrilato de 30 l, luego que se tenga una buena densidad y calidad del alga se pasa a bolsas de 230 l y por último a tanques de 1000 l o más dependiendo del volumen final de microalgas que se quiera obtener.

El cultivo continuo es un sistema de flujo en el cual cada cierto tiempo hay una renovación del cultivo y adición de medio nutritivo. Cuando se requiere de grandes cantidades de células a intervalos frecuentes para alimentar especies en cultivo (peces, crustáceos, moluscos), los cultivos semicontinuos o continuos proveen una gran biomasa algal con mayor consistencia en forma uniforme y constante. En estos cultivos es importante determinar la concentración óptima de los nutrientes por unidad de tiempo en relación a la tasa de dilución o cosecha del cultivo. Para el caso de *Chlorella vulgaris* se debe cosechar cada vez que la concentración de células alcance los $2,5 \times 10^6$ cel/ml (concentración ideal a la cual debe mantenerse el cultivo) y se debe dejar un 50 % del volumen inicial y se rellenará con agua a la misma temperatura y parámetros a los que se encuentre el medio de cultivo, así como con la correspondiente dosis de nutrientes, con el fin de evitar un colapso del cultivo por el cambio brusco en sus condiciones.

Para realizar el cultivo en general, se deben tener unas condiciones de agua óptimas a través de diferentes tipos de filtración, buena iluminación y fuerte agitación mecánica, así como se deberán mantener las condiciones de esterilidad en el cultivo. Se recomienda para cultivos en bolsas de más de 50 l que van a soportar un peso grande, tengan un ancho cercano a las 800 μm y que sus extremos se amarren con bridas plásticas ajustables, haciéndose un pliegue de forma de abanico para evitar pérdidas de agua.

También se pueden utilizar cilindros de metacrilato que son mucho más resistentes, aunque tienen mayor coste a corto plazo. Es posible que con el paso del tiempo, se forme una capa de algas en la pared del cilindro que deberá limpiarse con cierta frecuencia, ya que ésta puede llegar a impedir el paso de la luz. No deben utilizarse materiales abrasivos en dichas labores de limpieza, puesto que el metacrilato se raya con suma facilidad.

1.1.1. Calidad del agua

El agua a emplear debe ser obligatoriamente agua de filtrada para evitar que cualquier elemento disuelto dañe el cultivo. La temperatura óptima en la cual se desarrolla es de aproximadamente unos 25°C (termotolerancia entre 15-30°C). Niveles de pH entre 7,8 y 8 serán los adecuados, aunque se recomienda manejar el mismo pH de la zona donde se trabaja.

1.1.2. Filtración

El agua antes de llegar a los tanques o bolsas, debe pasar por diferentes tipos de filtros para evitar contaminación por microorganismos y para suministrar un agua de calidad óptima al cultivo. Dentro de los más fáciles de usar y adquirir se recomienda el uso de un filtro de arena, uno o dos filtros de malla de diferentes diámetros y finalmente un filtro de luz ultravioleta. A continuación se describen las características de estos filtros:

Filtro de Arena: Es especialmente efectivo para la eliminación de las partículas orgánicas (bacterias, algas, etc.) que se encuentran en el agua de riego. Este filtro está compuesto por un depósito generalmente metálico (también existen de plástico reforzado) lleno de arena o grava de un determinado tamaño. El agua entra al depósito por la parte superior y atraviesa la arena, de forma que las partículas quedan retenidas por ésta. La salida del agua se encuentra en la parte inferior. La arena ha de ser de un tamaño igual al del paso del agua por el emisor, para filtrar todas las partículas mayores o iguales a este paso, que podrían causar obstrucciones. Estos filtros tienen la ventaja de que pueden retener una gran cantidad de partículas antes de ser limpiados.

Filtro de malla: Formados por un cuerpo metálico cilíndrico que contiene en su interior un soporte perforado recubierto con una malla de orificios de tamaño variable. Se recomienda un ojo de malla entre 10 a 50 μm . El soporte puede ser metálico o de plástico y la malla suele ser de acero inoxidable o de nylon. El tamaño del orificio de paso del agua por la malla ha de ser como máximo una décima parte del tamaño del conducto del emisor en goteo por lo cual, el filtro retendrá la mayor parte de las partículas que podrían obstruir el emisor. El filtro de malla se colmata con rapidez, por lo que no resulta indicado para aguas con muchos sedimentos.

Filtro de luz ultravioleta (UV): El filtro de luz ultravioleta es un aparato que posee un tubo de luz ultravioleta germicida el cual está en contacto con el agua. Con los rayos ultravioletas (UV) emitidos por el tubo que hay en el filtro, se modifica el ADN de los micro-organismos expuestos matándolos y evitando que se multipliquen sin alterar las características físico-químicas del agua.

1.1.3. Iluminación

Se debe manejar una temperatura de color cercana a los 6000 y 6500° K (temperatura de color), entre los 30 y 60 w con fluorescentes T8 (también pueden utilizarse fluorescentes T5 o lámparas PL que generan mucha más intensidad de luz a igual potencia), para potenciar los procesos fotosintéticos. La luz puede ser constante las 24 h del día para acelerar el desarrollo de las microalgas, aunque a partir de las 16 h no se observan mejoras significativas en el cultivo. Las lámparas a emplear pueden ser fluorescentes que debido a su forma cubren todo el volumen del recipiente empleado para el cultivo. En lo posible, el montaje debe de estar algunos centímetros por encima del suelo para evitar riesgo de cortocircuito. Hay que tener en cuenta que si se exceden los 30 cm de diámetro de la bolsa deberá incrementarse la intensidad lumínica.

1.1.4. Aireación

Debido a que esta microalga carece de cilios o flagelos para su locomoción, necesita agitación mecánica para mantenerse en suspensión. El empleo de aireadores dentro de los recipientes de cultivo es una práctica bastante extendida para favorecer el movimiento permanente del cultivo. No obstante, se debe tener cuidado con la cantidad de aire que se suministra al cultivo ya que hay determinadas especies de microalgas que pueden llegar a dañarse con una agitación muy severa. Por lo tanto, cada tanque o bolsa debe tener una entrada de aire regulada, que permita mantener en continuo movimiento la totalidad del cultivo. El tubo de aireación no debe tener difusor, ya que convertiría el tanque de cultivo en un *skimmer*. Cada manguera debe tener un peso o lastre para que la aireación parta del centro de la base del tanque y sea homogénea para la totalidad del volumen de agua. El sistema de aire debe tener un filtro que evite la entrada de microorganismos patógenos al cultivo, el cual debe limpiarse periódicamente dependiendo del grado de taponamiento.

1.2. Montaje del cultivo

Es importante que el cultivo se realice en un recinto cerrado para facilitar las condiciones asépticas. Durante el cultivo se deben adoptar medidas de precaución en este aspecto, tales como:

- Usar ropa y botas exclusivas para el laboratorio.
- Colocar en la entrada de la sala de cultivo un lava pies con lejía para no introducir microorganismos. La lejía debe ser cambiada mínimo una vez a la semana.
- Desinfectar material antes de usarlo y si es posible tener una manguera marcada para cada tanque. Las desinfecciones se hacen con lejía a una dosis cercana a 0,25 ml por cada litro de agua.

- Lavarse las manos antes de utilizar cualquier objeto dentro de la sala.
- El suelo debe, en lo posible, mantenerse seco.
- Las bolsas o tanques de cultivo deben permanecer cerradas y sin goteos.
- Rellenar el formato de seguimiento, para llevar un control diario sobre cada tanque de cultivo.

La dosis y frecuencia de abonado del cultivo de fitoplancton no puede estandarizarse a menos que las condiciones de cultivo sean idénticas y se utilice no sólo la misma especie de alga sino también la misma cepa. Dado que el cumplimiento de todas estas premisas no siempre es posible, es recomendable realizar un pequeño experimento para conocer las necesidades reales de nutrientes del cultivo con el fin de maximizar su rendimiento.

Los nutrientes necesarios se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes. Existen varias posibilidades. Puede adquirirse un abono comercial específico para el cultivo de fitoplancton, también puede utilizarse un abono para plantas terrestres o bien uno para plantas de acuario (p.e.: Sera Florena) o bien, se puede optar por preparar la mezcla en laboratorio siguiendo recetas estandarizadas para la especie de alga que sea de nuestro interés. Si se desea preparar el enriquecimiento, se recomienda el método de Winokur (1948), que tiene la siguiente composición:

0.0251 M KNO₃

0.018 M de K₂HPO₄

0.02 M MgSO₄ H₂O

0.44 ppm Mn,

0.08 ppm Zn

0.002 ppm Cu

0.02 ppm Mo

7 x 10⁻⁶ M Fe citrato, a un pH de 5.6

Una manera sencilla de calcular la dosis y frecuencia de abonado consiste en monitorizar alguno de los macro o micronutrientes que se suministra al cultivo a lo largo del tiempo. La mejor opción es monitorizar varios a la vez, por ejemplo, nitrato, fosfatos y hierro. Es importante conocer la concentración de dichos nutrientes en la disolución stock que se va a utilizar como abono. En caso de haber sido preparada en el propio laboratorio, esta labor será muy sencilla.

En primer lugar, se añadirá una dosis tal al cultivo que permita alcanzar una concentración de 20 mg/l, por ejemplo, de nitrato. La concentración del resto de macro y micronutrientes vendrá determinada por la proporción que tengan éstos en la mezcla. De acuerdo con los estudios realizados, se recomienda que la proporción de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) sea de 0.75:0.25:1, utilizando como fuentes de NPK: nitrato potásico, dihidrógeno fosfato de potasio y sulfato potásico. Aún habiendo calculado la dosis, es importante asegurarse que dicha concentración ha sido alcanzada mediante un test colorimétrico de los comúnmente utilizados en acuariofília. Se recomienda filtrar la muestra de agua a través de papel de filtro antes de realizar el test con el fin de facilitar la lectura (las algas en suspensión dificultan mucho esta labor). Por otro lado, también puede dejarse la muestra unos minutos en reposo y tomar el sobrenadante para realizar el análisis. Al ser *Chlorella vulgaris* una microalga sin mecanismos de locomoción, precipitará al poco tiempo tras el cese de la agitación mecánica.

Este proceso deberá repetirse como mínimo una vez al día en los días sucesivos a la adición de nutrientes. De este modo, podrá conocerse cuando las algas han

agotado por completo la dosis de nutrientes que se ha suministrado y no sólo eso, sino que también podrá estudiarse la tasa de consumo que tienen en las diferentes fases de cultivo. En resumidas cuentas, se podrá calcular la dosis y frecuencia para la etapa de crecimiento del cultivo, pero también una dosis para el mantenimiento del mismo en fase estacionaria.

Monitorizando varios parámetros al mismo tiempo no sólo podrá conocerse cuanto tiempo han tardado en asimilar todo el nitrato que se ha suministrado, sino que también podrá detectarse si aún quedando nitrato en el medio de cultivo, las algas ya agotaron todo el fosfato presente o si, por el contrario, ha sido el hierro el que ha quedado deficitario y se podrá adecuar la mezcla de nutrientes a juicio personal. Es costoso y dificultoso monitorizar muchos parámetros a la vez a lo largo de toda esta fase experimental y, mucho más, hacerlo como rutina en todos los cultivos de algas. Sin embargo, el análisis de nitratos, fosfatos y hierro permite hacerse una idea de los requerimientos nutricionales del cultivo y optimizar todo el proceso.

Se debe determinar la densidad del cultivo mediante la técnica de hemocitómetro (conteo manual en placa de Neubauer y la turbidez a través de un espectrofotómetro. El conteo se debe hacer diariamente, tratando de realizarlo a la misma hora del día. Consiste en colocar con una pipeta un poco de la muestra en una placa de Neubauer que tiene una profundidad de 0,1 mm y un volumen por cuadro de $0,004 \text{ mm}^3$ tapada con un cubreobjetos. Se cuentan 5 cuadros grandes de la placa a través del microscopio, tratando de situar el conteo en diferentes sitios de la placa para homogenizar la muestra. Al tener los 5 conteos se saca un promedio de la densidad, expresado en cel/ml. Para saber cuantos inóculos hacen falta para obtener una bolsa con un volumen determinado a una densidad de $2,5 \times 10^6$ cel/ml, se debe aplicar la fórmula:

$$\text{Volumen 1} * \text{Concentración 1} = \text{Volumen 2} * \text{Concentración 2}$$

Lo ideal es que el cultivo se mantenga en crecimiento exponencial de un color verde intenso. Cuando las células alcanzan una densidad muy grande para seguir creciendo o se ponen viejas, entran en una fase de decaimiento del cultivo, donde se debe tirar la bolsa y volver a sembrar. Esto se evidencia con cambios de coloración a verde amarillento o pardo y la formación de grumos.

En caso que un cultivo esté contaminado o se quiera empezar un cultivo nuevo es primordial conocer el procedimiento para aislar una cepa. Por consiguiente, se debe poner una alícuota del cultivo en una placa de Neubauer, donde se realizará un conteo de la densidad de cel/ml y se sacará un promedio. Ya que cada cuadro de la placa de Neubauer mide $0,004 \text{ mm}^3$, se divide el promedio de la densidad de cel/ml entre 4 para expresar el resultado en ml.

Hay que tener en cuenta los macro y micro nutrientes que debemos ofrecer al cultivo. Para este fin, se prepara una solución 1 de nitratos y metales traza a una concentración de 0,2 ml/l de cultivo y una solución 2 de vitaminas y fosfatos a una concentración de 0,05 ml/l. A 0,1 ml de la solución 1 y 2 se deben añadir 9,9 ml de agua destilada para llegar a 10 ml. Esto es lo mismo que decir que se disolvió 100 veces la solución 1 y 2. Entonces,

$$\begin{aligned} 1 \text{ l} &\rightarrow 5 \text{ ml} \\ 0,4 \text{ l} &\rightarrow x \\ x &= 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ l} &\rightarrow 20 \text{ ml} \\ 0,4 \text{ l} &\rightarrow x \\ x &= 8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Entonces a 400 ml de agua destilada se le añaden los 2 ml de solución 1 y los 8 ml de solución 2. De esta solución enriquecedora, que va a servir como medio de cultivo, se ponen 9 ml en varios tubos de ensayo. Así, en el primer tubo de ensayo

con 9 ml de enriquecedor se pone 1 ml del cultivo, se revuelve y se saca 1 ml de muestra y se pone en el siguiente tubo de ensayo que ya tiene los 9 ml de enriquecedor y se continua el procedimiento sucesivamente hasta llegar a 1 cel/ml. En síntesis, se debe disminuir un orden de magnitud cada vez que se va cambiando de tubo, hasta aislar la cepa. Los tubos se tapan y se dejan crecer con luz durante 24 horas tiempo en el cual se ven los primeros resultados de crecimiento en la base del tubo.

La siembra con cepas de *Chlorella vulgaris* se realiza en geles de agar preparados con anterioridad. La técnica consiste en poner el asa de siembras en el mechero durante unos segundos para esterilizar, trabajando siempre cerca del calor de la llama. Se coloca el asa dentro del gel unos segundos para que se derrita un poco y el asa se enfríe unos cuantos grados. Luego se roza una de las cepas y se hace una siembra en el agar, en forma de zigzag continuo, en tres partes, para tratar de abarcar la máxima área de la caja de Petri. Cada caja se marca por el revés, para evitar que las letras tapen la entrada de luz y se pone a incubar a 20 °C con aire pasado por un filtro de 0,2 µm para evitar contaminación y a luz constante. Luego de que se tiene los geles con cepas nuevas se pueden almacenar en nevera, para posteriormente comenzar la siembra en el momento requerido. Durante el cultivo, es importante mantener un pequeño volumen alterno con microalgas, en balones de vidrio o matraces bien iluminados.

2. Características de *Brachionus calyciflorus*

Los rotíferos son una de las principales fuentes de alimento vivo usadas para alimentar larvas de peces y crustáceos debido a su pequeño tamaño (aproximadamente 250 μm de longitud total), forma de vida pelágica, relativa baja motilidad, alta tasa de reproducción, fácil cultivo a altas densidades y la posibilidad de manipulación bioquímica. Además, en la actualidad los rotíferos sirven como biocápsulas o vehículos para transferir agentes terapéuticos a las larvas. La especie de rotíferos de agua dulce más cultivada es *Brachionus calyciflorus*. Presenta simetría bilateral y están cubiertos por una cutícula protectora. Su cuerpo está dividido en 4 partes: cabeza con corona, cuello, cuerpo y pie. Este último es un apéndice retráctil y posee 2 dedos. La cabeza lleva el órgano rotatorio o corona, que es reconocido fácilmente por sus cilios anulares. La corona retráctil asegura la locomoción y un movimiento del agua en forma de remolino que facilita la captación de pequeñas partículas de alimento tales como microalgas, levaduras, protozoos, etc. El tronco contiene el tracto digestivo, con una estructura denominada mastax que muele las partículas ingeridas.

La longevidad de *B. calyciflorus* es de 3.4 a 4.4 días y se estima que las hembras producen hasta diez generaciones de progenie antes de morir. Tienen dimorfismo sexual y su ciclo de vida presenta dos modos de reproducción. Su modo primario de reproducción asexual es la partenogénesis, por lo que no necesita de fecundación interna para reproducirse, pudiendo una hembra de rotífero producir cerca de 7 huevos simultáneamente sin necesidad de la presencia del macho. Estos huevos son idénticos genéticamente y pueden tener descendencia a las 18 horas tras la eclosión.

Durante la partenogénesis las hembras amícticas producen huevos amícticos (diploide, cromosomas $2n$) los que se desarrollan nuevamente en hembras amícticas. Esta es la manera más rápida de reproducción y por lo tanto la más importante para la producción intensiva de rotíferos. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables, pueden reproducirse de forma sexual donde son producidas hembras míticas y amícticas. Aunque ambas no son morfológicamente diferentes, las hembras míticas producen huevos haploides (n cromosomas). Las larvas que son incubadas fuera de estos huevos míticos infértiles se desarrollan en machos haploides. Estos machos son aproximadamente un cuarto del tamaño de la hembra; ellos no poseen tracto digestivo ni vesícula, pero tienen un sobredimensionado testículo lleno de esperma. Los huevos míticos que eclosionarán en machos son significativamente menores en tamaño, mientras que los huevos míticos fertilizados son más grandes y poseen una capa externa gruesa y débilmente granulada. De estos huevos llamados latentes, únicamente eclosionarán hembras amícticas bajo cambios repentinos en las condiciones ambientales como la temperatura, salinidad o en las condiciones alimenticias lo que les permite asegurar la supervivencia de la población en condiciones adversas.

Los machos tienen menor valor nutricional que las hembras debido a que su gran movilidad les reduce la posibilidad de ser consumidos por las larvas y la ausencia del sistema digestivo impide su enriquecimiento con los nutrientes que son esenciales para las larvas de peces o crustáceos. El número de huevos de resistencia producidos por una hembra de forma sexual (1-8) es significativamente menor que los que produce una de forma asexual (18-23) y los huevos que producen no eclosionan inmediatamente, lo que significa que con la reproducción sexual los rotíferos resultan menos adecuados. Si se tienen en cuenta todos estos factores los costes de un huevo de larga duración será superior al menos en un 20-30% que los producidos de forma asexual. Se debe resaltar que la densidad de la

población del rotífero juega también un papel importante en la estrategia del modo de reproducción.

2.1. Parámetros técnicos y fisicoquímicos para el cultivo de rotíferos

2.1.1. Calidad del agua

Antes de comenzar el cultivo, el agua debe ser clorada con cloro activo a 5 ppm durante 1 hora y neutralizada con tiosulfato de sodio de 5-6 ppm. Se deben tener controles bastante estrictos, sobre todo cuando las siembras son a altas densidades ya que el tanque donde se tiene el cultivo de rotíferos se ensucia fácilmente. Por tal razón diariamente se debe purgar una parte del volumen, sobre todo al fondo del tanque, para recoger rotíferos muertos o materia orgánica que al descomponerse puede generar la aparición de microorganismos nocivos para el cultivo. Este volumen de agua debe ser repuesto todos los días añadiendo cada día agua dependiendo de la densidad de los rotíferos.

Los rotíferos pueden tolerar temperaturas entre 15 a 31°C, siendo 25°C la temperatura óptima de desarrollo. El pH óptimo para ésta especie se encuentra entre 6 y 8. En caso de una caída de acidez, se pueden minimizar sus efectos utilizando bicarbonato sódico. Tienen una gran tolerancia al hacinamiento, así como a las condiciones ambientales que de él se derivan, tales como incremento de la concentración de compuestos nitrogenados tóxicos (amoníaco, nitritos), descenso en la concentración de oxígeno, etc. No obstante, siendo el objetivo optimizar la producción, se debe evitar que tales condiciones se den en el cultivo. Con tal fin, se deberán realizar renovaciones parciales del medio de cultivo, intentando eliminar la mayor cantidad de materia orgánica en suspensión posible, al ser ésta un foco de microorganismos oportunistas no deseados y también una fuente de los compuestos nitrogenados anteriormente comentados. Para esto, se debe parar la aireación del tanque para que la materia orgánica se decante y pueda ser eliminada mediante una purga del sistema (apertura de la llave de paso de la base del tanque).

2.1.2. Filtración

Se requiere que el agua pase por un filtro de arena (para que decante el sedimento), uno o dos filtros de cartucho de 50 y 10 µm para atrapar partículas y microorganismos y un filtro de luz ultravioleta para erradicar hongos, bacterias y virus.

2.1.3. Iluminación

Para el cultivo de rotíferos no es necesaria una gran instalación de luz, ya que sólo necesitan ver el alimento. En pequeñas instalaciones con un tubo fluorescente T5 o T8 entre los 30 y 60 W, ubicado a 1 m del tanque es suficiente para este fin. Sin embargo, hay que tratar de mantener un fotoperíodo de 24 h de luz en el caso que se vaya a alimentar el cultivo de rotíferos con microalgas para que estas puedan realizar la fotosíntesis.

2.1.4. Aireación

Se debe airear el tanque con el fin que haya suficiente oxígeno disuelto (2-5 ppm) debido a la gran cantidad de alimento (microalgas) y al consiguiente aumento de la población de rotíferos. El aireador debe ubicarse en el centro del tanque a una altura de unos 15 cm del fondo, con un tamaño de burbuja grande para mantener en constante movimiento toda la masa de agua. Es importante resaltar que para tanques de volúmenes grandes se necesita un compresor industrial para generar la aireación necesaria.

2.2. Montaje del cultivo

El cultivo de rotíferos se divide en dos fases: mantenimiento de un stock (cultivo en volúmenes pequeños) y cultivo a gran volumen.

2.2.1. Mantenimiento de los rotíferos

Se inoculan tubos de ensayo de 20 ml con una densidad de 20 rotíferos (la densidad no debe ser mayor a 1 rot/ml de cultivo). Estos deben ser alimentados con 1 ml de *Chlorella* sp., a una densidad de cultivo de 2,5 a 5 x10⁶ cel/ml, durante 2 o 3 semanas, hasta que alcancen una densidad de 10 rotíferos/ml. Posteriormente se filtran con una malla de 50 µm enjuagando abundantemente con agua sin mucha presión para no dañar sus estructuras y se transfieren a una fiola o erlenmeyer de 1000 ml donde se siembran con *Chlorella* sp., a una densidad de 1 rot/ml. Luego de unos días, cuando alcancen la densidad de 10 rot/ml se cosecha y se utiliza la cantidad requerida de rotíferos para re-inocular en tubos de ensayo y comenzar el ciclo nuevamente. Debido a que estas cepas son las de reserva del cultivo, se deben mantener unas condiciones asépticas muy estrictas para que no haya contaminación y deben almacenarse en un cuarto cerrado, con luz y temperatura constante. Otra manera de garantizar un stock futuro, es guardar los huevos de resistencia producidos por los rotíferos en el tanque de producción. La cantidad de estos huevos variará en función de las condiciones de cultivo. Para su conservación, se recogerán con una pipeta Pasteur y se dejarán secar en una placa de Petri. Después se colocarán en viales y se guardarán en nevera o a temperatura ambiente. Es recomendable que pasen por un período de bajas temperaturas para incrementar la tasa de eclosión.

2.2.1.1. Método de conteo

Se toman 100 ml del tanque de cultivo, se homogenizan (agitando) y se saca una alícuota de 5 ml y se coloca en una cámara de conteo de zooplancton. Para contar los rotíferos se hacen 3 conteos en los que se agrega una gota de lugol a la alícuota para teñirlos y facilitar la visualización en el microscopio óptico y se anota la cantidad de rotíferos presentes en la alícuota. En base a la media de la cantidad de rotíferos contados, conociendo el volumen de la alícuota puesta en el campo de la cámara, se calcula el volumen del cultivo que se necesita para obtener la cantidad de rotíferos deseada, a través de la fórmula:

$$\text{Volumen 1} * \text{Concentración 1} = \text{Volumen 2} * \text{Concentración 2}$$

2.2.2. Cultivo masivo de rotíferos

Existen 3 sistemas de producción de rotíferos a gran escala; 1. Cultivos batch, 2. Cultivos semi-continuos y 3. Cultivos continuos (tipo quemostato).

2.2.2.1. Cultivos tipo batch

Este tipo de cultivo consiste en sembrar los rotíferos a bajas densidades en “agua verde” que se ha producido por fertilización previa de los tanques o estanques. De los Erlenmeyer de 1000 ml se inoculan tanques de plástico de 50 l y se alimentan con *Chlorella* sp., (enriquecida con vitamina B₁₂), hasta que alcancen una densidad aproximada de 150 rot/ml. Luego deben ser transferidos a tanques de 200, 500 litros, etc, según la cantidad de rotíferos que se necesiten y por un lapso de 4 días en cada fase. Los tanques deben ser preferiblemente cónicos con una válvula situada en la parte inferior central del tanque que permita la extracción total del cultivo.

Diariamente, se debe purgar la llave por unos segundos para limpiar el cultivo ya que la materia orgánica en descomposición se precipita en el fondo del tanque. El mismo volumen de agua que se saca, debe ser repuesto nuevamente para renovar y mantener la calidad del agua.

Al cabo de 4-5 días de cultivo el volumen final del tanque es alcanzado y se procede a filtrarlos y concentrarlos en un recipiente ya que se recomienda sumergirlos brevemente (15 seg aproximadamente) en lejía diluida en agua con el fin de eliminar ciliados y otros organismos indeseados. De igual modo, el tanque y los accesorios (tamices, tubos de aireación) se deben introducir en lejía comercial (10 ppm) durante 24 h y enjuagarlos muy bien para poder volver a reutilizarlos. Los rotíferos concentrados deben ser enriquecidos con ácidos grasos esenciales y proteínas antes de suministrarlos a las larvas. Una pequeña fracción de estos, se utiliza para inocular el tanque nuevo. La importancia del enriquecimiento variará en función de la especie de pez a cultivar. Se pueden hacer aproximaciones de estos requerimientos con especies marinas u otras especies continentales que requieran de este tipo de alimento en sus primeras fases de su desarrollo larvario si bien, lo más recomendable es la puesta a punto de un protocolo exclusivo para la especie de interés en cuestión.

En un cultivo de rotíferos sano se dobla su número cada 4 días y como mínimo un 25% de ellos debe poseer huevos. Por lo tanto, si los animales no llevan huevos, presenta movimientos lentos y su cuerpo es translúcido, son claros síntomas de falta de alimento. De igual forma, se ha sugerido que cuando los cultivos de rotíferos muestran una tasa de huevos menor que 15% de hembras con huevos, se puede colapsar el cultivo debido al envejecimiento de los mismos, por lo que se recomienda vaciar y limpiar el tanque y comenzar nuevamente el cultivo con una cepa nueva. A su vez, si se presentan machos en el cultivo a una tasa mayor al 30 % del cultivo, se sugiere empezar el cultivo nuevamente.

2.2.2.2. Cultivos semi-continuos

Este sistema de cultivos permite realizar cosechas periódicas (casi a diario) de rotíferos extrayendo una parte del medio y reemplazando con agua. El volumen extraído depende de la tasa de reproducción de los rotíferos y se cosecha extrayendo sólo el número de rotíferos ganados por la reproducción desde la última

cosecha. En general estos sistemas suelen requerir un gran número de tanques con rangos de volumen desde 3.000-30.000 l.

Estos cultivos se caracterizan por sus bajas densidades (100-300 rot/ml) y su alimentación es a base de levadura de pan. Los cultivos se mantienen varios días o semanas, pero eventualmente los productos procedentes de la excreción (restos sólidos y productos nitrogenados) que se acumulan en el fondo de los tanques pueden colapsar los cultivos. La renovación de estos restos sólidos aumenta la reproducción de los rotíferos y las densidades pueden llegar hasta 400 individuos/ml y los cultivos son más estables durando más de 30 días con cosechas diarias. En estos cultivos los restos sólidos son transferidos a tanques de descomposición y después de la mineralización se transfieren para cultivos de algas. Además, estos grandes tanques tienen otros organismos que pueden competir por la comida con los rotíferos (p.e. ciliados, copépodos, etc) o dañarlos, como virus, bacterias u hongos.

Una alta densidad en cultivos semi-continuos se pueden lograr, usando dietas comerciales modificadas con una recirculación media del cultivo. El método consiste en disponer de tanques de cultivo de 100 l, un tanque para establecer la materia particulada, un *skimmer* y un biofiltro. La cantidad de alimento que se suministra en este sistema se ajusta al flujo de agua y a las pérdidas de alimento por el *skimmer*. Los rotíferos iniciales están a una concentración de 250 rot/ml aproximadamente, la densidad se incrementa después de 8 días de cultivo hasta cerca de 3000 /ml y se mantiene a esta concentración un mes. Alrededor del 20% (30-60 millones de rotíferos) del stock de cultivo se cosecha diariamente.

La calidad del agua se mantiene con una tasa de renovación diaria del 500%. A pesar de que es posible obtener densidades de 8.000 rot/ml a los 8 días de la inoculación, se recomienda que la producción de rotíferos se mantenga a menores densidades cuando el sistema es estable. El número total de rotíferos producidos por este sistema es de alrededor de $1,7 \times 10^9$ durante 32 días de cultivo.

2.2.2.3. Cultivos continuos

Estos cultivos se basan en modelos de microorganismos como quemostatos o turbidostatos y en un control muy riguroso (temperatura, pH, oxígeno suministrado y densidad de los organismos cultivados). Permiten una fácil manipulación fisiológica y calidad nutritiva de los rotíferos, que alimentados con *Chlorella vulgaris*, supone densidades de cultivo (por encima de 10.000 rot/ml). En la fase de crecimiento pueden ser cosechados continuamente y su calidad nutritiva se mantiene añadiendo los alimentos adecuados.

Parte de la eficiencia en la producción de los rotíferos con este método intensivo se atribuye al crecimiento de bacterias y al consumo de ellas por los rotíferos, las cuales pueden llegar a alcanzar aproximadamente un 20% de la materia orgánica nitrogenada ingerida por los rotíferos. Este sistema necesita grandes instalaciones y dependen constantemente del suministro de microalgas condensadas.

2.3. Preparación del alimento

Si se alimenta con microalgas en este caso *Chlorella vulgaris*, se alimenta una vez al día, a una concentración de $2,5$ a 5×10^6 cel/ml (agua verde). También se puede alimentar con algas liofilizada disolviéndose la cantidad requerida en 500 ml de agua y licuándose por 3 minutos con una batidora de cocina.

Si se alimenta con levadura la ración diaria es de 1 g por cada millón de rotíferos y de levadura manipulada es de 300 a 550 mg por cada millón de rotíferos, manteniéndose el mismo procedimiento que con el alga liofilizada. Es importante, homogeneizar muy bien el alimento evitando dejar grumos porque serán partículas muy grandes que los rotíferos no pueden comer y por lo tanto se convertirán en material orgánico en descomposición.

2.4. Cosecha del cultivo

La cosecha se divide en dos partes: Aproximadamente un 20 % de la cosecha total se inocular en un nuevo cultivo, con la técnica descrita anteriormente. Al 80% restante, se aconseja agregarle enriquecedores comerciales para potenciar el valor nutritivo de este alimento vivo. Cada casa comercial tiene su propia receta dependiendo del producto. Por lo tanto, una vez hecho el cálculo del enriquecedor dependiendo de la densidad del cultivo, se pesa en un beaker con 1 l de agua y se licua con una batidora de cocina por 3 minutos hasta homogenizar la solución. Esta se divide en 2 tomas con intervalo de tiempo de 3 horas. A las 6 horas de haber dado la primera toma se puede cosechar los rotíferos para alimentar los peces o crustáceos. El tanque cosechado será limpiado y desinfectado con lejía y agua abundante. Antes de reutilizar un tanque se debe dejar un día secándose. Se debe realizar un seguimiento diario del cultivo anotando los parámetros más relevantes.