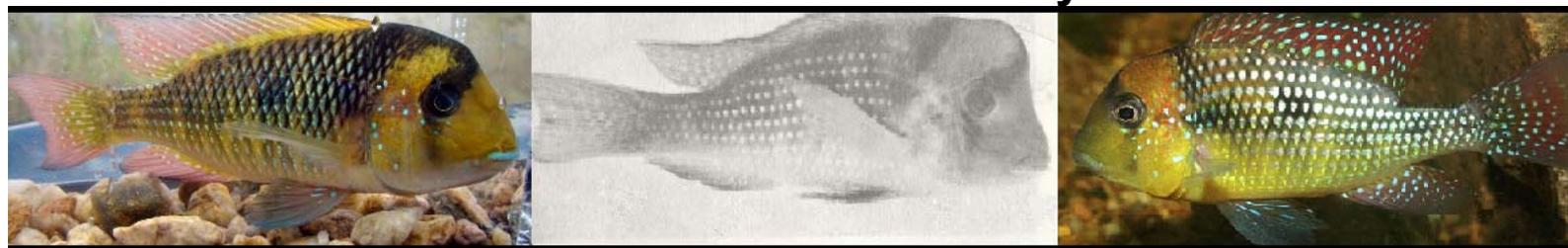


**Procesos de diferenciación en
Gymnogeophagus cf. gymnogenys
en base a secuencias de
ADN mitocondrial**

Néstor Ríos

**Pasantía de Grado en Ciencias Biológicas
Orientador: Graciela García
Coorientador: Silvana Pereyra**



Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias.
Universidad de la República
2011

Agradecimientos

A Graciela García y Silvana Pereyra por su orientación y formación a nivel académico y personal.

A Verónica Gutiérrez y Cecilia Delgado que hacen más ameno el trabajo diario y que han colaborado en mi formación con aportes diarios.

A Luiz Malabarba (Universidad Federal de Rio Grande Do Sul) y Marcelo Loureiro, Alejandro Duarte, Sebastián Serra (Sección Zoología de Vertebrados, FC) por los ejemplares donados y la clasificación exomorfológica de los especímenes.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el financiamiento parcial de este trabajo.

A mis Padres que me han apoyado para poder llegar hasta esta etapa de mi carrera.

A Cecilia, amigos, CO2 y compañeros de estudios que hicieron más amenos los años de facultad y colaboraron a sobreponerme a los distintos tropezones.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | i |
| Índice | ii |
| <u>Resumen</u> | 1 |
| <u>Introducción</u> | 2 |
| <u>Historia y evolución en la familia Cichlidae</u> | 2 |
| <u>Antecedentes del género <i>Gymnogeophagus</i></u> | 3 |
| <u>Niveles de complejidad taxonómica en <i>Gymnogeophagus gymnogenys</i></u> | 4 |
| <u>Propuesta de trabajo</u> | 4 |
| <u>Característica del ADN mitocondrial</u> | 5 |
| <u>Análisis filogeográficos y estructuración poblacional</u> | 6 |
| Hipótesis de trabajo | 7 |
| Objetivo general | 7 |
| Objetivos específicos: | 7 |
| <u>Materiales y métodos</u> | 8 |
| <u>Muestras analizadas</u> | 8 |
| <u>Extracción de ADN</u> | 8 |
| <u>Amplificación de un fragmento del gen citocromo <i>b</i> mitocondrial</u> | 10 |
| <u>Secuenciación</u> | 12 |
| <u>Análisis de secuencias</u> | 12 |
| <u>Edición de secuencias y análisis estadísticos del set de datos</u> | 12 |
| <u>Test de neutralidad</u> | 14 |
| <u>Análisis filogenético</u> | 14 |
| <u>Análisis Poblacional</u> | 15 |
| <u>Reloj Molecular</u> | 17 |
| <u>Resultados</u> | 18 |
| <u>Extracción, amplificación y secuenciación del gen citocromo <i>b</i></u> | 18 |
| <u>Análisis de secuencias</u> | 18 |
| <u>Test de neutralidad</u> | 19 |
| <u>Análisis Filogenéticos</u> | 19 |
| <u>Análisis poblacional</u> | 23 |
| <u>Reloj Molecular</u> | 26 |
| <u>Discusión</u> | 27 |
| <u>Polimorfismo de ADN en el gen de citocromo <i>b</i></u> | 27 |
| <u>Análisis filogenéticos</u> | 28 |
| <u>Análisis poblacional</u> | 29 |
| <u>Conclusión</u> | 31 |
| <u>Bibliografía</u> | 33 |
| Anexo 1 | 38 |

Resumen

Los cíclidos son un grupo de peces teleósteos caracterizados principalmente por su amplia diversidad específica y por presentar procesos de radiación adaptativa. Si bien estos procesos han sido descritos en grupos africanos, los cíclidos neotropicales no han sido lo suficientemente estudiados, lo que hace pensar que su divergencia específica sería aún mayor de lo que se sabe. Esta enorme diversidad, sumada a la hipótesis de radiación adaptativa en la familia Geophaginae y la confirmación de que *Gymnogeophagus gymnogenys* es un complejo de especies, hace que este sea un importante modelo de estudio para el análisis evolutivo. Los análisis previos muestran un alto nivel de estructuración y la existencia de linajes genéticos divergentes, lo cual sugiere la hipótesis de especiación múltiple en este complejo. En el presente trabajo se realizan análisis filogeográficos basados en secuencias del gen citocromo *b* mitocondrial a los efectos de inferir patrones de diferenciación en el complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* en diferentes cuencas del Uruguay. Los análisis filogenéticos muestran la existencia de cinco grupos con soporte robusto en algunos de los clados. Analizando la distribución geográfica de las poblaciones de estos clados no se encontró correspondencia entre ésta y la actual estructura geográfica de las cuencas, e incluso se observa que dos linajes diferentes pueden coexistir en una misma cuenca. Esto puede ser explicado por dos tipos de hipótesis: diferenciación *in situ* o dispersión de linajes genéticos entre cuencas con potenciales conexiones durante periodos recientes (Pleistoceno). El hallazgo de estos cinco filogrupos monofiléticos confirma la hipótesis de que *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* constituye un complejo de linajes genéticos divergentes producto de eventos de diferenciación explosiva y reciente.

Introducción

Historia y evolución en la familia Cichlidae

Los cíclidos son una de las familias de vertebrados con más especies descritas, por encima de 1300 especies (Froese & Pauly 2010). Se destacan por su alta diversidad morfológica, ecológica y en su comportamiento reproductivo (Sparks 2004; Salzburger & Meyer 2004; Pereyra & García 2008; Koblmüller et al. 2008; Smith et al. 2008). Presentan una distribución Gondwánica, estando presente en los continentes de África, América, en Madagascar e India, ajustándose a la hipótesis de vicarianza dado que el aislamiento impuesto por la deriva de las placas continentales provocó la divergencia de los cíclidos en estos cuatro grupos (Farias et al. 1999; Kullander & Ferraris 2003; Sparks 2004; Salzburger & Meyer 2004; Koblmüller et al. 2008; Bettin Pires et al. 2010). Los cíclidos han sido propuestos como uno de los mejores ejemplos de especiación explosiva y radiación adaptativa (Farias et al. 1999; Salzburger et al. 2002; Baric et al. 2003; Seehausen 2006). Además se ha propuesto la especiación simpátrica en esta familia de teleósteos (Koblmüller et al. 2008; Říčan et al. 2008); constatándose en cíclidos del Este de África en los lagos Bermin y Barombi Mbo (Schliewen et al. 1994). También se ha propuesto la hibridación como generador de diversidad (Egger et al. 2007). Uno de los primeros en probar este fenómeno fue Stauffer et al. (1996) en cíclidos del Lago Malawi (África) entre las especies *Cynotilapia afra* y *Pseudotropheus zebra*.

La mayoría de los estudios en cíclidos han sido realizados sobre los cíclidos africanos, mientras que los cíclidos Neotropicales han sido poco estudiados (Wimberger et al. 1998). Dentro del grupo Neotropical existen ocho subfamilias, 54 géneros, con una estimación de 1500 especies de las cuales algunas aún no han sido descritas (Wimberger et al. 1998; Bettin Pires et al. 2010). Los cíclidos Neotropicales constituyen un clado monofilético y su distribución en América va desde la Patagonia a Texas (Wimberger et al. 1998, Musilová et al. 2008; López-Fernández et al. 2010). Farias et al. (1999) en base a análisis de ADN mitocondrial, encontraron que los cíclidos Neotropicales poseen una mayor divergencia genética que sus pares Africanos. Por otro lado, dentro de este clado se ha propuesto que la tribu Heroinii sería producto de

una rápida radiación (Concheiro Pérez et al. 2007), mientras que para la subfamilia Cichlasomatinae sería el resultado de eventos vicariantes (Musilová et al. 2008).

La subfamilia Geophaginae se distribuye a lo largo de América del sur y sur de Panamá, con al menos 18 géneros y aproximadamente 250 especies (López-Fernández et al. 2005; López-Fernández et al. 2010). La radiación adaptativa es la rápida evolución de la diversidad ecológica, lo que genera variedad de linajes con distintos caracteres morfológicos adaptados a diversos ambientes (Schluter 2000). López-Fernández et al. (2005) propusieron que el clado constituido por los Geophaginae sería producto de una radiación adaptativa pudiendo comprobar sólo tres de las características necesarias para evidenciar la ocurrencia de este fenómeno. Siguiendo a Schluter (2000) estas características son: la monofilia, la especiación rápida, la correlación entre fenotipo y medioambiente. En este contexto, López-Fernández et al. 2010 no pudieron encontrar la existencia de caracteres morfológicos útiles en su adaptación al ambiente.

Antecedentes del género *Gymnogeophagus*

El género *Gymnogeophagus* propuesto por Ribeiro (1918), perteneciente a la subfamilia Geophaginae, se distingue por la falta de supraneurales y la presencia de una pequeña espina ósea sobre el primer pterigoporo dorsal. Este género es considerado endémico de la cuenca del Río de la Plata, del sistema de la Laguna dos Patos y del drenaje del río Tramandaí (Reis & Malabarba et al. 1988). Estos autores incluyeron las siguientes especies en su revisión del género: *G. australis*, *G. balzanii*, *G. gymnogenys*, *G. labiatus*, *G. rhabdotus*, *G. lacustris*, *G. meridionalis*. Luego se incluyó *G. setequeadas* (Reis et al. 1992) y la recientemente descrita *G. tiraparae* (González-Bergonzoni et al. 2009). Este género es uno de los pocos que presenta una diversidad en su comportamiento reproductivo similar a la observada en la familia. Presentan especies que depositan sus huevos y cuidan a sus crías en el substrato y por otro lado especies que son incubadores bucales. Dentro de este género se considera que la primera estrategia representa un carácter ancestral, y que la incubación bucal constituye un carácter derivado. Todas las especies del género

poseen dimorfismo sexual, aunque está más marcado en los incubadores bucales, ya que el macho posee una destacada giba en la nuca (Wimberger et al. 1998).

Niveles de complejidad taxonómica en *Gymnogeophagus gymnogenys*

La especie *G. gymnogenys*, la más derivada del género, es endémica de la cuenca del Río de la Plata, Laguna dos Patos y Merín (Reis & Malabarba 1988). La misma fue propuesta como un complejo de especies por Reis & Malabarba (1988) en base a datos morfológicos. Los complejos de especies están formados por taxones que son morfológicamente similares (especies crípticas) unas de otras dentro de un mismo género (López-Fernández et al. 2005). Luego, Wimberger (1998) propuso la existencia de varias especies no descritas relacionadas con *G. gymnogenys*. Los distintos linajes dentro de este clado se diferencian morfológicamente en caracteres que podrían ser de importancia en la selección sexual, como la coloración y la giba en machos. Mediante análisis de sistemática molecular utilizando secuencias de citocromo *b* mitocondrial, Pereyra & García (2008), confirmaron a *G. gymnogenys* como un complejo de especie en base al hallazgo de cuatro taxa monofiléticos con fuerte soporte estadístico. Debido a que estos diferentes taxa colapsaban en una politomía basal en forma de estrella, estos autores propusieron la hipótesis de la posible ocurrencia de eventos de especiación explosiva. Posteriormente a partir de uno de estos grupos fue descrita como una nueva especie *G. tiraparae* sustentada en caracteres morfológicos (González-Bergonzoni et al. 2009). Recientemente, análisis citogenéticos en el género *Gymnogeophagus* encontraron diferencias en el número de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos dentro de *G. gymnogenys* (Bettin Pires et al. 2010).

Propuesta de trabajo

El presente estudio pretende realizar un análisis filogenético y poblacional en el complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* mediante el uso del citocromo *b*, a los efectos de ampliar análisis anteriores, incluyendo nuevas localidades de muestreo al sur y norte del Río Negro en Uruguay, dado que la región Norte no estaba suficientemente representada en los análisis anteriores. Este marcador ha sido

empleado en varios análisis filogenéticos a altos y bajos niveles taxonómicos, debido a que posee tanto información de lenta como de rápida evolución. Este marcador ya ha sido utilizado con éxito en análisis filogenéticos de cíclidos (por ejemplo: Schliewen et al. 1994; Wimberger et al. 1998; Farias et al. 2001; Baric et al. 2003; Říčan et al. 2008; Smith et al. 2008; Musilová et al. 2008; López- Fernández et al. 2010) y dentro de este complejo de especies (Pereyra & García 2008). Dado que ya se ha utilizado con éxito como un buen marcador molecular y a las características antes mencionadas, el gen citocromo *b* es elegido en esta propuesta de trabajo como marcador, para el análisis sistemático y poblacional de *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*.

Característica del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial es una molécula pequeña de ADN, menor a 20.000 pares de bases en animales, con una estructura circular de doble cadena (Nelson et al. 2008). Es elegido como marcador genético en la mayoría de los análisis filogenéticos (Farias et al. 2001), por su rápida evolución (entre 5 y 10 veces mayor que los genes nucleares). Esta rápida evolución se debe a su alta tasa mutacional a causa de un ineficaz sistema de reparación de errores en la replicación, mayor número ciclos de replicación que los genes nucleares y herencia matrilineal (Brown et al. 1979). Este tipo de marcador con rápida evolución es indicado para determinar relaciones entre organismos estrechamente relacionados, es decir entre especies hermanas y poblaciones (Brown et al. 1979; Hey & Machado 2003). El uso del ADN mitocondrial como marcador ha sido cuestionado por presentar saturación y homoplasia a niveles taxonómicos superiores al intragénero (Hey & Machado 2003). Uno de los genes mitocondriales más conocido en estructura y función de proteína es el citocromo *b* (Farias et al. 2001).

Análisis filogeográficos y estructuración poblacional

El fenómeno de estructuración genética se da en la mayoría de las especies, en mayor o en menor medida. Un nivel alto de estructuración entre poblaciones vecinas puede conducir eventualmente a una posible especiación, ya que dicha estructuración facilita la ocurrencia de fenómenos tales como la deriva génica y la selección sexual (López-Fernández et al. 2005). Análisis filogeográficos con datos moleculares de estas poblaciones pueden dar cuenta de esta estructuración (Barluenga & Meyer 2005).

Los análisis filogeográficos esto es, el análisis espacial de los linajes genéticos y su evolución, es considerada como una disciplina puente entre los procesos micro y macroevolutivos (Avice et al. 1987). Los procesos observados a nivel molecular tales como mutación, selección natural o deriva génica pueden evidenciar patrones demográficos, relaciones filogenéticas a nivel de especie y niveles taxonómicos más altos (Bermingham & Moritz 1998). El aporte de la filogeografía puede ayudarnos a discernir si los eventos de diferenciación que marcaron la estructura que hoy observamos ocurrieron en simpatria o en alopatria. La especiación alopátrica implica la evolución de barreras reproductivas entre poblaciones aisladas mediante barreras geográficas, impidiendo el flujo génico entre ellas y por tanto favoreciendo la diferenciación entre ambas (Futuyma 2006). Mientras que la especiación simpátrica supone la adquisición del aislamiento reproductivo entre poblaciones que habitan una misma área, sin aislamiento espacial. Este tipo de diferenciación es muy difícil de probar, por eso en este trabajo nos referimos como diferenciación *in situ*. La filogeografía también puede ayudar a investigar la relevancia de la selección sexual y la diferenciación ecológica en los eventos de especiación (Sturmbauer et al. 2005). Un análisis de este tipo a nivel intraespecífico puede evidenciar Unidades Evolutivas Significativas (ESU del inglés Evolutionary Significant Unit) y Unidades de Manejo (MU en inglés: Management Units) importantes para la políticas de conservación de la biodiversidad (Moritz 1994). Las ESUs son grupos recíprocamente monofiléticos en filogenias basadas en ADN mitocondrial y con una divergencia importante a nivel nuclear. Mientras que las MU son poblaciones divergentes a nivel molecular con bajos niveles de flujo génico con otras poblaciones.

Hipótesis de trabajo

El complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* está integrado por un conjunto de poblaciones estructuradas.

1- Esta estructuración puede ser el resultado de eventos de vicarianza como subproducto de la separación entre cuencas, en un pasado más o menos reciente.

2- Alternativamente, puede explicarse por procesos de diferenciación *in situ* tanto por diferencias en el apareamiento o tipos de cruzamientos, o por diferenciación ecológica dentro del mismo ambiente.

3- Una tercera hipótesis podría ser la dispersión de linajes genéticos divergentes entre cuencas que hayan tomado contacto como resultado de eventos geológicos más o menos reciente.

Objetivo general

Inferir patrones de diferenciación en el complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* en diferentes cuencas del Uruguay.

Objetivos específicos:

-Extender las localidades de muestreo en el área de distribución del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* en el Uruguay.

-Testear la eficacia del gen citocromo *b* para resolver las relaciones dentro del complejo.

-Realizar análisis filogeográficos dentro de poblaciones del complejo de *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*.

Materiales y métodos

Muestras analizadas

Los individuos trabajados en esta pasantía corresponden a ejemplares diagnosticados exomorfológicamente como perteneciente a la especie *G. gymnogenys*, provenientes de cuatro de las grandes cuencas del país: cuenca del Río Uruguay, del Río Negro, del Río de la Plata, Laguna Merín (Tabla 1). En la Figura 1 se señalan los puntos de muestreo de los individuos trabajados.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se utilizó aproximadamente 20 miligramos de músculo. El protocolo utilizado fue una modificación de Medrano et al. (1990). Este consiste en la precipitación con alta concentración salina y etanol (EtOH) absoluto en frío. El protocolo comienza con dos lavados de 1ml de buffer STE 1X pH 8 frío (50mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8; 1% SDS y 100 mM NaCl). A continuación se le agrega 550 µl de tampon de lisis pH 8 (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM EDTA pH 8; 1% SDS y 100mM NaCl) y 11µl de Proteinasa K (10mg/mL). Luego el tejido es homogeneizado mecánicamente. Se deja incubando toda la noche en estufa a 55 °C. Una hora antes de finalizar la incubación se le agrega 5 µl de ARNasa (10mg/mL). Finalizada la incubación se centrifuga por 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante es transferido a otro tubo y se le agrega 200µl de NaCl 5M para una concentración final de NaCl 2 M y se centrifuga por 30 minutos a 12000 rpm (a temperatura ambiente). El sobrenadante resultante es transferido a otro tubo para luego agregarle el doble de volumen de EtOH absoluto en frío. Se homogeneiza manualmente de forma lenta las dos fases. Se deja precipitando por 48hs a 4°C. Pasadas las 48 hs el tubo se centrifuga durante 30 minutos a 12000 rpm (a temperatura ambiente). A continuación se elimina el sobrenadante y se realizan dos lavados del pellet con EtOH 70%, luego de cada lavado se realiza una centrifugación de 5 minutos a 6000 rpm y se elimina el sobrenadante. El pellet se deja secando durante una hora en estufa a 55°C, luego se resuspende en 100µl de buffer TE 1X (10 mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA). Finalmente, las muestras se colocan en baño a 65°C durante 20 minutos y se guardan a – 20°C.

Tabla 1. Lista de especímenes trabajados en este estudio, junto con sus respectivos sitios de muestreo y las cuencas a las que pertenecen.

| Espécimen | Localidad | Cuenca |
|-----------|--|-----------------|
| P1530 | Arroyo Batoví (-31:06:58/-55:24:56), Rivera. | Río Negro |
| P1531 | Arroyo Cuñapirú (-31:02:21/-55:29:31), Rivera. | Río Negro |
| P1532 | Arroyo Cuñapirú (-31:02:21/-55:29:31), Rivera. | Río Negro |
| P1533 | Arroyo Cuñapirú (-31:02:21/-55:29:31), Rivera. | Río Negro |
| P1536 | Arroyo Batoví (-31:54:30/-56:01:04), Tacuarembó. | Río Negro |
| P1537 | Arroyo Batoví (-31:54:30/-56:01:04), Tacuarembó. | Río Negro |
| P1538 | Arroyo Batoví (-31:54:30/-56:01:04), Tacuarembó. | Río Negro |
| P1540 | Río Yí (-33:23:49/-56:24:10), Durazno. | Río Negro |
| P1541 | Río Yí (-33:23:49/-56:24:10), Durazno. | Río Negro |
| P1542 | Río Yí (-33:21:45/-56:31:12), Durazno. | Río Negro |
| P1543 | Río Yí (-33:21:45/-56:31:12), Durazno. | Río Negro |
| P1544 | Arroyo corrales (-31:23:26/-55:15:14), Rivera. | Río Negro |
| P1545 | Arroyo corrales (-31:23:26/-55:15:14), Rivera. | Río Negro |
| P1546 | Arroyo Yucutujá (-30:26:16/-57:17:46), Artigas. | Río Uruguay |
| P1547 | Arroyo Yucutujá (-30:26:16/-57:17:46), Artigas. | Río Uruguay |
| P1548 | Arroyo Yucutujá (-30:26:16/-57:17:46), Artigas. | Río Uruguay |
| P1549 | Cañada en la Ruta 4 (-32:12:25/-57:12:47), Paysandú. | Río Uruguay |
| P1550 | Cañada en la Ruta 4 (-32:12:25/-57:12:47), Paysandú. | Río Uruguay |
| P1551 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27), Artigas. | Río Uruguay |
| P1552 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27), Artigas. | Río Uruguay |
| P1553 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27), Artigas. | Río Uruguay |
| P1554 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27), Artigas. | Río Uruguay |
| P1555 | Arroyo Guaviyú (-30:37:51/-57:41:18), Artigas. | Río Uruguay |
| P1559 | Arroyo Tres cruces Grandes ruta 4 (-30:35:31/56:37:34), Artigas. | Río Uruguay |
| P1560 | Arroyo Tres cruces Grandes ruta 4 (-30:35:31/56:37:34), Artigas. | Río Uruguay |
| P1561 | Río Tacuarembó (-31:58:33/-55:28:13), Tacuarembó. | Río Negro |
| P1576 | Río Tacuarembó, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1577 | Río Rosario (Ruta 2 K 20,900), Colonia. | Río de la Plata |
| P1578 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1579 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1580 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1581 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1582 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1583 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1584 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1585 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó. | Río Negro |
| P1586 | Arroyo Molles (30 km al NW de la ciudad de Artigas), Artigas. | Río Uruguay |
| P1587 | Palmar, Durazno. | Río Negro |
| P1588 | Palmar, Durazno. | Río Negro |
| P1593 | Río Negro (Paraje 329), Durazno. | Río Negro |
| P1594 | Río Negro (Paraje 329), Durazno. | Río Negro |
| P1601 | Río Tacuarí, Paso del Dragón, Cerro largo. | Laguna Merín. |
| P1602 | Río Tacuarí, Paso del Dragón, Cerro largo. | Laguna Merín. |
| P1606 | Arroyo Grande, Flores- Durazno. | Río Negro |

La calidad del ADN extraído se testeó mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa (Sigma) 1% en buffer TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1L): 242g de Tris-base, 57,1mL de ácido acético glacial y 10mL de 0,5M EDTA pH 8), conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 5µL/100mL. Se siembra 5 µL del ADN genómico extraído con 2µL de buffer de corrida (Bromophenol Blue y Xylene Cyanol FF: 0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF y 30% Glycerol en agua). La corrida se realiza durante 40 minutos a 80 V. Todas las soluciones y los reactivos utilizados fueron preparados según Sambrook et al. (1989).

Amplificación de un fragmento del gen citocromo b mitocondrial

La amplificación de la región de interés, aproximadamente 800pb, se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la misma se utilizaron oligonucleótidos universales para este gen: CB3-H y Gludg.L (Palumbi et al. 1991). Las secuencias de estos oligonucleótidos se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los dos oligonucleótidos universales utilizados en la amplificación parcial del citocromo *b* (Palumbi et al. 1991).

| Oligonucleótido | Secuencia nucleotídica |
|-----------------|------------------------------|
| CB3-H | 5' GGCAAATAGGAARTATCATTC 3' |
| Gludg-L | 5' TGA CTTGAARAACCAYCGTTG 3' |

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador automático (PTC-100, MJ Research, Inc.). Para un volumen de 20µL se utilizaron 2µL del ADN genómico extraído de las muestras analizadas de *G. cf. gymnogenys*. La mezcla de la reacción de un volumen final tiene la siguiente composición: 2µL de buffer 10X, 0.5 µL MgCl₂ 50mM, 0,3 µL de dNTPs 10mM, 0,5 µL de CB3-H y Gludg-L 10µM y 0,1 µL de polimerasa Taq (5U/µL). El programa utilizado consiste en un primer paso de desnaturalización de 94°C por 5 minutos. Luego 30 ciclos de tres paso: primero se desnaturaliza el molde a 94°C por 30 segundos, segundo paso (annealing=pegado de oligonucleótido) 45° C durante 30 segundo y tercero (extensión) a 72 ° C por 1 minuto. Finalmente 10 minutos de extensión final a 72° C.

El producto de PCR fue analizado mediante una corrida electroforética en las condiciones que ya fueron detalladas. En este caso, además de sembrar 5µL del producto de PCR junto a 2µL de buffer de carga, se corre 3µL del marcador de peso molecular (1kb ladder digerido con Hinf 1) (Invitrogen) junto con 2µL de buffer de corrida.

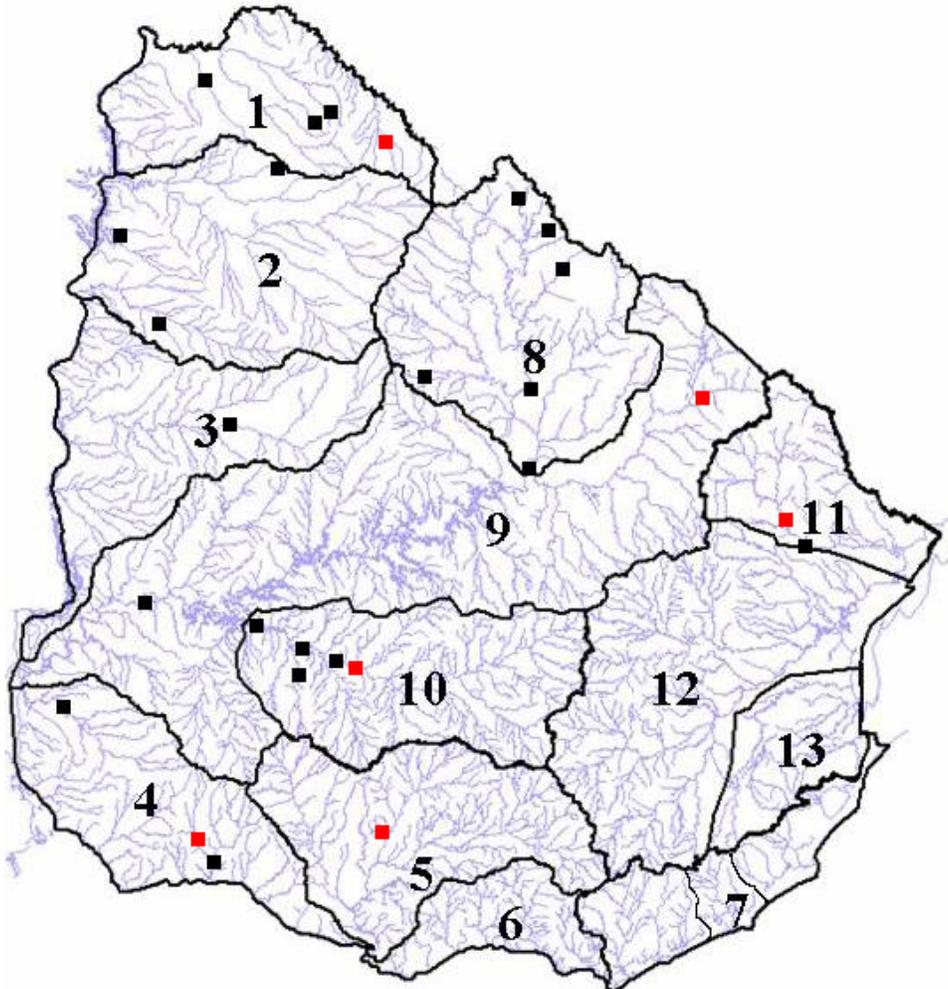


Figura 1. Los puntos negros indican los 21 sitios de muestreos de los especímenes de *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*. Los puntos rojos señalan las localidades a las que corresponden las secuencias del complejo bajadas del GenBank. Los números en negro indican las distintas subcuencas del Uruguay. 1, 2, 3 Cuenca del río Uruguay (subcuencas 1- Cuareim, 2- Arapey, 3- Queguay). 4, 5, 6 Cuenca del río de la Plata (subcuencas 4- Río de la Plata W, 5- Río Santa Lucía, 6- Río de la Plata E). 7 Cuenca del Océano Atlántico (subcuencas: 7a- Laguna del Sauce, 7b- Laguna de Rocha, 7c- Laguna de Rocha). 8, 9, 10 Cuenca del Río Negro (subcuencas: 8- Río Tacuarembó, 9- Río Negro, 10- Río Yí). 11, 12, 13 Laguna Merín (subcuencas: 11- Alta 12- Media 13- Baja). La división en subcuencas fue tomada de González-Bergonzoni (2008.).

Secuenciación

Los productos amplificados se enviaron a purificar y secuenciar a un Servicio de secuenciación automático (Macrogen Inc., Corea).

Análisis de secuencias

Además de las secuencias generadas en este trabajo se incluyeron otras secuencias del GenBank del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*, del género *Gymnogeophagus* y del género *Geophagus* (Anexo 1).

Edición de secuencias y análisis estadísticos del set de datos

La edición de secuencias fue realizada manualmente en el programa Bioedit (Hall 1999). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa Clustal X versión 1.8 (Thompson *et al.* 1997).

Para los 47 individuos del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* se contabilizó el número de sitios polimórficos. Además, se calculó la diversidad nucleotídica como el promedio de las diferencias pareadas a través de la fórmula:

$$\hat{\pi} = \sum_{i,j} \chi_i \chi_j \pi_{ij}$$

donde χ es la frecuencia del individuo y π es la proporción de diferentes nucleótidos entre los individuos i y j (Nei 1987).

También se relevaron los distintos haplotipos dentro de las secuencias pertenecientes al complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* y se estimó la diversidad haplotípica mediante la siguiente ecuación:

$$H = \frac{n}{n-1} (1 - \sum \hat{\chi}_i^2)$$

donde n es número de copias en la muestra, χ es la frecuencia haplotípica del haplotipo i -ésimo, esta fórmula es una modificación de la ecuación de Nei (1987) (Rozas *et al.* 2009).

Los sitios polimórficos, la diversidad nucleotídica, el relevamiento de haplotipos y la diversidad haplotídica fueron calculados en el programa DNAsp v5 (Rozas et al. 2009). El programa Modeltest (Posada & Crandall 1998) se utilizó para identificar el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajusta al set de datos. El tipo de criterio para comparar entre los distintos modelos fue el criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés). El mismo pondera los modelos que se ajustan mejor a nuestro set de datos y desvaloriza los modelos que menos se ajustan. El modelo elegido entre los 56 testeados por el Modeltest fue el Hasegawa Kishino Yano (HKY85; Hasegawa et al. 1985). Este modelo evolutivo toma en cuenta la diferencia entre transiciones (sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra) y tranversiones (sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa), al momento de considerar la tasa de sustitución y la frecuencia nucleotídica.

Mediante el programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007) se realizó el análisis de distancias dentro del género *Gymnogeophagus* según el modelo Kimura 2 parámetros (Kimura 1980). El modelo Kimura 2 parámetros es similar al Hasegawa Kishino Yano ya que también asume diferentes tasas de transiciones y transversiones que son calculadas a partir de los datos analizados. También se calcularon las distancias genéticas entre el complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*, *G. meridionalis*, *G. labiatus* y los individuos del género *Geophagus*. Luego se calcularon las diferencias pareadas discriminando entre transiciones y transversiones. Además se compararon las transiciones y transversiones tanto como para las primeras dos posiciones del codón, como para la tercera. Por último, se calculó la relación entre el número de sustituciones sinónimas (k_S , son aquellas mutaciones que no cambian el aminoácido codificado) y las no sinónimas (k_A , aquellas que sí producen un cambio en el aminoácido codificado). Los valores de ambas sustituciones (k_S y k_A) fueron calculados en el programa DNAsp v5 (Rozas et al. 2009).

Test de neutralidad

Se implementaron dos tests “Tajima” y “Fu” con el fin de definir si nuestros datos ajustan al modelo de neutralidad. El test de Tajima (Tajima 1989) asume el modelo de sitios infinitos y sin recombinación. El estadístico D se calcula en base al parámetro poblacional θ ($\theta=2N\mu$ para marcadores haploides, donde N es el tamaño poblacional y μ es la tasa de mutación neutral), el mismo se calcula a través de la comparación entre el parámetro calculado a partir del número de sitios polimórficos y el que se calcula a partir de la diversidad nucleotídica en los datos.

El test de Fu (Fu 1997) también asume sitios infinitos y ausencia de recombinación. El mismo se basa en la probabilidad de encontrar un número de alelos igual o menor al observado, realizando un muestreo al azar bajo la teoría de neutralidad.

La significancia de ambos estadísticos se calcula mediante la generación de muestras al azar utilizando una simulación del coalescente. Estos cálculos se realizan bajo el modelo de neutralidad y considerando una población en equilibrio.

Análisis filogenético

Se implementaron dos métodos de reconstrucción filogenética con el fin de tener una mejor aproximación a la genealogía de la especie *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*. Las topologías obtenidas se presentan en árboles filogenéticos.

En primer lugar se utilizó el método de distancia “Neighbor joining” o “Unión de Vecinos” (Saitou & Nei 1987). Este método minimiza la subestimación de las distancias observadas con base a las distancias esperadas, basado en un modelo de evolución. El modelo utilizado fue el Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa et al. 1985), basado en el resultado del Modeltest. El método de Neighbor joining utiliza el principio de Mínima Evolución en la unión de cada vecino, lo que lo hace un método rápido a la hora de construir una topología (Nei & Kumar 2000). La construcción del árbol bajo este método comienza con una topología en forma de estrella y a continuación se unen los dos taxa que tengan el menor valor en la matriz de distancias. Luego se crea una nueva matriz

donde los dos vecinos elegidos anteriormente se toman como un solo taxón, la unión de vecinos continúa hasta llegar a una topología binaria. Por último, de los árboles creados se elige el mejor según el modelo de distancia empleado.

Además, se implementó la construcción filogenética basada en el criterio de máxima parsimonia, en donde el menor número de cambios es el que mejor explica la relación entre taxa (Avice 2004). Este método comienza con un alineamiento de las secuencias de cada taxa, y se trabaja con los sitios parsimoniosamente informativos (aquellos sitios donde hay más de un carácter que esté representado al menos dos veces). Debido a que el set de datos en este trabajo es mayor a veinte taxa se utilizó una búsqueda heurística, ya que una búsqueda exhaustiva consumiría mucho tiempo. El algoritmo para adherir las taxa para construir el árbol fue el "Stepwise Addition Algorithm". El mismo integra cada taxa a las distintas ramas, en cada adición se evalúan los distintos árboles y se continúa adhiriendo taxa al árbol que resultó ser el más parsimonioso en la adición anterior. Cuando se forma el árbol provisional con todas las taxa se aplica el algoritmo "Tree Bisection and Reconnection", generando nuevas topologías, cortando ese árbol provisional y reconectándolo en las distintas ramas (Nei & Kumar 2000). Para conocer la calidad del árbol se calculó el índice de consistencia (número mínimo de pasos/número de pasos posibles). Esto también nos da una idea de la homoplasia presente, es decir, la cantidad de ruido en el conjunto de datos empleados en la reconstrucción filogenética (Freeman & Herron 2002).

Los análisis filogenéticos tanto Neighbor joining como parsimonia se realizaron utilizando el programa informático PAUP* v4.0 b10 (Swofford 2002). La estabilidad de ambos árboles fue testada con 100 pseudoréplicas del test de bootstrap (Felsenstein 1985), un método estadístico de muestreo de reposición al azar.

Los árboles fueron enraizados con el criterio de grupo externo. En este caso fueron utilizados los siguientes taxa como grupos externos: *G. labiatus*, *Gymnogeophagus* cf. *meridionalis*, *Geophagus* sp., *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus steindachneri*.

Análisis Poblacional

Con el fin de estimar el patrón de estructura poblacional para nuestro set de datos realizamos el análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin ver 3.0

(Excoffier et al. 2005). El mismo analiza la varianza en el set de datos de la frecuencia haplotídica y el número de mutaciones entre haplotipos. Los haplotipos fueron previamente definidos en base a los resultados del programa DNAsp v 5 (Rozas et al. 2009), y el set de datos introducido contiene sólo sitios parsimoniosamente informativos de las secuencias. La significancia de la covarianza se calcula mediante 100 permutaciones no paramétricas. Las poblaciones fueron definidas en base a las distintas subcuencas definidas previamente por González-Bergonzoni (2008). Además siguiendo la interpretación de Pereyra & García (2008) se tuvo en cuenta que en algunas de esas localidades se definieron distintos morfotipos (A y B) los que posteriormente fueron descriptos como nueva especie (González-Bergonzoni et al. 2009). Las hipótesis de agrupamientos de poblaciones se realizaron primero según las cuatro cuencas representadas en este estudio y segundo considerando que la hipótesis que mejor describe la estructura poblacional es aquella que maximice la varianza entre los grupos de poblaciones y minimice la heterogeneidad dentro de las poblaciones.

Además, se construyó la red de haplotipos mediante el “Minimum Spanning Network” a partir de los sitios parsimoniosamente informativos de los distintos haplotipos. La red de haplotipos se construye a partir de una matriz euclidiana del cuadrado de las distancias pareadas entre los diferentes haplotipos de la muestra.

Se calcularon los estadísticos análogos (Φ) a los estadísticos F (Wright 1951) para todos los pares de poblaciones con el fin de tener un estimativo de la estructuración poblacional y del valor indirecto del Flujo génico (número de migrantes por generación). El estadístico se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$F_{st=i} = \frac{1}{n} \left[\frac{1}{P-1} \text{SSD}(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} \text{SSD}(WP)_i \right] \sigma_T^2$$

donde n es el número de copias del haplotipo en la población-i, P es el número de poblaciones, N es el número de haplotipos, SSD (AP) es la suma de los cuadrados de las desviaciones entre poblaciones y SSD (WP) es la suma de las desviaciones dentro de las poblaciones. Mientras que el número de migrantes por generación basado en el

modelo de islas y para genes haploides como los mitocondriales, se puede estimar con la siguiente fórmula: $Nm = (1/F_{st}-1)/2$ (Wright 1951). El Flujo génico puede dar cuenta de la estructuración de las poblaciones y si cada una se comporta como una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1994).

Al igual que el AMOVA, el Minimum Spanning Network y el cálculo de F_{st} fueron realizados en el programa Arlequin ver 3.0 (Excoffier et al. 2005).

Con el fin de testear si el aislamiento genético medido a través del estadístico F_{st} se relaciona con las distancias geográficas, se realizó el test de Mantel (Mantel 1967). Este análisis busca si hay correlación entre dos matrices de datos, y a través de permutaciones calcula la significancia de esta correlación. El test de Mantel se realizó en el programa Mantel Non-parametric Test Calculator 2.0 (Liedloff 1999).

Reloj Molecular

Con el fin de tener una referencia temporal de las distintas divergencias dentro del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*, se estimó un reloj molecular para el gen de citocromo *b* y para el grupo. El mismo se calculó con una tasa de mutación de un 2% (Brown et al. 1979) por millón de años. La divergencia genética se calculó basado en el modelo evolutivo Kimura 2 parámetros.

Resultados

Extracción, amplificación y secuenciación del gen citocromo b

Se realizó la extracción de 53 individuos de *G. cf. gymnogenys* a partir de muestras de músculo. A partir de ADN genómico, mediante los experimentos de PCR se amplificaron y se envió a secuenciar una región parcial del gen mitocondrial citocromo *b* en 21 muestras, las que representan secuencias nuevas para el complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*.

Análisis de secuencias

En el presente trabajo se obtuvieron 21 nuevas secuencias para el complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*, las mismas se detallan en el Anexo 1.

Las nuevas secuencias de un total de 700 pb fueron alineadas en conjunto con secuencias ya existentes en GenBank, generando un archivo final conteniendo 57 secuencias. Este archivo tiene un total de total 711 sitios, de los cuales 63 fueron variables y 54 fueron parsimoniosamente informativos (Tabla 3).

Tabla 3. Estimadores de polimorfismo del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*.

| Pares de Bases | Sitios Variables | Sitios parsimoniosamente informativos | Número de Haplotipos | Diversidad haplotídica | π (Desvío estándar) | Distancia corregida (K2P) (Desvío estándar) | D | Fs |
|----------------|------------------|---------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|---|-------------------|--------------------|
| 710 | 41 | 30 | 22 | 0,951 | 0,1804 (0,02545) | 0.020 (0.005) | -0,999 (P>0,1) | -4,904 (P>0,05) |

Diversidad Haplotídica (H) (adaptada de Nei 1987); *Diversidad Nucleotídica* (π) (Nei 1987); Distancias genéticas corregidas con el modelo Kimura 2 parámetros (Kimura 1980). Estadístico D del test de Neutralidad de Tajima (1989); Estadístico Fs del test de Neutralidad Fu (1997).

Para el complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* se encontraron 41 sitios polimórficos. Mientras que la diversidad nucleotídica fue $\pi= 0,01804$. También se encontraron 22 haplotipos, representando una alta diversidad haplotídica (Tabla 3)

La distancia genética promedio, corregida por el modelo Kimura 2 parámetros, dentro del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* se observa en la Tabla 3. En la Tabla 4 se puede ver que la mayor distancia pareadas entre los grupos allí descritos se

observa entre el género *Geophagus* y los grupos *G. labiatus* y *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*.

Tabla 4. Tabla de distancias pareadas corregidas con el modelo Kimura 2 parámetros, entre los cuatro grupos descritos en el texto.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|-------|-------|-------|-------|
| 1- <i>Gymnogeophagus cf. gymnogenys</i> | 0,000 | | | |
| 2- <i>Gymnogeophagus labiatus</i> | 0,086 | 0,000 | | |
| 3- <i>Gymnogeophagus meridionalis</i> | 0,122 | 0,160 | 0,000 | |
| 4- <i>Geophagus</i> | 0,214 | 0,225 | 0,186 | 0,000 |

En la Figura 2A se observa la diferencia entre transiciones y transversiones. En la misma las transiciones superan a las transversiones, con una relación $ts/tv = 5,41$. En esta gráfica no se observan evidencias de saturación. Cuando se distinguió entre las primeras dos posiciones del codón y la tercera (Figura 2B), se observó que la mayor parte de las transiciones ocurren en la tercera posición evidenciando saturación por encima del 8 % de la diferencias genéticas. Además, se observó una mayor relación ts/tv en la tercera posición del codón ($ts/tv=10,66$) que en las primeras dos posiciones ($ts/tv=1,13$). En cuanto a la relación K_S/K_A esta fue de 4,7317, lo cual revela la existencia de selección positiva en el fragmento analizado.

Test de neutralidad

El valor del estadístico de Tajima fue $D=-1,06745$ mientras que el estadístico para el test de Fu fue $F_s = -5,255$. Aunque ambos estadísticos fueron negativos, no se puede afirmar que haya desplazamiento de la neutralidad debido a que ambos estadísticos no fueron significativos.

Análisis Filogenéticos

El método de reconstrucción filogenética, Unión de Vecinos “Neighbor joining” (Figura 3), mostró una topología similar al método de Máxima Parsimonia (Figura 4). En ambos

no se pudo comprobar la monofilia del género *Gymnogeophagus* dado que se observó una politomía basal no resuelta donde coalescen tres clados: 1) El género *Geophagus* y la especie *G. meridionalis*; 2) El complejo *G. gymnogenys*; 3) *G. labiatus*. Dentro del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* se encontraron 5 clados con fuerte soporte estadístico. El índice de consistencia para el árbol consenso de máxima parsimonia fue 0,662.

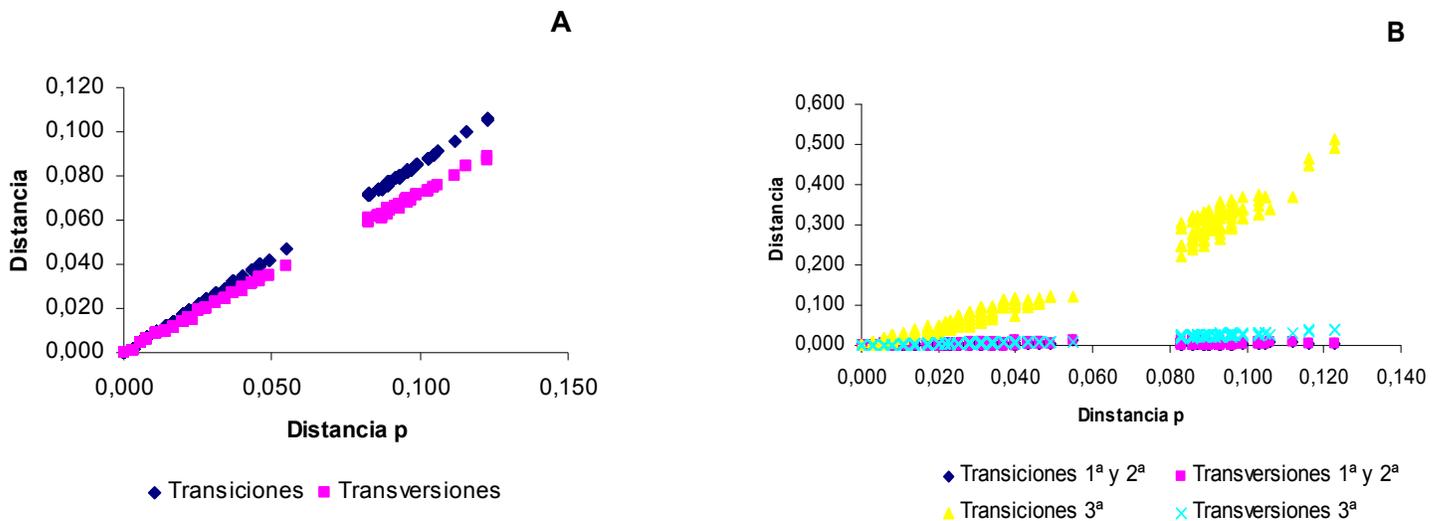


Figura 2. A. Distancias calculada en base a las transiciones y transversiones en función de las distancias p sin corregir, para las 52 secuencias del género *Gymnogeophagus*. **B.** Distancia calculada según transiciones y transversiones discriminando entre las dos primeras posiciones del codón y la tercera, en función de las distancias p sin corregir para las 52 secuencias del género *Gymnogeophagus*.



Figura 3. Topología basada en el método de reconstrucción por distancia Neighbor joining, con el modelo HKY85, utilizando secuencias de citocromo *b*. La barra indica 10 cambios. El apoyo de los nodos se obtuvo mediante 100 pseudoreplicas de bootstrap. El grupo externo fue: *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus sp.*, *Geophagus steindachneri*, *G. meridionalis* y *G. labiatus*. Los números refieren a los distintos haplotipos y los colores indican las cuencas donde fueron colectadas. A la derecha se señalan los cinco grupos encontrados con fuerte soporte de bootstrap dentro del complejo *G. cf. gymnogenys* que incluyen tanto el *sensu stricto* como la especie ya descrita como *G. tiraparae*.

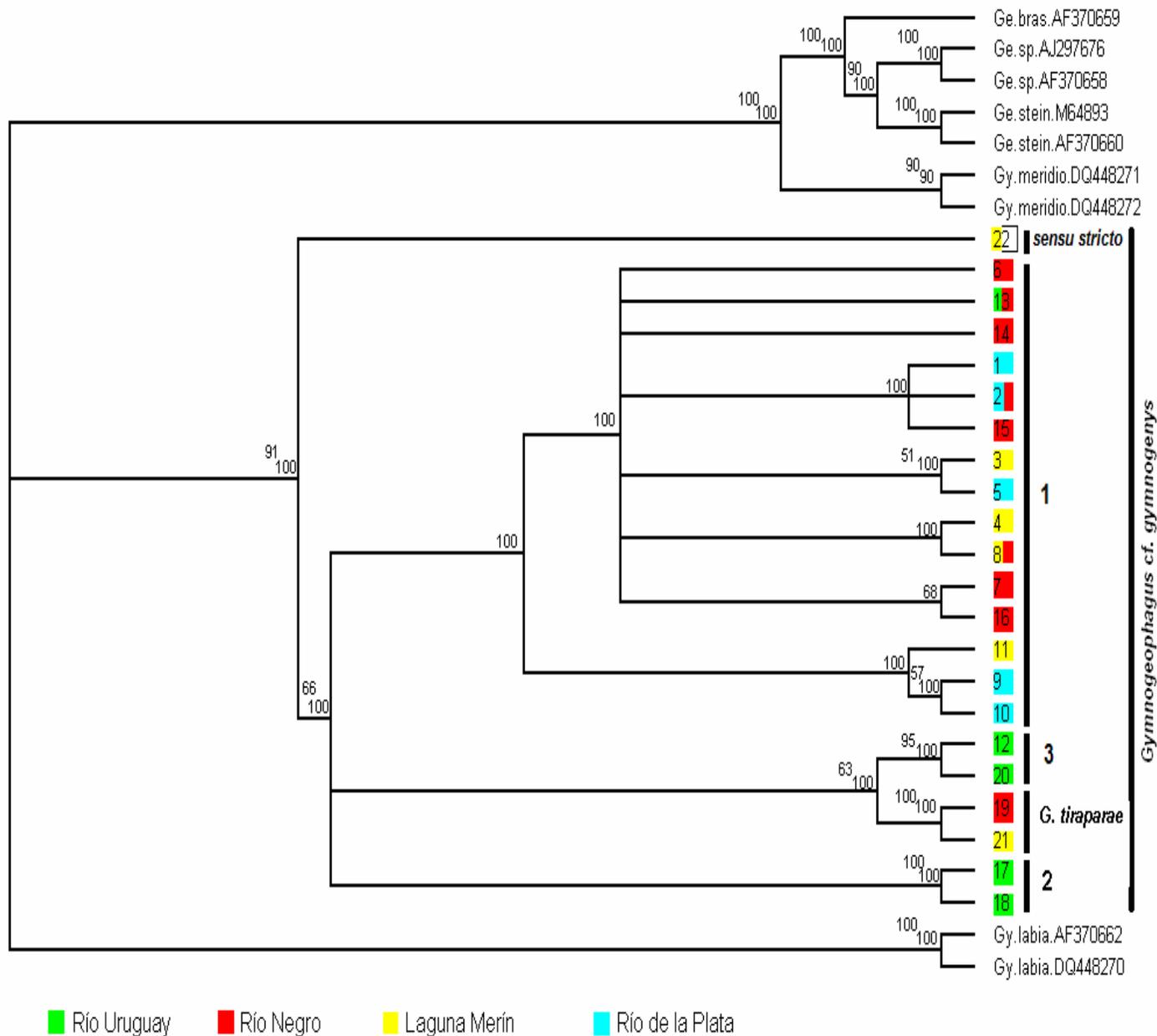


Figura 4. Árbol de Máxima Parsimonia obtenido bajo el criterio 50% de la mayoría, de un total de 2334 árboles de 362 pasos, basado en secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo *b*. Los apoyos de los nodos fueron obtenidos por 10 pseudoreplicas de bootstrap (arriba) y el consenso de mayoría (abajo). Se utilizaron como grupo externo: *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus sp.*, *Geophagus steindachneri*, *Gymnogeophagus meridionalis* y *G. labiatus*. Los números indican los distintos haplotipos y sus colores refieren a las cuencas a las que pertenecen. A la derecha se indican los 5 grupos con fuerte apoyo de bootstrap, dentro del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*.

Análisis poblacional

Dos de las hipótesis de agrupamiento testeadas se describen en la Tabla 5.

En la “hipótesis a” en la que se considera los agrupamientos por cuencas, se vio mayor variación dentro de las poblaciones que entre los grupos formados. De la misma manera el estadístico Φ_{ST} hallado mostró una alta heterogeneidad dentro de las poblaciones, considerando que dentro de una misma localidad existen diferentes morfotipos representados por diferentes haplotipos. Para la estructura encontrada en la “hipótesis b”, el nivel de varianza entre grupos fue mayor que dentro de las poblaciones (Tabla 5). Para esta estructura el Φ_{ST} también fue alto al igual que el Φ_{CT} , lo que indica una alta heterogeneidad tanto dentro de las poblaciones como entre las agrupaciones testeadas.

En la red de haplotipos (Figura 5) se observan los 5 grupos obtenidos mediante el análisis filogenético. Además de la alta diferencia marcada por el número de cambios entre los distintos haplotipos, se puede ver que dentro de las distintas cuencas coexisten haplotipos altamente divergentes. La mayor diferencia se da entre los grupos 2 y 5 (30 pasos mutacionales). También se puede discriminar una topología en forma de estrella en donde el haplotipo F, es el más frecuente y central localizado en el Río Negro, posiblemente representando el más ancestral del cual derivan otros haplotipos.

Tabla 5. Análisis Molecular de Varianza genética. Se presentan los valores del análisis bajo dos Hipótesis de estructura poblacional del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys* en Uruguay.

| Hipótesis | Fuente de la Variación | Grados de Libertad | Suma de cuadrados | Componentes de Varianza | Porcentaje de Variación | Estadístico Φ |
|-----------|------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| a | Entre Grupos | 3 | 58,19 | 0,58 Va | 11,86 | $\Phi_{CT}=0,14$ |
| | Entre poblaciones dentro de grupos | 6 | 79,5 | 2,68 Vb | 54,81 | $\Phi_{CS}=0,61$ |
| | Dentro de las Poblaciones | 37 | 60,33 | 1,63 Vc | 33,33 | $\Phi_{ST}=0,66$ |
| B | Entre Grupos | 3 | 95,90 | 3,99 Va | 59,58 | $\Phi_{CT}=0,60$ |
| | Entre poblaciones dentro de grupos | 6 | 41,79 | 1,08 Vb | 16,1 | $\Phi_{CS}=0,40$ |
| | Dentro de las Poblaciones | 37 | 60,33 | 1,63 Vc | 24,32 | $\Phi_{ST}=0,76$ |

Tres niveles jerárquicos de la varianza: Grupos formados por poblaciones, entre las poblaciones de un mismo grupo y entre las poblaciones. Tres Hipótesis fueron testeadas a) las poblaciones se agruparon según las 4 grandes cuencas representadas en este trabajo. b) Cuatro grupos: Yucutujá/Tres cruces; Pintado; Laguna Merín A y Yí A; Cuenca del Río Tacuarembó, Cuenca del Río de la Plata W, Santa Lucía, Laguna Merín B y Yí B.

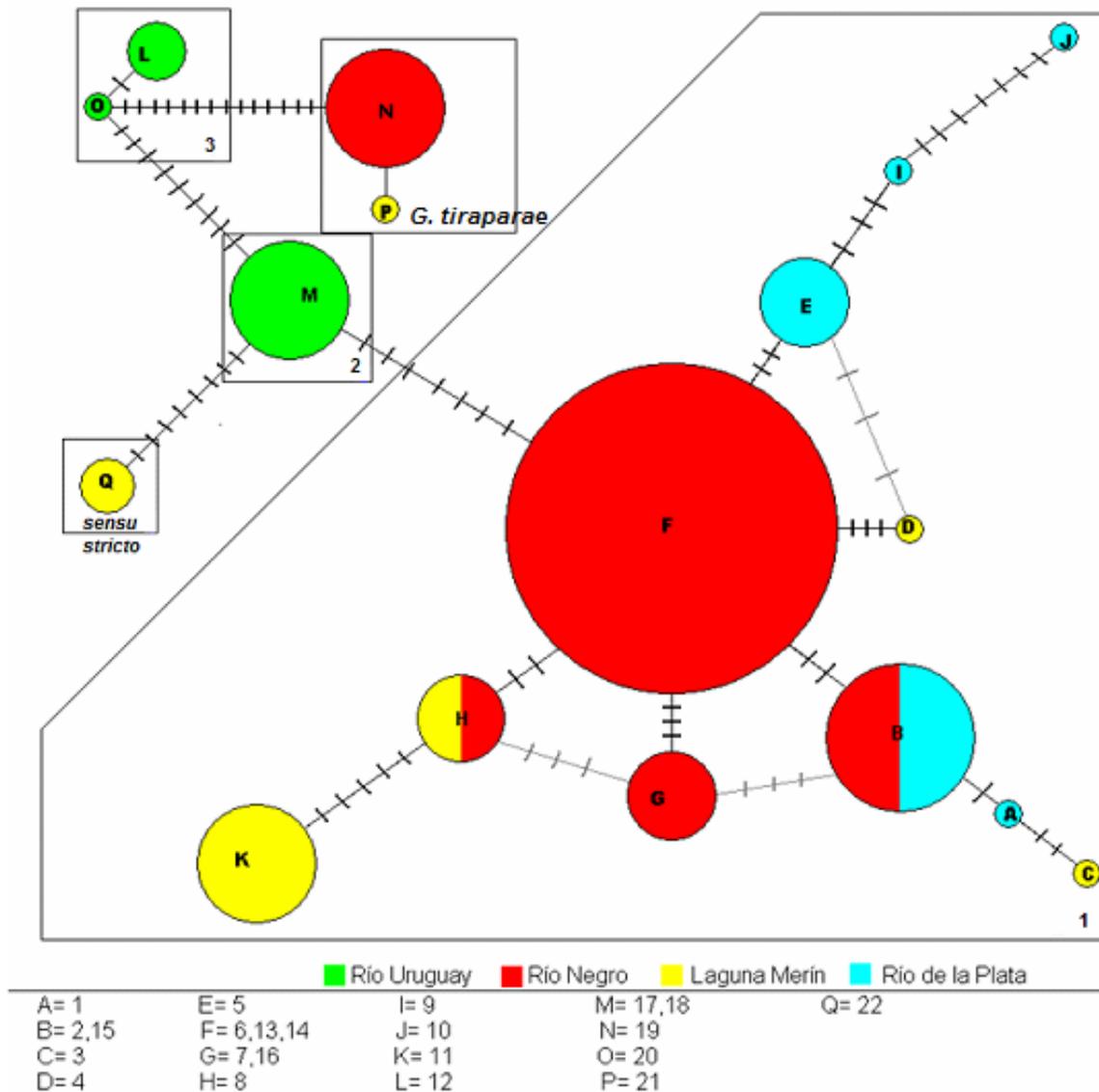


Figura 5. Red de haplotipos del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*. El Área de los círculos es proporcional a su frecuencia. Las barras transversales a las líneas que conectan los círculos indican un cambio entre los haplotipos. Las letras corresponden a los haplotipos encontrados en el Arlequín en base a los sitios parsimoniosamente informativos. Se indica la correspondencia entre estos y los haplotipos encontrados en el DNAsp. Los colores refieren a las cuencas donde está presente cada haplotipo. En gris se observan conexiones alternativas. También se indican con números azules los 5 grupos encontrados en el análisis filogenético.

En la Tabla 6 se observan los estadísticos F_{st} pareadas y el número de migrantes por generación, entre las distintas poblaciones. En ésta se evidencia que las poblaciones de Yucutujá, A. Pintado y Yí B están aisladas de las otras poblaciones ya que los F_{st} con las otras poblaciones fueron mayores a $1/3$, lo que indica menos de un migrante por generación intercambiado entre las poblaciones. Las restantes poblaciones tienen

flujo génico por lo menos con una población cada una. Sin embargo, varios de los valores de F_{st} no fueron significativos. Es de destacar que el valor negativo de F_{st} entre las poblaciones de la cuenca del Queguay y la del Río Tacuarembó se debe al algoritmo utilizado por el programa para su cálculo. Esto es porque para estas dos poblaciones el valor de SSD (AP) es bajo y SSD (WP) es alto; y consecuentemente el valor negativo es interpretado como infinito número de migrantes infinito.

El gráfico en la Figura 6, donde se comparan las distancias obtenidas por el estadístico F_{st} y las distancias geográficas, se observó una alta dispersión. La falta de correlación es probada con el resultado del test de Mantel.

Tabla 6. En azul los valores pareados del estadístico F_{st} entre las diez poblaciones creadas según subcuencas y morfotipos. En negro se observa el Número de migrantes por generación. En negrita se señala los valores significativos. En amarillo se señala los valores que indican Flujo génico.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1-Yucutujá/Tres cruces | - | 0,014 | 0,257 | 0,000 | 0,042 | 0,259 | 0,000 | 0,155 | 0,330 | 0,000 |
| 2-A.Pintado | 0,972 | - | 0,196 | 0,022 | 0,046 | 0,232 | 0,012 | 0,172 | 0,515 | 0,012 |
| 3-Tacuarembó | 0,660 | 0,718 | - | ∞ | 3,047 | 1,128 | 0,833 | 0,999 | 0,409 | 0,115 |
| 4-Queguay | 1,000 | 0,958 | -0,312 | - | 0,488 | 1,674 | 0,000 | 1,165 | 0,900 | 0,000 |
| 5-R de la Plata W | 0,923 | 0,917 | 0,141 | 0,506 | - | 0,543 | 0,160 | 0,451 | 0,247 | 0,021 |
| 6-Laguna MerínB | 0,659 | 0,683 | 0,307 | 0,230 | 0,480 | - | 0,623 | 0,769 | 0,539 | 0,121 |
| 7-Yí B | 1,000 | 0,976 | 0,375 | 1,000 | 0,758 | 0,445 | - | 0,332 | 0,353 | 0,000 |
| 8-Santa Lucía | 0,763 | 0,744 | 0,334 | 0,300 | 0,526 | 0,394 | 0,601 | - | 0,488 | 0,084 |
| 9-Laguna MerínA | 0,602 | 0,493 | 0,550 | 0,357 | 0,669 | 0,481 | 0,586 | 0,506 | - | 1,500 |
| 10-Yí A | 1,000 | 0,977 | 0,813 | 1,000 | 0,960 | 0,806 | 1,000 | 0,857 | 0,250 | - |

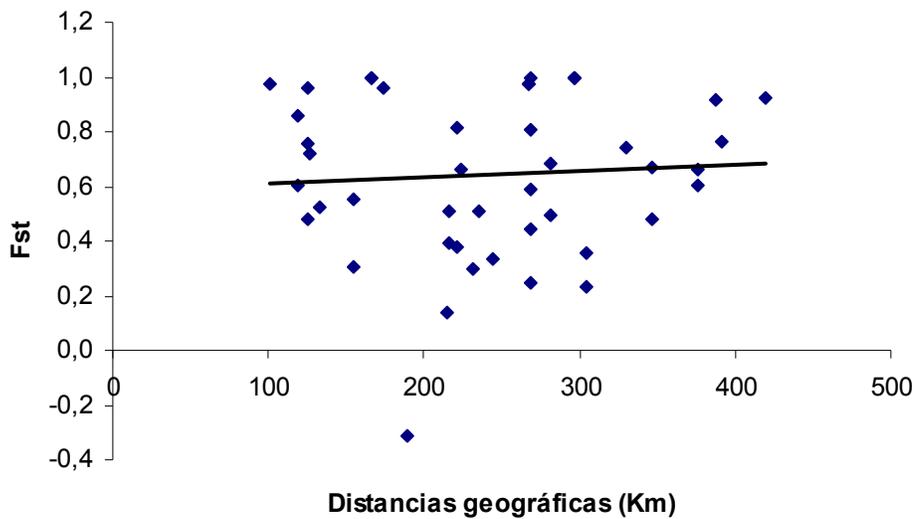


Figura 6. Relación entre las distancias genéticas representadas con el estadístico Fst vs. distancias geográficas, para 10 poblaciones de *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*. Mantel test ($g=-0,7$; $r=0,107$).

Reloj Molecular

Las estimaciones del tiempo de divergencia en base a la tabla de divergencia genética (Tabla 7), permitió estimar que los grupos 1 y 2 (Figura 3 y 4) divergieron hace aproximadamente 2,3 millones de años, mientras que la diferenciación más reciente fue hace aproximadamente un millón de años, entre los grupos 4 y 5 (Figura 3 y 4). Por tanto, los diferentes eventos de divergencia fueron situados en el Pleistoceno.

Tabla 7. Tabla de Divergencia genética pareadas, bajo el modelo Kimura 2 parámetros, entre los clados del complejo *Gymnogeophagus cf. gymnogenys*, encontrados en los análisis filogenéticos.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|---|
| Grupo 1 | | | | | |
| Grupo 2 | 0,046 | | | | |
| Grupo 3 | 0,030 | 0,034 | | | |
| Grupo 4 | 0,032 | 0,044 | 0,026 | | |
| Grupo 5 | 0,029 | 0,045 | 0,025 | 0,021 | |

Discusión

Polimorfismo de ADN en el gen de citocromo b

Las secuencias obtenidas del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*, mostraron una alta variabilidad, especialmente una alta diversidad haplotídica. Los valores de esta fueron cercanos a los encontrados en el género *Gymnogeophagus* por Pereyra & García (2008). Valores altos de variabilidad ya fueron destacados para los cíclidos Neotropicales sobre todo en la subfamilia Geophaginae, la cual sería más alta que la encontrada en cíclidos Africanos (Farias et al. 1999).

El análisis de distancia genética indica que la especie más cercana al complejo *G.* cf. *gymnogenys*, en el contexto de este estudio, es *G. labiatus*, mientras que la especie *G. meridionalis* sería una especie hermana de estas dos. Asimismo, los ejemplares del género *Geophagus* muestran ser hermanos a los del género *Gymnogeophagus*, lo que confirmaría la monofilia del género *Gymnogeophagus*. Las relaciones encontradas concuerdan con estudios anteriores (Reis & Malabarba 1988; Wimberger et al. 1998; Pereyra & García 2008).

Uno de los cuestionamientos del uso de los genes mitocondriales para los análisis filogenéticos es la evidencia de saturación y homoplasia (Hey & Machado 2003; López Fernández et al. 2005). En este estudio solo se observó saturación en *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* cuando se analizaron las transiciones en la tercera posición; no así cuando se estudió la saturación en las tres posiciones del codón en su conjunto. Según Farias (1999), esto se debe a que la saturación se evidencia cuando la divergencia entre los individuos supera el 15%. Este valor no se supera dentro del complejo estudiado, mientras que si se dan valores mayores a 0,15 entre *G. meridionalis* y *G. labiatus*, y entre los géneros *Gymnogeophagus* y *Geophagus*.

Los test de neutralidad realizados no constataron evidencia de selección natural o de expansión demográfica en la secuencia de citocromo *b* analizada, por tanto esta no compromete nuestras inferencias evolutivas.

Sin embargo, en el presente set de datos se evidenció selección positiva lo que es de esperar en un gen codificante para una proteína de la cadena respiratoria de la mitocondria. La ausencia de selección purificadora en la evolución del ADN mitocondrial es una de las asunciones necesarias para poder asegurar que los patrones genéticos reflejan la historia de los organismos (Zink 2005).

Análisis filogenéticos

Las relaciones filogenéticas encontradas mediante los dos métodos no concuerdan con resultados anteriores. Nuestros análisis muestran una politomía basal donde coalescen tres clados: 1) *Geophagus* y *G. meridionalis*; 2) *G.cf gymnogenys*; 3) *G. labiatus*. El complejo *G. cf. gymnogenys* incluye, *G. gymnogenys sensu stricto* y *G. tiraparae* además de los otros 3 linajes genéticos divergentes. En contraposición, en análisis anteriores los géneros *Geophagus* y *Gymnogeophagus* son monofiléticos respectivamente. En esos análisis *G. gymnogenys* sería una especie hermana de *G. labiatus* y estos dos forman un clado hermano de *G. meridionalis* (Reis & Malabarba 1988; Wimberger et al. 1998; Pereyra & García. 2008). La incongruencia entre el presente trabajo y los resultados anteriores puede deberse a la saturación del marcador para distancias genéticas mayores a 15 %, caso en el cual, de acuerdo a Farías et al. (1999) las relaciones filogenéticas no quedarían bien dilucidadas debido a la existencia de homoplasia. Otra posible causa para la mencionada incongruencia, puede deberse a que no se puedan resolver las relaciones entre *Geophagus* y *Gymnogeophagus* debido a que la politomía basal puede estar representando o falta información o rápida especiación, eventos ya reportados para la familia Geophaginae (López Fernández et al. 2005). Esto podría solucionarse con un grupo externo menos emparentado dentro de la familia. En nuestros análisis filogenéticos el género *Gymnogeophagus* resulta parafilético debido a que *G. meridionalis* se encuentra formando un clado con el género *Geophagus*. Por tanto, se confirma que *G. meridionalis* posee caracteres basales dentro del género *Gymnogeophagus*, sin embargo no se puede confirmar la monofilia del género *Gymnogeophagus* en base al presente set de datos.

En cuanto al complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* se confirma la monofilia, al igual que lo hicieron Pereyra & García (2008). Dentro del complejo se encontraron 5 grupos incluyendo el *sensu stricto* y la especie *G. tiraparae*, uno más que los encontrados anteriormente por Pereyra & García (2008). El nuevo grupo encontrado pertenece a las localidades de Yucutujá y Arroyo Tres Cruces (Artigas), muy cercano al Arroyo Pintado donde se encuentra otro grupo. Los 5 grupos encontrados concuerdan con la hipótesis propuesta por Reis & Malabarba (1988) y que luego fue confirmado por Pereyra & García (2008), que este taxa sería un complejo de especie. Estos análisis no pudieron resolver la relación entre cuatro grupos y dentro de uno de los grupos, observándose una politomía no resuelta, lo cual se ha visto antes en cíclidos (Seehausen 2006; Pereyra & García 2008). Esta politomía puede deberse tanto a la falta de información necesaria para resolver las relaciones filogenéticas o a eventos de rápida diferenciación (López-Fernández et al. 2005).

Los distintos episodios de divergencias dentro del complejo fueron situados en el Pleistoceno, en acuerdo con Pereyra & García (2008). Este resultado, en base al Reloj Molecular, puede ser cuestionado debido a que los registros fósiles son escasos en la familia y nulos en *Gymnogeophagus* lo que dificulta la calibración del mismo (Koblmüller et al. 2008; Pereyra & García 2008).

Análisis poblacional

La red de haplotipos también evidenció una alta divergencia, haplotipos divergentes separados por varios cambios que representan haplotipos intermedios no encontrados. Estos haplotipos intermedios no encontrados pueden ser a causa de un muestreo no representativo o a una divergencia de estos haplotipos en un pasado lejano (Seehausen 2006). Además, en este análisis se pueden ver los cinco agrupamientos encontrados en los análisis filogenéticos. Las relaciones observadas en la red de haplotipos, no concuerdan con la distribución de los organismos en las cuencas, presentándose haplotipos altamente divergentes en la misma cuenca, incluso coexistiendo en la misma localidad. Esto podría indicar o bien que la estructura geográfica actual de las cuencas no se corresponde con el pasado, por lo que haplotipos altamente divergentes previamente diferenciados en alopatría, puedan

dispersarse por diferentes cambios geológicos y climáticos en las cuencas y cohabitar en una misma cuenca. Por otro lado, la presencia de esos haplotipos altamente divergentes, también puede explicarse mediante procesos de diferenciación *in situ*. La hipótesis de dispersión para explicar solapamiento de poblaciones divergentes, ya fue propuesta en el género *Tropheus* de cíclidos Africanos (Sturmbauer et al. 2005).

Al buscar la estructura poblacional del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* mediante el AMOVA, se pudo confirmar que esta no se ajusta con la estructura actual de las cuencas. La hipótesis de agrupamiento que mejor describe la estructura del complejo en el Uruguay fue la “b” (Tabla 5), en la cual no solo se tuvo en cuenta los agrupamientos que incluyen la mayor cantidad de poblaciones, minimizando la varianza entre las poblaciones dentro de esos grupos y maximizando la varianza entre grupos, sino que también se agruparon poblaciones en base a similitudes morfológicas. Esto no concuerda con una divergencia en alopatría de acuerdo a la actual estructura de cuencas, mientras podría apoyar la posible divergencia *in situ* a través de la especialización ecológica o selección sexual. Estos mecanismos ya han sido propuestos para la diferenciación en cíclidos (Farias et al. 1999; Salzburger et al. 2002; Salzburger & Meyer 2004; Koblmüller et al. 2008). Por ejemplo, Schliewen et al. (1994) probaron la diferenciación en simpatría dentro de los lagos Bermin y Barombi Mbo, ya que la forma cónica de los lagos no permitiría la separación entre poblaciones en cambios del nivel del agua. También encontraron una relación entre los grupos encontrados mediante análisis moleculares de citocromo *b* y las adaptaciones tróficas de los distintos grupos. Alternativamente, los resultados del AMOVA pueden explicarse por dispersión de linajes divergentes entre cuencas que hayan tomado contacto mediante eventos geológicos en un pasado más o menos reciente.

El análisis de flujo genético sugiere varias poblaciones aisladas y con muy bajo número de migrantes por generación lo que indica que el aislamiento no es reciente. Este análisis confirma la existencia de dos poblaciones divergentes y aisladas cohabitando en las localidades tanto de Laguna Merín como en el río Yí. Los resultados del Mantel descartan el aislamiento por distancia en *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys*; lo que

está de acuerdo con los anteriores análisis ya que se han visto poblaciones altamente divergentes coexistiendo en la misma localidad.

Conclusión

En este estudio se confirmó la monofilia de *Gymnogeophagus gymnogenys* y la hipótesis de que sería un complejo de especie. Este complejo está compuesto por cinco clados con fuerte apoyo. Estos clados deberían ser tenidos en cuenta en futuras políticas de conservación de la biodiversidad como distintos ESUs. Además se encontraron poblaciones altamente divergentes cohabitando los mismos ambientes y con bajos valores de flujo génico entre sí. Se descartó la diferenciación por distancia, dejando dos hipótesis como posibles fenómenos a explicar la divergencia de los distintos clados: diferenciación *in situ* y por otro lado, diferenciación en alopatria con eventos de dispersión por contacto entre cuencas durante un pasado reciente.

Nuestra investigación permitió la reconstrucción de relaciones filogenéticas y de la historia biogeográfica de un complejo de especies de una de las familias de teleósteos más diversa, en el Uruguay.

Perspectivas

Con el fin de poder discriminar si la politomía se debe a falta de información del marcador utilizado o a una diferenciación rápida *in situ*, es necesario el muestreo en localidades que aún no están representadas en nuestros análisis (por ej: cuenca del Arapey y Queguay), ya que un muestreo riguroso puede maximizar la resolución (Říčan et al. 2008; López-Fernández et al. 2010). Así mismo se deberán realizar análisis combinados de genes mitocondriales con genes nucleares. Estos análisis proveen diferente información para poder resolver las relaciones filogenéticas y acerca de los eventos de diferenciación (Hey & Machado 2003; Říčan et al. 2008).

En este estudio no se pudo resolver el fenómeno de diferenciación en el complejo, para esto se propone un análisis morfológico, ecológico y etológico para probar si existe selección sexual o especializaciones tróficas relacionadas a los clados encontrados.

Por otro lado, en base a nuestros resultados y a los antecedentes en la subfamilia Geophaginae, es importante estudiar el fenómeno de radiación adaptativa. Para ello, es

importante comprobar las características que propuso Schluter (2000): monofilia, rápida diversificación, correlación entre fenotipo medioambiente y caracteres con utilidad ecológica. Las dos primeras se pueden desprender de nuestros análisis, mientras que las dos últimas implicarían un estudio ecológico de los caracteres morfológicos.

Por último, debido a que ya se ha encontrado variación a nivel citogenético dentro del género *Gymnogeophagus* (Bettin Pires et al. 2010) sería informativo realizar un estudio a nivel citogenético dentro del complejo y contrastarlo con los grupos o poblaciones aisladas encontradas en este estudio.

Bibliografía

- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avice JC. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- Baric S, Schlieven W, Sturmbauer C. 2003. Phylogeography and Evolution of the Tanganyikan Cichlid Genus *Tropheus* Based upon Mitochondrial DNA Sequences. *J. Mol. Evol.* 53: 54-68.
- Barluenga M, Meyer A. 2005. Old fish in a young lake: stone loach (Pisces: *Barbatula barbatula*) populations in Lake Constance are genetically isolated by distance. *Mol. Ecol.* 14: 1229-1239.
- Bermingham E, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* 7: 367-369
- Bettin Pires L, Giuliano-Caetano L, Dias AL. 2010. Cytogenetic Characterization of *Geophagus brasiliensis* and Two Species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba Lake, RS, Brazil. *Folia biologica (Kraków)*. No 1-2 doi:10.3409/fb58_1-2.29-34.
- Brown WM, George M Jr., Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- Concheiro Pérez GA, Říčan O, Ortí G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya, R. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Mol. Phylogenetic. Evol.* 43: 91-110.
- Egger B, Koblmüller S, Sturmbauer C, Sefc KM. 2007. Nuclear and mitochondrial data reveal different evolutionary processes in the Lake Tanganyika cichlid genus *Tropheus*. *BMC. Evol. Biol.* 7: 137.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A. 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. *J. Mol. Evol.* 48: 703-711.

- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J. Mol. Evol.* 53: 89-103.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Freeman S, Herron JC. 2002. *Análisis Evolutivo*. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- Froese R, Pauly D. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version 11/2010.
- Fu Y-X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyma DJ. 2006. *Evolution*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- González-Bergonzoni I, Loureiro M, Oviedo S. 2009. A new species of *Gymnogeophagus gymnogenys* from the río Negro and río Tacuarí basins, Uruguay (Teleostei: Perciformes). *Neotropical Ichthyology* 7: 19-24.
- González-Bergonzoni I. 2008. Patrones de Distribución del Género *Gymnogeophagus* Miranda-Rivero (Cichlidae; Perciformes) en Uruguay. *Pasantía de Grado*
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating of the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160–174.
- Hey J, Machado CA. 2003. The study of structured populations-New hope for a difficult and divided science. *Nature* 4: 535-543
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Koblmüller S, Sefc KM, Sturmbauer C. 2008. The Lake Tanganyika cichlid species assemblage: recent advances in molecular phylogenetics. *Hidrobiologia* 615: 5-20.
- Kullander SO, Ferraris CJ. 2003. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Museu de Ciências e Tecnologia, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Liedloff A. 1999. Mantel nonparametric test calculator for windows. Version 2.00. Distributed by the author, School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane.
- López-Fernández H, Honeycutt RL, Stiassny MLJ, Winemiller KO. 2005. Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American Geophagine cichlids (Perciformes, Labroidei). *Zoologica Scripta* 34: 627-651.
- López-Fernández H, Winemiller KO, Honeycutt RL. 2010. Multilocus phylogen and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae) *Mol. Phylogenetic. Evol.* 50: 1070-1086.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209–220.
- Moritz C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Tree* 9: 373-375.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Musilová Z, Řičan O, Janko K, Novák J. 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Mol. Phylogenetic. Evol.* 46: 659-672.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. USA.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. 2008. *Principles of Biochemistry*. 5th edition. Freeman WH and Company, cop. New York, USA.
- Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. 1991. The simple fool’s guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
- Pereyra S, García G. 2008. Patterns of genetic differentiation in the *Gymnogeophagus gymnogenys* species complex, a neotropical cichlid from South American basins. *Environ. Biol. Fish.* 83: 245-257.
- Posada D, Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

- Reis RE, Malabarba LR. 1988. Revision of the Neotropical cichlid genus *Gymnogeophagus* Ribeiro, 1918, with descriptions of two new species (Pisces, Perciformes). *Rev. Bra. Zool.* 4: 259-305.
- Reis RE, Malabarba LR, Pavanelli CS. 1992. *Gymnogeophagus setequedas*, a new cichlid species (Teleostei: Labroidei) from middle Rio Paraná system, Brazil and Paraguay. *Ichthyol. Explor. Freshwaters.* 3: 265-272.
- Řičan O, Zaedoya R, Doadrio I. 2008. Phylogenetic relationships of Middle American cichlids (Cichlidae: Heroini) based on combined evidence from nuclear genes, mtDNA, and morphology. *Mol. Phylogenetic. Evol.* 49: 941-957.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messenguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Salzburger W, Meyer A, Baric S, Verheyen E, Sturmbauer. 2002. Phylogeny of the Lake Tanganyika Cichlid Species Flock and Its Relationship to the Central and East African Haplochromine Cichlid Fish Faunas. 51: 113-135.
- Salzburger W, Meyer A. 2004. The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91: 277-290.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Schluter D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, New York.
- Schliewen UK, Tautz D, Paavo S. 1994. Sympatric speciation suggested by monophyly of crater lake cichlids. *Nature* 368: 629-632.
- Seehausen O. 2006. African cichlid fish: a model system in adaptative radiation research. *Proc. R. Soc. B.* 273:1987-1998
- Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure. En *Ecological Genetics*. L. Real (Editor). Princeton.
- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS. 2008. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24: 625-641.

- Sparks JS. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Mol. Phylogenetic. Evol.* 30: 599-614
- Sturmbauer C, Koblmüller S, Sefc KM, Duftner N. 2005. Phylogeographic history of the genus *Tropheus*, a lineage of rock-dwelling cichlid fishes endemic to Lake Tanganyika. *Hidrobiologia* 542: 335-366.
- Swofford DL. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Stauffer JR, Browsers NJ, Kocher TD, McKaye KR. 1996. Evidence of Hybridization between *Cynotilapia afra* and *Pseudotropheus zebra* (Teleostei: Cichlidae) Following an Intralacustrine Translocation in Lake Malaŵi. 1: 203-208.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- 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 JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25: 4876.
- Wimberger PH, Reis RE, Thornton KR. 1998. Mitochondrial phylogenetics, biogeography, and evolution of parental care and mating systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae). In: Malarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Editora Universitaria, Pontificia Universidad Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323-354.
- Zink RM. 2005. Natural selection on mitochondrial DNA in *Parus* and its relevance for phylogeographic studies. *Proc. R. Soc. B.* 272: 71-78.

Anexo 1. Número de haplotipos en base a secuencias parciales del citocromo *b* obtenidos del complejo *Gymnogeophagus* cf. *gymnogenys* en cuatro cuencas del Uruguay y su correspondencia con el número de catálogo ó número de acceso del Genbank, sitio de muestreo y cuenca correspondiente.

| Haplotipo | Espécimen (N) | Localidad | Cuenca |
|-----------|---------------|--|-----------------|
| 1 | DQ448257 | Arroyo Colla. Dpto. Colonia. | Río de la Plata |
| 2 | P1544 | Arroyo corrales (-31:23:26/-55:15:14). Dpto Rivera. | Río Negro |
| | DQ448258 | Arroyo Colla. Dpto. Colonia. | Río de la Plata |
| | DQ448259 | Arroyo Colla. Dpto. Colonia. | Río de la Plata |
| | P1577 | Río Rosario (Ruta 2 K 20,900). Dpto. Soriano. | Río de la Plata |
| 3 | DQ448252 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| 4 | DQ448256 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| 5 | DQ448269 | Río Santa Lucía. Dpto. Florida. | Río de la Plata |
| | DQ448269 | Río Santa Lucía. Dpto. Florida. | Río de la Plata |
| | DQ448266 | Río Santa Lucía. Dpto. Florida. | Río de la Plata |
| 6 | P1594 | Río Negro (Paraje 329), Dpto. Durazno. | Río Negro |
| | DQ448265 | Río Negro. Dpto. Cerro Largo. | Río Negro |
| | P1587 | Palmar. Dpto. Durazno | Río Negro |
| 7 | DQ448264 | Río Yí. Dpto. Durazno | Río Negro |
| 8 | DQ448251 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| | P1580 | Río Tacuarembó, Pueblo Ansina. Dpto. Tacuarembó | Río Negro |
| | DQ448255 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| 9 | DQ448267 | Río Santa Lucía. Dpto Florida. | Río de la Plata |
| 10 | DQ448268 | Río Santa Lucía. Dpto. Florida. | Río de la Plata |
| 11 | EF426493 | Río Yaguarón. Dpto. Cerro Largo. | Laguna Merín |
| | EF426492 | Río Yaguarón. Dpto. Cerro Largo. | Laguna Merín |
| | EF426491 | Río Yaguarón. Dpto. Cerro Largo. | Laguna Merín |
| | EF426490 | Río Yaguarón. Dpto. Cerro Largo. | Laguna Merín |
| 12 | DQ448261 | Arroyo Pintado. Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| | DQ448261 | Arroyo Pintado. Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| 13 | P1576 | Río Tacuarembó. Dpto. Tacuarembó, | Río Negro |
| | P1606 | Arroyo Grande. Dptos. Flores- Durazno. | Río Negro |
| | P1530 | Arroyo Batovi (-31:06:58/-55:24:56). Dpto. Rivera. | Río Negro |
| | P1533 | Arroyo Cuñapiru (-31:02:21/-55:29:31). Dpto. Rivera. | Río Negro |
| | P1538 | Arroyo Batovi (-31:54:30/-56:01:04). Dpto. Tacuarembó. | Río Negro |
| | P1545 | Arroyo corrales (-31:23:26/-55:15:14). Dpto. Rivera. | Río Negro |
| | P1549 | Cañada en la Ruta 4 (-32:12:25/-57:12:47). Dpto. Paysandú. | Río Uruguay |
| 14 | P1531 | Arroyo Cuñapiru (-31:02:21/-55:29:31). Dpto. Rivera. | Río Negro |
| 15 | P1532 | Arroyo Cuñapiru (-31:02:21/-55:29:31). Dpto. Rivera. | Río Negro |
| 16 | P1540 | Río Yí (-33:23:49/-56:24:10). Dpto. Durazno. | Río Negro |
| | P1542 | Río Yí (-33:23:49/-56:24:10). Dpto. Durazno. | Río Negro |
| 17 | P1559 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27). Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| | P1546 | Arroyo Yucutajá (-30:26:16/-57:17:46). Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| | P1547 | Arroyo Yucutajá (-30:26:16/-57:17:46). Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| 18 | P1552 | Arroyo Pelado (-30:39:31/-56:40:27). Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| 19 | P1582 | Río Tacuarembó, Pueblo ansina. Dpto. Tacuarembó. | Río Negro |

| | | | |
|----|----------|------------------------------------|--------------|
| | DQ448262 | Río Yí. Dpto. Durazno. | Río Negro |
| | DQ448263 | Río Yí. Dpto. Durazno. | Río Negro |
| 20 | DQ448260 | Arroyo Pintado. Dpto. Artigas. | Río Uruguay |
| 21 | DQ448253 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| 22 | DQ448254 | Río Tacuarí. Dpto. Treinta y Tres. | Laguna Merín |
| | AF370661 | | |