

Tesis de grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

**Variación morfológica de *Austrolebias bellottii* (Cyprinodontiformes:
Rivulidae): aspectos históricos, biogeográficos y ecológicos**

Alejandro Duarte

Orientador: Marcelo Loureiro

Índice

<u>Agradecimientos</u>	3
<u>Resumen</u>	4
<u>Introducción</u>	
Los peces anuales como modelo	5
Análisis morfológico de la variación de <i>A. bellottii</i>	7
<u>Materiales y métodos</u>	9
<u>Resultados</u>	13
Análisis merístico y presencia de depredador	13
Análisis merístico y Cuencas	15
Análisis merístico y Latitud	18
Morfometría geométrica y Cuencas	19
Morfometría geométrica y coocurrencia de depredador	22
Morfometría geométrica y latitud	24
<u>Discusión</u>	25
Factor histórico: cuencas hidrográficas	25
Factor ecológico: Variable Depredador	27
Factor Biogeográfico: variable latitud	28
<u>Conclusiones y perspectivas</u>	28
<u>Bibliografía</u>	29

Agradecimientos

A todos los amigos por aguantar cabeza

A Marcelo por la guía en este camino sin retorno

Al jolgory por la ciencia y la demencia compartida

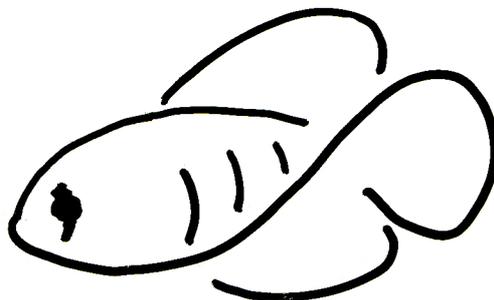
A la familia por dar para adelante aun sin saber qué hago

Al Mato y Pajarito por leer y corregir esto

Al Seba por la ayuda en miles de cosas

A Anita por aguantarme tan seguido y seguirme

A la ANII por nunca financiarme las becas



Resumen

La región Neotropical presenta la mayor diversidad de peces de agua dulce del mundo. Parte de esta gran diversidad corresponde a varias familias de Cyprinodontiformes. Dentro de estas, se encuentra la familia Rivulidae, la cual presenta varios géneros con un ciclo de vida anual único entre los vertebrados. Esto sumado a las características de hábitat fragmentado en que estos peces anuales se desarrollan, los convierten en excelentes modelos para el estudio de los patrones biogeográficos. *Austrolebias bellottii* es un pez anual que habita charcos temporales de las cuencas Paraná, Uruguay y La Plata, presentando una de las distribuciones más amplias para el género. El presente estudio evaluó la variación en la forma respecto a la Latitud, la Cuenca Hidrográfica y la presencia de depredadores mediante análisis de morfometría geométrica y conteos merísticos. Se encontraron relaciones con significancia estadística para las 3 variables estudiadas, se halló una identidad por cuenca y diferencias en la forma en presencia y ausencia de depredadores, la variable latitud explica solamente el 10% y 15% de la variación en machos y hembras respectivamente. De acuerdo a estos resultados, se apunta a la dinámica historia geomorfológica de la cuenca, generando procesos de aislamiento y efecto fundador, la interacción con otras especies y la propia biología del grupo como los principales factores involucrados en la variación observada.

Introducción

Los peces anuales como modelo

La región Neotropical presenta la mayor diversidad de peces de agua dulce del mundo, con al menos 6000 especies habitando sus grandes cuencas hidrográficas (Reis *et al.*, 2003). Parte de esta gran diversidad Neotropical corresponde a varias familias de Cyprinodontiformes, orden que se encuentra entre los cinco grupos con mayor número de especies en esta región (Vari & Malabarba, 1998). Entre ellas, la familia Rivulidae presenta varios géneros con un ciclo de vida anual único entre los vertebrados. El mismo consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan. Estos huevos presentan una capa coriónica externa extremadamente gruesa y ornamentada que los aísla del medio externo adverso (Simpson, 1979; Loureiro & de Sá, 1996, 2000). Además, los embriones tienen la capacidad de atravesar hasta tres períodos de diapausa (Wourms, 1972), lo que les permiten retrasar el tiempo de desarrollo hasta el momento en que las condiciones ambientales son nuevamente propicias para la eclosión de los alevines y el desarrollo de los adultos. Estas adaptaciones del desarrollo embrionario, son complementadas con una alta tasa metabólica que permite a los juveniles alcanzar la madurez sexual pocas semanas después de la eclosión, en algunos casos solamente 4 semanas después del nacimiento (Cardozo, 1999). Una vez adultos, los peces anuales se reproducen constantemente hasta su muerte, la cual ocurre poco antes de secarse los charcos, posiblemente por las altas temperaturas de fines de primavera (Simpson, 1979; Errea & Danulat, 2001). El comportamiento reproductivo también se encuentra asociado a este particular ciclo de vida. El mismo consiste en el despliegue de determinadas conductas de atracción y respuesta por parte del macho y la hembra, cuya culminación es el enterramiento total de la pareja con el fin de depositar los huevos dentro del sustrato (Vaz-Ferreira *et al.*, 1964; Belote & Costa, 2002).

La familia Rivulidae presenta gran variabilidad morfológica (Vaz-Ferreira & Melgarejo, 1984; Costa, 1990; Loureiro & de Sá, 1998) y también se ha registrado amplia divergencia cariotípica entre las especies (García, 2009). Las características de hábitat fragmentado en que los peces anuales se desarrollan, son propicias para que mecanismos evolutivos tales como la deriva genética (Gillespie, 2001), cuellos de botella, efecto fundador (Carvalho & Hauser, 1999) y endogamia tengan influencia sobre la evolución y la probabilidad de extinción de las poblaciones (Whitlock, 2000). Estos mecanismos, junto con las altas tasas metabólicas encontradas en estos organismos (Cardozo, 1999), las características estresantes del ambiente que ocupan y su corto tiempo generacional, provocarían altas tasas de evolución que propiciarían una alta variabilidad morfológica y molecular. Su escasa vagilidad favorecería además el aislamiento entre las poblaciones. La acción conjunta de estos mecanismos evolutivos propiciaría por tanto la diferenciación entre las poblaciones con la potencial probabilidad de la ocurrencia de eventos de especiación (Loureiro, 2004). Asimismo, las interacciones ecológicas, tales como la competencia y la depredación, son también otros posibles mecanismos responsables de la creación de variabilidad y diversidad en estos organismos. Estas condiciones hacen de los peces anuales un buen modelo para estudiar diferenciación intraespecífica y especiación en los vertebrados (D'Anatro & Loureiro, 2005).

El género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) incluye aproximadamente 38 especies distribuidas a lo largo de la cuenca del Paraná-La Plata (Paraná, Paraguay y Uruguay) y del sistema de lagunas Patos-Merín (Costa, 2006). Uno de los clados dentro de *Austrolebias*, el complejo de *A. bellottii* (*sensu* Costa 2006), está compuesto por especies pequeñas y medianas. En la actualidad, este complejo está representado por cinco taxa: *A. bellottii* Steindachner 1881, *A. apaii* Costa, Laurino, Recuero y Salvia 2006, *A. vandenbergi* Huber 1995, *A. melanoorus* Amato 1986, y *A. univentripinnis* Costa y Cheffe 2005. *Austrolebias vandenbergi* se distribuye en las cuencas de los ríos Paraguay y Alto Paraná, *A. melanoorus* en la cuenca alta del río Negro y la parte superior del río Yaguarón, mientras que *A. univentripinnis* se conoce para una única ubicación en el sistema Patos-Merín (Costa, 2006). Mientras que los taxa mencionados

parecen representar especies válidas, *A. bellottii* debido a su alta variabilidad morfológica y errores de identificación de los ejemplares, ha mostrado históricamente controversias taxonómicas (Vaz-Ferreira y Sierra, 1973; Costa, 2006). Esta especie se conocía tradicionalmente para la provincia de Buenos Aires, la parte baja del río Paraná y la cuenca del río Uruguay, pero las poblaciones de esta última zona se han descrito como una nueva especie, *A. apaii* (Costa, 2006). Sin embargo, estudios recientes basados en análisis moleculares y morfológicos, quitan el estatus de especie válida a *A. apaii* incluyéndola nuevamente dentro de *A. bellottii* (García *et al.*, en prensa).

Dentro de su rango de distribución *Austrolebias bellottii* comparte el hábitat con otras especies de peces anuales del mismo género; al menos 5 especies de 3 clados diferentes están representados en la región (Costa, 2006). Si bien no hay estudios respecto a la interacción de las diferentes especies para este caso, es de suponer que procesos como competencia ya sea por espacio y/o recursos, y depredación ocurran entre las mismas. En este sentido cabe destacar la presencia en sintopía en parte del rango de distribución de *A. bellotti*, de una especie de anual de gran tamaño, *A. elongatus*, la cual es depredadora de otros anuales (Obs. Pers). Las presiones ejercidas por los depredadores se encuentran entre los principales factores que estructuran las comunidades (Jeffries & Lawton, 1984; Jackson *et al.*, 2001). Los depredadores no sólo afectan la distribución y abundancia de los taxa, sino además la distribución y abundancia de los fenotipos dentro de las especies (Endler, 1995; Reznick, *et al.* 2001)

Análisis morfológico de la variación de *A. bellottii*

Entre los objetivos más importantes de la biología evolutiva se encuentra el entendimiento de los patrones de diversificación morfológica entre linajes y sus relaciones con los patrones ecológicos e históricos (Lessa & Patton, 1988). La evolución morfológica involucra a la selección natural como el principal proceso actuante (Endler, 1986), el cual favorece a los animales que estén mejor adaptados al ambiente, tanto en estructuras anatómicas

como en comportamiento (McNeill, 1982). Asimismo la variación morfológica puede darse también por procesos de deriva genética, generando así “deriva morfológica” la cual no tiene implicancias adaptativas (Marroig & Cheverud, 2004).

La Morfometría Geométrica surgió en las últimas décadas como una importante herramienta para el estudio de la variación en estructuras anatómicas (Bookstein, 1991). Las variables utilizadas en estos análisis morfológicos son marcas anatómicas (“landmarks”) consideradas homólogas en todos los individuos en estudio (Rohlf *et al.*, 1993; Monteiro & dos Reis, 1999). Esta técnica permite hacer un análisis detallado de la forma lo cual permite su descripción cuantitativa y por lo tanto la interpretación biológica de tal variación (Rohlf, 1990). La cuantificación de la forma se lleva a cabo por medio de modelos matemáticos y estadísticos, transformándose la morfometría en un área en la frontera de la biología, la estadística y la geometría (Monteiro & dos Reis, 1999). De esta manera, Bookstein (1989) creó una definición de *forma* más precisa: “todas las propiedades de una configuración de puntos que no se alteran por efectos de tamaño, posición u orientación” (Monteiro & dos Reis, 1999). Un punto importante en el estudio de la variación morfológica interespecífica es contar con la sensibilidad suficiente para que dicha variación sea detectada, característica en la que se destaca la Morfometría Geométrica (Zelditch, 2004). Es una técnica muy efectiva en la captura de información sobre la forma de los organismos y sus resultados son estadísticamente convincentes al testear las diferencias (Rohlf *et al.*, 1993). Debido a la efectiva capacidad de esta técnica ha sido escogida para llevar a cabo los análisis del presente estudio.

Los caracteres morfológicos, incluyendo merísticos (conteo de series de los elementos) y las proporciones del cuerpo, a menudo varían clinalmente (es decir, a lo largo de un gradiente geográfico) (Barlow, 1961; Chernoff, 1982). Los patrones de variación geográfica en los rasgos fenotípicos entre una amplia gama de peces a menudo sugieren la influencia de factores medio ambientales e influencias de los hábitats locales (Corti & Crosetti, 1996). Estudios recientes de la variación en caracteres moleculares entre las poblaciones de peces han permitido comparar el grado de variación de los rasgos moleculares con la de los caracteres morfológicos y ayudar a evaluar el grado de plasticidad fenotípica mostrado por una especie (Beheregaray & Levy, 2000). Los estudios de variación de caracteres morfológicos, por lo tanto, son vitales para dilucidar los patrones observados en la variación de caracteres fenotípicos y genéticos, entre las poblaciones de peces (Beheregaray & Levy, 2000).

Hipótesis

La escasa vagilidad de los peces anuales, la extensa área de distribución de *A. bellottii* (tres sub-cuencas hidrográficas) con amplios rangos en condiciones locales y su parcial coocurrencia con *Austrolebias elongatus*, (ictiófaga), determinan diferentes contextos ecológicos que afectan el desempeño de *A. bellottii*. Procesos de adaptación local a estas condiciones y la evolución de respuestas plásticas determinan la existencia de variabilidad morfológica en esta especie determinada por fuerzas ecológicas locales.

Objetivo

El presente estudio pretende analizar la variación morfológica de *Austrolebias bellottii*, partiendo de la hipótesis de que la variación morfológica observada es explicada por tres posibles factores: la cuenca hidrográfica en las que la especie está presente, como factor histórico, y como factores ambientales, la variación en un gradiente latitudinal y la coocurrencia de especies de peces anuales predadores.

Materiales y métodos

Se trabajó con especímenes depositados en las colecciones de peces de la Facultad de Ciencias, Montevideo (ZVC-P), Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN), y el Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN), (Anexo 1).

En base a la información contenida en los catálogos de las instituciones a donde pertenecen los ejemplares, se georeferenció cada una de las localidades, utilizando el programa Google Earth, cuando los datos de colecta no eran exactos se tomaron las coordenadas de las zonas que presentaran humedales de características temporales más cercanas a la localidad presente en la información del catálogo (Fig. 1).

Para la obtención de datos de presencia de peces anuales potencialmente predadores para *A. bellottii*, se realizó una búsqueda bibliográfica tomando en cuenta la última revisión del género (Costa, 2006), catálogos de colecciones científicas disponibles y de

revisión de material en préstamo del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN) y Museo de La Plata (MLP).

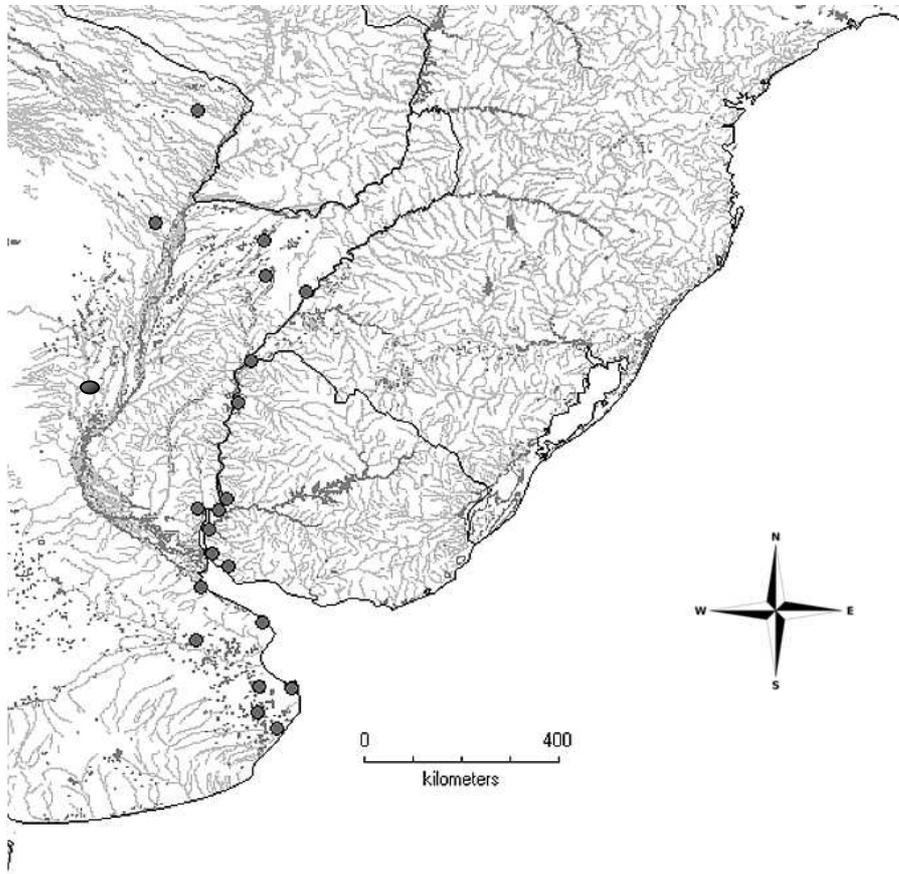


Figura 1. Mapa de la cuenca del Plata, los puntos representan una o varias de las localidades analizadas.

Para el análisis merístico se utilizaron 224 ejemplares de las localidades disponibles, tomando un máximo de 10 ejemplares por lote. Los caracteres merísticos utilizados, fueron los propuestos por Loureiro (2004): número de radios óseos de las aletas dorsal (**Rdors**), anal (**Ranal**), caudal (**Rcaud**), pectorales (**Rpec**) y pélvicas (**Rpelv**);, número de escamas en la serie lateral (**Elat**), serie transversal (**Etrans**) alrededor del pedúnculo (**Eped**) y predorsales (**Epred**) contadas como la serie que va desde la región anterior de la cabeza hasta el origen de la aleta dorsal; número de neuromástos (Fig. 2) en la serie supraorbital (**Nsup**), serie suborbital (**Nsub**), y serie preopercular (**Npreop**). Los conteos de estructuras bilaterales se realizaron siempre del lado izquierdo.

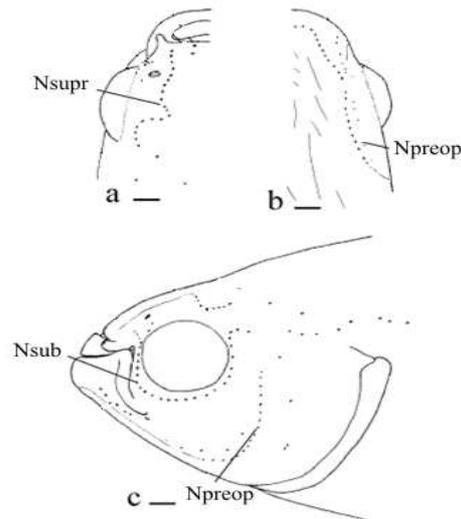


Figura 2. Series de neuromástos analizados en el estudio: A, vista superior, Nsupr; serie supraorbital. B, vista ventral. C, vista lateral de la región cefálica, Nsub; serie suborbital, Npreop; serie preopercular (modificado de Costa, 2006).

Mediante test no paramétrico de Mann-Whitney se evaluó la significancia de la variable Presencia de depredador sobre las variables merísticas. Para la Latitud se realizó una regresión entre esta variable y los conteos merísticos evaluando la significancia mediante test Lambda de Wilks. La significancia de la variable Cuenca fue evaluada mediante el estadístico Kruskal-Wallis para las 3 variables a la vez, y luego se analizaron las cuencas par a par mediante el estadístico Mann-Whitney .

La variación de la forma se analizó a través de análisis de morfometría geométrica utilizando la aproximación de “thin plate splines” (Bookstein, 1991). Para el análisis se utilizaron 384 ejemplares de 23 localidades de Uruguay y Argentina. La posición de los marcos anatómicos fue definida en base a García *et al.* (en prensa), las imágenes de los ejemplares fueron obtenidas mediante un scanner (RealTek Scanner), y posteriormente digitalizadas con el software TPSdig (Rohlf, 2003). Quince marcos anatómicos por espécimen fueron digitalizados en vista lateral (Fig. 3).

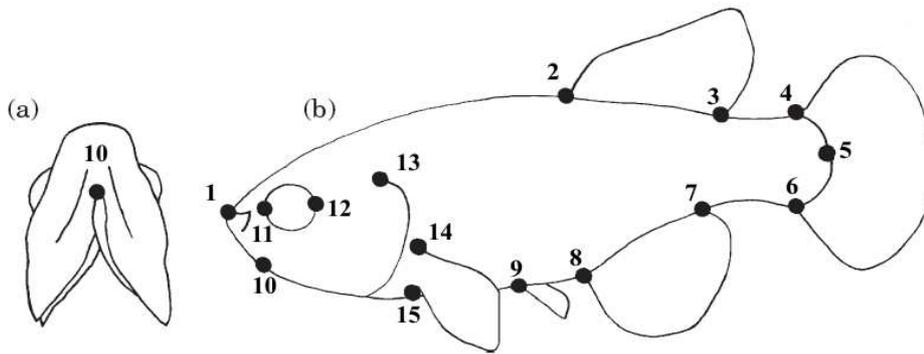


Figura 3. Marcos anatómicos utilizados: (1) punta del hocico, (2) origen de la aleta dorsal, (3) final de la aleta dorsal, (4) origen dorsal de la aleta caudal (5) final del pedúnculo caudal, (6) origen ventral de la aleta caudal, (7) final de la aleta anal, (8) origen de la aleta anal, (9) origen de la aleta pélvica, (10) unión de los ceratohyales con el basihyal, (11) margen anterior del ojo, (12) margen posterior del ojo, (13) inserción de la membrana opercular en la cabeza. (14) inserción dorsal de la aleta pectoral en el cuerpo y (15) inserción ventral de la aleta pectoral en el cuerpo. (Modificado de D'Anatro & Loureiro, 2005)

Las configuraciones obtenidas para los marcos anatómicos de cada individuo fueron superpuestas de modo que las desviaciones entre estos fueron minimizadas usando el método de ajuste "Procrustes". La variación entre individuos se expresa como variación en los parámetros de una función interpolante que compara un individuo dado con la configuración consenso. Esta función luego fue descompuesta en elementos geoméricamente ortogonales llamados deformaciones principales ("principal warps") (Adams & Rosenberg, 1998). Los especímenes superpuestos se proyectaron sobre estas deformaciones para describir sus desviaciones con respecto a la configuración consenso. Dichas proyecciones ("partial warps scores") describen la diferencia en la forma entre individuos en términos de la variación de la deformación de gradillas (Bookstein, 1991).

Para evaluar la incidencia de la cuenca en la variación de la forma se agruparon a los ejemplares de acuerdo a la pertenencia a una cuenca (Paraná, Uruguay o La Plata) y luego se realizó un análisis discriminante utilizando dichas agrupaciones. La significancia a nivel discriminante del conjunto de variables fue expresada mediante el estadístico de Lambda de Wilks. Además, la similitud entre las variables aleatorias multidimensionales, teniendo en cuenta su correlación, se realizó mediante distancias cuadradas de Mahalanobis (Monteiro & dos Reis, 1999). El análisis discriminante es un método de clasificación formado por un conjunto de técnicas multivariantes

explicativas, descriptivas y predictivas que nos permiten estudiar la significancia y naturaleza de las diferencias existentes entre grupos establecidos *a priori*, así como la asignación de individuos a grupos cuyas características hayan sido previamente estudiadas (González *et al.*, 1991).

Respecto a la presencia de peces anuales ictiófagos se siguió el siguiente criterio: grupo 0, ausencia de depredador; grupo 1, presencia de depredador. Se realizó un análisis de componentes principales en base a la matriz de peso (Partial Warps) y se extrajeron los componentes principales 1 y 2. Este análisis simplifica la matriz de peso reemplazando las variables originales por los componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales e independientes unas de otras. Estas nuevas variables están ordenadas de mayor a menor respecto a cuanto variación explican de los datos originales (Manly, 2005).

Para evaluar la incidencia de la latitud se probó si existía una relación lineal entre esta y los factores 1 y 2 del análisis de componentes principales de la matriz de peso. Para realizar los análisis de Morfometría Geométrica antes descritos, se utilizaron los programas tpsRegr y tpsRelw (Rohlf, F., <http://life.bio.sunysb.edu/morph>).

Dado el evidente dimorfismo sexual en la especie, machos y hembras fueron analizados separadamente en todos los análisis realizados.

Resultados

Análisis merístico y presencia de depredador

Mediante el análisis con el estadístico Mann-Whitney se observaron diferencias significativas entre los grupos de machos clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de *A. elongatus*, en los conteos merísticos de escamas laterales, escamas transversales, escamas predorsales y las series de neuromástos supraoculares y preoperculares (Fig. 4). Las demás variables merísticas no mostraron diferencias con

significancia estadística. Para los conteos merísticos de las hembras, las diferencias significativas de los grupos con presencia y ausencia de *A. elongatus* se observaron en los radios de las aletas dorsales, anales y pectorales, en la serie de escamas transversales y neuromástos supraoculares y preoperculares (Fig. 5).

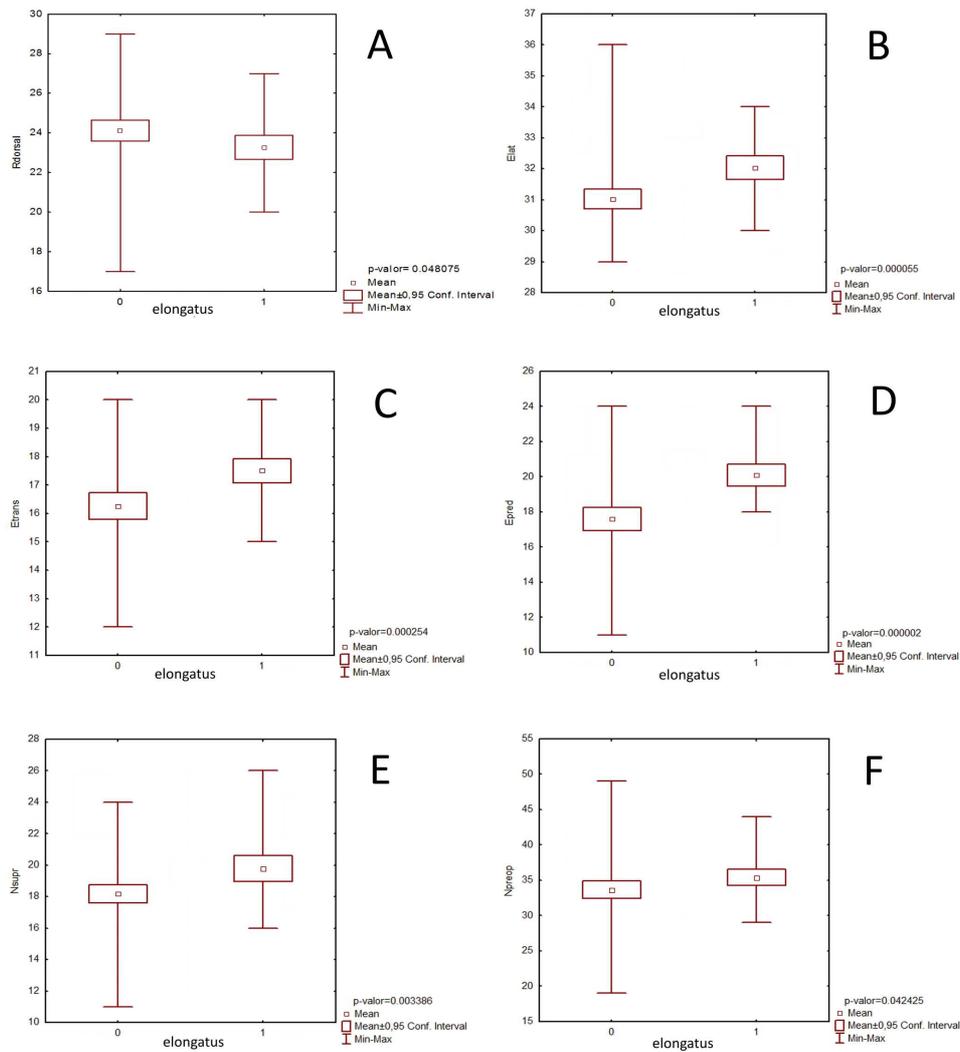


Figura 4. Box-plots para las variables merísticas analizadas con significancia estadística ($p < 0,05$) en función de la presencia o ausencia de *A. elongatus* para machos. A: radios dorsales, B: escamas laterales, C: escamas transversales, D: escamas predorsales, E: neuromástos supraorbitales, F: neuromástos preoperculares.

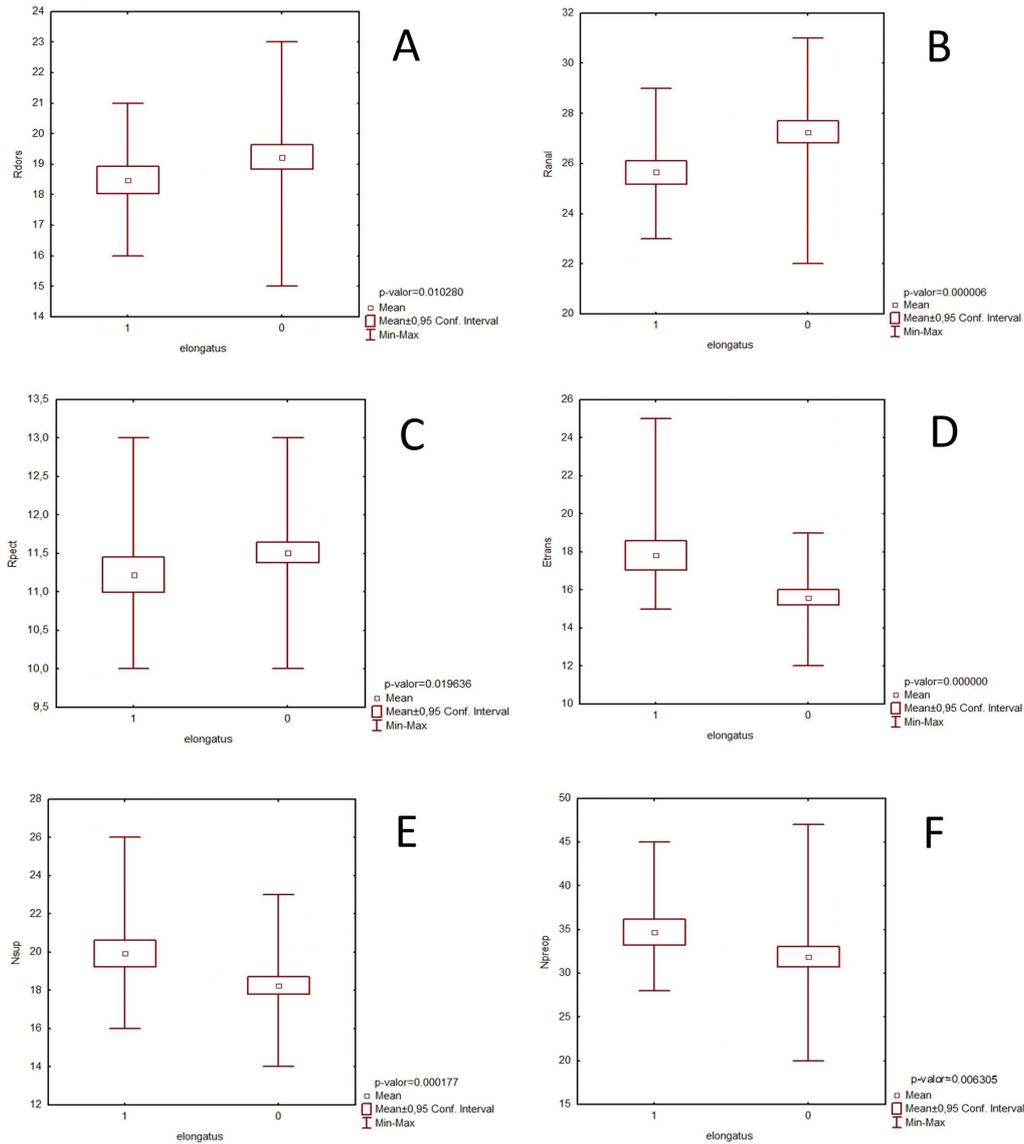


Figura 5. Box-plots para las variables merísticas analizadas con significancia estadística ($p < 0,05$) en función de la presencia o ausencia de *A. elongatus* para hembras. A: radios dorsales, B: radios anales, C: radios pectorales, D: escamas transversales, E: neuromástos supraorbital, F: neuromástos preoperculares.

Análisis merístico y Cuencas

Respecto a la variable Cuenca, el estadístico Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre los grupos en los conteos de radios de la aleta dorsal, anal, caudal y pélvica, de neuromastos y en las series preopercular y suborbital en hembras (Fig. 6). En machos, las diferencias fueron encontradas entre los radios de las aletas dorsal,

anal, caudal y pélvica. Asimismo se encontró significancia estadística en las series de escamas transversales, del pedúnculo y predorsales, y en los conteos de neuromastos de la serie suborbital (Fig. 7). El análisis con el estadístico de Mann- Withney para la evaluación de las cuencas de a pares mostró significancia estadística en las variables analizadas, observándose un mayor numero de diferencias en los conteos merísticos entre los ejemplares de las cuencas Paraná y Uruguay y menores numeros de diferencias entre las cuencas La Plata y Paraná (Tabla 1).

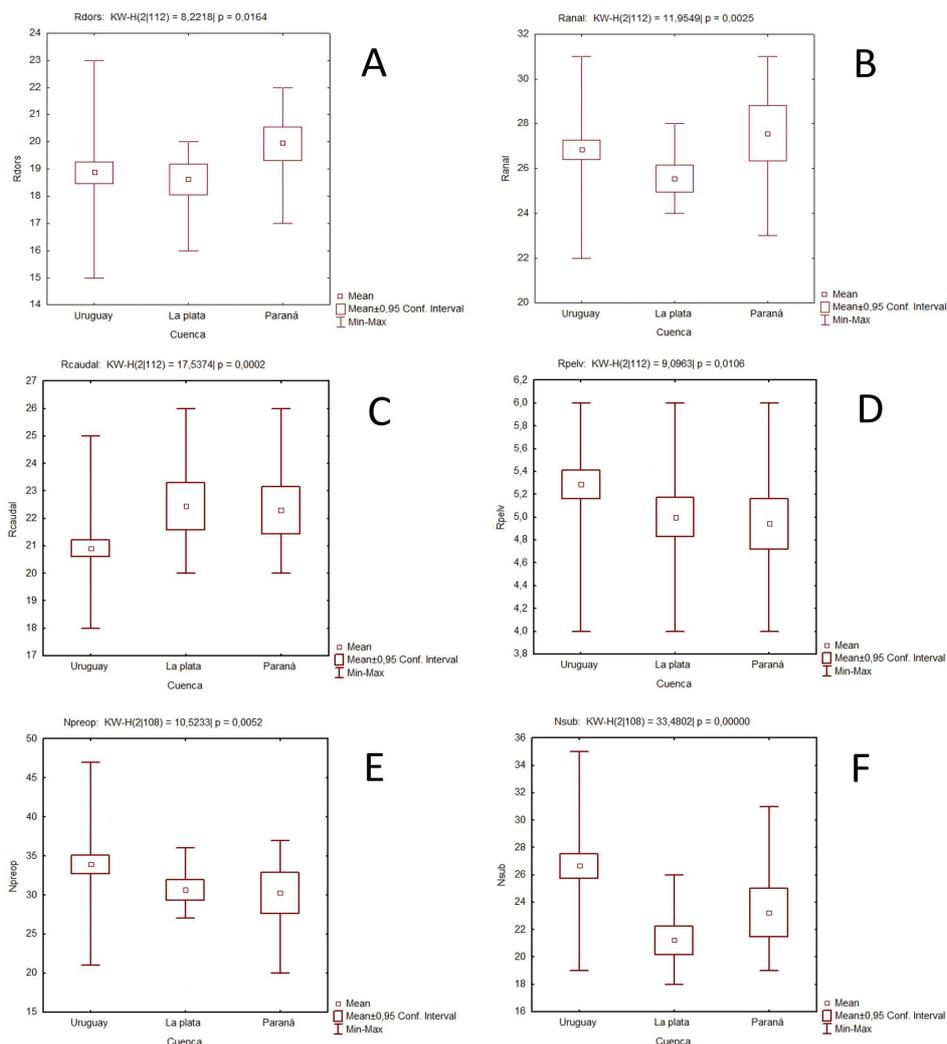


Figura 6. Box-plots para las variables merísticas por cuenca en hembras con significancia estadística ($p < 0,05$). A: radios dorsales, B: radios anales, C: radios caudales, D: radios pélvicos, E: neuromástos preoperculares, F: neuromástos suborbitales.

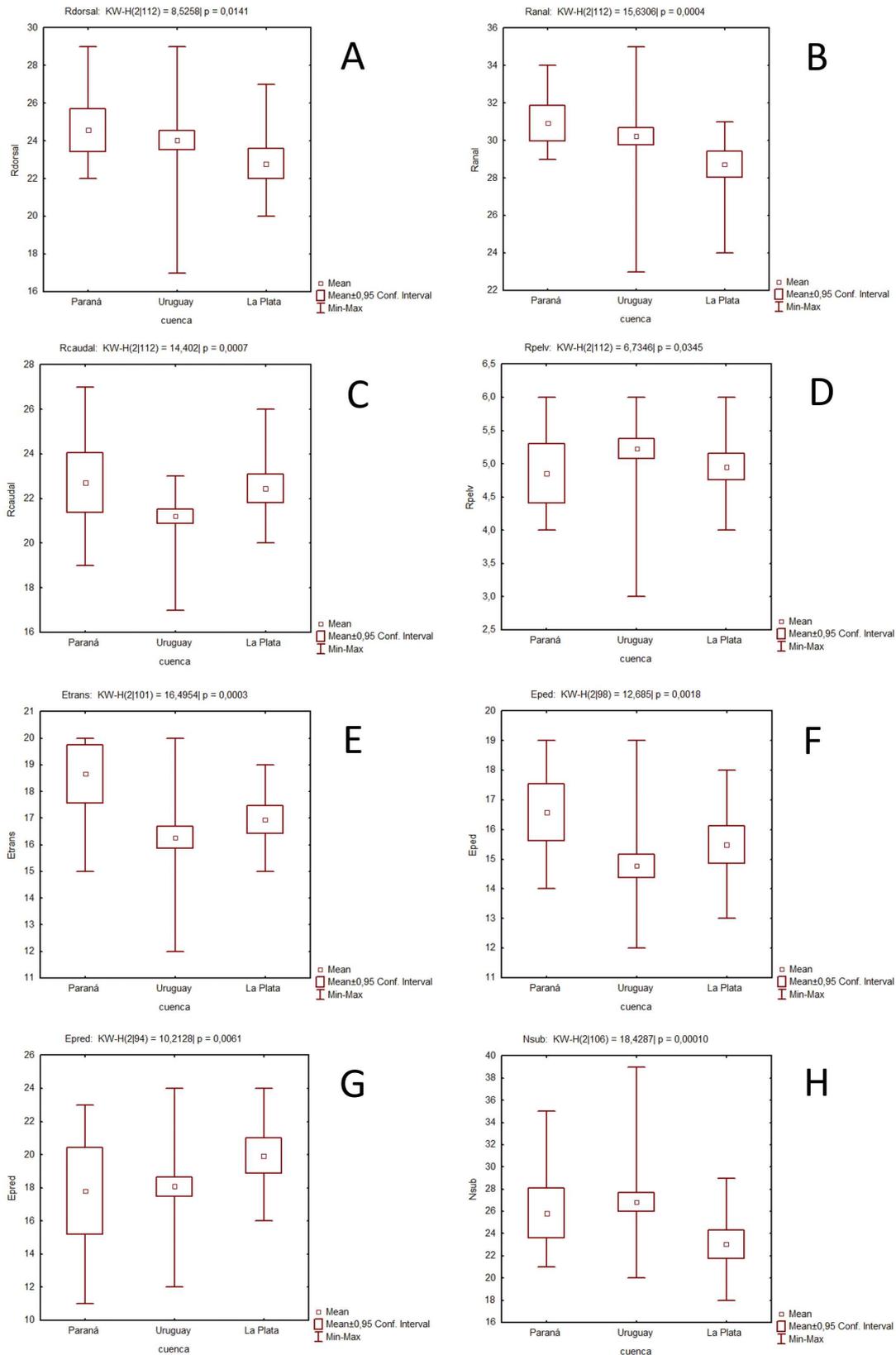


Figura 7. Box-plots para las variables merísticas por cuenca en machos con significancia estadística ($p < 0,05$). A: radios dorsales, B: radios anales, C: radios caudales, D: radios pélvicos, E: escamas transversales, F: escamas pedúnculo, G: escamas predorsales H: neuromástos suborbitales.

Tabla 1: valores del estadístico Mann-Withney para las variables merísticas por cuencas. En negrita se muestran los valores con significancia estadística (p-valor<0,05)

		La Plata - Z ajustado	Uruguay p-level	La Plata - Z ajustado	Paraná p-level	Uruguay - Z ajustado	Paraná p-level
Hembras	Rdors	0.4752	0.6346	3.1686	0.0015	2.4541	0.0141
	Ranal	2.9477	0.0032	2.8380	0.0045	1.6020	0.1091
	Rcaudal	-3.4127	0.0006	-0.2349	0.8143	3.0419	0.0023
	Rpelv	2.1452	0.0319	-0.4614	0.6445	-2.3610	0.0182
	Npreop	2.8073	0.0050	0.3314	0.7404	-2.1447	0.0319
	Nsub	5.2724	0.0000	1.7812	0.0749	-3.2841	0.0010
	Rdorsal	-2.6006	0.0093	-2.5930	0.0095	0.6183	0.5363
	Ranal	-3.4193	0.0006	-3.5434	0.0003	1.2373	0.2159
Machos	Rcaudal	3.2663	0.0010	-0.3855	0.6998	2.5579	0.0105
	Rpelv	-2.1263	0.0334	0.5950	0.5518	-1.8515	0.0640
	Etrans	1.7461	0.0807	-2.9287	0.0034	3.7456	0.0001
	Eped	1.8964	0.0578	-1.9083	0.0563	3.2390	0.0011
	Epred	3.2587	0.0011	1.6480	0.0993	-0.0153	0.9877
	Nsub	-4.2232	0.00002	-2.2052	0.0274	-1.2322	0.2178

Análisis merístico y Latitud

La regresión lineal realizada entre las variables merísticas y la latitud, en hembras, mostró correlaciones significativamente diferente de 0 en los conteos de radios dorsales, caudales, pectorales y de las aletas pélvicas, así como también en las series de escamas del pedúnculo caudal, serie predorsal y en el número de neuromástos supraoculares. Para el grupo de los machos la significancia del estadístico se observó en los conteos de radios dorsales y de la aleta anal, en la serie de escamas transversales y en los neuromástos preoperculares y suborbitales (Tabla 2). Es necesario destacar que si bien los conteos merísticos mencionados mostraron significancia estadística, estos presentan valores de R^2 bajos, siendo en ningún caso mayores a 0.15.

Tabla 2. Valores de la regresión lineal entre variables merísticas y latitud. En negrita se muestran los valores con significancia estadística (p-valor<0,05)

	<u>Hembras</u>		<u>Machos</u>	
	R² ajustado	p-valor	R² ajustado	p-valor
Rdors	0,1548	0,0001	0,1446	0,0001
Ranal	-0,0079	0,5609	0,1088	0,0008
Rcaudal	0,0802	0,0049	-0,0043	0,4345
Rpect	0,0446	0,0291	0,00005	0,3189
Rpelv	0,0456	0,0277	-0,0009	0,3418
Elat	0,0061	0,2217	-0,0075	0,5631
Etrans	-0,0066	0,5054	0,0719	0,0061
Eped	0,0564	0,0161	0,0187	0,1041
Epred	0,0814	0,0046	0,0061	0,2161
Nsup	0,0347	0,0480	-0,0056	0,4829
Npreop	-0,0055	0,4649	0,0548	0,0149
Nsub	-0,0119	0,9469	0,0431	0,0276

Morfometría geométrica y Cuencas

Los análisis de funciones discriminantes muestran separaciones definidas entre individuos de las distintas cuencas, en ambos sexos. En machos, a lo largo de los valores positivos de la raíz 1 se ubican los individuos pertenecientes a La Plata (Fig. 8). Estos presentan desplazamientos respecto al consenso en los *landmarks* pertenecientes al final de la aleta dorsal y anal; estos desvíos se caracterizan por un corrimiento hacia posiciones posteriores. Asimismo, se observan cambios en la posición del inicio de la aleta pélvica y anal, dichos marcos anatómicos se desvían en dirección postero-inferior respecto al consenso, también se observa un acercamiento en los marcos anatómicos pertenecientes al ojo; los peces dentro de este grupo tienden a presentar cuerpos más altos, un pedúnculo caudal más corto y robusto, y ojos más pequeños. Desviaciones opuestas ocurren en los valores negativos de dicha raíz. Sobre los valores negativos de la raíz 2 se encuentran los individuos de la cuenca Uruguay, cuyas desviaciones en relación al consenso ocurren en los *landmarks* ocurren principalmente en la región caudal; se observa un acercamiento entre el final de las aletas dorsal y el inicio dorsal de la aleta caudal, y del final de la aleta anal y el inicio

ventral de la aleta caudal. Esto genera un pedúnculo caudal más robusto. Los demás marcos anatómicos no presentan desvíos aparentes respecto al consenso. Sobre los valores positivos de la raíz 2 se ubican los ejemplares pertenecientes a la cuenca Paraná, que presentan desvíos opuestos a los anteriores, presentando, por lo tanto pedúnculos caudales más estilizados.

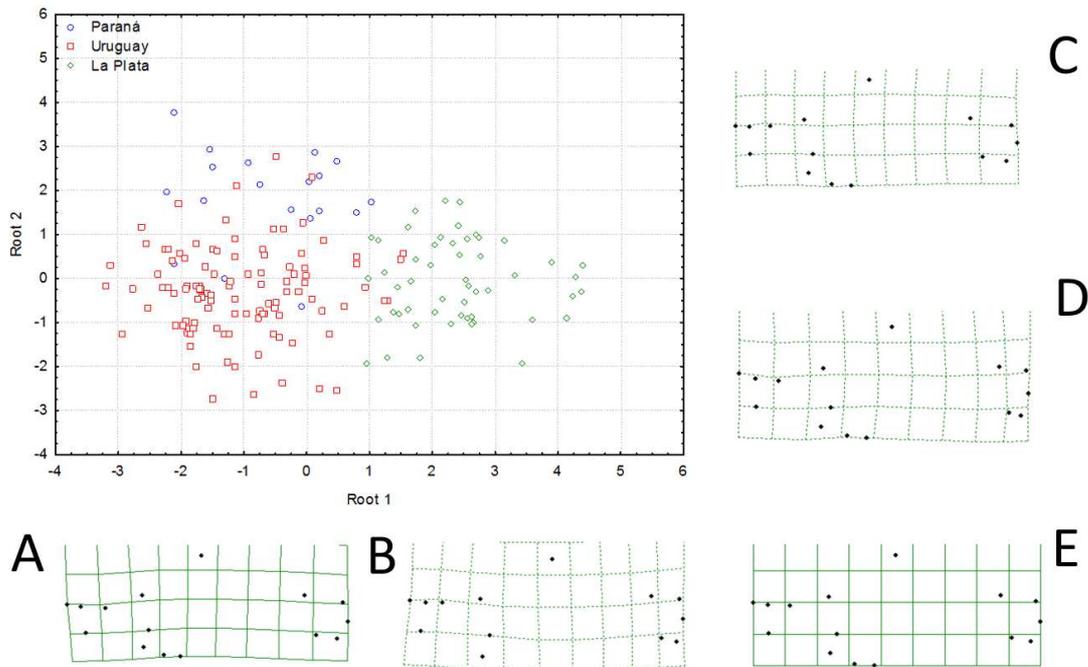


Figura 8. Raíz 1 vs. Raíz 2 de función lineal discriminante realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos hembras de las distintas cuencas. Gradillas A. y B. representan las deformaciones negativas y positivas, respectivamente, de Raíz 1. Gradillas C. y D. representan las deformaciones positivas y negativas, respectivamente, de Raíz 2. Gradilla E forma consenso. Valor estadístico de Lambda de Wilks de 0.2054415 (p-valor < 0,0000).

La matriz de clasificación muestra un total de individuos correctamente clasificados de aproximadamente un 92%. Respecto a las distancias de Mahalanobis obtenidas, la mayor similitud entre los grupos se observa entre los ejemplares de La Plata y Paraná, y la menor similitud se encuentra entre los grupos de Paraná y Uruguay (Tabla 2).

Los cambios asociados a la forma en las diferentes cuencas para las hembras se observan en la Figura 9. Sobre la raíz 1 los cambios destacables en la posición de los marcos anatómicos ocurren en los márgenes del ojo, para valores positivos. Dichos puntos tienden a acercarse, tanto el inicio de la aleta anal como el de las pélvicas

sufren un desvío en sentido postero-inferior. En esta zona se encuentran los individuos de la cuenca de La Plata. Deformaciones en sentido opuesto ocurren hacia valores negativos. Sobre la raíz 2, las deformaciones en los valores positivos, ocurren principalmente en la aleta dorsal, donde, ambos puntos sufren un desplazamiento hacia posiciones posteriores y los marcos anatómicos correspondientes a la aleta caudal se desplazan hacia adelante, generando así un acortamiento del pedúnculo caudal en su totalidad. Los especímenes de Paraná se posicionan en esta zona del grafico. Hacia valores negativos se observan cambios en sentido opuesto.

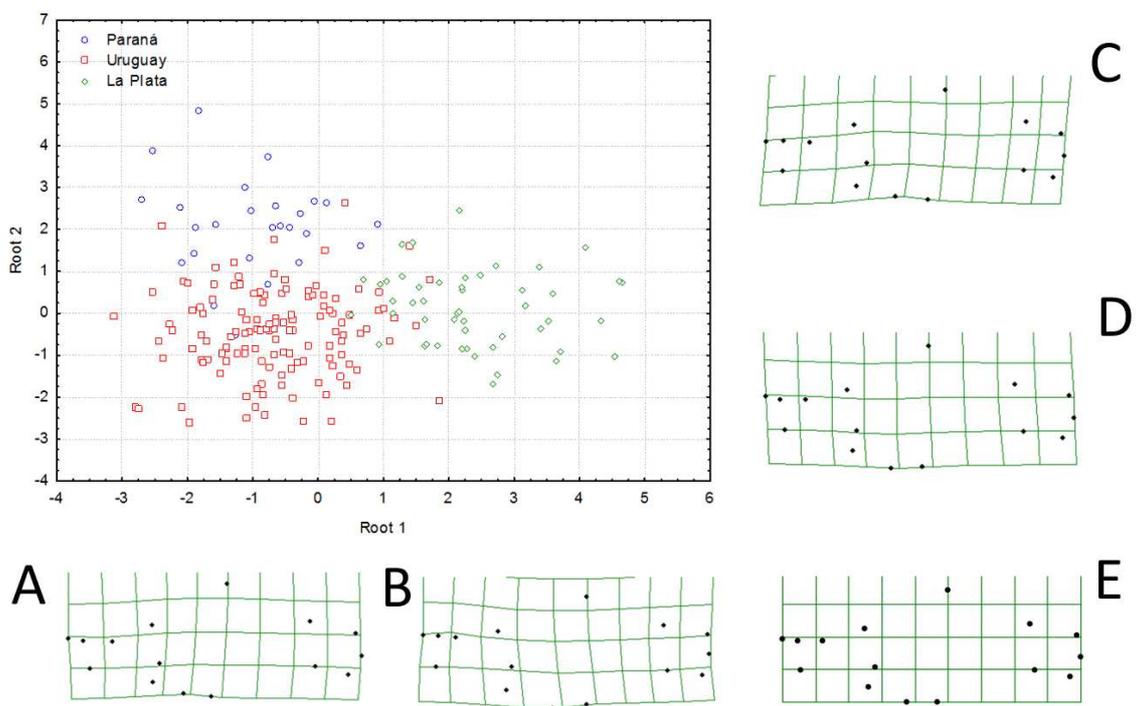


Fig.9. Raíz 1 vs. Raíz 2 de función lineal discriminante realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos hembras de las distintas cuencas. Gradillas A. y B. representan las deformaciones negativas y positivas, respectivamente, de Raíz 1. Gradillas C. y D. representan las deformaciones positivas y negativas, respectivamente, de Raíz 2. Gradilla E forma consenso. Valor estadístico de Lambda de Wilks de 0.2121151 (p-valor < 0,00000).

De acuerdo a la matriz de clasificación, el 90% de los ejemplares fueron asignados correctamente, asimismo las distancias cuadradas de Mahalanobis muestran un patrón similar al de los machos, en donde la mayor similitud se ve entre los grupos de Uruguay y Paraná, y la menor similitud entre los grupos de La Plata y Paraná (Tabla 3).

Tabla3. Matriz de clasificación y distancias de Mahalanobis al cuadrado. En negrita se denotan las diferencias significativas entre especies a $p < 0,05$.

	% correctamente asignados		Distancias de Mahalanobis			Machos
	Machos	Hembras	Paraná	Uruguay	La Plata	
Paraná	78,9474	73,0769	X	4,7984	12,7468	
Uruguay	92,5234	93,9849	6,7016	X	11,8696	
La Plata	98,0769	91,8367	15,2858	9,61791	X	
Total	92,6966	90,8654	Hembras			

Morfometría geométrica y coocurrencia de depredador

Los factores obtenidos del análisis de componentes principales en machos, fueron evaluados mediante un test de T, del cual se observó que solamente el factor 1 presentaba significancia estadística respecto a la variable Ausencia/Presencia de *A. elongatus* (**p-valor=0,009093**, **T=2,637745**, **FD=176**). La visualización de las deformaciones de los marcos anatómicos sobre el factor 1 se observan, hacia valores negativos (con presencia de *A. elongatus*), en los landmarks correspondientes al inicio de la aleta dorsal una desviación en dirección posterior. Tanto los marcos anatómicos de la aleta pectoral, como el inicio y final de la anal tienden a ubicarse en una posición postero-inferior respecto al consenso. Estas características generan un cuerpo con una altura mayor y de forma opuesta a lo largo de los valores positivos (Fig. 10).

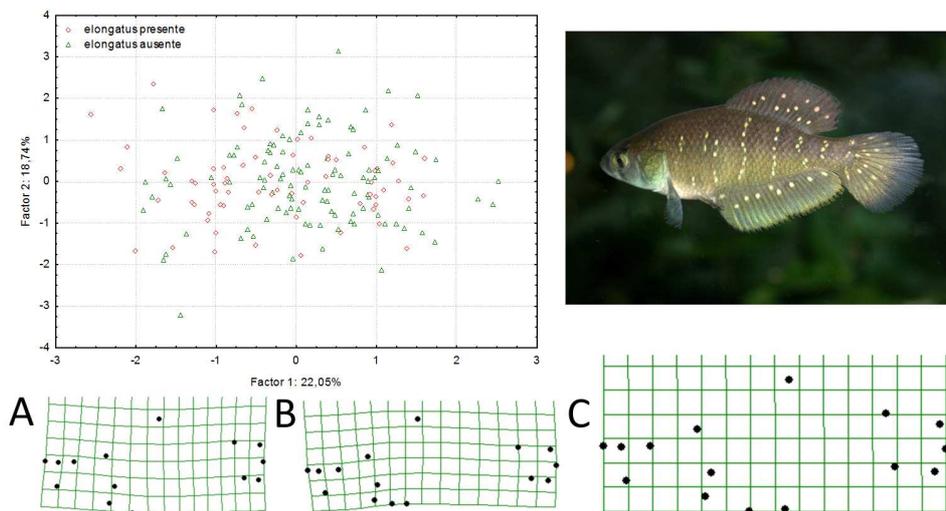


Figura 10. Factor 1 vs factor 2 del análisis de componentes principales realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos machos de los grupos con presencia y ausencia de *A. elongatus*. Gradillas A. y B. representan las deformaciones negativas y positivas, respectivamente, de Raíz 1, C. consenso.

Para las hembras, el test de T muestra significancia estadística solamente en el factor 1 (**p-valor= 0,000028**, **T= 4,286726**, **DF=206**) hacia valores negativos de dicho eje, se observa un patrón similar al descrito para los machos en los landmarks de las aletas pélvicas, dorsal y anal, con corrimientos hacia posiciones posteriores al consenso. Además de estas desviaciones el tamaño del ojo se ve reducido en los individuos que se encuentran sobre valores negativos del factor 1. Los valores positivos de este eje representan desvíos exactamente opuestos a los anteriores. (Fig. 11).

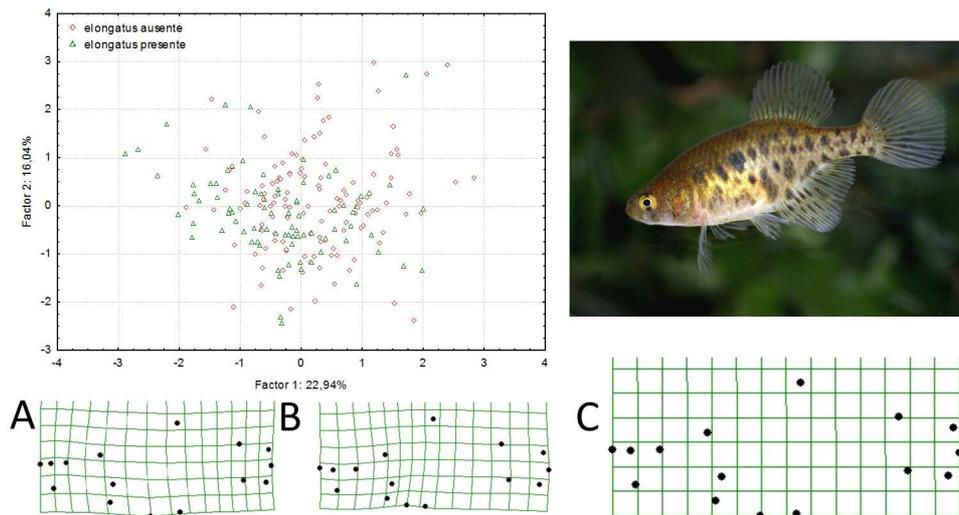


Figura 11: factor 1 vs factor 2 del análisis de componentes principales realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos hembras de los grupos con presencia y ausencia de *A. elongatus*. Gradillas A. y B. representan las deformaciones negativas y positivas, respectivamente, de Raíz 1, C. consenso.

Morfometría geométrica y latitud

En machos, la regresión de los factores 1 y 2 con la variable latitud muestra significancia estadística (p-valor=0,000036 y 0,020936, R^2 ajustado= 0,087591 y 0,024413 respectivamente), la latitud explica aproximadamente el 9% y el 2% respectivamente de la variabilidad observada. Para las hembras, sólo el factor 1 presentó significancia estadística (p-valor<0,01, R^2 ajustado= 0,164817) y explica aproximadamente el 16% de la variabilidad.

Discusión

Factor histórico: cuencas hidrográficas

La descripción geométrica de la forma mediante deformaciones parciales y análisis de variables canónicas, y el análisis de las variables merísticas, ha demostrado que los grupos muestran variabilidad morfológica entre las cuencas analizadas permitiendo identificar los cambios de forma en cada una de ellas. Asimismo, las variaciones observadas varían entre machos y hembras, lo que sugiere que diferentes mecanismos pueden estar generando estos patrones.

En sus últimos 600 km, el Paraná se presenta como un río de planicie con depósitos aluviales y extensas llanuras de inundación (Kawakami de Resende, 2003), es la Ecorregión ictiofaunística (López *et al.*, 2002), que presenta la mayor diversidad de peces de la cuenca del Paraná-La Plata (López *et al.*, 2005). La parte baja del Río Uruguay, también se considera una ecorregión ictiofaunística (López *et al.*, 2002), y presenta similares características que la anterior. Los dos ríos (Paraná y Uruguay) descargan en el Río de La Plata que desemboca en el Océano Atlántico. Existe la hipótesis de que estos ríos se han conectado entre sí en diferentes lugares y tiempos geológicos (Bonetto, 1994). Por otra parte, extensas transgresiones marinas se han producido en esta zona durante el Mioceno (11,8 a 10,0 millones de años), generando lo que se llama el Mar Paranaense (Lundberg *et al.*, 1998). Estos escenarios geológicos, hidrológicos y geomorfológicos han generado un área geográfica muy dinámica y fluctuante.

En este contexto, procesos como diferenciación alopátrida, por ejemplo mediante efecto fundador, pueden haber tenido un rol significativo en la evolución de las poblaciones. El hábitat fragmentado y la escasa vagilidad pueden favorecer este tipo de fenómenos.

La importancia de la selección sexual en peces del género *Austrolebias*, potencialmente podría ser muy importante en este caso, siendo considerada como

uno de los principales factores evolutivos implicados en la generación de variabilidad en estos organismos (García & Loureiro, 2008). Diferencias en la elección de pareja por parte de las hembras de las distintas cuencas pueden generar variaciones tanto en la forma como en los caracteres merísticos.

Tampoco podemos descartar la posible interacción con las demás especies de peces anuales que habitan los sistemas temporales, enmarcado en la teoría de la competencia (MacArthur & Levins, 1964), como factor generador de la variabilidad observada. En este sentido, podría existir un proceso de desplazamiento de caracteres debido a las interacciones ecológicas que ocurren con las especies con las que comparte hábitat y recursos. Si bien *A. bellottii* está presente en los tramos bajos y medios de los Ríos Uruguay y Paraná, así como en el Río de la Plata, las demás especies que coocurren con *A. bellottii* presentan rangos de distribución más acotados y muchas de ellas están restringidas a una sola de las 3 cuencas (Costa, 2006), lo que genera distintos ensambles de especies en cada uno de los sistemas hídricos estudiados.

Estudios filogenéticos en *A. bellottii* (García *et al.*, en prensa) sugieren una compleja historia biogeográfica para la especie. Eventos vicariantes ocurridos durante el plioceno parecen haber separado las poblaciones del margen oriental del Río Uruguay de las restantes, y similares procesos ocurridos durante el pleistoceno dividieron las poblaciones pertenecientes al Paraná de las de la Provincia de Buenos Aires (Río de la Plata) y las del Río Uruguay.

Las menores diferencias observadas en distancias de Mahalanobis (tabla 2) entre las poblaciones de Paraná y Uruguay, pueden atribuirse a flujo genético entre dichas agrupaciones mediante el corredor de humedales que comunica ambas cuencas en las provincias de Entre Ríos (Gualeguaychú) al sur y Corrientes (Esteros de Iberá) al norte. Tanto evidencias genéticas para esta especie (García *et al.*, en prensa), como reportes relacionados a la distribución de otros taxa no-anuales (Zarucki *et al.*, 2010) respaldan la hipótesis de conexión entre ambos ríos.

Factor ecológico: Variable Depredador

La depredación es una de las mayores causas de selección natural de patrones de coloración, tamaño corporal y forma (Endler, 1995). La presencia de *A. elongatus*, especie ictiófaga (Obs. Pers) con potencial efecto depredador sobre las poblaciones de *A. bellottii* podría ejercer presiones selectivas tanto a nivel morfológico como merístico, (siempre teniendo en cuenta que variables no evaluadas pueden estar influenciando las variaciones observadas). Las poblaciones que se encuentran dentro del rango de distribución de *A. elongatus* muestran tendencias a cuerpos más altos y pedúnculos caudales robustos (vs. cuerpos estilizados en ausencia de *A. elongatus*), ambas características pueden responder a estrategias antipredadoras; cuerpos altos pueden ayudar a los peces a escapar del rango de tamaños de presa que un depredador posee. En este sentido, la relación entre un pedúnculo caudal robusto y la presencia de depredadores puede significar una tendencia a aumentar la velocidad de escape, la cual podría ser clave en la supervivencia en un sistema donde la depredación es significativa. Si bien es evidente que un pedúnculo caudal robusto está relacionado con una mayor cantidad de músculo encargado de los movimientos de la aleta caudal, experimentos biomecánicos son necesarios para respaldar esta última hipótesis.

En el género *Austrolebias*, el sistema de la línea lateral es altamente elaborado, sobretodo en la región cefálica (Costa, 2006). Dicho sistema, está formado por cúmulos de células ciliadas que producen potenciales nerviosos cuando son excitadas por movimientos en el agua (Dijkgraaf, 1963) estos receptores, denominados neuromástos cumplen un rol fundamental en la supervivencia de los peces, las señales detectadas por este sistema influyen comportamientos tales como reproducción (Satou *et al.*, 1994) detección de obstáculos, presas, predadores, formación de cardúmenes y rheotaxis (Coombs & Van Netten, 2006). En presencia de *A. elongatus* se observa un aumento en el número de neuromástos en dos de las tres series estudiadas, si bien esta diferencia puede ser causada por variables no evaluadas en el

presente estudio, teniendo en cuenta la función del sistema mecanoreceptor de la línea lateral, es esperable que un mayor número de receptores pueda ser un factor clave en la detección temprana y efectiva de un depredador en los sistemas temporales.

Factor Biogeográfico: variable latitud

Si bien en otros trabajos se destaca la relación entre las variables merísticas y morfométricas con la latitud (Barlow, 1961; Chernoff, 1982; O'Reilly, 2004), los resultados del presente estudio no encuentran una relación clara entre estas variables. Esto puede deberse a un gradiente latitudinal demasiado pequeño en el cual no se evidencian patrones claros. Ya que la mayoría de las reglas biogeográficas relacionadas con la latitud, involucran a factores ambientales como los responsables de los patrones observados (Bell, 2009), la biología tan particular de los peces anuales (huevos enterrados en el sedimento protegidos del fotoperiodo y fluctuaciones de temperatura, etc.) puede desvanecer los patrones que fácilmente se observarían en otros grupos de peces con ciclos de vida diferentes.

Conclusiones y perspectivas

Dos de las tres variables estudiadas resultaron estar relacionadas con la variación en la forma de la especie. Los análisis de carácter exploratorio que fueron realizados arrojaron resultados interesantes en torno a las posibles potenciales adaptaciones frente a las presiones ejercidas por los predadores y respecto a las identidades propias de las agrupaciones por cuenca.

Es necesario resaltar la evidente correlación entre las variables estudiadas; solamente en las cuencas Uruguay y La Plata se encuentra *A. elongatus*. Al mismo tiempo, la presencia de depredador se da solamente en ciertas latitudes, por lo que no es posible identificar aisladamente el efecto entre estas variables con los análisis realizados en este trabajo.

Futuros estudios de laboratorio resultan necesarios para evaluar la incidencia e interacción de cada una de las variables en juego, para esto, los peces anuales parecen ser modelos animales excelentes dados sus bajos requerimientos de espacio y mantenimiento.

La correcta delimitación de las diferentes poblaciones o unidades evolutivas es imprescindible para aumentar los esfuerzos de conservación de estos peces y sus ambientes, los cuales se encuentran en aéreas con fuertes presiones antrópicas. La aproximación morfológica puede utilizarse como “proxy” de la variación genética subyacente (Heywood, 1995) y además tiene varios puntos a su favor. Por un lado, la morfología sigue siendo la base de las diagnósis específicas y por otro su aplicación requiere bajos costos con resultados relativamente rápidos.

Bibliografía

Adams, D. C. & B. Rosenberg. (1998). Partial Warps, Phylogeny, and Ontogeny: A Comment on Fink and Zelditch (1995). *Systematic Biology* 47 (1):168-173.

Agostinho A. A., S.M Thomaz, & L. C. Gomes. (2005). Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation Biology* 19, (3): 646–652.

Arezo, M. J., L. Pereiro & N. Berois (2005). Early development in the annual fish *Cynolebias varius*. *Journal of Fish Biology*, 66:1357–1370.

Arim, M., S. R. Abades, G. Laufer, M. Loureiro & P. A. Marquet. (2010). Food web structure and body size: trophic position and resource acquisition. *Oikos*, 119(1): 147-153.

Bailey, R. M. & G. R. Smith. (1981). Origin and geography of the fish fauna of the Laurentian Great Lakes drainage. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1539–1561.

Barlow, G. W. (1961). Causes and significance of morphological variation in fishes. *Systematic Zoology* 10, 105–117.

Beheregaray, L. B. & Levy, J. A. (2000). Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. *Copeia* 2000, 441–447.

Bell M. A. (2009) Microevolution. En *The Princeton Guide to Ecology* by Simon A. Levin (Ed.). Princeton University Press Published by Princeton University Press, 41 William Street, Princeton, New Jersey 08540

Belote, D. F. & W. J. E. M. Costa, (2002). Reproductive behavior patterns in the neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. *Boletim do Museu Nacional, Nova Série Rio de Janeiro-Brasil* 489:1-10.

Boneto, A. A. (1994) Austral rivers of South America. *Limnology now: a paradigm of planetary problems* (ed. by R. Margalef), pp. 425-472. Elsevier Science B.V.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pp. 435.

Bookstein, F. L. (1989). Size and shape: a comment on semantics. *Systematic Zoology* 38: 173-180.

Cardozo, V. (1999). Tasa Metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). Tesis de Maestría. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.

Carvalho, G. R. & L. Hauser. 1999. Molecular markers and the species concept: New techniques to resolve old disputes? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:379-382.

Chernoff, B. (1982). Character variation among populations and the analysis of biogeography. *American Zoologist* 22, 425-439.

Coombs, S. & S. M. Van Netten (2006) The hydrodynamics and structural mechanics of the lateral line system. In *Fish biomechanics* (eds R. Shadwick & G. Lauder), pp. 103-139. New York, Elsevier.

Corti, M. & D. Crosetti (1996). Geographic variation in the grey mullet: a geometric morphometric analysis using partial warp scores. *Journal of Fish Biology* 48, 255-269.

Costa, W. E. J. M., (1990). Análise filogenética da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei). *Rev. Brasil. Biol.* 50(1):65-82.

Costa, W. J. E. M. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213: 1-162.

D'Anatro A. & M. Loureiro (2005) Geographic variation in *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae) *Journal of Fish Biology* 67, 849-865 doi:10.1111

Dijkgraaf, S. (1963). The functioning and significance of the lateral-line organs. *Biol. Rev.* 38, 51-105. (doi:10.1111/j.1469-185X.1963.tb00654.x)

Endler, J. A. (1986). *Natural Selection in the wild*. Princeton: Princeton University Press.

Endler, J. A. (1995) Multiple-trait coevolution and environmental gradients in guppies. In: *Trends in Ecology & Evolution*, 10, Nr. 1, S. 22 - 29

- Errea, A. & E. Danulat, (2001). Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes*. 61:261- 268.
- García, G., Gutiérrez, V., Vergara, J., Calviño, P., Duarte, A & Loureiro, M. (2012). Patterns of population differentiation in annual killifishes from the Parana-Uruguay-La Plata basin: the role of vicariance and dispersal. Aceptado para publicación en *Journal of Biogeography*.
- García, G., Loureiro M., Berois N., Arezo M. J., Casanova, G. Clivio G.& Olivera, A. (2009) Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 620-635.
- García D., M. Loureiro & B. Tassino (2008) Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) *Neotropical Ichthyology*, 6(2):243-248, 2008
- Gillespie, J. H., (2001). Is the population size of a species relevant to its evolution? *Evolution* 55(11): 2161-2169.
- González López-Valcárcel, B., (1991). Análisis multivariante. Aplicaciones en el ámbito sanitario. Editorial SG. Barcelona. 247 páginas.
- Heywood, V.H. (ed) (1995) The Global Biodiversity Assessment. United Nations Environment Programme. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jeffries, M. J., and J. H. Lawton. 1984. Enemy free space and the structure of ecological communities. *Biological Journal of the Linnean Society* 23: 269–286.
- Jackson, D. A., P. R. Peres-Neto, and J. D. Olden. 2001. What controls who is where in freshwater fish communities—the roles of biotic, abiotic, and spatial factors. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58:157–170.
- Kawakami de Resende, E. (2003) Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the Upper Paraná Basin. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status (ed. by J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross and A. Baer). The World Bank – IDRC – World Fisheries Trust, Victoria, BC
- Lessa, E.P. & Patton, J.L. (1988). Structural constraints, recurrent shapes, and allometry in pocket gophers (genus *Thomomys*). *Biological Journal of The Linnean Society of London*. 36:349-363.
- López, H. L., Miquelarena, A.M. & Ponte Gómez, J. (2002) Biodiversidad y distribución del Ictiofauna Mesopotámica. Tema de la Biodiversidad del Litoral fluvial Argentino II. INSUGEO, Miscelánea, 14, 311-354.
- López, H. L., Morgan, C. C. & Montenegro, M. J. (2005) Ichthyological ecoregions of Argentina. Probiota, Serie Documentos 1. La Plata.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, (1996). External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 1996 (4): 1016-1022.

- Loureiro, M. & R. O. de Sá, (1998). Osteological analysis of the killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Morph.* 238:245-262.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, (2000). Ornamentación del corion en los huevos de especies de *Austrolebias* y *Simpsonichthys* (Rivulidae: Cynolebiatinae). *FACENA* 16: 85-91.
- Loureiro, M. (2004) Sistemática y Biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Tesis de Doctorado, PEDECIBA, Uruguay.
- Loureiro, M., D'Anatro, A., Teixeira de Mello, F. & Cardozo, V. (2007) *Austrolebias cinereus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>.
- Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L. & Wesselingh, F. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. Phylogeny and classification of Neotropical fishes (ed. by L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S Lucena and C. A. S. Lucena). Edipucrs, Porto Alegre.
- MacArthur, R. H. & Levins, R. (1964). Competition, habitat selection, and carácter displacement in a patchy environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 51, 1207-1210.
- Marroig, G., & Cheverud J. M. (2004). Did Natural Selection or Genetic Drift Produce the Cranial Diversification of Neotropical Monkeys? *The American Naturalist*. vol. 163, no. 3
- McNeill, A., (1982). *Optima for Animal*. Princeton University Press ed. 1996.
- Monteiro, L.R., & dos Reis, F.S., (1999). *Principios de Morfometria Geometrica*. Ribeirao Preto: Holos. 188 páginas.
- O'Reilly K. M. & M. H. Horn (2004) Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. *Journal of Fish Biology* (2004) 64, 1117–1135 doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00379.
- Reis, R & Lima, F. (2009). *Austrolebias affinis*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Descargado el 10 de Enero de 2012.
- Reis, R. E., Kullander, S. O. & C. J. Ferraris (2003) Checklist of freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre.
- Reznick, D. Butler, M. J. & Rodd. H. (2001). Life-History Evolution in Guppies. VII. The Comparative Ecology of High- and Low-Predation Environments. *American Naturalist* 2001. Vol. 157, pp. 126–140.
- Rohlf, F.J., (1990). Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 299-316
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F, (1993). A Revolution in Morphometrics. Reprinted from *Trends in Ecology and Evolution*. 8 (4):129-132
- Satou, M., Takeuchi, H. A., Tanabe, M., Kitamura, S., Okumoto, N., Iwata, M. and Nishii, J. (1994). Behavioral and electrophysiological evidences that the lateral-line is involved in the inter-sexual vibrational communication of the hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus-nerka*). *Journal of Compared Physiology A* 174, 539-549.

- Schaefer, S. A. & Cavender, T. M. (1986). Geographic variation and subspecific status of *Notropis spilopterus* (Pisces: Cyprinidae). *Copeia* 1986, 122–130.
- Simpson, B. R. C. (1979) The phenology of annual killifishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44: 243-261.
- Thorpe, R. S. (1984). Primary and secondary transition zones in speciation and population differentiation: a phylogenetic analysis of range expansion. *Evolution* 38, 233–243.
- Whitlock, M. C. (2000). Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* 54(6):1855-1861.
- Wourms, J. P. (1972) The developmental biology of the annual fishes. pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 182:169-200.
- Vari, R. P. & L. R. Malabarba (1998) Neotropical ichthyology: an overview. En *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba L. R., Reis R. E., Vari, R. P., Lucena Z.M., Lucena C.A.S., eds.), pp1-11. Edipucrs, Porto Alegre
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra & S. Scaglia, (1964). Tres especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876 (Teleostomi, Cyprinodontidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montev.* 8(102):
- Vaz-Ferreira, R. y B. Sierra, (1973). Caracteres etológicos, genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Bol. Soc. Zool. Uruguay*, 2: 22-35.
- Vaz-Ferreira, R. y A. R. Melgarejo, (1984). La distribución de las especies del género *Cynolebias* Steindachner 1876, en el Uruguay, con notas sobre *C. alexandri* Castello y Lopez, 1974. *Bol. Soc. Zool., Uruguay*, 2:41-46.
- Zarucki, M., González-Bergonzoni, I., Teixeira de Mello, F., Duarte, A., Serra, S., Quintans, F., Loureiro, M. (2010) New records of freshwater fish for Uruguay. *Check List*, 62, 191-194.
- Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D. & Fink W. (2004) *Geometric morphology for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, New York. USA.