



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudio Genético y  
Morfológico del género  
*Paralichthys* en el Río de la  
Plata y su Frente Oceánico.**

Daniela Olsson.

Tutor: M.Sc. Alejandro Marquez, Laboratorio de Bioquímica de Organismos Acuáticos, DINARA-MGAP.

Co-tutor: Dr.PhD. Walter Norbis, Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

OCTUBRE 2011

Tribunal

Dr. Marcelo Loureiro

Dr. Alejandro D

## Agradecimientos:

-A mi tutor Ale Márquez, por su gran apoyo y paciencia en cada una de las etapas de este largo proceso. Siempre creyendo en mí, confiando y aguantando cada una de mis locuras.

-A mi co-tutor Walter Norbis, “my mentor” que desde el primer momento que golpee su puerta cuando recién comenzaba mi carrera me apoyo en cada una de mis locuras y jamás me dio la espalda, procurando siempre mi formación y desarrollo como biólogo pero también como persona, lo que él llama “la carrera paralela”. Cada una de sus inasistencias o “llegadas tarde” valieron la pena. La espera se recompensaba con largas charlas sobre la vida y obra de la especie de turno y anécdotas que le enseñaban a uno como ser biólogo y no morir en el intento.

-A mi “compañera de todas las horas” y amiga incondicional Manuela por enseñarme el valor de la amistad y saber que siempre puedo contar con ella.

-A mis hermanas de la vida Elisa, Valeria, Natalia, Lucia, Cristina y Soledad por ser incondicional y estar en los buenos y malos momentos.

-A José “otolito” Verocai, por su apoyo en los buenos y no tan buenos momentos que me tocaron vivir. A su familia un cariño grande.

-A María Noel y Sofía por su paciencia y apoyo en el laboratorio, haciendo aquellas tardes más divertidas y llevaderas.

-A Alfredo por abrirme desinteresadamente las puertas del laboratorio y permitirme llevar acabo mis locuras.

-A Silvia mi “madre académica” por los consejitos y charlas didácticas.

-A Javier y Daniel por la gran ayuda en los muestreos.

-A Ruben Canavese por su paciencia y apoyo.

-A Oscar Galli por su ayuda y aporte desinteresado para este trabajo. Ejemplar único en la fauna de DINARA.

-A la tripulación del Aldebarán por su ayuda en los muestreos, especialmente a Claudio Berriolo.

Muchas gracias a todos!!!!



## INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

---

El orden Pleuronectiformes incluye catorce familias de lenguados (Chapleau, 1993) y está compuesto por dos subórdenes, Psettodoidei integrado por la familia Psettodidae y Pleuronectoidei donde se agrupan las trece familias restantes, las cuales contienen aproximadamente 570 especies (Chapleau, 1993; Nelson, 1994). Dentro del Orden se encuentran especies de importancia comercial que pertenecen a las familias Pleuronectidae, Scopthalmidae y Soleidae (Sotelo *et al.*, 2001).

Los Pleuronectiformes se caracterizan por su notable metamorfosis donde a partir de una simetría bilateral a nivel de larva termina en juveniles y adultos lateralmente comprimidos con ambos ojos sobre un lado de la cabeza (Berendzen & Wheaton, 2002). La monofilia del orden se apoya en tres sinapomorfias morfológicas, la migración ocular durante la ontogenia, la posición anterior del origen de la aleta dorsal y la presencia de *recessus orbitalis*, órgano que permite protruir los ojos por encima de la superficie del cuerpo (Chapleau, 1993). La mayoría de las especies se agrupan principalmente en las familias Paralichthyidae y en menor grado en las familias Pleuronectidae, Achiropsettidae y Cynoglossidae (Fabre & Díaz de Astarloa, 1996). La familia Paralichthyidae (Girard, 1858) integrada por especies de alto valor a nivel comercial, es uno de los recursos pesqueros más importantes explotados en pesquerías artesanales y demersales en aguas argentinas y uruguayas Fabre & Díaz de Astarloa, 1996; Díaz de Astarloa & Munroe, 1998; Norbis *et al.*, 2005, 2006).

El género *Paralichthys* se distribuye a lo largo de la plataforma continental Sudamericana entre los 34° y 47° S (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). Hasta hace pocos años en aguas argentinas y uruguayas y de acuerdo a caracteres morfológicos se habían reportado seis especies de este género (Menni *et al.*, 1984; Fabre, 1988): *P. bicyclophorus* Miranda Ribeiro (1915), *P. brasiliensis* Ranzani (1842), *P. isoceles* Jordan (1891), *P. orbignyana* Valenciennes (1839), *P. patagonicus* Jordan (1889) y *P. simulans* Lahille (1939). Sin embargo *P. bicyclophorus* se considera como estadio juvenil de *P. patagonicus* (Díaz de Astarloa, 1995) y *P. simulans* estadio juvenil de *P. orbignyana*. Ninguna de estas especies ha sido bien definida y su distribución resulta dudosa aun (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). De acuerdo a Figueiredo & Menezes (2000) *P. brasiliensis* no estaría en aguas uruguayas. Esto denota las dificultades que ha presentado el género cuando se trata de identificar las especies integrantes del grupo.

Dentro de la zona común de pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU) se consideran especies de interés comercial a *P. isoceles*, *P. patagonicus*, *P. orbignyana* y *X. rasile* (Fabre & Díaz de Astarloa, 1996; Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). Ginsburg (1952) sugiere que *P. orbignyana* es la especie más común en la zona del Atlántico Suroccidental y el lenguado más importante en las capturas comerciales de la zona (Fabre & Díaz de Astarloa, 1996). Los lenguados pertenecientes a la familia Paralichthyidae, principalmente *P. patagonicus*, *P. orbignyana* y *X. rasile* son intensamente explotados en el Atlántico Suroccidental (Díaz de Astarloa, 2002). Las estadísticas de desembarques muestran que la captura de lenguado para Uruguay a partir de 1996 ha aumentado de forma exponencial observándose actualmente un aumento mayor al 400% (Norbis *et al.*, 2006), donde *P. patagonicus* es capturada en la plataforma continental y *P. orbignyana* en aguas de profundidades menores a los 40 metros, *P. isoceles* y *X. rasile* en áreas costeras pero en menor número en comparación con las anteriores especies (Díaz de Astarloa, 2002). De acuerdo a Norbis *et al.* (2006) las capturas de la flota costera entre 1996-1998 se quintuplicaron con respecto al periodo 1992-1995, alcanzando valores próximos a las 500 toneladas. A partir del año 2000 las capturas han disminuido considerablemente (Norbis *et al.*, 2006).

## **Problemáticas**

Según Díaz de Astarloa (2002) el rápido aumento de las capturas durante 1995-1998 principalmente por la flota costera (Norbis *et al.*, 2006) podría conducir a una disminución de la tasa de crecimiento poblacional y a largo plazo podría producir la extinción de uno de los principales recursos pesqueros de la región. Debido a esto se intentan dar los primeros pasos en el desarrollo de la acuicultura de lenguados (Wasielesky *et al.*, 1995, 1997; Sampaio & Bianchini, 2002; Ronzani, 2005). Para esta actividad la correcta identificación de las especies o las eventuales variantes genéticas contribuirían al desarrollo de un adecuado plan de cría. A pesar de su considerable importancia económica, aún no se ha investigado la composición genética de las poblaciones ni evaluado la posible presencia de diferentes stocks. En la región los datos son escasos, tanto desde el punto de vista de la sistemática (Ginsburg, 1952) como del punto de vista ecológico (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). Esta escasez de información podría deberse a la compleja morfología del grupo, dada por su similitud ecomorfológica (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). Las relaciones dentro del grupo basadas en evidencia morfológica no están bien definidas (Saitoh *et al.*, 2000). Una apropiada identificación de las especies es esencial para poder comprender tanto los parámetros poblacionales, cambios en la distribución y fluctuaciones en abundancia así como los rasgos ecológicos y biológicos de los mismos (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998).

La correcta identificación de los peces planos no es solo de interés de los consumidores sino que es también de gran importancia para la industria pesquera (Sotelo *et al.*, 2001). Luego del advenimiento de métodos moleculares para el análisis de la variación genética intra e interespecífica, el uso de marcadores moleculares como herramienta para la identificación de especies, la resolución de filogenias a partir de secuencias de ADN cobro una gran importancia (Kartavtsev & Lee, 2006). El ADN mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como herramienta en estudios evolutivos y poblacionales en muchos organismos eucariotas (Brown, 1985). Dado su herencia por línea materna y su alta sustitución nucleotídica es una herramienta muy útil para análisis taxonómicos, evolutivos y filogenéticos incluyendo estudios filogeográficos (Nei, 1987; Wallace, 1992; Avise, 2001). La necesidad de un análisis genético molecular en peces planos se ha vuelto relevante desde dos puntos de vista: 1) existencia de problemas taxonómicos para varios grupos y ciertas especies (Cooper & Chapleau, 1998) y 2) escasa información disponible sobre la estructura poblacional de especies con alto valor comercial (Kartavtsev *et al.*, 2007).

### ***HIPOTESIS***

---

- 1) Dado que todas las especies de lenguados presentan adaptaciones morfológicas al mismo modo de vida, mostrarán solapamiento en muchos de los caracteres morfológicos.
- 2) Individuos de diferentes especies presentarán diferencias a nivel molecular.

### ***OBJETIVO***

---

#### Objetivo general

-Definir caracteres que permitan la correcta identificación de las especies de lenguados del género *Paralichthys* en aguas uruguayas tanto a nivel morfológico como genético.

#### Objetivos específicos

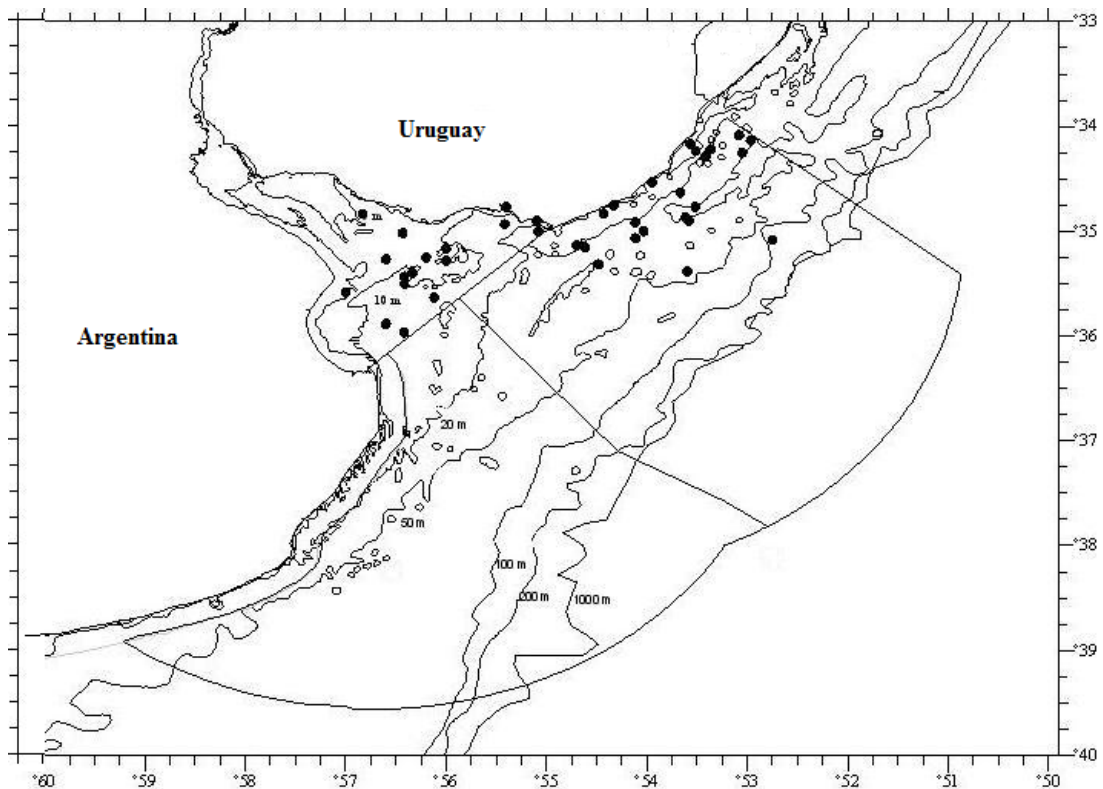
-Evaluar el grado de solapamiento morfológico e identificar los caracteres que permitan la correcta diferenciación de las especies del género.

-Evaluar el grado de diferenciación genética de las especies descriptas.

## MATERIALES Y METODOS

### Colecta de muestras

Un total de 141 ejemplares fueron colectados en campañas de relevamiento del B/I Aldebarán de Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) en el Río de la Plata y su Frente Oceánico. También se realizaron muestreos empleando red de arrastre de playa de 12,5x1,10 m y un cm de malla en el copo en las localidades de Arroyo Solís Grande (Canelones-Maldonado), Santa Lucía del Este (Canelones) y Piriapolis (Maldonado) (Fig. 1). De acuerdo a los caracteres diagnóstico propuestos en Díaz de Astarloa (1995, 2005), del total de la muestra se identificaron 37 individuos correspondientes a *P. orbignyana* (Po) (Fig. 3), 42 a *P. patagonicus* (Pp) (Fig. 2), 19 a *P. isósceles* (Pi) (Fig. 4) y los 43 restantes a *Oncopterus darwini* (Od) (Anexo 1) (Fig. 5) especie que se utilizó como grupo externo en el posterior análisis filogenético. Muestras de músculo de cada uno de los ejemplares colectados se fijaron en etanol 96° para posteriores análisis moleculares (Tabla 1.)



**Figura 1.** Distribución de los puntos de muestreo de los individuos utilizados en el estudio.





**Figura 2.** *Paralichthys patagonicus*



**Figura 3.** *Paralichthys orbignyanus*



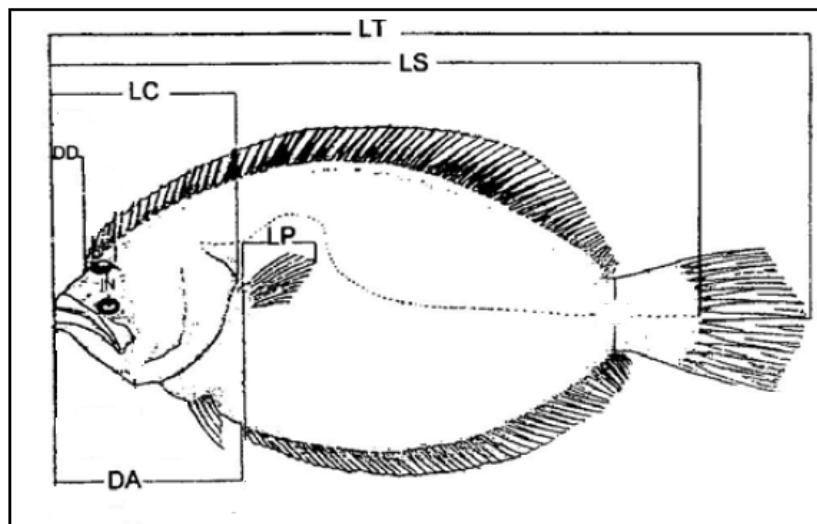
**Figura 4.** *Paralichthys isósceles*



**Figura 5.** *Oncopterus darwinii*

#### **Análisis de caracteres morfométricos.**

Para cada uno de los individuos colectados se obtuvieron los siguientes datos morfométricos (Fig. 6): largo total (LT), longitud estándar (LS), ancho interorbital (IN), longitud de la aleta pectoral (LP), longitud desde la boca hasta la base de la aleta anal (DA), longitud desde la boca hasta la base de la aleta dorsal (DD) y longitud de la cabeza (LC). En base al análisis de estas variables y según los criterios propuestos por Díaz de Astarloa (1995, 2005), se determinaron diferentes especies.



**Figura 6.** Variables morfométricas obtenidas (Modificado de Díaz de Astarloa, 1995)

**Tabla 1.** Individuos utilizados para el análisis molecular(N=35).(Po: *Paralithys orbignyanus* , Pp: *Paralithys patagonicus*, Pi: *Paralithys isósceles*, Od: *Oncopterus darwinii*).

Lugar de colecta	Po	Lugar de colecta	Pp
(latitud –longitud)	n° de indiv	(latitud –longitud)	n° de indiv
35°30'-56°25'	1	35°05'-52°45'	60
35°10'-56°00'	8	35°05'-52°45'	61
35°09'-54°37'	87	34°46'-53°31'	108
35°05'-52°45'	64	34°55'-54°07'	127
34°08'-52°58'	101	35°00'-54°02'	129
34°13'-53°22'	96		
35°08'-54°42'	131		
35°38'-56°07'	139		
35°26'-56°25'	141		
35°26'-56°25'	142		
35°05'-52°45'	69		
34°50'-56°50'	9		
34° 54'-55°06'	21		
34°46'-55°24'	42		
34°46'-55°24'	45		
34°46'-55°24'	47		
34°46'-55°24'	77		
34°46'-55°24'	78		
35°00'-55°05'	80		
Lugar de colecta	Pi	Lugar de colecta	Od
(latitud –longitud)	n° de indiv	(latitud –longitud)	n° de indiv
35°09'-54°37'	84	34°46'-55°24'	26
35°05'-52°45'	70	34°32'-53°57'	99
35°05'-52°45'	72		
35°05'-52°45'	74		
35°05'-52°45'	75		
34°46'-53°31'	111		
34°46'-53°31'	113		
34°46'-53°31'	114		
34°38'-53°40'	115		

### Análisis de datos

Para verificar la correcta identificación de los ejemplares colectados y a los efectos de verificar qué variables morfométricas pueden aportar más a la discriminación de las diferentes especies, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Davis, 1986; Harper, 1999) utilizando la matriz de correlaciones y un análisis discriminante y canónico de poblaciones (CVA) (Manly 1994). Se utilizó el programa PAST versión 2.10.

Por medio de estos análisis se intento evaluar la separación entre especies ya que los ejes discriminantes y canónicos permiten ver que tan alejados están los grupos en el espacio multivariados maximizando la variación entre los mismos (Manly, 1994). Antes de realizarse los análisis multivariados, se removió el efecto del tamaño y la alometría sobre las variables analizadas según el método propuesto por Leonart *et al* (2000). Para esto las 6 variables analizadas fueron estandarizadas de acuerdo al largo total (LT). Utilizando el modelo de regresión estándar  $Y=aX^b$ , ajustada mediante la transformación logarítmica de las variables X e Y, para homogenizar los residuos. Cada medida  $Y_{ij}$ , donde i es la variable y j el individuo fue transformada en  $Z_{ij}$  de acuerdo a  $Z_{ij}= Y_{ij} (X_0/X_j)^{bi}$  donde  $X_j$  es el largo total del individuo j,  $X_0$  es el largo total de referencia (se utilizo el promedio del largo total ) y  $bi$  es el parámetro alométrico que relaciona la variable dependiente  $Y_i$  con la variable independiente X.  $Z_{ij}$  es el valor medido  $Y_{ij}$  si el largo del ejemplar es  $X_0$ , considerando su crecimiento alométrico (Lombarte & Leonart, 1993; Leonart *et. al.*, 2000).

## **Análisis Molecular**

### Extracción de ADN

Se realizo extracción de ADN de 35 individuos de diferentes puntos de muestreo (Fig. 7). Se utilizó el método del fenol-cloroformo de acuerdo a Maniatis *et al.* (1982)

### Amplificación por PCR

Se amplificó un fragmento del gen de citocromo b de aproximadamente 400pb mediante la utilización de cebadores L14735 y H15149AD (Burgener, 1997) (Fig. 8).

Para 50 ml de la reacción PCR se usaron: 5-50ng de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerasa, 200 mM de cada dNTP y 0,5 mM de cada primer. La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 45 segundos a 52°C y 45 segundos a 72°C; y una extensión final a 72° durante 7 minutos.

### Secuenciación

Las regiones amplificadas mediante PCR fueron enviadas a MACROGEN INC (Corea) donde se realizó la purificación y secuenciación automática de las mismas.

## Edición de secuencias

Para la edición de secuencias se trabajó con el programa Bioedit (Hall, 1999) y el alineamiento se realizó con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997).

## Análisis

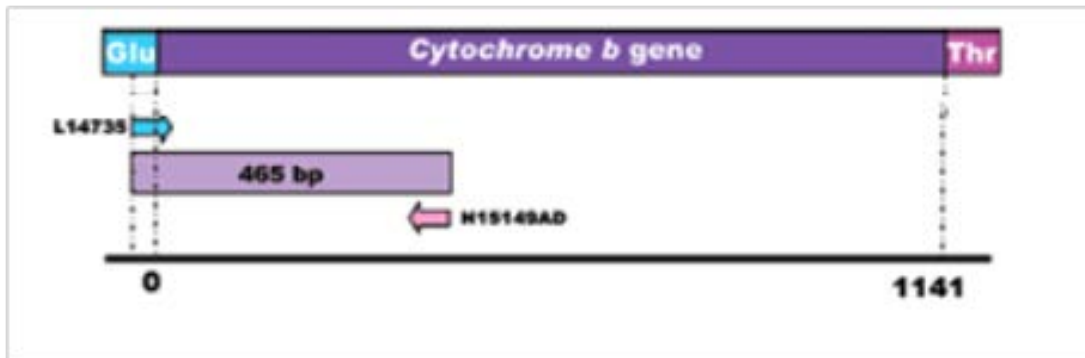
La reconstrucción filogenética de las secuencias a partir de distancias genéticas se realizó en el programa MEGA4 (Tamura, 2007), utilizando el método de reconstrucción filogenética “Neighbor Joining”(NJ) como algoritmo de agrupamiento.

Para el análisis de haplotipos se utilizó el programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009).

Se utilizó el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2003) para determinar el tipo de modelo evolutivo de la especie en estudio. También se realizó un árbol de haplotipos con criterio de máxima verosimilitud (ML), utilizando el programa PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) utilizando como modelo de evolución molecular el escogido con ModelTest y con un bootstrap de 1000 pseudoréplicas.



**Figura 7.** Distribución de los individuos utilizados para el análisis molecular.  
(●: *P. orbignyana*A (Po\_A); ●: *P. orbignyana*B (Po\_B); ▲: *P. patagonicus* (Pp); +: *P. isosceles* (Pi); ☆: *O. darwini* (Od)).



**Figura 8.** Ubicación del fragmento de ADN a amplificar.(Modificado de Espinera *et al*, 2008).

## **RESULTADOS**

---

### **Análisis de caracteres morfológicos**

Los tres primeros factores del análisis de componentes principales (ACP) explicaron el 72,44% de la varianza total. El primer factor explicó el 30,96 % de la varianza total y las variables que más aportaron fueron DA en sentido positivo y DD en sentido negativo. El segundo factor explicó el 22,06% de la varianza total y las variables que más aportaron fueron LP en sentido positivo y LS en sentido negativo. El tercer factor explicó el 19,44 % de la varianza total (casi tanto como el segundo factor) y las variables que más contribuyeron a su formación fueron LC en sentido positivo e IN en sentido negativo (Tabla 2). Se encontró que existe una importante superposición de los individuos de las diferentes especies en el espacio bidimensional determinado por los tres primeros componentes, de acuerdo a la contribucion de las variables morfométricas (Fig.9).

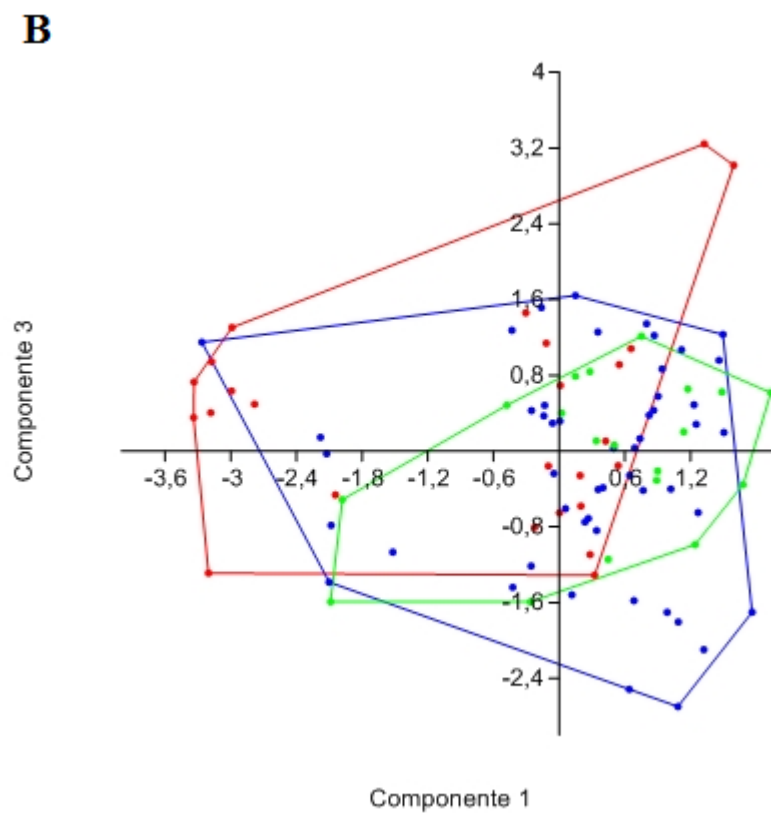
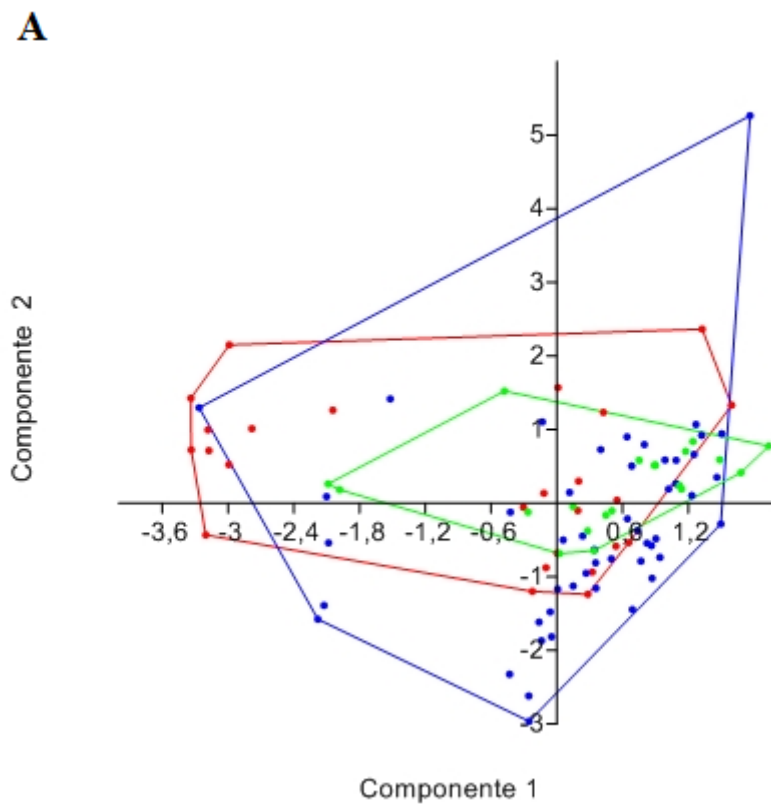
Respecto al factor 1, las variables DA e IN estuvieron positivamente correlacionados, mientras que DD estuvo negativamente correlacionado. Las variables LP y LS estuvieron positiva y negativamente correlacionados al factor 2 respectivamente y la variable LC estuvo positivamente correlacionada al factor 3 (Tabla 3).

**Tabla 2.** Valor de factores de carga de las variables morfométricas para los tres primeros componentes.

	<b>Comp 1</b>	<b>Comp 2</b>	<b>Comp 3</b>
<b>LS</b>	-0,034	-0,536	0,511
<b>LC</b>	0,073	0,456	0,679
<b>LP</b>	0,161	0,647	-0,073
<b>IN</b>	0,372	0,015	-0,450
<b>DA</b>	0,668	0,024	0,258
<b>DD</b>	-0,618	0,289	0,041

**Tabla 3.** Valores del coeficiente de correlación de las variables con los 3 primeros componentes (Comp).

	<b>Comp 1</b>	<b>Comp 2</b>	<b>Comp 3</b>
<b>LS</b>	-0,046	-0,617	0,552
<b>LC</b>	0,099	0,525	0,734
<b>LP</b>	0,220	0,744	-0,079
<b>IN</b>	0,508	0,017	-0,486
<b>DA</b>	0,910	0,028	0,279
<b>DD</b>	-0,842	0,332	0,044

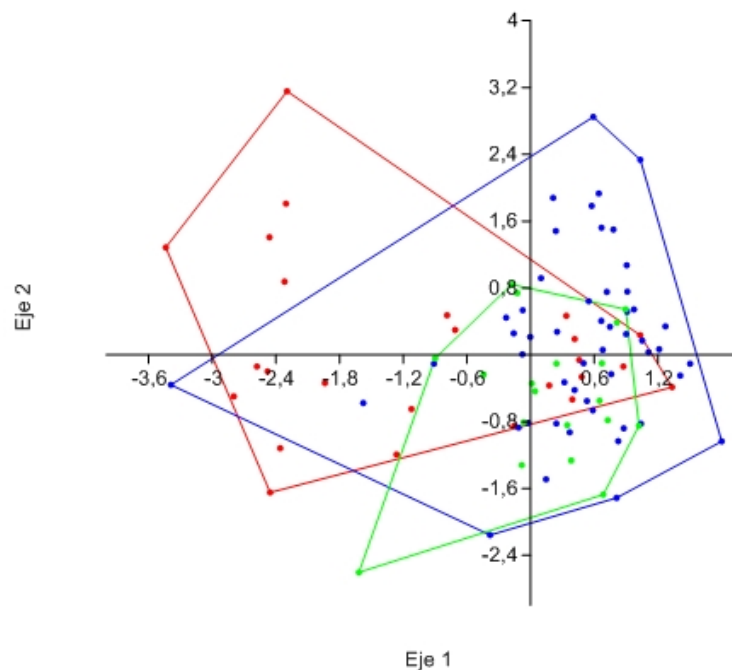


**Figura 9.** Proyección bidimensional de los componentes (comp) 1-2 (A) y 1-3 (B) resultado del análisis de componentes principales de los datos morfométricos para el total de los individuos colectados por especie (rojo: *P. orbignyanus*, azul: *P. patagonicus*, verde: *P. isosceles*)

El análisis discriminante aplicado a la matriz de datos morfométricos, presentó diferencias significativas entre grupos de especies (Wilks  $\lambda=0,666$ , Pillai = 0,3516;  $F_{12,176} = 3,129$ ;  $p = 0,000472 < 0,05$ ). El primer factor canónico explicó el 86,36% del total y el segundo el 13,64% del total (Fig. 10). Las variables que más contribuyeron a la discriminación de los grupos fueron IN con signo positivo y DD con signo negativo (Tabla 4). Analizando esas mismas variables se encontraron diferencias significativas entre *P.orbignyanus* y las otras dos especies (Tabla 5).

**Tabla 4.** Aporte de las variables morfométricas analizadas a cada uno de los ejes canónicos.

	Eje 1	Eje 2
<b>LS</b>	0,043	0,100
<b>LC</b>	-0,025	-0,089
<b>LP</b>	0,013	-0,004
<b>IN</b>	0,431	0,010
<b>DA</b>	-0,020	0,018
<b>DD</b>	-0,062	0,050



**Figura 10.** Resultado del análisis canónico de poblaciones para los datos morfométricos por especie. (rojo: *P.orbignyanus*, azul: *P.patagonicus*, verde: *P.isosceles*)



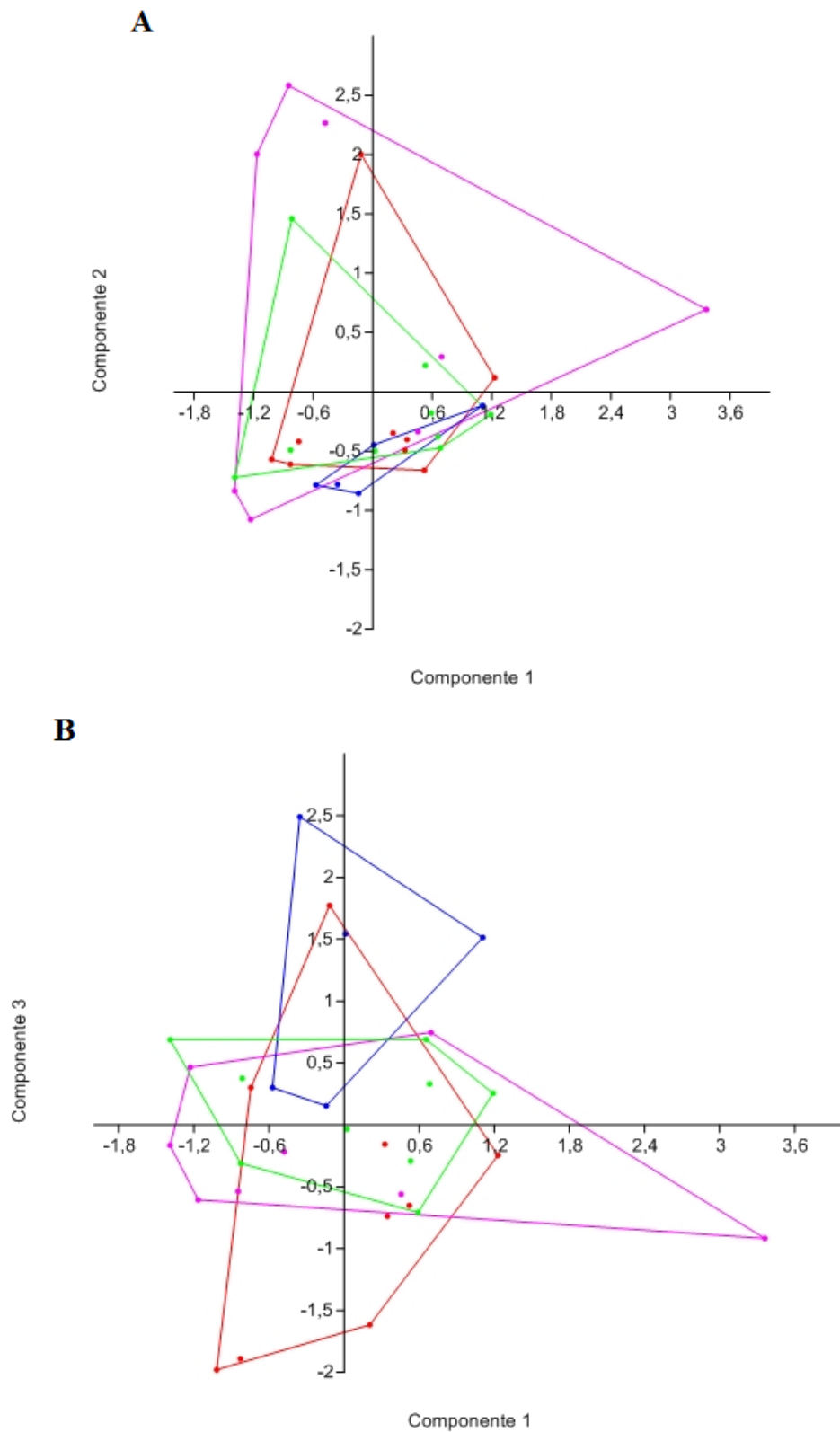
**Tabla 5.** Resultado del Test de Hotelling corregido por el criterio de Bonferroni para el total de individuos analizados según los datos morfológicos por especie (Po: *P. orbignyana*, Pp: *P. patagonicus*, Pi: *P. isosceles*)

	<b>Po</b>	<b>Pp</b>	<b>Pi</b>
<b>Po</b>	0	6,4027E-05	0,024016
<b>Pp</b>	6,40E-05	0	0,391096
<b>Pi</b>	0,024016	0,391096	0

A partir del análisis molecular se observó que los individuos de *P. orbignyana* se dividieron en dos grupos los cuales fueron identificados con Po\_A y Po\_B (Tabla 6).

**Tabla 6.** División de acuerdo al análisis molecular de *P. orbignyana*(Po).

<b>Grupo A</b>		<b>Grupo B</b>	
<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>	<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>
<b>Po_A 1</b>	35°30'-56°25'	<b>Po_B 9</b>	34°50'-56°50'
<b>Po_A 8</b>	35°10'-56°00'	<b>Po_B 21</b>	34° 54'-55°06'
<b>Po_A 87</b>	35°09'-54°37'	<b>Po_B 42</b>	34°46'-55°24'
<b>Po_A 64</b>	35°05'-52°45'	<b>Po_B 45</b>	34°46'-55°24'
<b>Po_A 101</b>	34°08'-52°58'	<b>Po_B 47</b>	34°46'-55°24'
<b>Po_A 96</b>	34°13'-53°22'	<b>Po_B 77</b>	34°46'-55°24'
<b>Po_A 131</b>	35°08'-54°42'	<b>Po_B 78</b>	34°46'-55°24'
<b>Po_A 139</b>	35°38'-56°07'	<b>Po_B 80</b>	35°00'-55°05'
<b>Po_A 141</b>	35°26'-56°25'		
<b>Po_A 142</b>	35°26'-56°25'		
<b>Po_A 69</b>	35°05'-52°45'		



**Figura 11.** Analisis de componentes principales 1-2 (A) y 1-3(B) de las variables morfometricas de aquellos individuos utilizados para el analisis molecular (rojo: *P. orbignyana* A(P.o\_A), fucsia: *P. orbignyana* B(P.o\_B), azul: *P. patagonicus*(P.p), verde: *P. isosceles*(P.i)).

El análisis de componentes principales de las variables morfométricas realizado con los individuos que se utilizaron para el análisis molecular (Fig. 11), mostro que los tres primeros componentes explicaron el 81,31% de la varianza total. El primer componente explicó el 29,24 % de la varianza total y las variables que más aportaron fueron LP en sentido positivo y DD en sentido negativo. El segundo componente explicó el 27,59% de la varianza total y las variables que más aportaron fueron DD en sentido positivo y DA en sentido negativo. El tercer factor explicó el 23,58 % de la varianza total y las variables que mas contribuyeron a su conformación fueron LS en sentido negativo e IN en sentido positivo (Tabla 7).

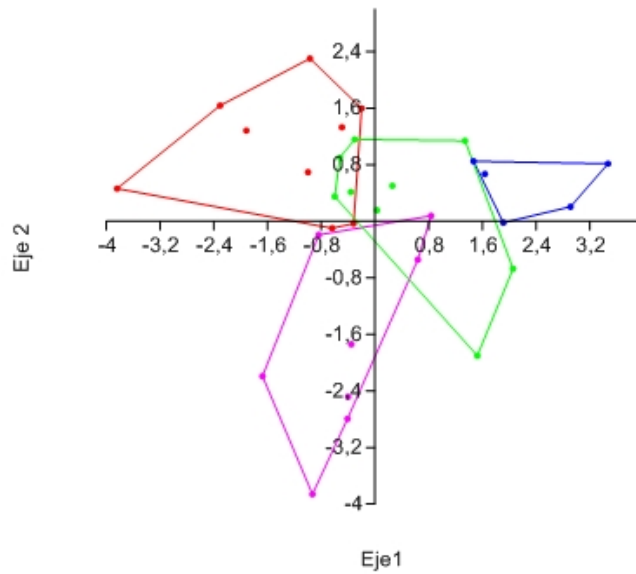
**Tabla 7.** Valor de factores de carga de las variables morfométricas para los tres primeros componentes para aquellos individuos por especie que fueron parte del análisis molecular.

	<b>Comp 1</b>	<b>Comp 2</b>	<b>Comp 3</b>
<b>LS</b>	0,045	-0,024	-0,662
<b>LC</b>	0,579	0,365	-0,243
<b>LP</b>	0,595	0,25	0,288
<b>IN</b>	0,072	-0,134	0,639
<b>DA</b>	0,539	-0,499	-0,073
<b>DD</b>	-0,11	0,732	0,068

Las variables de mayor correlación con el componente 1 fueron LC, LP y DA; con el componente 2, DD y con el componente 3 LS (Tabla 8).

**Tabla 8.** Valores del coeficiente de correlación de las variables morfométricas con los tres primeros componentes (Comp) para aquellos individuos por especie que fueron parte del análisis molecular.

	<b>Comp 1</b>	<b>Comp 2</b>	<b>Comp 3</b>
<b>LS</b>	0,060	-0,031	-0,791
<b>LC</b>	0,767	0,478	-0,290
<b>LP</b>	0,787	0,327	0,345
<b>IN</b>	0,095	-0,176	0,763
<b>DA</b>	0,714	-0,652	-0,087
<b>DD</b>	-0,145	0,957	0,082



**Figura 12.** Resultados del análisis canónico de poblaciones para los datos morfométricos de los individuos utilizados para el análisis molecular. (rojo: *P. orbignyana* A(Po\_A), fucsia: *P. orbignyana* B(Po\_B), azul: *P. patagonicus*(Pp), verde: *P. isosceles*(Pi)).

El análisis discriminante presentó diferencias significativas entre grupos (Wilks  $\lambda=0,1391$ , Pillai =1,349;  $F_{18,72} = 3,269$ ,  $p=0,0001819$   $p<0,05$ ) (Fig. 12). El primer factor canónico explicó el 52,09% del total y el segundo el 41,33% del total. Las variables que más contribuyeron a la discriminación de los grupos fueron LP con signo positivo y LC con signo negativo al eje canónico 1 e IN y LS con signos positivo al eje canónico 2 (Tabla 9). Se encontraron diferencias significativas entre *P. orbignyana* tanto los individuos pertenecientes al grupo A como al B con *P. patagonicus* (Tabla 10)

**Tabla 9.** Aporte de las variables morfométricas analizadas a cada uno de los ejes canónicos según los datos por especie para los individuos considerados en el análisis molecular.

	Eje 1	Eje 2
<b>LS</b>	-0,075	0,129
<b>LC</b>	-0,184	0,033
<b>LP</b>	0,175	0,021
<b>IN</b>	-0,074	0,724
<b>DA</b>	0,020	-0,047
<b>DD</b>	0,006	-0,084

**Tabla 10.** Resultado del Test de Hotelling corregido por el criterio de Bonferroni para los individuos analizados según datos morfométricos por especie para los individuos considerados en el análisis molecular (Po\_A: *P. orbignyanus* A, Po\_B: *P. orbignyanus* B, Pp: *P. patagonicus*, Pi : *P. isosceles*).

	Po_A	Po_B	Pp	Pi
Po_A	0	0,0283677	0,0435626	0,125763
Po_B	0,0283677	0	0,080893	0,111333
Pp	0,0435626	0,080893	0	0,291353
Pi	0,125763	0,111333	0,291353	0

### Análisis Molecular.

De acuerdo a jModelTest el modelo sustitución con el mejor ajuste para la especie estudiada fue HKY+G, con  $\alpha=0,2640$ . Todos los individuos correspondiente a una misma especie se agruparon juntos. El árbol filogenético muestra como se relacionaron los individuos estudiados (Fig. 13). *Paralichthys orbignyanus* se dividió en dos grupos Po\_A y Po\_B con un apoyo de bootstrap del 100% en cada uno de los nodos. Dentro de Po\_A se encontraron dos subgrupos, uno con 45% de apoyo de bootstrap que incluyó a los individuos PAR1, PAR64, PAR101, PAR142, PAR87, PAR141, PAR69, PAR8 y PAR131 el otro subgrupo con 41% de apoyo de bootstrap incluyó a el subgrupo antes mencionado y el PAR96. Ambos apoyos son bajos.

El grupo Po\_B formado por ocho individuos, incluye un subgrupo con 65% de apoyo de bootstrap conformado por siete individuos PAR 21, PAR 78, PAR 9, PAR 45, PAR 42, PAR 47 y PAR 77. En el caso de las demás especies que conforman el género en estudio también se encontró un buen apoyo de bootstrap del 100% en los tres casos. El grupo conformado por los individuos de la especie *P. isosceles* incluyó a PAR115, PAR72, PAR111, PAR75, PAR113, PAR84, PAR70, PAR114 y PAR74 donde los últimos ocho individuos forman un subgrupo cuyo apoyo de bootstrap fue del 64%.

El agrupamiento correspondiente a *P. patagonicus* está formado por cinco individuos y se subdividió en tres grupos. El primero con un nodo de 60% de apoyo incluyó a los individuos PAR108 y PAR129, el segundo con un 66% incluyó al subgrupo anterior y a PAR61 y el ultimo subgrupo conformado por los subgrupos anteriormente mencionados y a PAR127 tuvo un apoyo de bootstrap de 80% .PAR60 se encuentra por fuera de estos subgrupos formando parte del grupo de *P. patagonicus* también. El agrupamiento correspondiente al grupo externo *O. darwinii* está formado por los únicos ejemplares de la especie PAR26 y PAR99.

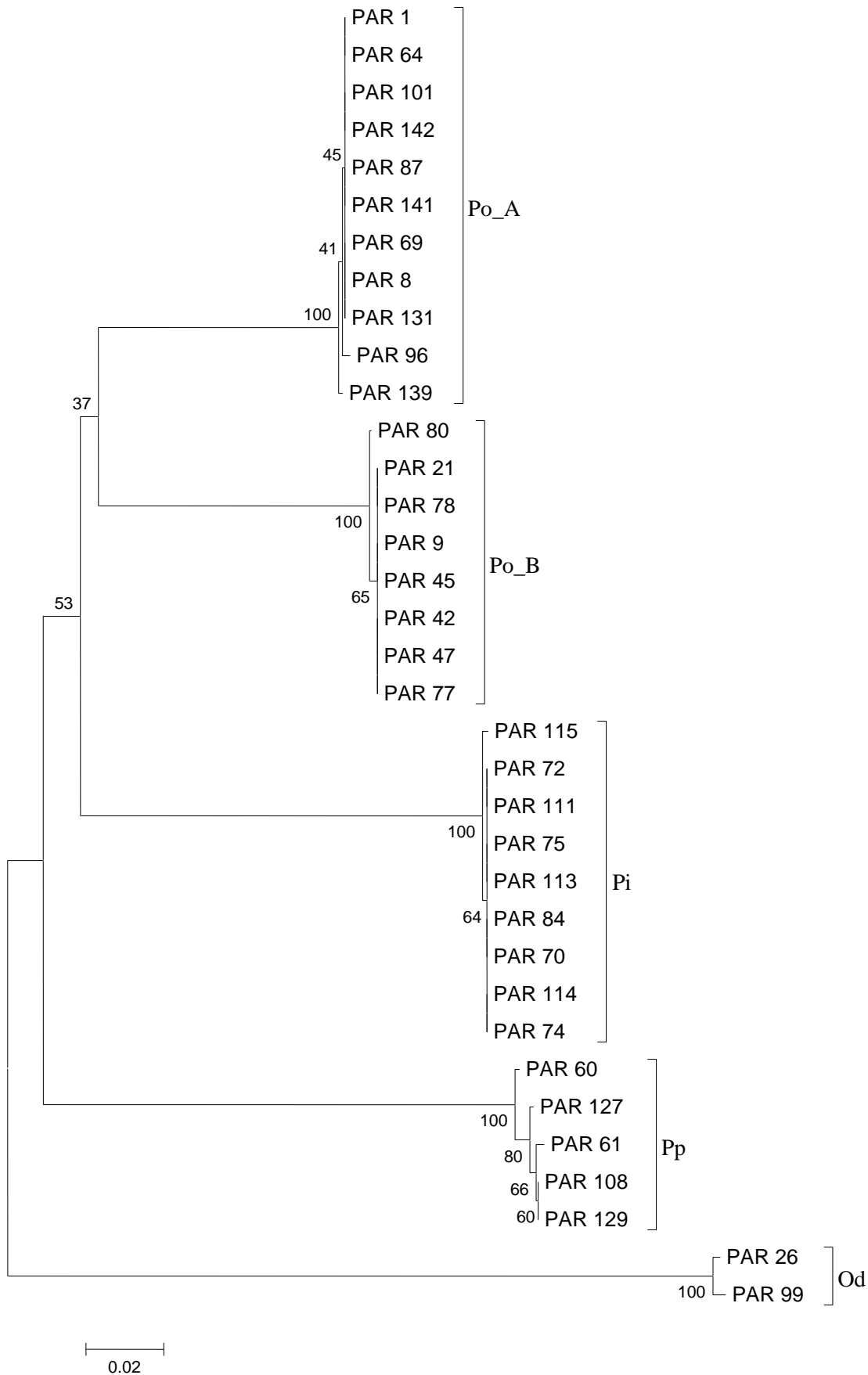
Los haplotipos mostraron que en *P. orbignyanus* las secuencias se agrupan en 5 haplotipos donde el más común fue el haplotipo 1 en el caso de Po\_A y el haplotipo 2 en el caso de Po\_B con 9 y 7 individuos respectivamente. Los haplotipos 1,7 y 13 formaron el clado Po\_A y el clado Po\_B fue

formado por los haplotipos 2 y 6. un claro agrupamiento de Po\_A en el haplotipo 1 con excepción de los individuos de *Paralichthys patagonicus* que fue la especie que más haplotipos abarcó. Los cinco individuos de la especie analizados se distribuyeron en los haplotipos 3, 4, 12 y 8 donde los tres primero incluyeron un solo individuo cada uno.

En el caso de *P. isosceles* abarcó los haplotipos 5 y 9 donde el primero incluyó 8 de los 9 individuos analizados (Tabla 11). Los integrantes del grupo externo se dividieron en los haplotipos 10 y 11. En cuanto a los haplotipos analizados con NJ como algoritmo de agrupamiento (Fig. 14) se observó que *P.isosceles* está más cercano a el grupo de *P. orbignyanus* con apoyo de bootstrap del 63%.

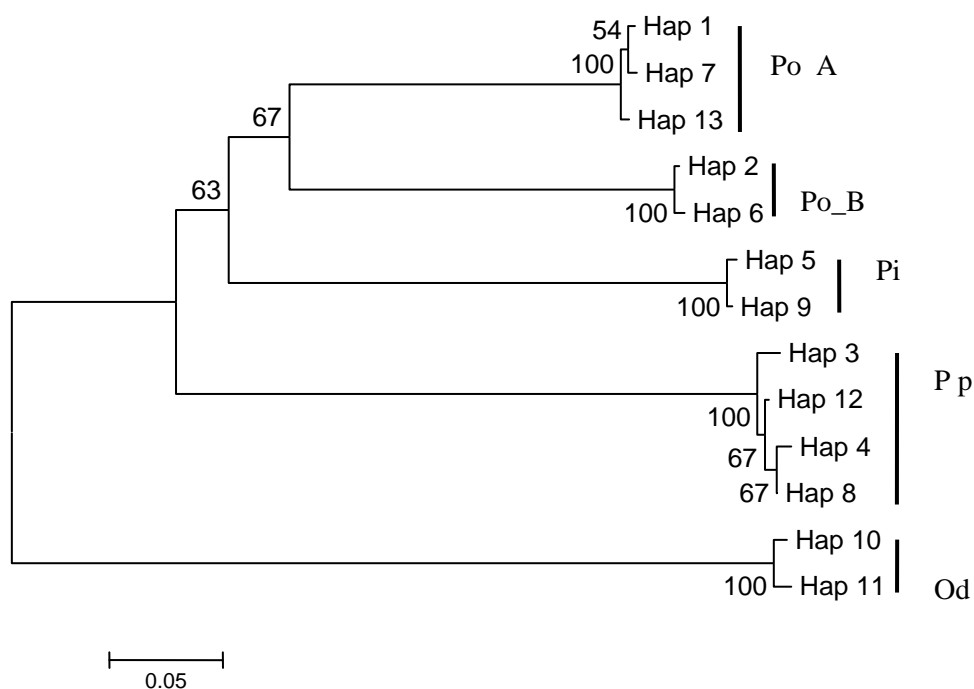
**Tabla 11.** Distribución de las especies en los diferentes haplotipos.  
(Po\_A: *P. orbignyanus* A, Po: *P. orbignyanus* B)

Haplotipo	Especie	N°	Individuo
1	Po_A	9	1,64,69,101,8,87,131,141,142
2	Po_B	7	9,42,45,47,21,77,78
3	<i>P.patagonicus</i>	1	60
4	<i>P.patagonicus</i>	1	61
5	<i>P.isosceles</i>	8	72,75,84,111,113,114,70,74
6	Po_B	1	80
7	Po_A	1	96
8	<i>P.patagonicus</i>	2	108,129
9	<i>P.isosceles</i>	1	115
10	<i>O.darwinii</i>	1	26
11	<i>O.darwinii</i>	1	99
12	<i>P.patagonicus</i>	1	127
13	Po_A	1	139



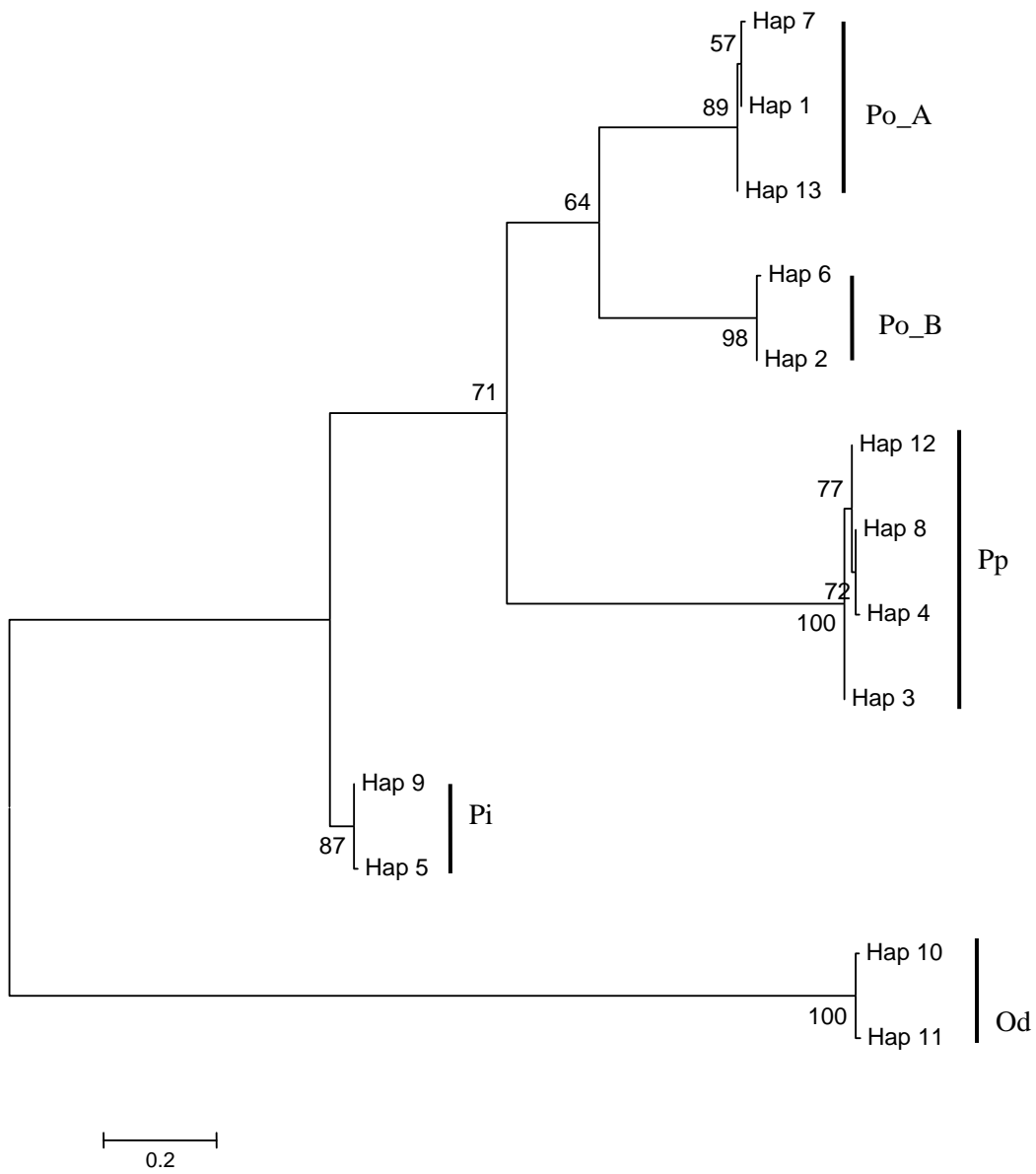
**Figura 13.**Relacion filogenética de los individuos analizados utilizando” Neighbour Joining” como algoritmo de agrupamiento (Po\_A: *P. orbignyanus* A, Po\_B: *P. orbignyanus* B, Pi: *P. isósceles*, Pp: *P. patagonicus*, Od: *O.darwinii*)

En el árbol de los haplotipos, construido en base al criterio de máxima verosimilitud se observaron agrupamientos diferentes a los de los árboles de distancia. El apoyo de bootstrap superó el 60% (Fig. 15). En éste caso *P. orbignyana* (Po\_A, Po\_B) es más cercano a *P. patagonicus* con un 71% de bootstrap y *P. isósceles* es el grupo hermano de ambos grupos con un valor de bootstrap del 87%. *O.darwinii* al igual que en el árbol de distancias (Fig. 14) se dividió en los haplotipos 10 y 11 con 100% de apoyo de bootstrap.



**Figura 14.** Árbol de los haplotipos con el criterio de "Neighbor Joining" (Po\_A: *P. orbignyana* A, Po\_B: *P. orbignyana* B, Pi: *P. isósceles*, Pp: *P. patagonicus*, Od: *O.darwinii*).





**Figura 15.** Árbol de los haplotipos con el criterio de máxima verosimilitud (Po\_A: *P. orbignyanus* A, Po\_B: *P. orbignyanus* B, Pi: *P. isósceles*, Pp: *P. patagonicus*, Od: *O. darwinii*).

## *DISCUSSION*

---

### **Análisis Morfológico**

El análisis morfológico del total de individuos estudiados por especie mostró la existencia de una importante superposición entre grupos de acuerdo de las variables morfológicas analizadas.

Solo el ancho interorbital (IN) y longitud desde la boca hasta la base de la aleta dorsal (DD) contribuyeron a separar de manera significativa a *P.orbigyanus* del resto de las especies las cuales tampoco mostraron diferencias significativas entre ellas.

Las especies más difíciles de determinar desde el punto de vista fenotípico fueron *P. orbigyanus* y *P. patagonicus*. Las características más notorias propuestas para diferenciar estas especies se basaron en sus escamas (cicloides en *P. orbigyanus* y ctenoides en *P. patagonicus*) y en el comienzo de la aleta anal (se inicia a nivel de la vertical que pasa por la base de las pectorales en *P. orbigyanus* y se inicia por delante de la base de las pectorales en *P. patagonicus*) (Cousseau & Perrota, 2004). Sin embargo el ancho interorbital y la longitud de la boca hasta la base de la aleta dorsal, deberían ser variables a tener en cuenta a la hora de obtener información morfométrica que contribuya a facilitar la separación de las mismas. La mayor distancia interorbital (IN) observada en *P.orbigyanus* podría estar relacionada a sus hábitos alimenticios ya que se lo define como un predador piscívoro activo que utiliza la visión para capturar a sus presas (Norbis & Galli, 2004). Los Pleuronectiformes pueden tener diferencias en su comportamiento de alimentación, usando la visión o mecanismos complejos incluyendo quimio y mecano-receptores para detectar a sus presas (Holmes & Gibson, 1983; Batty & Hoyt, 1995). Los depredadores activos, como *P. orbigyanus* utilizan indicadores visuales para detectar el alimento, respondiendo en primera instancia a las presas en movimiento y por lo tanto se alimentan sobre presas activas más que sedentarias (de Groot, 1971; Barber & de Groot, 1973; Holmes & Gibson, 1983; Batty & Hoyt, 1995). La mayor distancia interorbital de *P. orbigyanus*, podría estar relacionada a la estimación de la distancia a la presa (Norbis & Galli, 2004) aunque sería necesario el desarrollo de estudios complementarios para demostrar esta hipótesis. En el caso *P. patagonicus* y *P. isósceles* los parámetros morfológicos escogidos para los análisis realizados no permitieron la discriminación de las especies dado que presentan una gran superposición de caracteres. Esto podría deberse a que comparten similitudes ecológicas relacionadas al hábitat tales como preferencias de temperatura, salinidad y tipo de sustrato o alimentación (Nobis *et al*, 2005).

Dado que viven y están adaptados a ambientes similares es de esperar que compartan caracteres morfológicos que le permitan habitar en dicho ambiente. Esta coexistencia de ambas especies en un mismo ambiente podría ser posible gracias a diferencias en la utilización del nicho ecológico. Una de las principales diferencias a nivel ecológico de estas especies es su dieta, donde el principal componente de la dieta de *P. patagonicus* son los peces (Diaz de Astarloa y Munroe, 1998) mientras que la dieta de *P. isósceles* posee una dieta mucho más amplia y consume además de peces, cefalópodos y crustáceos (García, 1987).

Podría establecerse que las diferencias morfológicas fueron mayores entre las especies en donde las chances de interacciones competitivas entre los individuos sean mayores. *P. orbignyianus* y *P. patagonicus* son piscívoros (Diaz de Astarloa y Munroe, 1998; Norbis y Galli, 2004; Lopez-Cazorla y Forte, 2005); sin embargo, *P. orbignyianus* habita aguas costeras de profundidades no mayores de 20 metros y parece tener gran afinidad con ambientes de baja salinidad, como los estuarios y las lagunas costeras (Diaz de Astarloa y Munroe, 1998; Santana y Fabiano, 2000; Prisco et al., 2001; Norbis y Galli, 2004; Lopez-Cazorla y Forte, 2005), mientras que *P. patagonicus* habita aguas marinas (Diaz de Astarloa y Munroe, 1998; Norbis et al., 2005). Estos resultados sugieren que hay dos especies que no son ecológicamente idénticos como sería el caso de *P. orbignyianus* y *P. isósceles*, lo que podría representar un raro ejemplo de selección divergente manteniendo los dos morfos (Bergstrom, 2007). Diferentes morfos en sistemas naturales a menudo son mantenidos por selección ecológica solo si existe la segregación de nicho entre los diferentes morfos (Bergstrom, 2007). En este sentido, la segregación del nicho trófico entre *P. patagonicus* y *P. isósceles* podría contribuir a la coexistencia de ambas especies en un hábitat común. Por otra parte y si bien no existen estudios sobre los hábitos de alimentación de *P. patagonicus*, las características y preferencias por diferentes habitats, condicionado por diferentes tipos de presas (peces), sería responsable de la segregación entre *P. orbignyianus* y *P. patagonicus*.

## **Análisis Molecular**

Los resultados demostraron que a nivel molecular los individuos estudiados se agruparon según la especie. Los árboles filogenéticos mostraron cinco grupos bien definidos, dado el apoyo de bootstrap cercanos al 100% (Fig 13, 14 y 15).

La relación filogenética entre los individuos mostró que el grupo correspondiente a la especie *P. orbignyianus* está dividido a su vez en dos grupos. Si bien esta característica fue identificada primariamente a nivel molecular al realizar los análisis morfológicos utilizando solamente los individuos analizados genéticamente se pudo verificar la separación de los mismos también a este nivel.

Estas diferencias a nivel fenotípico se observaron claramente en el CVA (Fig. 12) donde se pudo ver que los individuos de la especie *P. orbignyanus* se dividieron en dos subgrupos (A y B) también. Los individuos que conformaron el agrupamiento Po\_A fueron colectados en aguas oceánicas y en aguas profundas del Río de la Plata, mientras que los pertenecientes a Po\_B fueron colectados solo en aguas costeras del Río de la Plata y en el arroyo Solís Grande este último considerado como zona de cría de la especie (Vizziano et al., 2002).

En Figueiredo & Menezes (2000) se presenta una clave en la cual *P. orbignyanus* se diferencia de *P. brasiliensis* solamente por el número de espinas branquiales y las filas oblicuas de escamas sobre la parte recta de la línea lateral. Este mismo trabajo propone que *P. brasiliensis* no está presente en aguas de Uruguay ya que acota su distribución desde San Luis de Maranhao (MA) hasta Bahía de Isla Grande (RJ) y Díaz de Astarloa & Munroe (1998) definen como validas para la plataforma continental de aguas uruguayas y argentinas la presencia de *P. orbignyanus*, *P. patagonicus* y *P. isósceles* únicamente mientras que plantean que la presencia de *P. brasiliensis* si bien de acuerdo a la bibliografía está reportada para el área no fue encontrada en su estudio.

Los individuos de un agrupamiento de *P. orbignyanus* son típicamente oceánicas (Po\_A) y las del otro estuarinas (Po\_B) por lo cual podríamos considerar que los individuos de los dos grupos son especies diferentes, siendo los oceánicos probablemente de *P. brasiliensis*.

Estas diferencias genéticas también se observaron en el análisis de haplotipos. La realización de dos análisis con algoritmos de agrupación diferentes como “Neighbour Joining” (NJ) y máxima verosimilitud (ML), confirman el tipo de agrupación por especie pero ambos mostraron diferencias en los valores de bootstrap de los nodos y cambios en el orden de agrupación. Dado que NJ es un método relativamente más rápido, aplicable cuando la divergencia entre secuencias es baja, una desventaja sería que al comprimir las secuencias en distancias algo de la información se pierde (Holder & Lewis, 2003), por lo que estimaciones confiables de distancias podrían ser difíciles de obtener para secuencias divergentes. Por otro lado el método de máxima verosimilitud reconstruye mejor las relaciones entre secuencias que han sido separadas por largo tiempo o evolucionaron rápidamente, este método corrige múltiples eventos mutacionales (Holder & Lewis, 2003). ML, es un método mucho más consistente y robusto para el caso de inferencias estadísticas en general. Si bien el tiempo que lleva el análisis es mayor que NJ es más confiable (Holder & Lewis, 2003).

Por lo antes mencionado y dado que valores de bootstrap para los nodos principales en el árbol filogenético y de haplotipos donde se considera NJ como algoritmo de agrupamiento apenas superan el 60% (Fig. 13 y 14) es razonable aceptar como modelo de agrupamiento para la especie en estudio el árbol que utiliza ML ya que mejora el valor de los nodos tanto los principales como sus ramificaciones (Fig. 15).

Este agrupamiento de las especies coincide con lo esperado de acuerdo las características fenotípicas las cuales se ajustan a la batimetría y características de los ambientes que habitan dada su distribución espacial (Nobis *et al*, 2005). Se podría afirmar entonces que factores de cambio (Riginos & Nachman, 2001) influyen fuertemente la estructura genética y divergencia en organismos acuáticos mas allá de las oportunidades de dispersión pasiva que dicho ambiente ofrece (Silva *et al*, 2010). Son las adaptaciones al ambiente donde habitan las que determinan la divergencia entre grupos y la posible coexistencia o no de los mismos. Es por esto que los individuos con distribuciones espaciales divergentes y fenotipos muy similares como *P. orbignyana* y *P. patagonicus* se diferencian a nivel ecológico lo cual se refleja en su distancia genética. A diferencia de esto la gran cercanía biogeográfica de *P. patagonicus* y *P. isósceles* (Nobis *et al*, 2005) se observa tanto a nivel molecular como fenotípico. Diferencias a nivel ecológico son las que permitirían que ambas especies puedan coexistir en el mismo espacio biogeográfico y compartir una misma historia de vida sin competir por los recursos. La segregación ecológica y divergencia dirigidas por la competencia serian posibles mecanismos de mantenimiento de la distribución geográfica (Bergstrom, 2007).

#### Perspectivas:

Dados que los resultados sugieren que los individuos agrupados como Po\_A podrían corresponder a *P. brasiliensis* y que hasta el momento no existe registro de tal especie para el área de estudio, estudios comparativos entre ejemplares de este grupo y los colectados en nuestras aguas deberían realizarse de manera de determinar la presencia o no de *P. brasiliensis* para nuestras costas.

El gran solapamiento de los datos morfológicos, apoyan la hipótesis que las especies de lenguados de la Familia Paralichthyidae, con modos de vida similares, presentan un solapamiento importante en sus caracteres morfológicos, por lo tanto son necesarias herramientas moleculares para la correcta identificación de las especies

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS***

---

- Awise J.C (2001).Cytonuclear genetic signatures of hybridization phenomena:Rationale utility and empirical examples from fishes and other aquatic animals.Rev Fish Biology .Fisheries.Vol 10,pp253-263.
- Barber L & de Groot S.J (1973). The food of five flatfish species (Pleuronectiformes) in southern North Sea. Netherlands Journal of Sea Research.6: 163-172.
- Batty R.S & Hoyt R.D (1995). The role of sense organs in the feeding behavior of juvenile sole and plaice.Journal of Fish Biology.47:931-939.
- Bergstrom C.A (2007).Morphological evidence of correlational selection and ecological segregation between dextral and sinistral forms in a polymorphic flatfish, *Platichthys stellatus*.Journal compilation,European Society For Evolutionary Biology.20:1104-1114.
- Bredendzen P& Wheaton W.(2002)Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence.Copeia,(3),pp 642-652.
- Brown W.M (1985).The mitochondrial genome of animals.Molecular Evolutionary Genetics,Macintyre R.J.(ed).New York:Plenum Press. 95-130.
- Burgener M (1997). Molecular species differentiation of fish and mammals. PhD. Thesis, University of Bern, Switzerland.
- Chapleau F (1993).Pleuronectiform relationships: a cladistic reassessment. Bulletin of Marine Science.52:516-540.
- Cooper JA and Chapleau F (1998). Monophyly and intrarelationships of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification. Fish Bull 96:686–726.
- Cousseau M.B & Perrotta R.G (2004). Peces marinos de Argentina. Biología, distribución, pesca. Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, Publicaciones Especiales, 167 pp.
- Davis J.C.(1986). Statistics and Data Analysis in Geology. John Wiley & Sons.New York.
- de Groot S.J (1971). On the interrelationships between morphology of the alimentary tract, food and feeding behaviour in flatfishes (Pisces: Pleuronectiformes). Netherlands Journal of Sea Research, 5:121-196.

- Díaz de Astarloa J.M. (1995). Determinación taxonómica de un grupo de lenguados del género *Paralichthys* colectado en aguas Argentinas (Pleuronectiformes:Paralichthyidae).Revista de Biología Marina., Valparaíso, 30(1):79-90.
- Díaz de Astarloa J.M & Munroe T.A (1998). Systematics, distribution and ecology of commercially important paralichthyid flounders occurring in Argentinean–Uruguayan waters(*Paralichthys*,Paralichthyidae):an overview.Jouurnal of Sea Research 39,1-9.
- Díaz de Astarloa J.M. (2002). A review of the fisheries of the south Atlantic Ocean. Revista de Biología Marina y Oceanografía 37 (2): 113-125.
- Díaz de Astarloa J.M. (2005). Osteología craneal comparada de tres especies de lenguado del género *Paralichthys* (Pleuronectiformes, Paralichthyidae) del Atlántico Suroccidental. Revista Chilena de Historia Natural.78: 343-391.
- Eschmeyer W.N.(1990).Catalog of the genera of recent fishes. California Academy of Sciences.697 pp.
- Espiñera M ,Gonzalez-Lavin N ,Vieites J.M & Santaclara F.J.(2008).Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. Journal of Agricultural and Food Chemistry.56, 8954-8961.
- Fabr  N.N & Díaz de Astarloa J.M. (1996).Pleuronectiformes de importancia comercial del atlántico sudoccidental, entre los 34°30` y 55°S.Distribucion y consideraciones sobre su pesca. Revista Investigación y Desarrollo Pesquero. N  10:45-55.
- Fabr , N.N. (1988). Estudio morfológico y morfométrico de los otolitos de dos especies de lenguados, *Xystreurys rasile* y *Paralichthys isosceles* (Pisces, Bothidae). Physis A (Buenos Aires), 46: 7–14.
- Figueiredo J.L & Menezes N.A (2000). Manual de peises marinhos do sudeste do Brasil VI. Teleostei (5),116pp.Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.
- García M.L (1987). Pleuronectiformes de la Argentina.IV. Alimentacion de *Paralichthys isósceles* (Bothidae, Paralichthinae). Notas Mus. La Plata XXI, Zool. 207:111-125.
- Ginsburg I (1952). Flounders of the genus *Paralichthys* and related genera in American waters. Fishery Bulletin (USA) 52: 267-351.

- Guindon S, & Gascuel O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696-704.
- Hall T.A (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Hammer,O, Harper D.A & Ryan P.D (2001). PAST:Paleontological Statistics software package for aducation and data analysis.*Paleontologia Electronica* 4(1):9 pp.
- Harper D.A.T(ed)(1999).Numerical Paleobiology.John Wiley & Sons.New York.
- Holder M & Lewis P.O (2003). Phylogeny Estimation: Traditional and Bayesian Approaches.*Nature Reviews,Genetics*.Vol 4,pp 275-284.
- Holmes R.A & Gibson R.N (1983). A comparison of predatory behaviour in flatfish. *Animal behavior*, 31: 1244-1255.
- Kartavtsev Y.P & Lee J.S (2006). Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population,species and genus levels.*Russian Journal of Genetics*.Vol.42,N<sup>o</sup>4,pp 341-362.
- Kartavtsev Y.P,Park T.J,Vinnikov K.A, Ivankov V.N,Sharina S.N &Lee J.S(2007).Cytochrome b(*Cyt-b*) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei,Pleuronectidae),with phylogenetic and taxonomic insights. *Marine Biology*.152:757-773.
- Librado P & Rozas J(2009). DnaSP5 v5:A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.*Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Leonart J, Salat J & Torres GJ. (2000). Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology* 205:85-93.
- Lombarte A & J Leonart. (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Enviromental Biology of Fish* 37: 297-306.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982).Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Manly B.F.J.( 1994). Multivariate statistical methods—A Primer, second ed. Chapman and Hall, London, 129–133.



- Menni R.C, Ringuelet. R.A & Aramburu, R.H (1984). Peces marinos de la Argentina y Uruguay. Reseña histórica clave de familias, géneros y especies. Catálogo crítico. Editorial Hemisferio sur. elson.
- Nei M (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, new York, p 512.
- Nelson J.S. (1994). Fishes of the world. Tercera edición. John Wiley and Sons. New York.
- Norbis W & Galli O (2004). Feeding habits of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. *Ciencias Marinas*, 30(4):619-626.
- Norbis W, Galli O, Paesch L & Berriolo C (2005). Distribución y abundancia de tres especies de lenguados en el frente oceánico del Río de la Plata (Zona común de pesca Argentino-Uruguaya) Frente Marítimo. Vol. 20, Sec.A:27-33.
- Norbis W., L. Paesch & O. Galli. (2006). Los recursos pesqueros de la costa de Uruguay: ambiente, biología y gestión. Páginas: 197 – 211. En: Menafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F y D. Conde (Eds) “Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya”. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. I-xiv + 668 p. (ISBN: 9974-7589-2-0).
- Posada D. (2003). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*.
- Ronzani Cerqueira Vinicius (2005). Egg Development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.48, n. 3 : pp. 459-465
- Saitoh K, Hayashizaki K, Yokoyama Y, Asahida T, Toyohara H & Yamashita Y. (2000) Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: Structural properties and cue for resolving teleostean relationships. *The Journal of Heredity* ;91: 271-278.
- Sampaio, L.E. and Bianchini, A. (2002). Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269: 187–196.
- Silva I.C, Mesquita N & Paula J (2010). Lack of population structure in the fiddler crab *Uca annulipes* along an East African latitudinal gradient: genetic and morphometric evidence. *Marine Biology*. 157:1113-1126.

- Sotelo C.G, Calo-Mata P, Chapela M, Pérez-Martin R.I, Rehbein H, Hold G.L, Russell V.J, Pryde S, Quinteiro J, Izquierdo M, Rey-Méndez M, Rosa C & Santos A.T.(2001). Identification of flatfish (*Pleuronectiforme*) species using DNA-Based techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.49:4562-4569.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- Vizziano D, Puig P, Mesones C & Nagy G (2002).Eds 2002 The Río de la Plata. Research to manage the environment, fish resources and the fishery in the saline front. Ecoplata program, Montevideo, Uruguay. Gustavo Martinez & Susana Retta. Contribution N°10.
- Wallace D.C (1992).Diseases of the mitochondrial-DNA.*Annual Review of Biochemistry*. 61:1175-1212.
- Wasielesky Jr., W., Miranda, K. y Bianchini, A. (1995). Tolerancia do linguado *Paralichthys orbignyanus* a salinidade. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 38: 385–395.

# ANEXO

## Anexo 1

Lugar de colecta de los individuos utilizados en el estudio.

<b>Especie</b>	<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>
<i>P. orbignyanus</i>	Po 1	35°30'-56°25'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 2	35°17'-56°00'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 7	35°10'-56°00'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 8	35°10'-56°00'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 9	34°50'-56°50'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 10	35°35'-57°00'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 20	34° 54'-55°06'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 21	34° 54'-55°06'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 42	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 43	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 44	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 45	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 46	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 47	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 48	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 57	35°15'-56°12'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 76	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 77	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 78	34°46'-55°24'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 79	35°00'-55°05'
<i>P. orbignyanus</i>	Po80	35°00'-55°05'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 81	35°00'-55°05'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 83	35°09'-54°37'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 85	35°09'-54°37'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 86	35°09'-54°37'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 87	35°09'-54°37'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 106	34°46'-53°31'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 135	34°54'-53°35'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 140	35°53'-56°36'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 64	35°05'-52°45'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 96	34°13'-53°22'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 101	34°08'-52°58'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 131	35°08'-54°42'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 139	35°38'-56°07'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 141	34°56'-55°25'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 142	35°26'-56°25'
<i>P. orbignyanus</i>	Po 69	35°05'-52°45'

<b>Especie</b>	<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>
<i>P. patagonicus</i>	Pp 51	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 52	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 53	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 54	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 58	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 59	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 60	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 61	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 62	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 63	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 66	35°05'-52°45'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 95	34°17'-53°25'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 97	34°13'-53°22'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 100	35°04'-53°67'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 102	34°05'-53°05'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 103	34°05'-53°05'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 104	34°15'-53°03'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 105	34°15'-53°03'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 107	34°46'-53°31'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 108	34°46'-53°31'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 109	34°46'-53°31'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 118	34°52'-53°37'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 119	34°52'-53°37'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 120	34°52'-53°37'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 121	34°52'-53°37'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 122	34°52'-53°37'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 126	35°00'-54°02'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 127	34°55'-54°07'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 128	34°55'-54°07'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 129	35°00'-54°02'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 130	35°00'-54°02'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 132	35°19'-54°29'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 133	34°54'-53°35'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 134	34°54'-53°35'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 136	34°54'-53°35'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 137	34°54'-53°35'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 138	35°01'-56°26'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 143	35°58'-56°25'
<i>P. patagonicus</i>	Pp144	35°26'-56°25'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 145	35°26'-56°25'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 146	35°24'-56°20'
<i>P. patagonicus</i>	Pp 147	35°16'-56°36'

<b>Especie</b>	<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>
<i>P. isosceles</i>	Pi 55	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 56	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 65	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 68	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 70	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 71	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 72	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 73	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 74	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 75	35°05'-52°45'
<i>P. isosceles</i>	Pi 111	34°46'-53°31'
<i>P. isosceles</i>	Pi 112	34°46'-53°31'
<i>P. isosceles</i>	Pi 113	34°46'-53°31'
<i>P. isosceles</i>	Pi 114	34°46'-53°31'
<i>P. isosceles</i>	Pi 115	34°38'-53°40'
<i>P. isosceles</i>	Pi 116	34°38'-53°40'
<i>P. isosceles</i>	Pi 117	34°52'-53°37'
<i>P. isosceles</i>	Pi 125	35°00'-54°02'
<i>P. isosceles</i>	Pi 84	35°09'-54°37'

<b>Especie</b>	<b>Individuo</b>	<b>Lugar de colecta (latitud-longitud)</b>
<i>O. darwinii</i>	Od 3	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od4	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od 5	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od 6	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od 11	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 12	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 13	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 14	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 15	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 16	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 17	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 18	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 19	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 22	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 23	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 24	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 25	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 26	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 27	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 28	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 29	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 30	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 31	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 32	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 33	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 34	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 35	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 36	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 37	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 38	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 39	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 40	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 41	34° 54'-55°06'
<i>O. darwinii</i>	Od 49	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od 50	34°46'-55°24'
<i>O. darwinii</i>	Od 82	34°50'-54°26'
<i>O. darwinii</i>	Od 93	34°10'-53°34'
<i>O. darwinii</i>	Od 94	34°17'-53°25'
<i>O. darwinii</i>	Od 98	34°32'-53°57'
<i>O. darwinii</i>	Od 99	34°32'-53°57'
<i>O. darwinii</i>	Od 110	34°45'-54°20'
<i>O. darwinii</i>	Od 123	35°23'-53°36'
<i>O. darwinii</i>	Od 124	35°23'-53°36'

