

Universidad de la República (UdelaR)
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias Biológicas (PEDECIBA)
Sub-área: ZOOLOGÍA
2016

ANÁLISIS DEL PATRÓN FILOGEOGRÁFICO DEL PEZ ANUAL
Austrolebias arachan Loureiro, Azpelicueta, Garcia, 2004
(Cyprinodontiformes; Rivulidae) ENDÉMICO DE URUGUAY
Y SUR DE BRASIL

Lic. Sofía Stareczek

Orientador: Dr. Marcelo Loureiro
Co-orientador: Dr. Alejandro D'Anatro
Tribunal:
Dr. Enrique Lessa
Dra. Graciela García
Dr. Arley Camargo

Agradecimientos

A mi orientador Marcelo por todo su apoyo, guía y compañía en este camino

A mi corientador Alejandro por su orientación y apoyo

Al tribunal por su tiempo, apoyo y correcciones que fueron de gran aporte para este trabajo

A mis compañeros del piso 9 y 6, por su gran compañerismo

A mis padres por su apoyo incondicional y constante aliento

A mis hermanos por su amor de todos los días que me hace seguir adelante (a mis cuñadas que también son parte de esto)

A mis primas, que son mi norte

A mi familia entera, que está despegada

A mis amigas por bancarme la cabeza y alegrar mis días

A Alejandro por su cariño y empuje constante durante este trayecto

“Entonces supe, por primera vez, que hay que cultivar los recuerdos en el agua, que el agua elabora lo que en ella se refleja y que recibe el pensamiento. En caso de desesperación no hay que entregar el cuerpo al agua; hay que entregar en ella el pensamiento, ella lo penetra y él nos cambia el sentido de la vida” Y así fue.

Índice

Resumen	4
1 Introducción	5
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
1.3 Hipótesis	12
2 Materiales y métodos	13
2.1 Marcadores moleculares	13
2.2 Morfometría geométrica	22
2.3 Resultados	24
2.4 Marcadores moleculares	24
2.4.1 Estimación de las fases haplotípicas de los genes nucleares.....	24
2.4.2 Índices de diversidad	25
2.4.3 Correlación diversidad vs. órdenes de los Ríos	26
2.4.4 Red de haplotipos citocromo b	28
2.4.5 Red de haplotipos EPIC 1835	29
2.4.6 Análisis molecular de la varianza (AMOVA)	30
2.4.7 Test de neutralidad	31
2.4.8 Análisis de demografía histórica: “Mismatch distribution”	32
2.4.9 Distancias pareadas (F_{ST})	34
2.4.10 Correlación entre Matriz genética y Matriz de distancias geográficas.....	35
2.4.11 Modelos evolutivos	35
2.4.12 Análisis del número de clusters poblacionales	35
2.4.13 Flujo génico y direccionalidad	39
2.5 Morfometría geométrica – machos	41
2.6 Morfometría geométrica – hembras	44
2.7 Correlación entre Matriz genética y Matriz morfológica.....	48

3	Discusión	48
4	Conclusiones y Perspectivas	56
5	Bibliografía	58

RESUMEN

Austrolebias arachan es una especie de pez anual endémica de Uruguay y sur de Brasil. Esta especie se distribuye en la cuenca del Río Negro y en una pequeña porción del Sistema Patos-Merín, nordeste de Uruguay. Este patrón es compartido de manera general con 3 especies del mismo género: *A. quirogai*, *A. vazferreirai* y *A. juanlangi*, donde se han sugerido dos posibles mecanismos causantes: dispersión de huevos (mediado por aves u otros organismos que se mueven por estos ambientes), favorecida por la gran resistencia de los huevos a la desecación o vicarianza mediada por eventos geodispersivos de capturas de cuencas. Con el fin de contribuir a mejorar el entendimiento de los procesos que moldean la estructura poblacional y patrones de distribución de los peces anuales, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar la estructura poblacional e historia demográfica de esta especie a lo largo de su rango de distribución en Uruguay, utilizando marcadores morfológicos (Morfometría Geométrica) y dos marcadores moleculares (citocromo b mitocondrial y EPIC 1835, nuclear). Los resultados mostraron estructura de la variación de la forma y de las variantes genéticas mitocondriales de acuerdo a la configuración actual de las cuencas; no observándose el mismo resultado para el marcador nuclear, ni para el marcador morfológico. Las diversidades haplotípicas para ambos marcadores moleculares resultaron altas así como los índices F_{ST} entre las poblaciones, sugiriendo una gran estructuración poblacional, con bajo flujo génico entre las poblaciones. Para el marcador mitocondrial, se observó en la red de haplotipos una topología en forma de estrella, evidenciando una posible expansión poblacional reciente para las localidades pertenecientes al curso principal del Río Negro; lo que es reforzado por los valores negativos y significativos de los test de Neutralidad (Tajima y Fu) y un patrón unimodal del gráfico del análisis de las distancias pareadas ("Mismatch distribution"), de dicha población. En cuanto a la direccionalidad del flujo génico se observa que el mismo es asimétrico y que la población de Río Negro es la que tiene mayor aporte de migrantes, pudiéndose haberse comportado en un pasado reciente como una población fuente. Se evidencia a nivel de flujo génico una gran conexión pasada reciente entre el Río Negro y el Río Tacuarí, lo cual sería congruente con lo propuesto por Loureiro et al. (2011), que sugiere una

captura de cuencas en esta región. Los resultados apoyan la hipótesis propuesta para capturas de cuencas por Ribeiro (2006), quien propone que los drenajes del Atlántico (costeros) son los que capturan los drenajes del escudo de tierras altas.

INTRODUCCIÓN

La historia evolutiva de las poblaciones es el resultado de interacciones entre procesos como la mutación, la deriva genética, la selección natural y el flujo génico (Hardy & Edwards, 1908; Wright, 1951). La consecuencia de estos procesos depende altamente del tamaño efectivo poblacional. Se ha demostrado que las poblaciones pequeñas son más proclives a la influencia de dichos procesos, en particular la deriva genética (Templeton, 2006). Por ejemplo, las reducciones del tamaño efectivo poblacional están asociadas a un aumento de la tasa de endocria y consecuente pérdida de variación genética, mayor probabilidad de fijación de alelos deletéreos por deriva genética, reducción del potencial adaptativo e incremento de la probabilidad de extinción (Cornuet & Luikart 1996 y referencias allí citadas). Por contraparte, dichos «cuellos de botella» o los «efectos fundadores» poblacionales han sido propuestos como factores clave en algunos modos de especiación (Mayr, 1954; Carson, 1971; Kaneshiro, 1976, 1980; Templeton, 1980). Por ejemplo, la colonización de una nueva área por pocos individuos o el apareamiento de una sola hembra, puede causar grandes cambios genéticos que podrían conducir al aislamiento reproductivo (Carson, 1971).

La filogeografía es el estudio de los principios y procesos, históricos y contemporáneos, que influyen la distribución geográfica de los linajes genéticos dentro de una especie o entre especies próximas (Avice et al., 1987). Esta apunta a descifrar las marcas dejadas en la historia de la genealogía de las poblaciones, por los factores evolutivos (mutación, deriva genética, flujo génico y selección natural) y eventos demográficos (colonización, extinción de poblaciones locales, expansión o reducción poblacional y migración) y entender como esos factores modelaron la estructura genética actual de una especie (Cunha et al., 2010). Además, la genética de poblaciones, filogenética y filogeografía, como indicadores de la historia natural de las poblaciones y pronóstico de su futuro, proporcionan datos valiosos para su uso en el manejo de planes de conservación de especies amenazadas (O' Brien, 1994; Bowen, 2016).

Los estudios filogeográficos normalmente tratan con múltiples poblaciones distribuidas a lo largo del paisaje. A menudo existen impedimentos físicos o comportamentales a la dispersión entre algunas de las poblaciones, en el presente o pasado. En especies con vagilidad limitada,

las poblaciones van a estar parcialmente aisladas simplemente por la distancia que existe entre las mismas. Filtros o barreras físicas (como ríos para especies terrestres o montañas para especies de tierras bajas) en general aumentan los efectos de la limitada vagilidad promoviendo la estructuración poblacional. Algunos filtros pueden ser semi-permeables y permitir intercambios ocasionales de los linajes genéticos, pero otros pueden bloquear el intercambio genético por períodos evolutivos sustanciales (Avice, 2009). La dispersión es el proceso por el cual los individuos son llevados de su hábitat de nacimiento (o población) a otro hábitat para reproducirse (Manel et al., 2013). Este proceso es un factor clave para la persistencia de la población, especialmente en paisajes fragmentados (Nichols, 2001). La dispersión heterogénea en paisajes conduce a la noción de conectividad funcional (Manel et al., 2013). El concepto de conectividad funcional ha sido definido por Taylor et al. (1993) como "el grado en el cual el paisaje facilita o impide el movimiento entre los recursos parches". En él se describe la respuesta de los individuos a las características del paisaje (en términos de comportamiento de dispersión, los riesgos de mortalidad y costos por movimiento), así como las tasas de dispersión resultantes (Manel et al., 2013). En el contexto de la genética del paisaje, la medición de la conectividad por el flujo de genes (Lowe et al., 2010) es un método muy utilizado. El flujo de genes histórico y contemporáneo puede estimarse a partir de las distancias genéticas o la asignación y análisis de paternidad (Manel et al., 2005).

Los patrones de la variación fenotípica de los individuos también son importantes de interpretar cuando se quiere investigar cuáles son los factores y procesos involucrados en la historia evolutiva de una especie (Bailey & Smith, 1981; Thorpe, 1984). La morfometría geométrica juega un rol importante en muchos tipos de estudios biológicos (estudios antropológicos, morfo-funcionales, anatomía comparada, filogenética, etc.). En esta técnica, la forma de los individuos es representada por la posición relativa de los marcos anatómicos ("Landmarks"), puntos considerados homólogos entre los individuos (Bookstein, 1991). Una variedad de procesos biológicos son los que producen las diferencias en la forma entre los individuos o sus partes: desarrollo embrionario, adaptación a factores geográficos locales o diversificación evolutiva a largo plazo (Zelditch *et al.*, 2004). Uno de los potenciales problemas que tienen los marcadores morfológicos para inferir eventos demográficos de la historia de las poblaciones, es que aunque algunas características estén bajo estricto control genético, la influencia de las condiciones ambientales significa que no suele haber en general una relación uno a uno entre el genotipo de un organismo y su fenotipo (Freeland, 2003).

Los peces anuales (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei), son peces de agua dulce que tienen un período de vida muy corto y que habitan ambientes extremadamente variables, charcos temporales que se secan estacionalmente. Los adultos mueren cuando el charco se seca y la población sobrevive mediante la puesta de huevos resistentes a la desecación y de estadios de diapausa que retrasan la eclosión de los embriones (Wourms, 1972; Podrabsky et al., 2007, Berois et al., 2014). De dicha forma, estos organismos logran superar esta condición de alto estrés de los charcos temporales. Su rápido desarrollo, corto período de vida y la expresión de genes relacionados al envejecimiento, han hecho de estos peces un modelo de estudio muy utilizado (Berois *et al.*, 2015). Por otro lado, las características de hábitat fragmentado en que los peces anuales se desarrollan, son propicias para que mecanismos evolutivos tales como la deriva genética, cuellos de botella, efecto fundador y la endogamia tengan influencia sobre la evolución y la probabilidad de extinción de las poblaciones. La escasa vagilidad de estos organismos favorecería además el aislamiento entre las poblaciones. La acción conjunta de los mecanismos evolutivos mencionados propiciaría por tanto la diferenciación entre las poblaciones con la potencial probabilidad de la ocurrencia de eventos de especiación. Estas características biológicas los hacen un modelo ideal para el análisis de la relación entre fenómenos de rápida diferenciación poblacional y especiación en vertebrados.

Los charcos temporales donde los peces anuales habitan se encuentran asociados a los márgenes de ríos, arroyos, humedales y lagunas, y si bien no están directamente conectados con los cursos de agua, ocasionalmente pueden ser inundados durante los eventos de lluvia intensa, ya sea desde los arroyos adyacentes o a través de la conexión con charcos vecinos. Dado este hábitat tan particular, la dispersión de estos peces está bastante limitada lo que favorece que las especies tengan distribuciones poblacionales muy restringidas. Por ejemplo, *A. cinereus* (Amato, 1986), una especie considerada por la UICN como críticamente amenazada (Loureiro et al., 2007), se conoce solo de un pequeño charco en la parte baja de la cuenca del Río Uruguay (Amato, 1986; Costa, 2006). Por otra parte, los peces anuales presentan un fuerte dimorfismo sexual en la forma y la pigmentación, sugiriendo que la selección sexual ha jugado un rol importante en la evolución de estos taxa (Vaz-Ferreira et al., 1964; Costa, 2006).

Los peces anuales se distribuyen en América del Sur y África. Los que habitan en Sudamérica pertenecen a la familia Rivulidae, que incluye aproximadamente 20 géneros (Loureiro & de Sá, 2015). Entre estos se encuentra el género *Austrolebias* (Costa, 1998), un taxón muy diverso

que contiene 39 especies, distribuidas en la cuenca Paraná-Plata y en el sistema de lagunas Patos-Merín (Calviño, 2005; Costa, 2006, 2014; Ferrer et al., 2008; Loureiro et al., 2011; Volcan et al., 2014).

Austrolebias arachan es una especie de pez anual endémica de Uruguay y sur de Brasil (Volcan et al., 2012). Esta especie se distribuye en la cuenca del Río Negro y en una pequeña porción del Sistema Patos-Merín, al nordeste de Uruguay (Loureiro et al., 2004, 2011). Mientras que su grupo hermano putativo (complejo de especies *A. adloffii*, Garcia, 2006) presenta amplia distribución en las tierras bajas de todo el sistema Patos-Merín, *Austrolebias arachan* comparte su distribución con otras especies de este género, como lo son *A. quirogai*, *A. vazferreirai*, y *A. juanlangi* (Loureiro et al., 2011). En cuanto al patrón de distribución de estas especies se han sugerido dos posibles escenarios generadores: dispersión de huevos (mediado por aves que se mueven por estos ambientes) favorecida por la gran resistencia de los huevos a la desecación o vicarianza mediada por eventos de reordenamiento de los drenajes (Loureiro et al., 2011).

La zona media de la cuenca del Río Negro y el Sistema Patos-Merín han sido propuestos como áreas de endemismo (Costa, 2010). Estos sistemas pertenecen a la Región Neotropical, la cual representa una de las regiones con mayor diversidad orgánica del planeta y en particular la riqueza de especies de esta región representa a la mayoría de los peces de agua dulce del mundo y tal vez a un 10% del total de vertebrados conocidos (Vari & Malabarba, 1998; Reis et al., 2003).

El Río Negro pertenece a la cuenca del Río Uruguay con una longitud de 750 km y una superficie de cuenca de 70.714 km² (Serra et al., 2014). Dicho río se encuentra dentro de la Ecoregión del "Uruguay Medio-Bajo" (Abell et al., 2008) que cuenta con al menos 230 especies de peces, de las cuales entre 26 y 75 son endémicas. Esta región está compuesta por diversas formaciones geológicas, en términos de química, origen y edad, incluyendo rocas que van desde el Precámbrico al Cuaternario (Lambert, 1940). Por otro lado, el sistema Patos-Merín está compuesto por dos grandes sistemas lacunares y sus afluentes. En las partes bajas de ambas lagunas se concentra una gran extensión de humedales considerados una reserva de la biósfera (PROBIDES, 1999). Abell et al. (2008) consideran también a este sistema como una ecoregión a nivel de organismos de sistemas dulce acuícolas. Este sistema presenta una alta cantidad de endemismos y un elevado índice de rareza de especies (Albert et al., 2011), dado seguramente por el aislamiento geográfico del mismo de otros sistemas hidrográficos.

Además, debemos considerar el origen complejo de esta ictiofauna dado por conexiones múltiples en espacio y tiempo con regiones eco/biogeográficas adyacentes, como los sistemas costeros de la región de Rio de Janeiro (Costa, 1998; Ghedotti et al., 2001; Lucinda, 2005), el Río Paraná (Loureiro, 2004), así como evidencias recientes de conexiones marinas (Beheregaray et al., 2001). Sin embargo la mayor afinidad (en composición de especies) de este sistema es con la cuenca del Río Uruguay, sistema que drena el extremo austral del escudo Brasileño. Existen tanto especies en común como especies cercanamente emparentadas en ambos sistemas en diversos grupos taxonómicos como Characiformes (Buckup & Reis, 1997), Gymnotiformes (Loureiro & Silva, 2006), Cyprinodontiformes (Lucinda, 2005; Loureiro et al., 2004, 2011) y Cichlidae (Reis & Malabarba, 1988; González-Bergonzoni et al., 2009). Por lo que podemos pensar que las conexiones entre ambas abarcan un rango temporal y/o espacial relativamente amplio.

En este sentido, varios patrones de distribución, incluido el observado para las especies de peces anuales mencionadas indican que es altamente probable que los procesos geodispersivos de captura de cuencas sean el mecanismo responsable de dicha conexión biogeográfica. La presencia compartida tanto en el escudo de tierras altas y en drenajes del Atlántico es un buen ejemplo del reciente patrón de translocación de acuerdo con el criterio de captura de cuencas establecido por Ribeiro (2006). El hecho de que estas especies de peces anuales estén restringidos a una pequeña zona aguas arriba de dos afluentes de ríos adyacentes (Yaguarón y Tacuarí) de la Laguna Merín, podría indicar que el reordenamiento de estos drenajes se produjo incluso más recientemente que en otras regiones. En este contexto, el canal del Río Tacuarí y varios sectores del Río Yaguarón presentan topología de “codo” (Loureiro et al., 2011), considerada una configuración característica de eventos de captura de cuencas (Bishop, 1995) (Figura 1).

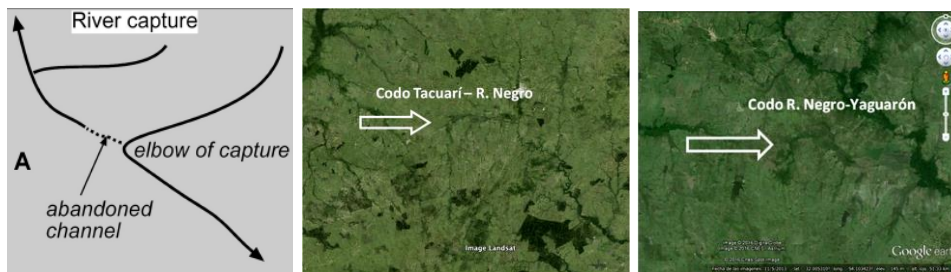


Figura 1. A la izquierda: dibujo representativo de la topología evidenciada donde ocurrió un evento de captura de cuenca, tomada de Burrige et al., 2006. Al centro: imagen tomada de Google Earth donde se observa una topología similar en el Río Tacuarí, en la zona de la posible captura de cuenca. A la derecha: imagen tomada de Google Earth donde se observa una topología similar en el Río Yaguarón, en la otra zona con posible captura de cuenca.

Esto concuerda con lo propuesto por Ribero (2006), donde se sugiere que los drenajes del Atlántico (costeros) son los que capturan los drenajes del escudo de tierras altas. Además la presencia de dichas especies en la cuenca del Río Yaguarón, sugiere otro evento independiente de reordenamiento de drenajes involucrando el sector norte de la parte alta del Río Negro. En este caso la topología de “codo” se encuentra en un afluente del Río Yaguarón (Figura 1), pero también en un afluente del Río Negro (Loureiro et al., 2011).

La hipótesis propuesta por Ribeiro (2006) es apoyada por los patrones de distribución y las relaciones filogenéticas de varios clados de peces neotropicales. Ribeiro (2006) identificó tres patrones diferentes que reflejarían las translocaciones en diferentes momentos de la evolución del continente: uno antiguo, representado por ejemplo por las familias de bagres *Trichomycteridae* y *Doradidae*, donde los clados más basales de ambos grupos son endémicas de los ríos del Atlántico, mientras que los miembros restantes están bien diversificados en los ríos del escudo; un patrón intermedio, observado a nivel de género y con clados hermanos distribuidos en ambas áreas (por ejemplo, *Corydoradinae*); y uno reciente, evidenciado por la presencia común de la misma especie tanto en los ríos del escudo como en los ríos costeros. Cabe destacar, que los roles de las barreras impermeables y semipermeables en producir y mantener la riqueza específica son escala dependientes (Heaney, 2000; Whittaker, 2000). A escalas temporales y espaciales más grandes, las barreras funcionarían aislando y protegiendo biotas de intercambios bióticos desde grandes islas e incluso continentes y promoviendo así especiación endógena *in situ* (Losos & Schluter, 2000). En este sentido, estas barreras ayudan a generar y mantener riqueza específica regional y global. A escalas menores (por ej.: dentro de una ecoregión), el rol de las barreras geográficas se vuelve menos importante, predominando el rol de los procesos ecológicos, y características fenotípicas, que permiten a muchas especies coexistir en simpatria.

Por otra parte, además de estos mecanismos propuestos como generadores de diversidad de los peces de agua dulce neotropicales, recientemente se ha sugerido que las propiedades topológicas de los ríos también estarían contribuyendo de gran manera a la alta diversidad encontrada en los peces de agua dulce, promoviendo al aislamiento reproductivo dentro de la cuenca de un río (Ng'oma et al., 2013; Thomaz et al., 2016). Por ejemplo el aislamiento sustancial se daría en las poblaciones de las cabeceras de los ríos, las cuales tienen poco o nada de flujo génico debido a los altos niveles del río, ramificaciones y migración asimétrica aguas abajo (Thomaz et al., 2016). Por ejemplo, en los ecosistemas fluviales varios estudios han encontrado un aumento aguas abajo de la diversidad genética (Hanfling & Weetman,

2006). Los ecosistemas fluviales, son casos específicos de redes ecológicas dendríticas, caracterizados por su patrón de ramificación geométrica en forma de árbol (Benda et al., 2004; Campbell Grant et al., 2007), y fuertemente estructurada por elevación, lo que hace que el flujo de agua sea unidireccional. Estas dos características (la geometría y la ramificación del flujo de agua unidireccional) pueden restringir en gran medida los movimientos de los individuos y por lo tanto la dispersión.

En cuanto a la influencia de estos procesos en la historia de los peces anuales, el patrón de la estructuración genética espacial encontrada en el género *Austrolebias* se asoció mayormente a eventos vicariantes de gran escala, ocurridos en la dinámica histórica de la cuenca del Plata (García et al., 2012), mientras que el patrón de distribución encontrado para *A. quirogai* se atribuye a eventos de capturas de cuencas (Loureiro et al., 2011). En *A. charrúa* se observó un haplotipo central de donde derivan todos los demás en un caso con baja estructuración espacial y evidencia de expansión reciente (García et al., 2009), mientras que en *A. bellottii* la estructura que se observó fue en una escala espacial regional (García et al., 2012). Por otro lado, estudios en el género de peces anuales africanos *Nothobranchius*, sugieren por ejemplo, que en *N. furzeri* existe una dispersión muy limitada con un prominente aislamiento por distancia y una profunda estructuración geográfica favorecida por la configuración espacial de los ríos (Dorn et al., 2011; Bartakova et al., 2013), mientras que en *N. kirki* y *N. wattersi* de Malawi se han detectado grandes distancias génicas en escalas geográficas pequeñas (Ng'oma et al., 2013).

Esta tesis pretende contribuir a mejorar el entendimiento de los procesos que moldean la estructura poblacional del pez anual *Austrolebias arachan*, con especial consideración del efecto de los procesos de reordenamiento de sistemas de drenaje y el concomitante proceso de dispersión, que se cree subyace al patrón de distribución de las especies de peces anuales en la cuenca del Río Uruguay y el Sistema Patos-Merín, implicando que esta zona podría funcionar como un corredor biológico que conecta dos ecoregiones.

Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo consiste en determinar la estructura poblacional e historia demográfica de esta especie a lo largo de su rango de distribución en Uruguay, utilizando marcadores morfológicos y dos marcadores moleculares.

Objetivos específicos

1. Determinar la variabilidad haplotípica y nucleotídica de un gen mitocondrial (citocromo b) de la especie y evaluar cómo se correlaciona con la configuración de los ríos.
2. Determinar si existe diferenciación en la forma de los individuos asociada a la estructura geográfica.
3. Determinar cuál es el número más probable de agrupamientos de las localidades muestreadas para cada marcador molecular.
4. Establecer el nivel y la direccionalidad de flujo génico entre sus poblaciones.
5. Comparación entre la variación de la forma de los individuos y la variación genética.

Hipótesis

Hipótesis y predicción 1. Considerando el patrón de anidamiento de las cuencas hidrogeográficas y un flujo génico (aporte de migrantes) potencial desde las poblaciones de las cabeceras de los cursos de agua hacia las poblaciones de las partes más bajas, entonces esperaríamos encontrar mayor diversidad genética en las poblaciones localizadas aguas abajo y menor diversidad genética en las poblaciones de las cabeceras de los ríos (Thomaz et al., 2016). Este patrón asimétrico de flujo génico de las poblaciones hacia “aguas abajo” ha sido propuesto como mecanismo para el mantenimiento de la alta diversidad génica en sistemas lóticos (Maruyama, 1970; Morrissey et al., 2009).

Hipótesis y predicción 2. Asumiendo que los peces anuales (*Austrolebias*) tienen baja vagilidad y por tanto solo podrían dispersarse en una escala geográfica moderada cuando ocurren grandes inundaciones, la hipótesis es que la configuración espacial (presente o pasada) de las cuencas de drenaje es una fuerza o factor importante en determinar la historia y estructura de los linajes genéticos y sus características morfológicas. Como predicción se espera que la variación geográfica en *A. arachan* esté estructurada de acuerdo a las cuencas hidrográficas y que por lo tanto, individuos de una misma cuenca geográfica sean genéticamente y morfológicamente más similares entre sí.

Hipótesis y predicción 3. Por otro lado, considerando la potencial ocurrencia de eventos pasados de captura de cuencas en la zona donde habita esta especie (Río Negro -Tacuarí y Río

Negro-Yaguarón), esperaríamos encontrar mayor similitud a lo esperado (dada la configuración actual de las cuencas y la baja vagilidad de los peces anuales), entre individuos de diferentes cuencas con posibles conexiones pasadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo y marcadores moleculares

Las muestras de tejido utilizadas para los análisis corresponden a individuos fijados y conservados en etanol 95% pertenecientes a la Colección de Vertebrados de Facultad de Ciencias (ZVC-P), provenientes de toda el área de distribución de la especie en Uruguay a lo largo de las cuencas del Río Tacuarembó, Río Negro, Río Tacuarí y Río Yaguarón (Figura 2). Este muestreo abarca casi la totalidad de la distribución de la especie ya que solamente quedó excluida una población ubicada en la cuenca del Río Yaguarón en el estado de Rio Grande del Sur (Brasil), la cual es muy próxima a la localidad de la misma cuenca incluida en este análisis (Paso de Melo, Departamento de Cerro Largo). Las extracciones de ADN total se realizaron siguiendo un protocolo modificado a partir del propuesto por Miller et al. (1988). Se realizaron extracciones de ADN de aproximadamente 10 individuos por localidad (charco) (Anexo 1).

La amplificación de los fragmentos de interés se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction). Se amplificó un fragmento del gen citocromo b (Palumbi et al., 1991) y un marcador nuclear (EPIC) (Li et al., 2010).

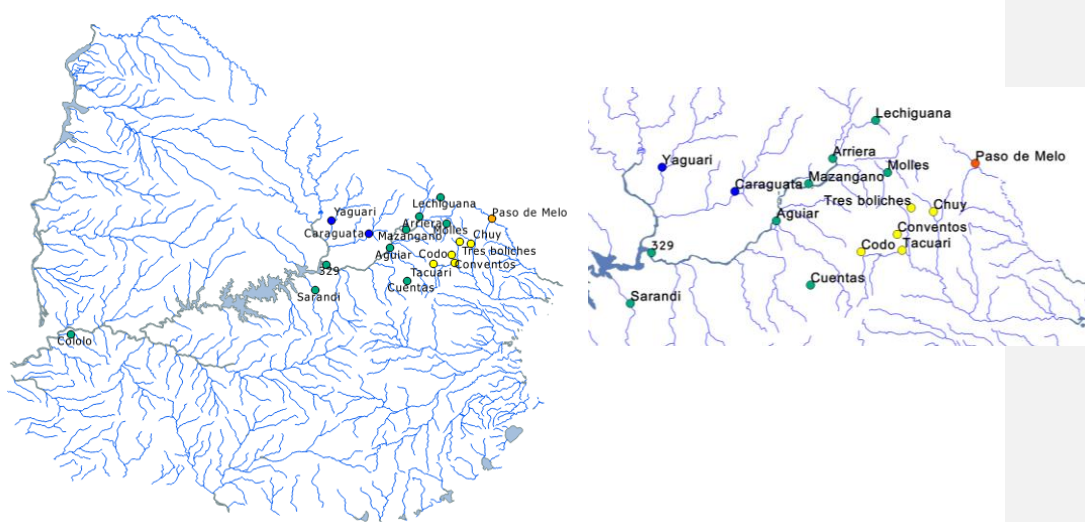


Figura 2. Izquierda: Mapa hidrográfico de Uruguay. Los puntos corresponden a las localidades de las cuales se cuenta con las muestras utilizadas en el presente trabajo, abarcando toda la distribución de *A. arachan* de Uruguay. Los puntos verdes corresponden a localidades pertenecientes a la cuenca del Río Negro, puntos amarillos a la cuenca del Río Tacuarí, puntos azules a la cuenca del Río Tacuarembó y puntos naranjas a la cuenca del Río Yaguarón. Derecha: zoom en la zona donde se localizan todas las localidades muestreadas en el presente trabajo, a excepción de la localidad de Cololó.

Los EPICs (“Exon-primed, intron-crossing markers”) son marcadores desarrollados mediante la comparación del genoma de peces (Li et al., 2010). Los oligos para estos marcadores se encuentran situados en regiones codificantes (exones) y conservadas del genoma y están diseñados para amplificar un intron, cuya localización es conservada pero su secuencia es potencialmente variable. Los intrones son regiones no codificantes del ADN genómico que son recortadas cuando se forma el ARN mensajero maduro. Datos empíricos han demostrado que dichos marcadores pueden ser considerados como neutrales y que poseen una serie de características deseables para análisis filogenéticos con datos moleculares (Friesen, 1997, 2000). Otro tipo de marcador molecular que es muy utilizado en estudios poblacionales es el ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial es una molécula cuya estructura y contenido están muy conservados a lo largo de la evolución. Se trata de una única molécula circular de doble cadena de aproximadamente 16,5 Kb con herencia clonal y generalmente a través de la línea materna en la mayoría de los organismos, y no suele experimentar procesos de recombinación (Avice et al., 1987). Desde un punto de vista filogenético, la falta de recombinación significa que los marcadores mitocondriales pueden servir para organizar a los individuos en un linaje matriarcal incluso luego de hibridización. Por lo que la heterogeneidad dada por este tipo de marcadores suele interpretarse directamente como resultado de un aislamiento reproductivo (aislamiento genético). Además de su rápida tasa evolutiva, debido al tamaño poblacional efectivo cuatro veces menor (ADN haploide heredado sólo por vía materna) al ADN nuclear diploide heredado biparentalmente, la tasa de deriva genética actuando sobre la población es mucho más alta incrementando de esta manera el grado de diferenciación genética entre poblaciones (Avice et al., 1987).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador automático Palm-Cycler™ Gradient Thermal Cycler, Corbett Life Sciences. Para un volumen de 25µl se utilizaron aproximadamente 30ng del ADN genómico extraído de las muestras analizadas de *A. arachan*. La mezcla de la reacción de un volumen final de 25 µl tiene la siguiente composición: agua destilada 5,0 µl, buffer 2,5 µl, MgCl₂ 3,5 µl, dNTPs 1,0 µl de cada oligonucleótido 0,4 µM, oligos 1,0 µl de cada uno, 0,25 µl de polimerasa Taq (Invitrogen) y 12,5 µl de ADN extraído diluido al 10%. El programa para la amplificación del marcador mitocondrial consistió en un

primer paso de desnaturalización de 94 °C por 3 minutos. Luego 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, annealing/pegado de oligonucleótidos a 49 °C durante 30 segundos y la extensión a 72 °C por 45 segundos. Por último, 7 minutos de extensión final a 72 °C. El programa utilizado para la amplificación del marcador nuclear consistió en un primer paso de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto. Luego 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, annealing/pegado de oligonucleótidos, a 54 °C durante 30 segundos y la extensión a 72 °C por 1:30 minutos. Por último, 10 minutos de extensión final a 72 °C. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de ambos fragmentos se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación, vía PCR de los fragmentos analizados en el presente trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia	Cita	Gen
1835E6-F	5'-AAACATCGATACTGGGARACVCGACTG-3'	Li et al., 2010	Canal de
1835E6-R	5'-GTTTGTCTCYACCATGTTCCAGATGAT-3'		Sodio
CB3-H	5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3'	Palumbi et al. 1991	Cyt-b
Gludg-L	5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3'		

Los fragmentos amplificados se secuenciaron con los oligonucleótidos 1835E6-F para el caso del EPIC y con Gludg-L para citocromo b; utilizando un servicio de secuenciación automático comercial Perkin-Elmer ABI Prism 377 (MACROGEN, Seúl, Korea).

Las secuencias fueron editadas mediante el programa Mega versión 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipiski & Kumar, 2011), y alineadas con la herramienta de alineamiento múltiple ClustalW (Thompson et al., 1994), con los valores de penalidad fijados por defecto en dicho programa para la apertura y la extensión de los gaps. Las secuencias de ADN mitocondrial (cyt-b) fueron traducidas a proteínas con el fin de verificar que no hubieran codones stop presentes dentro del fragmento amplificado.

Para el caso de las secuencias nucleares, dicho set de datos (alineamiento de las secuencias diploides) fue analizado con el programa Phase (Stephens et al., 2003) para estimar las fases haplotípicas de ambas copias de los genes nucleares para cada individuo. Cuando la probabilidad de resolución de la fase de cada sitio fue menor a 0,6 se excluyeron esos sitios del set de datos. El programa Phase implementa un método estadístico bayesiano para reconstruir haplotipos a partir de los datos genotípicos de una población. Para el caso del marcador

nuclear, los análisis realizados en el presente trabajo se hicieron sobre los set de datos con las fases alélicas estimadas por Phase.

Análisis genéticos

Para ambos loci se contabilizaron los sitios polimórficos o segregantes (S) y los sitios parsimoniosamente informativos (Pi). Además, se calculó la diversidad nucleotídica (π) como el número promedio de las diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares y la diversidad haplotípica (Hd), para todas las secuencias juntas y tanto la π y la Hd, para cada localidad. Con el fin de evaluar la primera hipótesis propuesta, se analizó la correlación entre la diversidad haplotípica y nucleotídica de cada localidad y el orden del curso de agua lótico más cercano, de acuerdo a la clasificación de Strahler (1957), la cual permite estimar el nivel de complejidad del sistema de drenaje aguas arriba de un punto dado. Un sistema de orden 1 no recibe agua de ningún afluente, mientras que los órdenes mayores van reflejando de forma creciente la complejidad del sistema de drenaje. Este análisis se realizó solamente para el marcador mitocondrial, por contar con datos para la totalidad de las localidades y se utilizó para ello la aproximación General Regression Model del programa STATISTICA (data analysis software system), version 10 (StatSoft, Inc. 2011; www.statsoft.com). La diversidad nucleotídica y haplotípica se estimaron mediante el programa DNASP versión 5 (Librado et al., 2009).

Se realizó una red de haplotipos mediante el programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>), utilizando como algoritmo de agrupamiento el utilizado por el programa TCS. El TCS utiliza el método de parsimonia (Templeton, 1992) para calcular el número máximo de pasos mutacionales entre haplotipos.

Con el fin de estudiar la partición de la varianza molecular intra- e interpoblacional se realizó el análisis de AMOVA (Excoffier, 1992), mediante el programa Arlequin versión 3.1. (Excoffier et al., 2005). Dicho análisis evalúa la varianza en el conjunto de datos de la frecuencia haplotípica y el número de mutaciones entre haplotipos. La significación de los componentes de la varianza se calculó mediante 10000 permutaciones no paramétricas. Se analizaron varias hipótesis de agrupamiento de las poblaciones (ver Tabla 2), siguiendo varios criterios según las cuencas y aislamiento de las mismas, y proponiendo a los grandes ríos como barreras (Bartáková, 2013), para ambos marcadores moleculares. La hipótesis de agrupamiento que mejor describe la estructura poblacional es aquella que maximiza la varianza entre los grupos (Φ_{CT}) y minimiza la heterogeneidad dentro de las poblaciones (Φ_{ST}) (Excoffier et al., 1992).

Tabla 2. Hipótesis de agrupamiento evaluadas mediante el Análisis de la varianza molecular (AMOVA). *Los 8 grupos de esta hipótesis corresponden a: Río Negro, Aceguá, Río Tacuarembó, Río Yaguarí, Arroyo Sarandí, Arroyo Cuentas, Río Yaguarón, Río Tacuarí. **Los 7 grupos correspondientes a esta hipótesis son: Río Negro, Cuentas, Chuy, Tacuarembó, Tacuarí, Sarandí y Yaguarón.

Hipótesis de agrupamiento	A	B	C	D
Cantidad de grupos	2	2	8	7
Criterio de agrupamiento	Un grupo al sur y otro al norte del Río Negro	Dos cuencas: Río Negro y Laguna Merín	Subcuencas*	Poblaciones sobre el curso principal de las Cuencas + poblaciones en localidades con mayor aislamiento de las principales cuencas**

Los haplotipos se definieron previamente con el programa DnaSP versión 5 utilizando únicamente los sitios informativos de las secuencias.

Para evaluar la historia demográfica de las poblaciones se realizaron los Test de neutralidad: test D de Tajima (Tajima, 1989) y el test Fu de Fu (Fu, 1997) y el análisis de la distribución de las diferencias pareadas (“mismatch distribution”). Dichos análisis se realizaron para los agrupamientos que mejor explicaron la diferenciación entre los grupos según lo obtenido mediante el análisis de AMOVA. Los mismos fueron computados en el programa ARLEQUIN versión 3.1. Para el caso del marcador nuclear no se analizó el test F de Fu (Fu, 1997), por no soportar dicho test recombinación de datos.

La teoría neutral de evolución molecular planteada por Kimura (1968) predice que a nivel molecular la mayoría de los cambios evolutivos y mucha de la variabilidad dentro de las especies no son causados por selección positiva de alelos ventajosos ni por selección balanceadora; sino que se deben a la deriva genética al azar de los alelos mutantes que son seleccionados de manera neutral o casi neutral (Wen-Hsiung & Graur, 1991). El test de Tajima asume el modelo de sitios infinitos (donde todo alelo ó estado de carácter en términos filogenéticos surge una única vez por mutación), en ausencia de recombinación. Dicho test examina la relación entre el número promedio de diferencias pareadas en los datos y el número de sitios segregantes. Un valor de D negativo estaría reflejando expansión demográfica y/o una barrida selectiva en contra de mutaciones levemente deletéreas; sin embargo un valor de D positivo indicaría selección balanceadora o población estructurada.

El test de Fu (F_s) (Fu, 1997) que también se basa en el modelo de sitios infinitos, sugiere estimar la probabilidad de observar una muestra con un número de alelos igual o menor al valor observado bajo la asunción de una población selectivamente neutra. Valores negativos de F_s indican un exceso en el número de alelos, como el que se esperaría de una reciente expansión poblacional. Para detectar estos fenómenos el test de Fu es más sensible que el de Tajima. Valores positivos de F_s son evidencia de una deficiencia de alelos, lo que correspondería de recientes cuellos de botella poblacionales o selección sobredominante. La significancia de ambos estadísticos (D y F_s) se calcula mediante generación de muestreos al azar utilizando simulación del coalescente, bajo un modelo de neutralidad y una población en equilibrio.

Tanto para el marcador mitocondrial como para el nuclear, se realizaron análisis de "distribución de las diferencias apareadas" ("Mismatch distribution") en el programa ARLEQUIN versión 3.1. El mencionado análisis se basa en la comparación de las frecuencias observadas de diferencias nucleotídicas apareadas entre los individuos contra las frecuencias que se esperaría bajo un modelo demográfico de expansión poblacional (Rogers & Harpending, 1992).

Para evaluar el grado de estructuración de las poblaciones y una estimación del flujo génico entre las mismas, se calcularon los índices F_{ST} , utilizando el mismo programa. Estas distancias se calculan bajo el modelo de Fisher-Wright, dicho modelo permite obtener la distribución de frecuencias génicas entre poblaciones sujetas a un proceso de deriva genética (WRIGHT S. 1951. The genetical structure of populations. Ann Eugen. 1951 Mar; 15(4):323-54, citado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578636/>).

Para evaluar si existe correlación entre la divergencia genética entre las poblaciones y la distancia geográfica existente entre las localidades se realizó un Test de Mantel entre la matriz de los índices de F_{ST} y una matriz de las distancias medidas en kilómetros entre las localidades. Este análisis se realizó en el programa Microsoft Excel (2007), con un complemento llamado XLSTAT.

Para evaluar cuál modelo evolutivo es el que mejor describe la historia mutacional de cada locus, se evaluaron 56 posibles modelos de sustitución nucleotídica mediante el criterio de información jerárquico de BIC (Bayesian Inference Criterion) con el programa jModeltest 2 (Darriba, 2012). Este método asume igual probabilidad a priori para todos los modelos, eligiendo el modelo con el BIC más bajo lo cual es equivalente a seleccionar el modelo con

mayor probabilidad a posteriori. Se calculó el likelihood para cada modelo, utilizando los siguientes parámetros: N° de escenarios de sustituciones: 7 (56 modelos evolutivos), N° de categorías: 4, algoritmo del árbol de búsqueda: NNI (Nearest Neighbour Interchange).

A modo de evaluar el escenario que mejor describa la cantidad de agrupamientos de las poblaciones, así como evidenciar quiebres filogeográficos, para cada marcador molecular, se utilizó el programa Geneland versión 3.2.2 (Guillot et al., 2005a; Guillot et al., 2005b; Guillot 2008). Dicho programa utiliza múltiples loci para inferir el número de poblaciones, asignar individuos a estas poblaciones, e identificar individuos migrantes y zonas híbridas. Para marcadores diploides dicho programa implementa un modelo que asume equilibrio de Hardy-Weinberg de las k poblaciones y equilibrio de ligamiento entre loci. Para datos haploides el modelo utilizado asume distribución multinomial de los genotipos condicionado a las frecuencias alélicas y a la pertenencia de los individuos a las poblaciones, también asume equilibrio de ligamiento. El programa implementa un algoritmo de agrupación bayesiana y utiliza un método de re-muestreo mediante simulación de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar parámetros desconocidos incluyendo el número de grupos poblacionales. GENELAND incorpora además los datos espaciales (coordenadas georeferenciadas) para cada individuo (Guillot et al., 2005a; Guillot et al., 2005b).

El número de poblaciones (K) fue determinado mediante 4 réplicas independientes, con los siguientes parámetros: 10^6 iteraciones MCMC permitiendo que el valor de K varíe en cada uno de ellos, la tasa máxima del proceso de Poisson fijado a 100, la K mínima = 1, la K máxima = 8, el número máximo de núcleos en el teselado de Poisson-Voronoi fijado a 300, y un “burn-in” de 10^4 en el post-procesamiento. Se utilizó el modelo de frecuencias no correlacionadas (Guillot, 2008), el cual asume que las frecuencias alélicas son similares en las poblaciones.

Para generar un mapa con la membresía de los individuos por localidad a los clúster definidos como los más probables, se utilizaron los valores obtenidos mediante Geneland de las probabilidades de pertenencia de cada individuo a los clúster. Dichos valores fueron introducidos en el programa DISTRUCT versión 1.1 (Rosenberg, 2004) para generar un gráfico de los coeficientes de membresía para los individuos.

Para calcular tasas de flujo génico y direccionalidad de las mismas para los agrupamientos propuestos por Geneland, así como que modelo de aislamiento de migración se ajusta más a los datos, se empleó el programa Migrate-N (Beerli & Felsenstein, 1999, 2001; Beerli, 2006). El

programa Migrate-N no logra estimar bien los parámetros cuando se definen muchas poblaciones, ya que por lo general con más de 3 poblaciones puede tener problemas para la estimación de los parámetros (Beerli, 2008). Para este trabajo se utilizó el método de inferencia bayesiana, que es mejor que el método utilizado por la máxima verosimilitud, en el sentido que permite comparar tanto modelos anidados como no anidados (Beerli, 2008). Para la comparación de los modelos se utilizará el Logaritmo del Factor de Bayes (LBF), que se calcula a partir de la comparación de los valores marginales de la máxima verosimilitud de los diferentes modelos a evaluar. Si $LBF < -2$ se apoya el modelo 2, y si es > 2 se apoya el modelo 1. También se evaluó la probabilidad para cada modelo, de la siguiente manera: $Prob. (modeli) = mLmodeli / \sum mLmodelj$. Se utilizarán los valores marginales aproximados mediante el método termodinámico porque es más estable durante las corridas de las cadenas largas que el método armónico (Beerli, et al., 2010). Para estimar el flujo génico, se utilizó el parámetro M , que representa la relación entre la tasa de mutación y la tasa de migración $M = m/\mu$. M representa la importancia de la variabilidad introducida a la población por migración comparada con la generada por mutación, mientras que m es la fracción de nuevos migrantes de la población por generación. A partir del parámetro M se calculó el número de migrantes por generación, como $Nm = M \cdot \theta$.

La estrategia de búsqueda utilizó una distribución de tipo uniforme para θ con valor inicial basado en los F_{ST} . La tasa de transversión/transición y el parámetro γ (citocromo b) se fijaron según los valores determinados por el jModelTest para cada locus. Se seleccionó la opción de múltiples cadenas (4) de MCMC con "calentamiento" de tipo estática, ya que es necesario esta opción para comparar modelos con estimaciones de verosimilitud marginal (MLE), los valores de calentamiento de las cadenas se dejaron por defecto. Para el marcador mitocondrial se fijó el valor de heredabilidad en 0,25, por tratarse de un marcador haploide y de herencia uniparental. Se especificó una tasa de mutación variable. Se optó por una cadena larga de Markov, de 100 mil pasos, con un burn-in de 20 mil. La matriz de migración se modificó dependiendo de cada modelo de migración a evaluar:

A- Poblaciones aisladas

B- "Full matrix": se dejan libres todos los parámetros de la matriz de migración entre las poblaciones.

- C- Río Negro como sumidero, existiendo solo migración unidireccional desde las demás poblaciones hacia la población de Río Negro.
- D- Población de Tacuarembó aislada, resto de las poblaciones intercambian migrantes con tasa no simétrica.
- E- Población de Río Negro como fuente (Hipòtesis de captura de cuencas).
- F- Población de Tacuarembó aislada, Chuy solo aporta individuos hacia Tacuarí y no recibe de ninguna población, no hay migración desde Tacuarí a Yaguarón y el resto de las poblaciones. intercambian migrantes con tasas no simétricas.

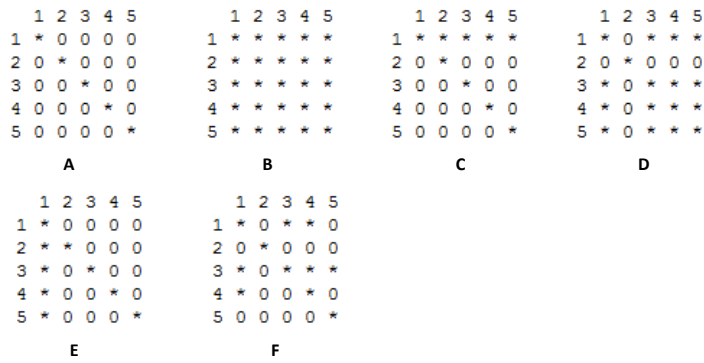


Figura 3. Diagrama de las diferentes matrices de migración evaluadas mediante el programa Migrate-N. Las columnas representan las poblaciones que aportan migrantes y las filas las poblaciones que reciben. 1: Río Negro, 2: Tacuarembó, 3: Tacuarí, 4: Yaguarón, 5: Chuy. La diagonal representa el parámetro θ .

Para el marcador nuclear se fijó el valor de heredabilidad en 1, por tratarse de un marcador diploide y de herencia bi-paternal y se probaron los modelos de migración A-E.

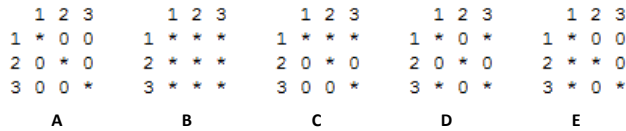


Figura 4. Diagrama de las diferentes matrices de migración evaluadas mediante el programa Migrate-N. Las columnas representan las poblaciones que aportan migrantes y las filas las poblaciones que reciben. 1: Río Negro, 2: Tacuarembó, 3: Tacuarí. La diagonal representa el parámetro θ .

Morfometría geométrica

La variación en la forma fue analizada a través de datos morfométricos utilizando 15 marcos anatómicos homólogos ("landmarks") del cuerpo de los ejemplares (Figura 3). Los marcos anatómicos utilizados fueron: (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).

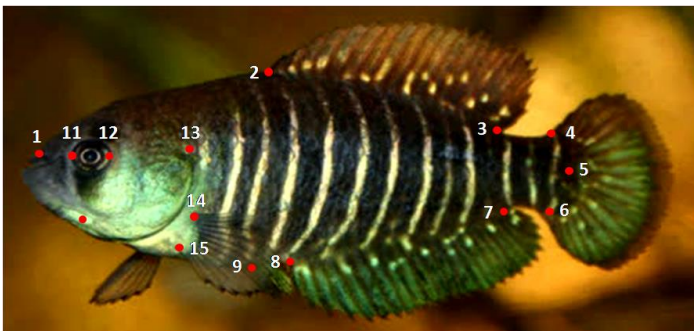


Figura 5. Ejemplar de *A. arachan* sobre el cual se indican con puntos rojos los marcos anatómicos utilizados en el análisis (modificado de D'Anatro & Loureiro, 2005).

Los individuos digitalizados corresponden a muestras conservadas en formol, pertenecientes a la Colección de vertebrados de Facultad de Ciencias (ZVC-P) (Anexo 2). Las imágenes digitales fueron obtenidas con un escáner Microtek ScanMaker4700. Los marcos anatómicos se digitalizaron a partir de las imágenes mediante el programa tpsDig 2 (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsdig2w32.exe>). Para cada ejemplar, cada uno de los marcos anatómicos queda definido por coordenadas cartesianas (x; y). Las coordenadas fueron alineadas en el programa tpsRelw

(<http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsrelww32.exe>), mediante una técnica de mínimos cuadrados conocida como sobreposición de Procrustes (Sneath, 1967; Gower, 1975; Siegel & Benson, 1982; Rohlf & Slice, 1990; Bookstein, 1991). En la misma, las configuraciones de los marcos anatómicos se rotan, trasladan y escalan, para retirar de los datos información tal como orientación, posición en la imagen y tamaño respectivamente (Rohlf & Slice, 1990). Este proceso de sobreposición produce un conjunto de coordenadas que localizan a cada espécimen en una superficie curva. Para proyectar los especímenes en un espacio de tangente lineal, de modo que la variación y covariación puedan ser analizadas con técnicas estadísticas multivariadas lineales, se utilizó la aproximación "thin plate spline" y componente uniforme (Bookstein, 1991), mediante el programa tpsRelw. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsrelww32.exe>). Esta técnica modela las transformaciones de la forma como si la configuración consenso (la configuración promedio de todos los especímenes) yaciera en la superficie de una placa de metal fina infinita. La función deforma la placa para transformar la configuración de referencia (consenso) en otra configuración (la deseada) y minimiza la energía necesaria para doblar la placa de metal. Los parámetros de la función ajustada representan un nuevo conjunto de variables que están contenidos en una nueva matriz llamada matriz de peso ("warps" parciales). La matriz obtenida para este trabajo consistió en 24 variables ("warps" parciales) y los componentes uniformes (estos últimos no fueron incluidos en los análisis).

A partir de dicha matriz se realizó un análisis discriminante, con el fin de evaluar la incidencia de pertenencia a un grupo en la variación de la forma de los individuos en el programa PAST 3.11 (Hammer et al., 2001). Para esto los individuos fueron agrupados según a la cuenca de pertenencia de la localidad donde fueron colectados y considerando a las localidades en el oeste del Río Negro y el Chuy como grupos separados de sus cuencas por el aislamiento espacial que tienen con el resto de las localidades de su propia cuenca. Dichos grupos son: Río Negro Oeste, Río Negro, Cuentas, Sarandí, Tacuarembó, Tacuarí, Chuy. 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 al cuadrado de Mahalanobis.

Se realizó también una matriz de clasificación de los individuos, para ver que tan bien quedaban clasificados según el criterio de grupos arbitrarios utilizado para el análisis discriminante. Se evaluó mediante una regresión lineal la relación entre la variación del tamaño de los individuos y

los coeficientes de la raíz canónica 1 y 2, para descartar la posible influencia del tamaño en la variación de la forma de los individuos. Dado el evidente dimorfismo sexual en la especie, machos y hembras fueron analizados separadamente en todos los análisis realizados. De los 198 individuos machos analizados: 19 pertenecen al grupo Cuentas, 38 al Chuy, 47 al Río Negro (este), 8 a Río Negro oeste, 5 a Sarandí, 67 a Tacuarí y 14 a Tacuarembó. De los 208 individuos hembras analizados: 21 pertenecen al grupo Cuentas, 21 al Chuy, 47 al Río Negro (este), 21 a Río Negro oeste, 3 a Sarandí, 82 a Tacuarí y 12 a Tacuarembó.

A modo de comparar los resultados obtenidos con el marcador mitocondrial y con el marcador morfométrico se realizó un Test de Mantel entre la matriz de los índices de FST y la matriz del análisis discriminante (Distancias de Mahalanobis), tanto para las hembras como para los machos. Este análisis se realizó en el programa Microsoft Excel (2007), con un complemento llamado XLSTAT.

RESULTADOS

Marcadores moleculares

Se obtuvieron un total de 179 secuencias de un fragmento de 662 pares de bases del gen citocromo b mitocondrial y un fragmento de 609 pares de bases de un total de 196 secuencias, para el marcador nuclear EPIC 1835. La cantidad de secuencias obtenidas para los dos marcadores moleculares se detallan en la tabla del anexo, según la localidad de pertenencia (Tabla 1A).

Estimación de las fases haplotípicas de ambas copias de los genes nucleares

Para el EPIC_1835 se encontraron 19 sitios ambiguos distribuidos en un total de 50 genotipos. El análisis realizado en el programa Phase logró estimar las fases haplotípicas de ambas copias de los genes nucleares con una probabilidad de resolución de la fase de cada sitio mayor a 0,6, a excepción de los siguientes sitios: sitio 39 para el individuo CAR_45, con una probabilidad de 0,54; sitio 114 para el individuo ARR_2, con una probabilidad de 0,59 y sitio 397 para el individuo CAR_113, con una probabilidad de 0,50. Estos sitios fueron excluidos de los análisis.

Índices de diversidad

A partir del alineamiento del fragmento de 662 pb del citocromo b, se observaron un total de 76 sitios variables (S) y 56 sitios parsimoniosamente informativos (Pi). La cantidad de

haplotipos encontrados fue 63, representando una diversidad haplotípica (H_d) de 0,928. La diversidad nucleotídica (π) para estos datos fue de 0,011. El contenido de G+C representó el 36,7 %.

Para los datos obtenidos del marcador EPIC 1835, el número de sitios usados para estimar los siguientes valores fue de 439, excluyendo los sitios con falta de datos. Se observaron un total de 21 sitios variables (S) y 18 sitios parsimoniosamente informativos (P_i). Se encontraron 20 haplotipos, representando una diversidad haplotípica de 0,755. La diversidad nucleotídica representó el 0,008. El contenido G+C representó el 32,6%.

	Citocromo b	EPIC 1835	Para
Pares de bases	662	609	ambos
Sitios variables (S)	76	21	marcador
Sitios parsimoniosamente informativos (P_i)	63	18	es
Contenido G + C	0,367	0,326	molecular
Nº de haplotipos	63	20	es
Diversidad haplotípica (H_d)	0,928	0,755	amplifica
Desvío estándar de H_d	0,015	0,022	dos es
Diversidad nucleotídica (π)	0,011	0,008	notoria la
Desvío estándar de π	0,00060	0,00067	alta H_d

encontrada, siendo más alta la encontrada para el marcador mitocondrial (Tabla 3).

Los valores de la H_d para cada localidad, se muestran en la Anexo 3.

Tabla 3. Valores de los índices de diversidad, para cada marcador molecular, obtenidos a partir del programa DNASP versión 5 (Librado et al., 2009).

Correlación entre diversidad molecular y orden de los ríos

El modelo de regresión entre la diversidad haplotípica y nucleotídica con el orden de los ríos que mejor se ajustó a los datos fue el de una regresión polinomial. Se realizó también una regresión lineal, que resultó de la siguiente manera: Div. Hap.: $R^2 = 0.33$, $p < 0.01$; Función de la curva: $y = 0.05 + 0.11 * x$; Div. nucl.: $R^2 = 0.1$, $p < 0.2$; Función de la curva: $y = 0.003 + 0.004 * x$

Los valores de los coeficientes de regresión, resultaron en ambos casos relativamente bajos ($R^2 = 0,49$ /div. Hap.; $R^2 = 0,36$ /div. Nuc.), aunque significativos ($p = 0,009$ /div. Hap.; $p = 0,0437$). En ambos casos se observó en los ordenes menores una tendencia al aumento de las diversidad en relación al aumento de orden y luego un leve decaimiento a partir del orden 7 (Figuras 6 y 7).

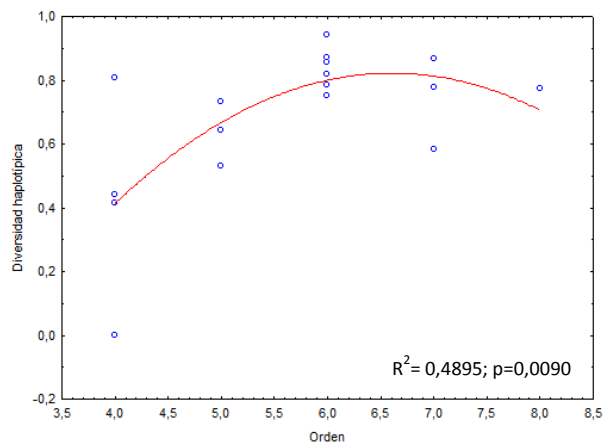


Figura 6. Regresión polinómica entre la diversidad haplotípica (Hd) de cada localidad y el orden del curso más cercano a cada localidad. Función de la curva: $y = -1.803 + 0.79 * x - 0.06 * x^2$

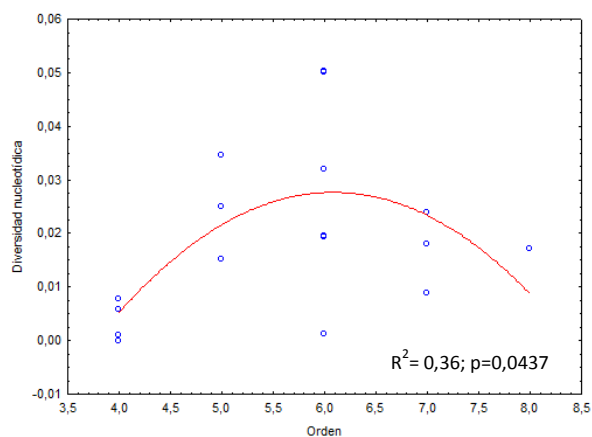


Figura 7. Regresión polinómica entre la diversidad nucleotídica (π) de cada localidad y el orden del curso más cercano a cada localidad. Función de la curva: $y = -0.16 + 0.06 * x - 0.005 * x^2$

Red haplotipos citocromo b

A modo general, en dicha red de haplotipos se observa que tanto los haplotipos correspondientes al Río Tacuarí (cuenca Tacuarí) y al Río Yaguarón (cuenca Tacuarí) se encuentran más cercanos a los haplotipos de la cuenca del Río Negro que entre ellos mismos. La red de haplotipos reconstruida a partir de las secuencias de citocromo b muestra una estructura marcada de los haplotipos según la cuenca a la que pertenecen (Fig. 8).. Sin embargo, existen casos particulares que se destacan como los haplotipos correspondientes a individuos de la localidad del Chuy y de Sarandí. Los haplotipos del Chuy quedan separados del resto de los haplotipos de esta cuenca (Río Tacuarí), por 10 cambios mutacionales. Los haplotipos de Sarandí (perteneciente a la cuenca del Río Negro) quedan más cercanos a la cuenca del Tacuarí, pero quedan separados del resto de los haplotipos de dicha cuenca por aproximadamente 8 pasos y del haplotipo más cercano de la cuenca del Río Negro por 14 pasos. Por otra parte los haplotipos de los individuos de la localidad del Cerro de las Cuentas también quedan separados del resto de los haplotipos de su cuenca (Río Negro) por aproximadamente 5 cambios mutacionales (Figura 8). Los haplotipos de las localidades de la cuenca del Río Tacuarembó quedan agrupados y separados de las demás cuencas, así como los haplotipos de la cuenca del Yaguarón. Sin embargo, hay un haplotipo compartido entre un individuo colectado en la localidad Cañada de los Molles (cuenca Río Negro) y un individuo de Paso de Melo (cuenca Río Yaguarón) (Figura 8). Para los individuos pertenecientes al Río Negro, se observa una topología con forma de estrella, con un haplotipo central altamente frecuente y varios haplotipos que se diferencian del central en uno o dos pasos mutacionales. Las secuencias que representan los haplotipos de la red del citocromo b aparecen detalladas en el anexo (Anexo 4).

Red de haplotipos EPIC 1835

La red de haplotipos reconstruida a partir de las secuencias del marcador nuclear muestra una estructura diferente a la encontrada para el marcador mitocondrial (Fig. 9). La mayoría de los

haplotipos correspondientes a localidades del Río Tacuarembó, quedan agrupados cercanos entre sí y separado del resto por al menos 6 pasos mutacionales. Los haplotipos más cercanos a este grupo pertenecen a la cuenca del Río Negro, siendo que el haplotipo 4 y 6, es compartido con individuos de la cuenca del Río Negro, más precisamente el Arroyo Sarandí. Por otro lado el haplotipo más frecuente de estos datos, está conformado por 56 secuencias, de las cuales 37 corresponden al Río Negro, 17 a Tacuarí y 2 a Paso de Melo. El siguiente haplotipo más frecuente, lo presentan 37 secuencias, de las cuales 23 pertenecen a individuos del Tacuarí y 14 a individuos del Río Negro. El siguiente haplotipo más frecuente, está representado por 14 secuencias del Río Negro, 6 del Tacuarí y 14 de Yaguarón. Estos tres haplotipos se encuentran separados por muy pocos cambios mutacionales. La única cuenca que queda agrupada como una unidad es la del Río Tacuarembó. Las secuencias que representan los haplotipos de la red del EPIC 1835 aparecen detalladas en el anexo (Anexo 5).

Citocromo b

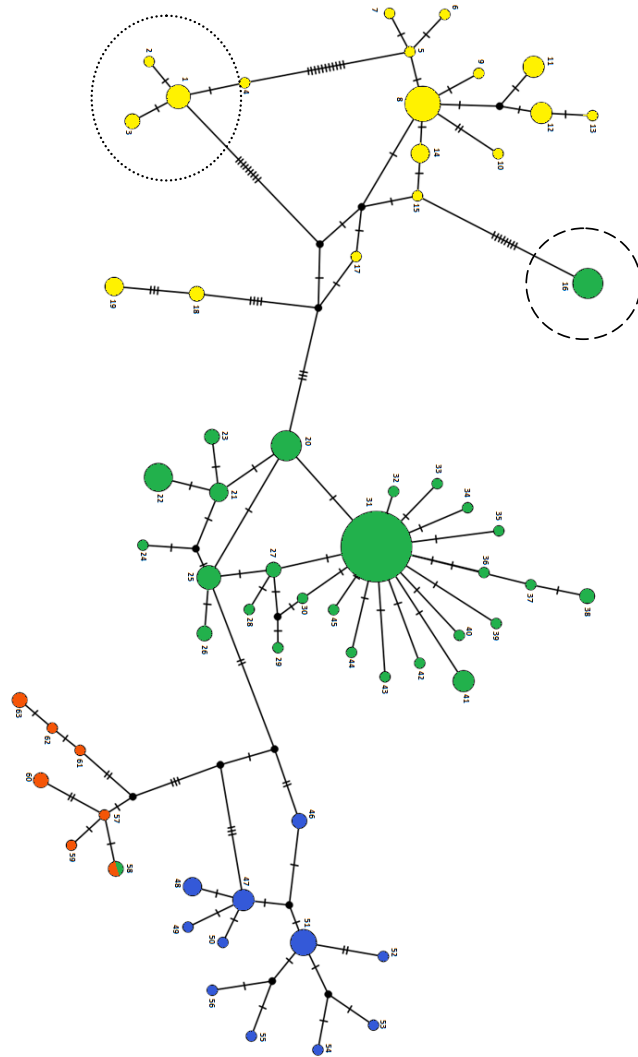


Figura 8. Red de haplotipos para el marcador citocromo b mitocondrial, realizada en el programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>). Los haplotipos se encuentran coloreados según la cuenca a la que pertenecen las secuencias de dicho haplotipo y la frecuencia en que se encuentran. Símbolos: **Verde** = Río Negro; **Amarillo** = Río Tacuarí; **Azul** = Río Tacuarembó; **Anaranjado** = Río Yaguarón; **Círculo punteado** = Chuy; **Círculo línea espaciada** = Sarandí. Los puntos negros corresponden a haplotipos hipotéticos.

EPIC_1835

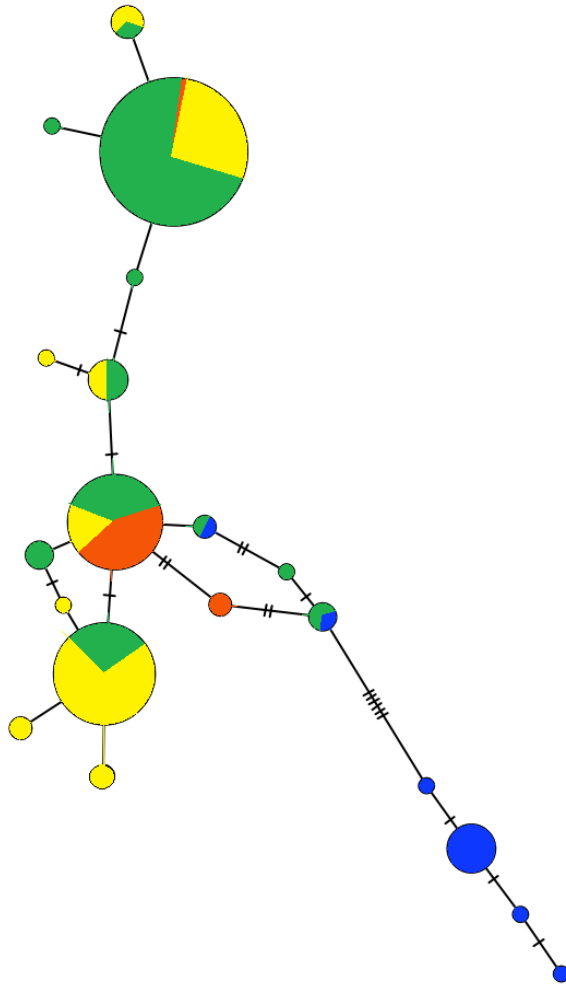


Figura 9. Red de haplotipos para el marcador EPIC_1835 nuclear, realizada en el programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>). Los haplotipos se encuentran coloreados según la cuenca a la que pertenecen las secuencias de dicho haplotipo y la frecuencia en que se encuentran. Símbolos: Símbolos: **Verde** = Río Negro; **Amarillo** = Río Tacuarí; **Azul** = Río Tacuarembó; **Anaranjado** = Río Yaguarón.

Análisis molecular de la varianza (AMOVA)

Para ambos marcadores, la hipótesis que mejor se ajustó a los datos, según el análisis de AMOVA fue la hipótesis D, que agrupa a las poblaciones en 7 grupos: Río Negro, Cuentas, Chuy, Tacuarembó, Tacuarí, Sarandí y Yaguarón. Para el caso del marcador mitocondrial la varianza entre los grupos representa aproximadamente el 74% de la varianza (Tabla 4), mientras que para el marcador nuclear sólo el 56% (Tabla 5).

Tabla 4. Análisis de la varianza molecular (Amova) en *A. arachan*, para citocromo b mitocondrial. Los componentes de la varianza y los índices de fijación resultaron significativos ($p < 0,05$), con 10000 réplicas. Se resaltan con negrita los resultados del agrupamiento que mejor se ajustó a los datos fue la hipótesis D: Río Negro, Tacuarí, Tacuarembó, Yaguarí, Yaguarón, Cuentas, Chuy.

Agrupamiento	% Vc entre grupos	% Vc entre poblaciones dentro de los grupos	% Vc dentro de poblaciones	FSC	FST	FCT
A	2,46	75,4	75,4	0,773	0,779	0,025
B	32,1	49,5	18,5	0,728	0,815	0,321
C	57,2	22,5	20,3	0,525	0,797	0,572
D	74,4	7,21	18,4	0,282	0,816	0,744

Tabla 5. Análisis de la varianza molecular (Amova) en *A. arachan*, para EPIC. Los componentes de la varianza y los índices de fijación resultaron significativos ($p < 0,05$), con 10000 réplicas. Se resaltan con negrita los resultados del agrupamiento que mejor se ajustó a los datos fue la hipótesis D: Río Negro, Tacuarí, Tacuarembó, Yaguarí, Yaguarón, Cuentas, Chuy.

Agrupamiento	% Vc entre grupos	% Vc entre poblaciones dentro de los grupos	% Vc dentro de poblaciones	FSC	FST	FCT
A	6,38	46,4	47,3	0,495	0,527	0,064
B	32,1	49,5	18,5	0,728	0,816	0,321
C	39,7	13,9	46,4	0,231	0,536	0,397
D	56,3	4,35	39,4	0,099	0,606	0,563

Test de neutralidad

El test D de Tajima fue evaluado para ambos marcadores moleculares, mientras que el test Fu de Fu fue evaluado solo para el caso del marcador mitocondrial, por no soportar recombinación de los datos. Ambos test se evaluaron para los agrupamientos obtenidos en el AMOVA. Para el caso del marcador mitocondrial ambos test resultaron significativos, para las poblaciones Río Negro; para las poblaciones de Tacuarembó y Chuy resultaron significativos en el caso del test

de Fu. En todos estos casos los índices fueron negativos, sugiriendo un apartamiento del equilibrio de H-W de dichas poblaciones. En el caso particular de la población Sarandí para el marcador mitocondrial, el test de Fu no pudo ser computado por contar con un único alelo (Tabla 6). Para el caso del marcador nuclear el test D de Tajima no resultó significativo para ninguna de las poblaciones.

Tabla 6. Valores de los índices de los test de neutralidad, Tajima (D) y Fu (FS), para cada grupo inferido por el análisis de AMOVA, para el marcador mitocondrial. Los valores en negrita son los que resultaron estadísticamente significativos P (D simul < D obs), a través de 1000 simulaciones. Los valores de D (Tajima) a la izquierda de la celda corresponden al marcador mitocondrial y a la derecha al marcador nuclear.

	Río Negro		Tacuarembó		Chuy		Tacuarí		Cuentas: 31K		Yaguarón		Sarandí: 23K	
D (Tajima)	-2,35	1,55	-1,23	-1,05	-0,812	1,27	-1,25	-0,144	-0,762	-	0,648	-0,888	-	0,320
FS (Fu)	-26,0		-4,30		-1,39		-3,25		-0.616		-1,92		-	

Análisis de la “distribución de las diferencias pareadas”

Se realizaron análisis de distribución de las diferencias pareadas, para las poblaciones inferidas del mejor agrupamiento encontrado según el análisis de AMOVA.

Para el marcador citocromo b, la población de Río Negro experimentó una expansión poblacional reciente, ya que presenta una distribución unimodal muy evidente (Figura 10). El índice de desigualdad de Harpending resultó igual a 0,041 y el índice de la suma de los cuadrados igual a 0, lo que indica que los datos observados se ajustan bien al modelo, apoyando la hipótesis de expansión poblacional (Tabla 7).

Para la población del Chuy también se observa una gráfica unimodal, aunque los datos observados en este caso no se ajustan tan bien al modelo simulado. Para la población de Sarandí no se pudo computar el análisis, debido a que la varianza de la distribución de las distancias pareadas era demasiado pequeña. Para todas las poblaciones, excepto Tacuarembó en el caso del test del Índice de desigualdad de Harpending, ambos test evaluados (SSD y Harpending) no resultaron estadísticamente significativos, por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula de expansión poblacional.

Para el caso del marcador nuclear (EPIC 1835), no se observa una clara distribución unimodal de la grafica para ninguna de las poblaciones (Figura 11). Sin embargo, ambos test computados para este análisis (SSD y Harpending) no resultaron significativos (Tabla 8), por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula de expansión poblacional. Para la población de Cuentas tampoco se pudo computar el análisis por la misma razón.

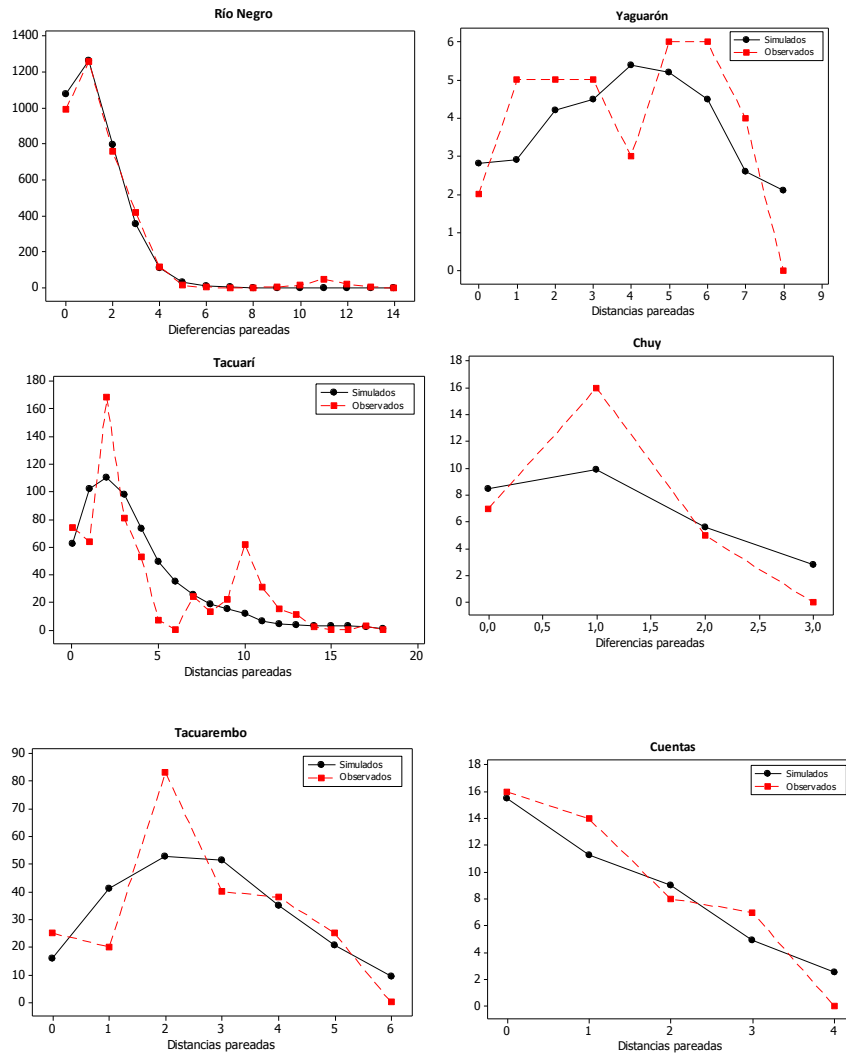


Figura 10. Gráficas de las distribuciones pareadas para cada población, para el marcador citocromo b mitocondrial. La línea continua representan los valores simulados por el modelo bajo una asunción de expansión poblacional y la línea punteada representa los valores observados.

Tabla 7. Índice de desigualdad de Harpending e índice de la suma de los cuadrados, con los valores estadísticos asociados, según 1000 réplicas y un índice de confianza de 0,10, para marcador citocromo b mitocondrial.

	Río Negro	Tacuarembó	Tacuarí	Chuy	Cuentas	Sarandí	Yaguarón
Suma de la desviación de los cuadrados (SSD)	0,000	0,027	0,031	0,048	0,004	-	0,012
p (SSD sim. >= SSD obs.)	0,750	0,080	0,240	0,200	0,810	-	0,820
Índice de desigualdad de Harpending	0,041	0,124	0,063	0,290	0,044	-	0,032
p (r sim. >= r obs.)	0,770	0,020	0,100	0,150	0,990	-	0,970

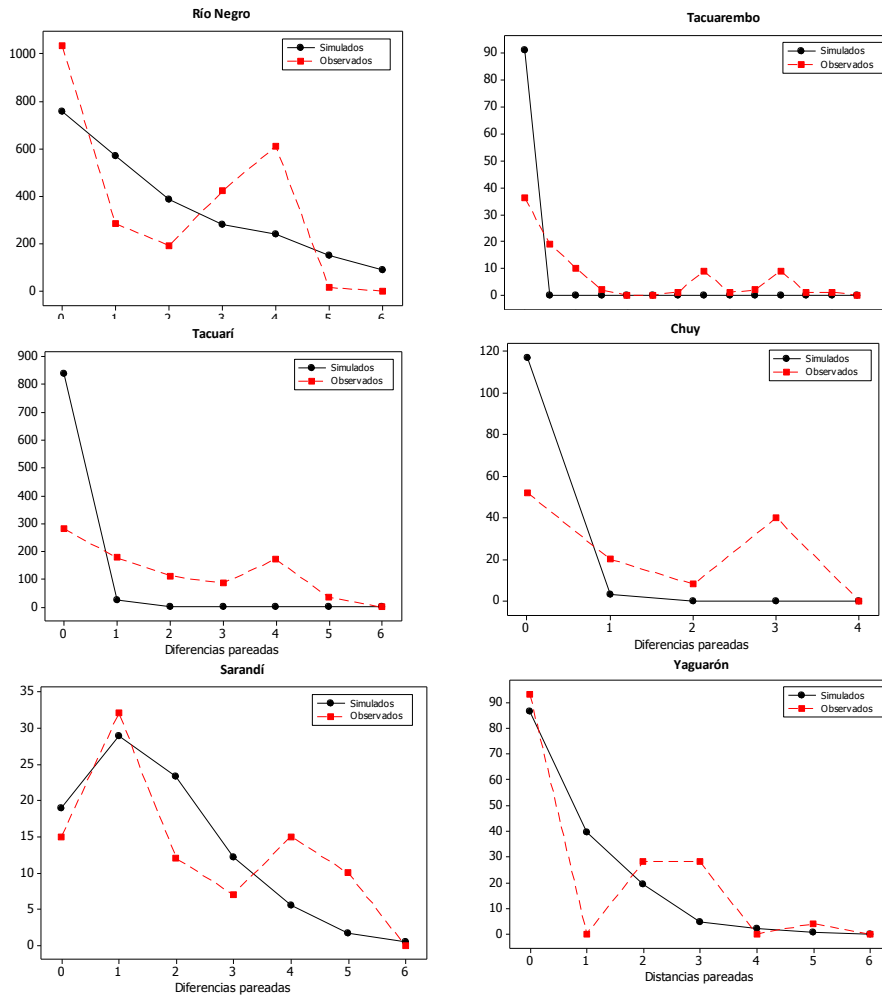


Figura 11. Gráficas de las distribuciones pareadas para cada población, para el marcador EPIC_1835. La línea continua representan los valores simulados por el modelo bajo una asunción de expansión poblacional y la línea punteada representa los valores observados.

Tabla 8. Índice de desigualdad de Harpending e índice de la suma de los cuadrados, con los valores estadísticos asociados, según 1000 réplicas y un índice de confianza de 0,10, para marcador citocromo b mitocondrial.

	Río Negro	Tacuarembó	Tacuarí	Chuy	Cuentas	Sarandí	Yaguarón
Suma de la desviación de los cuadrados (SSD)	0,025	0,442	0,566	0,464	-	0,042	0,087
p (SSD sim. >= SSD obs.)	0,600	0,000	0,000	0,000	-	0,120	0,130
Índice de desigualdad de Harpending	0,155	0,082	0,058	0,263	-	0,109	0,438
p (r sim. >= r obs.)	0,700	1,00	1,00	0,970	-	0,380	0,270

Índices de fijación: F_{ST}

Los valores del índice F_{ST} , muestran en general un alto nivel de estructuración para la mayoría de las poblaciones para el marcador mitocondrial, sugiriendo un bajo nivel de flujo génico entre poblaciones, siendo en general mayor el flujo génico entre poblaciones dentro de la misma cuenca. La mayoría de los valores calculados resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$; Tabla 9).

Para el marcador nuclear las distancias resultaron mucho menores, siendo que la única cuenca que presenta muy baja estimación de intercambio de migrantes con el resto es la del Tacuarembó, , por otra parte la población correspondiente al Cerro de las Cuentas también presenta baja estimación de intercambio de migrantes con el resto (Tabla 10). El nivel de estructuración no sigue el mismo patrón que el encontrado para el marcador mitocondrial, en cuanto a la relación entre el nivel de flujo génico entre las poblaciones y la pertenencia a la misma cuenca o no. Por otra parte muchos de los valores calculados no resultaron significativos ($p > 0,05$; Tabla 10).

Citocromo b

Tabla 9. Debajo de la diagonal las distancias pareadas (F_{ST}), entre las localidades muestreadas, para el marcador citocromo b mitocondrial, en negrita los valores que resultaron estadísticamente significativos ($P < 0,05$), a través de 1000 pseudoréplicas. Arriba de la diagonal la estimación del número de migrantes por generación ($M=Nm$). Estos valores se obtuvieron mediante el programa Arlequín, Versión 3.1.

	Yaguari	Caraguata	Cuentas	Mazangano	Aguiar	Arriera	Lechiguana	Cololó	Molles	329	Tacuari	Conventos	Tres B.	Codo	P.Melo	Sarandí	Chuy
Yaguari		0,846	0,08	0,113	0,098	0,093	0,056	0,104	0,148	0,074	0,191	0,371	0,111	0,087	0,144	0,031	0,045
Caraguata	0,371		0,123	0,161	0,144	0,138	0,089	0,137	0,195	0,117	0,244	0,454	0,148	0,131	0,165	0,054	0,066
Cuentas	0,858	0,802		0,738	0,269	0,257	0,150	0,401	0,442	0,198	0,166	0,267	0,093	0,067	0,120	0,026	0,036
Mazangano	0,815	0,756	0,404		3,55	2,44	1,74	4,23	11,0	3,28	0,224	0,354	0,129	0,106	0,152	0,045	0,053
Aguiar	0,835	0,776	0,650	0,123		4,96	4,00	2,19	∞	∞	0,183	0,297	0,104	0,079	0,133	0,032	0,042
Arriera	0,844	0,783	0,660	0,170	0,092		1,68	1,20	8,23	3,49	0,196	0,316	0,108	0,079	0,136	0,030	0,042
Lechiguana	0,899	0,849	0,769	0,223	0,111	0,229		1,09	6,74	3,72	0,120	0,214	0,066	0,042	0,086	0,012	0,022
Cololó	0,827	0,785	0,555	0,106	0,186	0,294	0,315		3,10	1,84	0,156	0,225	0,102	0,093	0,112	0,044	0,045
Molles	0,772	0,719	0,531	0,043	<0,000001	0,057	0,069	0,139		∞	0,273	0,402	0,161	0,142	0,201	0,067	0,072
329	0,872	0,810	0,716	0,132	<0,000001	0,125	0,118	0,213	<0,000001		0,161	0,276	0,085	0,053	0,116	0,015	0,028
Tacuari	0,723	0,672	0,751	0,691	0,732	0,718	0,806	0,762	0,647	0,756		1,12	1,20	∞	0,227	0,091	0,142
Conventos	0,574	0,524	0,652	0,586	0,628	0,613	0,700	0,689	0,554	0,645	0,308		0,665	0,665	0,334	0,166	0,162
Tres B.	0,818	0,771	0,843	0,795	0,827	0,822	0,884	0,830	0,757	0,855	0,295	0,429		0,591	0,155	0,052	0,062
Codo	0,851	0,793	0,881	0,827	0,864	0,864	0,923	0,843	0,779	0,904	<0,000001	0,429	0,458		0,131	0,020	0,040
P.Melo	0,776	0,751	0,807	0,767	0,790	0,786	0,853	0,817	0,713	0,811	0,687	0,600	0,763	0,793		0,093	0,078
Sarandí	0,941	0,903	0,951	0,918	0,939	0,943	0,976	0,919	0,882	0,971	0,845	0,751	0,905	0,961	0,843		0,013
Chuy	0,917	0,883	0,932	0,904	0,923	0,922	0,959	0,917	0,874	0,947	0,780	0,756	0,889	0,926	0,865	0,975	

Epic 1835

Tabla 10. Debajo de la diagonal las distancias pareadas (F_{ST}), entre las localidades muestreadas, para el marcador EPIC_1835 nuclear, en negrita los valores que resultaron estadísticamente significativos ($P < 0,05$), a través de 1000 pseudoréplicas. Arriba de la diagonal la estimación del número de migrantes por generación ($M=2Nm$). Estos valores se obtuvieron mediante el programa Arlequín, Versión 3.1.

	Yaguari	Caraguata	Cuentas	Mazangano	Aguiar	Arriera	Lechiguana	Molles	329	Tacuari	Conventos	Tres B.	Codo	P.Melo	Sarandí	Chuy
Yaguari		4,07	0,007	0,053	0,077	0,057	0,058	0,079	0,073	0,090	0,063	0,011	0,061	0,048	0,091	0,053
Caraguata	0,109		0,061	0,164	0,179	0,171	0,318	0,177	0,181	0,217	0,200	0,095	0,186	0,146	0,245	0,142
Cuentas	0,985	0,891		1,509	0,917	0,605	0,106	0,907	1,06	0,586	0,076	<0,000001	0,115	0,104	0,130	1,23
Mazangano	0,905	0,753	0,249		∞	18,0	∞	∞	∞	9,97	0,427	0,123	0,695	0,468	0,478	∞
Aguiar	0,867	0,736	0,353	<0,000001		25,6	∞	∞	∞	∞	0,925	0,362	1,91	0,890	0,767	30,1
Arriera	0,897	0,745	0,452	0,027	0,019		∞	16,6	∞	18,8	0,539	0,155	0,857	0,701	0,619	18,3
Lechiguana	0,896	0,611	0,825	<0,000001	<0,000001	<0,000001		∞	∞	∞	1,58	0,075	8,06	3,66	2,63	∞
Molles	0,864	0,739	0,355	<0,000001	<0,000001	0,029	<0,000001		∞	∞	0,991	0,406	2,13	0,944	0,793	16,0
329	0,872	0,734	0,320	<0,000001	<0,000001	<0,000001	<0,000001	<0,000001		∞	0,732	0,269	1,36	0,873	0,734	∞
Tacuari	0,848	0,698	0,460	0,048	<0,000001	0,026	<0,000001	<0,000001	<0,000001		1,59	0,497	4,29	1,37	1,14	6,48
Conventos	0,888	0,714	0,869	0,540	0,351	0,481	0,240	0,335	0,406	0,239		2,37	87,5	1,03	1,89	0,407
Tres B.	0,978	0,841	1,00	0,803	0,580	0,764	0,870	0,552	0,650	0,502	0,174		1,68	0,312	0,626	0,152
Codo	0,892	0,729	0,813	0,418	0,207	0,368	0,058	0,190	0,269	0,104	0,006	0,229		1,98	2,29	0,685
P.Melo	0,912	0,774	0,828	0,517	0,360	0,416	0,120	0,346	0,364	0,268	0,326	0,616	0,201		5,00	0,562
Sarandí	0,846	0,671	0,794	0,511	0,395	0,447	0,160	0,387	0,405	0,305	0,209	0,444	0,179	0,091		0,496
Chuy	0,904	0,779	0,289	<0,000001	0,016	0,027	<0,000001	0,030	<0,000001	0,072	0,551	0,766	0,422	0,471	0,502	

Correlación entre Matriz genética y Matriz de distancias geográficas

Se realizó el Test de Mantel entre la matriz genética de citocromo b (Índices de F_{ST}) y la matriz de distancias entre las localidades, medidas en kilómetros. No se realizó este test para la matriz genética del marcador nuclear, por no observarse en la red de haplotipos de dicho marcador algún tipo de estructura asociada a las localidades de pertenencia de las poblaciones y sus cuencas. El índice de correlación entre ambas matrices fue muy bajo y no significativo, por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula de que ambas matrices no están correlacionadas.

Tabla 11. Índice de correlación y valor p asociado, entre la matriz genética del citocromo b (índices de F_{ST}) y la matriz de distancias entre las localidades (Km). Análisis realizado con el complemento XLSTAT del Microsoft Excel (2207).

	F_{ST} cyt b (A)/distancias (B)
r (A/B)	0,145
Valor p	0,096
alfa	0,05

Modelos evolutivos

Para el citocromo b mitocondrial, el modelo que mejor se ajustó a los datos fue Tamura Nei + G, 1993, con distribución gamma no uniforme de la tasa de sustitución entre sitios, con parámetro $\alpha = 0,117$. La relación entre la tasa de transiciones y transversiones fue de 16,08. Las frecuencias de las bases, las siguientes: $f_A = 0,255$; $f_C = 0,222$; $f_G = 0,145$; $f_T = 0,378$.

Para el gen nuclear (EPIC 1835), el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el Hasegawa Kishino Yano + I, 1985. La relación entre la tasa de transiciones y transversiones fue de 3,36. Las frecuencias de las bases, las siguientes: fA= 0,319; fC= 0,160; fG= 0,178; fT= 0,342.

Análisis de número de clusters poblacionales

Para realizar el análisis con Geneland se excluyó en el caso del citocromo b mitocondrial, los datos correspondientes a la localidad de Cololó (oeste del Río Negro), debido al "gap" de distribución de *A. arachan* en la zona media del curso principal del Río Negro, por la presencia de las represas de Palmar, de Baygorria y del Rincón del Bonete) (Figura 2). En el anexo se muestra el mapa obtenido cuando se incluyen los datos de la localidad de Cololó (Anexo 8). Las 4 réplicas simuladas bajo los mismos parámetros iniciales arrojaron el mismo resultado del número más probable de clústers para ambos set de datos.

Para el marcador citocromo b, el número más probable de clústers (k) fue de 5 y se obtuvo una buena convergencia de las cadenas de MCMC para dicho parámetro (Anexo 6). Los 5 clúster representan de manera espacial las cuencas: Río Negro, Río Tacuarembó, Río Yaguarón y coloca a la localidad Chuy en un clúster separado (Figura 12). Con la peculiaridad de que la localidad de Sarandí queda agrupada dentro del clúster de la cuenca del Río Yaguarón y no con el de la cuenca del Río Negro, como sería esperable (Figura 12). Las probabilidades de pertenencia de las poblaciones (localidades) a los clústers resultaron igual a 1 para el clúster dentro del cual se posicionó a la población (Figura 13).

Para el marcador EPIC_1835, el número más probable de clúster (k) fue de 3 y se obtuvo una buena convergencia de las cadenas de MCMC para dicho parámetro (Anexo 7). La representación espacial de las poblaciones agrupa a la mayoría de las poblaciones del Río Negro en un mismo clúster, pero también incluyendo dentro de este clúster a dos localidades de la cuenca del Río Tacuarí (localidades Chuy y Tacuarí), por otro lado las demás localidades del Río Tacuarí quedan agrupadas dentro del mismo clúster, junto con la localidad Sarandí y Paso de Melo. El tercer clúster lo conforman las dos localidades de la cuenca del Río Tacuarembó (Figura 14). Para este marcador la probabilidad de pertenencia de las poblaciones (localidades) a los clúster resultaron mayores, con porcentajes de alrededor del 70% para el clúster con mayor probabilidad (Figura 15).

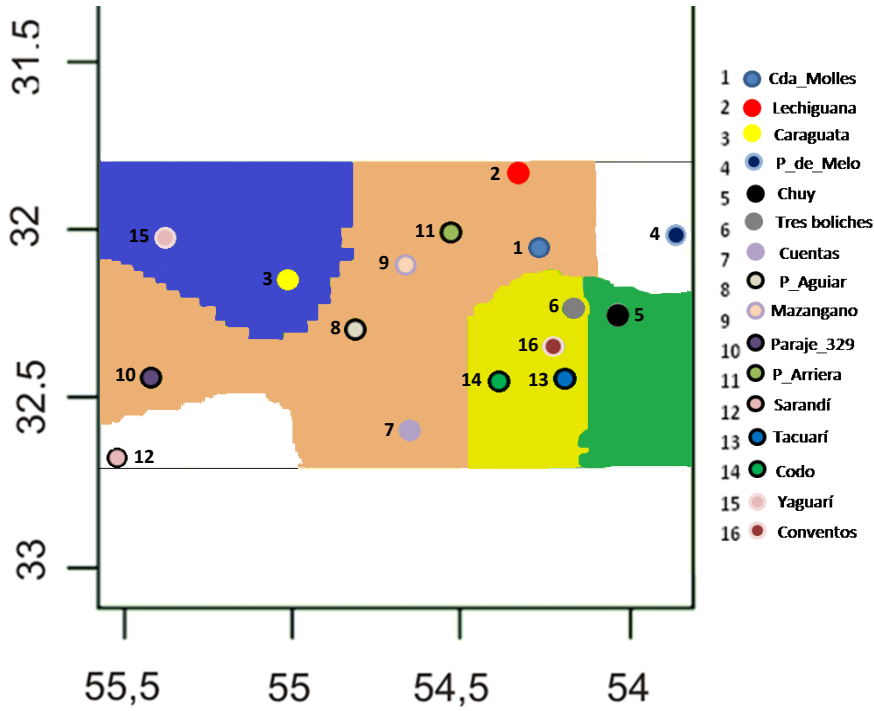


Figura 12. Mapa del valor de asignación a cada uno de los 5 grupos inferidos para cada uno de los píxeles del área de estudio, para el marcador citocromo b. Los puntos representan las localidades de pertenencia de los individuos. Superficie Azul= clúster "Tacuarembó"; superficie Anaranjada= clúster "Río Negro"; superficie Amarilla= clúster "Tacuarí"; superficie Verde= clúster "Chuy"; superficie Blanca= clúster "Yaguarón".

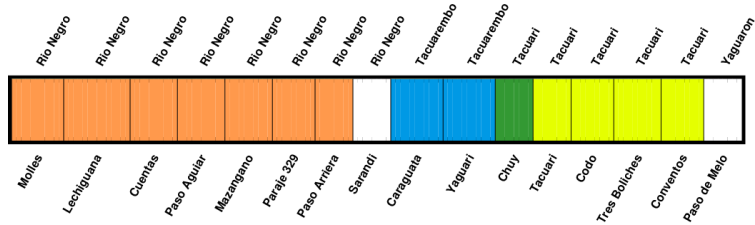


Figura 13. Representación gráfica de la probabilidad de pertenencia de cada localidad de muestreo a los clusters inferidos por el programa Geneland, para el marcador citocromo b. Las etiquetas encima de la figura representan la cuenca a la que corresponde cada localidad. Las etiquetas abajo hacen referencia a las localidades.

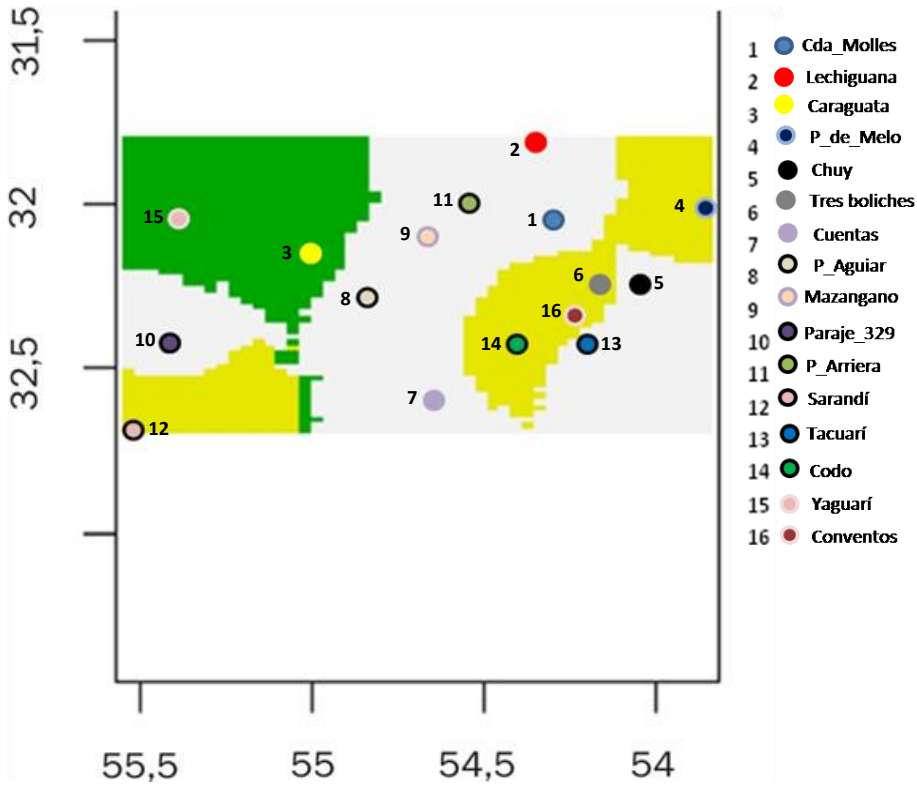


Figura 14. Mapa del valor de asignación a cada uno de los 3 grupos inferidos para cada uno de los pixeles del área de estudio, para el marcador nuclear EPIC_1835. Los puntos representan las localidades de pertenencia de los individuos. Superficie Amarilla= clúster "Tacuarí"; superficie Verde= clúster "Tacuarembó"; superficie Blanca= clúster "Río Negro".

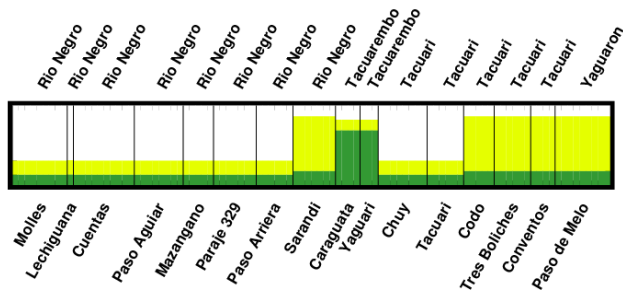


Figura 15. Representación gráfica de la probabilidad de pertenencia de cada localidad de muestreo a los clusters inferidos por el programa Geneland, para el marcador EPIC 1835. Las etiquetas encima de la figura representan la cuenca a la que corresponde cada localidad. Las etiquetas abajo hacen referencia a las localidades.

Flujo génico y direccionalidad

Citocromo b

El modelo que mejor se ajustó a los datos fue el modelo F (Tabla 12, Fig. 16).

Tabla 12. Modelos evaluados mediante el LBF, para el marcador citocromo b, con el programa Migrate-n. Se indican los números de parámetros estimados para cada modelo, el MLE y el LBF calculado.

	Modelo A (M ₀)	Modelo B	Modelo C	Modelo D	Modelo E	Modelo F
N° de parámetros	5	25	9	17	9	12
$\ln(\text{Prob}(D M))$	-2050,78	-1615,14	-1761,45	-1993,57	-1966,59	-1607,73
$\text{LBF} = 2 * \ln(\text{Prob}(D M_0)) - \ln(\text{Prob}(D M_i))$	0	-871,28	-578,66	-114,42	-168,38	-886,10
$\text{Prob.}(\text{model } i) = \frac{mL_{\text{model } i}}{\sum mL_{\text{model } j}}$	~0	0,000605	~0	~0	~0	0,999999

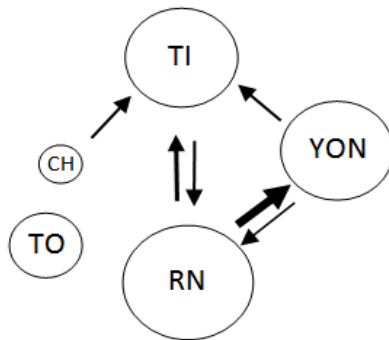


Figura 16. Figura representativa del modelo que resultó más representativo de los datos, según el LBF, para el marcador citocromo b. Los círculos representan el tamaño poblacional escalado por la tasa mutacional (parámetro θ) y las flechas representan el sentido y el peso relativo (representado por el grosor de las flechas) del parámetro M (migración escalada por la tasa mutacional). TI: Tacuarí, CH: Chuy, TO: Tacuarembó, RN: Río Negro, YON: Yaguarón.

Para todos los modelos probados el ESS (Effective sample size) para cada parámetro calculado, resultó muy mayor a 500, lo cual es un indicador de una buena estimación de los parámetros. Además las gráficas de la distribución a posteriori de los parámetros muestran una buena estimación de los parámetros.

EPIC 1835

El modelo que mejor se adaptó a los datos fue el modelo E (Tabla 13, Fig. 17).

Tabla 13. Modelos evaluados mediante el LBF, para el marcador EPIC 1835, con el programa Migrate-n. Se indican los números de parámetros estimados para cada modelo, el MLE y el LBF calculado.

	Modelo A (M ₀)	Modelo B	Modelo C	Modelo D	Modelo E
N° de parámetros	3	9	5	5	5
ln(Prob(D M))	-1860,75	-1617,60	-1661,59	-1669,07	-1610,32
LBF= 2*ln(Prob(D M ₀))- ln(Prob(D M _i))	0	-486	-398	-384	-500,86
Prob.(model _i)=mLmodel _i /ΣmLmodel _j	~0	0,000689	~0	~0	0,999999

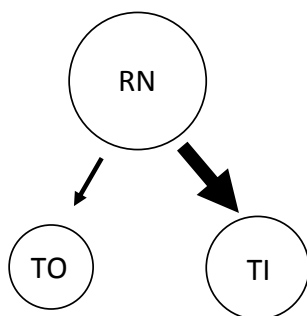


Figura 17. Figura representativa del modelo que resultó más representativo de los datos, según el LBF, para el marcador EPIC 1835. Los círculos representan el tamaño poblacional escalado por la tasa mutacional (parámetro θ) y las flechas representan el sentido y el peso relativo (representado por el grosor de las flechas) del parámetro M (migración escalada por la tasa mutacional). TI: Tacuarí, TO: Tacuarembó, RN: Río Negro.

Nuevamente, para todos los modelos probados, el ESS (Effective sample size) para cada parámetro calculado, resultó muy mayor a 500, lo cual es un indicador de una buena estimación de los parámetros. Las gráficas de la distribución posterior de cada parámetro resultantes de la corrida del programa muestran una buena estimación de los parámetros.

Para el marcador mitocondrial, las tasas de migración resultaron mucho más bajas que para el marcador nuclear, siendo todas muy similares a excepción de la tasa que representa migración (escalada por la mutación) desde Río Negro a Yaguarón, que resultó relativamente más alta que el resto. La población con mayor tamaño poblacional estimado (Θ) fue Río Negro, seguido por Tacuarí y Yaguarón, que presentaron tamaño poblacional similar entre sí.

Para el marcador nuclear, la tasa de migración (escalada por la mutación) desde Río Negro a Tacuarí resultó tres órdenes mayor que la tasa desde la misma población hacia Tacuarembó.

En las siguientes tablas se detallan los valores de los parámetros calculados por el análisis del Migrate-N, para los modelos que mejor explican los datos para ambos marcadores moleculares. La población con mayor tamaño poblacional estimado (Θ), para este marcador, fue para Tacuarí, seguido por el Río Negro y luego Tacuarembó.

Tabla 14. Estimación de la media de la tasa de migración escalada ($M=m/\mu$) y la media del tamaño poblacional escalado (θ), mediante el análisis realizado con el Migrate-N sobre los datos mitocondriales. A la derecha del valor M se muestra el valor de Nm (n° de migrantes por generación). Los grupos fuente están representados en las columnas (Población j) y los grupos sumideros en las filas (Población i). Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza del 95%. $\Theta=Ne\mu$, siendo Ne : tamaño efectivo poblacional y μ : tasa mutacional por sitio por generación. $M=m/\mu$, siendo m : tasa de migración.

Población j						
Población i	θ	Río Negro	Tacuarembó	Tacuarí	Yaguarón	Chuy
Río Negro	0,00614 (0,00453-0,00973)	-	-	36,4 (0-117,3)/0,157	25,8 (0-76,7)/0,106	-
Tacuarembó	0,00063 (0,000001-0,00227)	-	-	-	-	-
Tacuarí	0,00432 (0,00087-0,00807)	60,3 (0-206)/0,37	-	-	47,4 (0-168)/0,194	40,3 (0-109,3)/0,010
Yaguarón	0,00411 (0,00007-0,00867)	142,8 (0,7-341,3)/0,877	-	-	-	-
Chuy	0,00026 (0,000001-0,00153)	-	-	-	-	-

Tabla 15. Estimación de la media de la tasa de migración escalada ($M=m/\mu$) y la media del tamaño poblacional escalado (θ), mediante el análisis realizado con el Migrate-N sobre los datos nucleares. A la derecha del valor M se muestra el valor de Nm (n° de migrantes por generación). Los grupos fuente están representados en las columnas (Población j) y los grupos sumideros en las filas (Población i). Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza del 95%. $\Theta=4Ne\mu$, siendo Ne : tamaño efectivo poblacional y μ : tasa mutacional por sitio por generación. $M=m/\mu$, siendo m : tasa de migración.

Población j				
Población i	θ	Río Negro	Tacuarembó	Tacuarí
Río Negro	0,00926 (0,00540-0,13470)	-	-	-
Tacuarembó	0,00628 (0,00073-0,01333)	280,9 (32,0-618,0)/2,60	-	-
Tacuarí	0,01104 (0,00453-0,01847)	826,7 (579,3-1000,0)/7,66	-	-

Morfometría geométrica

Machos

La raíz canónica 1 y la raíz canónica 2 del análisis discriminante representaron aproximadamente el 39% y el 22% de la varianza total del grupo de datos, respectivamente, por lo cual sólo estos dos fueron utilizados para la representación gráfica. La correlación entre el tamaño del centroide y las raíces discriminantes (1 y 2) no mostró una relación lineal entre ambas variables (valor r para raíz 1 = 0,014; $p = 0,844$, valor r para raíz 2 = 0,223; $p = 0,002$; Anexos 9 y 10). El análisis discriminante presentó diferencias significativas entre los grupos (Lambda de Wilks= 0,146; $p < 0,05$). A lo largo de la raíz 1 se observa una discriminación de los individuos pertenecientes al grupo "Chuy", hacia el lado positivo del eje y se observa también una leve discriminación, hacia el lado opuesto del grupo "Cuentas" (Figura 18). Los individuos que se apartan de la forma consenso hacia la raíz positiva tienden a tener una forma más alargada y estilizada, mientras que los que se apartan del consenso hacia la raíz negativa tienden a tener una forma más comprimida y robusta. La discriminación de estos dos grupos, fueron significativos según las distancias cuadradas de Mahalanobis (Tabla 16).

Por otro lado, a lo largo de la raíz 2 se observa discriminación hacia el lado positivo del eje del grupo Río Negro oeste y hacia el lado negativo del grupo Tacuarembó. En cuanto a los cambios observados en la forma sobre el eje de esta raíz, los individuos que se discriminan hacia el lado positivo de la raíz 2 tienden a tener una cabeza más comprimida y el comienzo de la aleta dorsal más desplazado hacia arriba y atrás. Por otro lado los individuos que se diferencian hacia el lado opuesto de la raíz, tienden a tener los cambios opuestos, una cabeza más alargada y el comienzo de la aleta dorsal se desplaza hacia la parte antero inferior (Figura 19). En referencia a las distancias de Mahalanobis, la mayor distancia (significativa) se observa para los pares Sarandí-Cuentas, mientras que la menor distancia (significativa) es para los pares Río Negro-Tacuarí. La única distancia que no resultó significativa fue entre los grupos Sarandí-Río Negro Oeste (Tabla 16). La distancia de Mahalanobis que no resultó significativa fue el par Tacuarí - Sarandí, probablemente se deba al bajo número de datos para la localidad de Sarandí (5 individuos). En cuanto a la matriz de clasificación esta muestra que el 69% del total de los individuos fueron asignados correctamente al grupo. El grupo que presenta el mejor porcentaje de clasificación (78,57%) es Tacuarembó (Tabla 17).

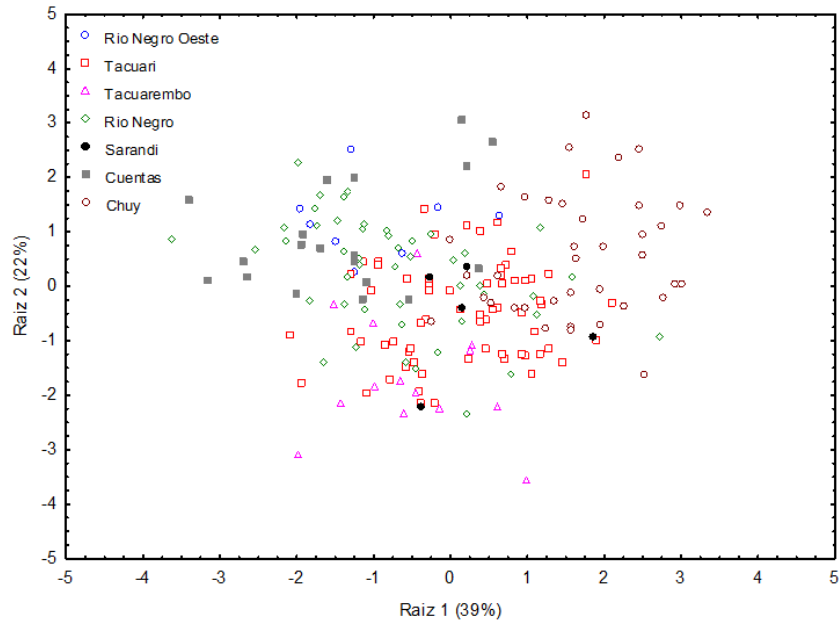


Figura 18. Raíz 1 vs. Raíz 2 de función lineal discriminante realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos machos de los distintos grupos.

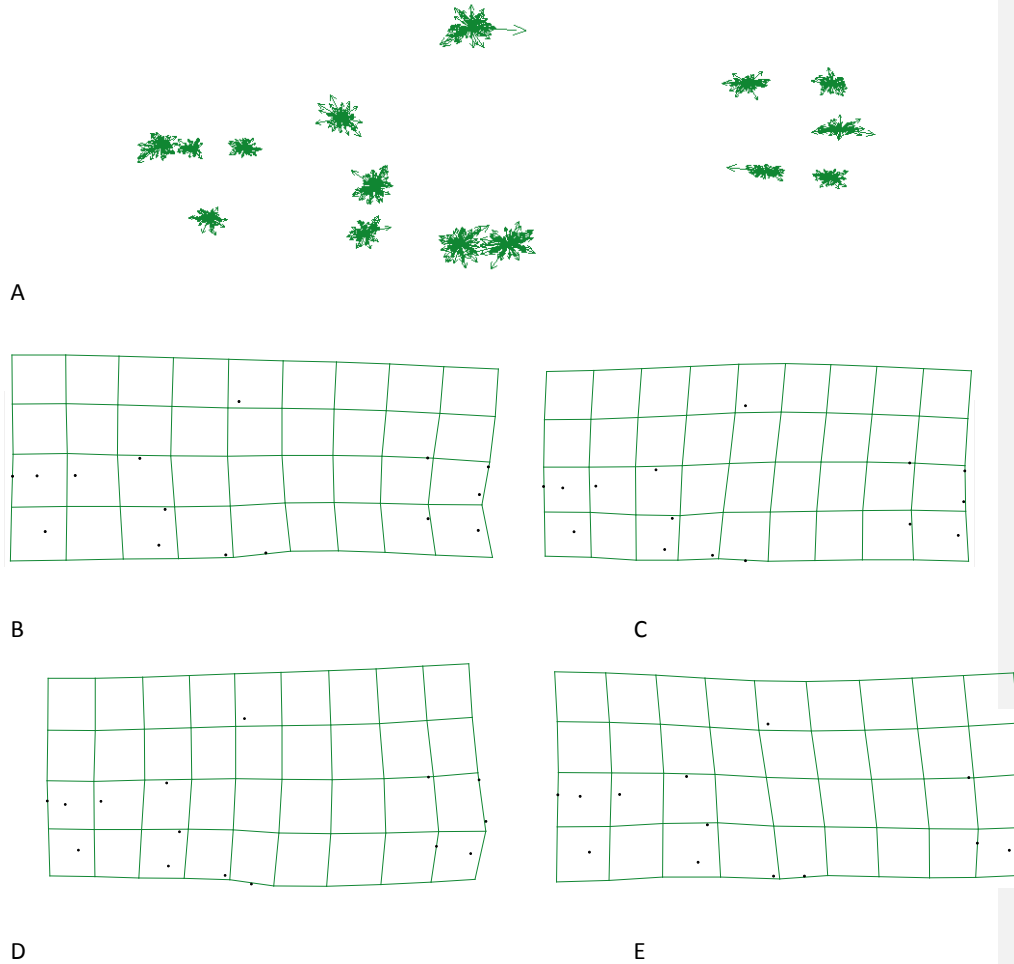


Figura 19. Gradilla **A** forma consenso de los machos, con representación gráfica de los vectores de todos los datos tomados para cada landmark. Gradillas **B** y **C** representan las deformaciones negativas y positivas de los machos, respectivamente, de Raíz 1. Gradillas **D** y **E** representan las deformaciones positivas y negativas de los machos, respectivamente, de Raíz 2. Valor estadístico de Lambda de Wilks: 0,146, $p < 0,000$.

Tabla 16. Distancias cuadradas de Mahalanobis (machos) entre los centroides de los grupos analizados en base a los caracteres morfométricos. Valores en rojo representan diferencias no significativas con $p > 0,05$. Valores sobre la diagonal = distancias; valores por debajo de la diagonal = valor estadístico asociado a la distancia ($p < 0,05$).

	Rio Negro Oeste	Tacuarembó	Tacuarembó	Rio Negro	Sarandí	Cuentas	Chuy
Rio Negro Oeste		9,525	12,24	7,767	14,81	7,758	12,18
Tacuarembó	<0,0001		4,379	2,792	8,901	5,435	4,024
Tacuarembó	0,00125	0,01268		6,330	12,06	10,22	10,67
Rio Negro	0,00801	<0,0001	<0,0001		9,751	4,701	6,644
Sarandí	0,03292	0,06740	0,04019	0,04282		15,88	11,44
Cuentas	0,04585	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001112		10,89
Chuy	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,01305	<0,0001	

Tabla 17. Matriz de clasificación de los individuos (machos) de *A. arachan* según los grupos definidos para el análisis discriminante.

	%	Río Negro Oeste	Tacuari	Tacuarembó	Río Negro	Sarandí	Cuentas	Chuy
Río Negro Oeste	75,00	6	0	0	1	0	0	1
Tacuari	74,63	2	50	1	5	0	1	8
Tacuarembó	78,57	0	1	11	2	0	0	0
Río Negro	59,57	1	8	2	28	1	3	4
Sarandí	60,00	0	1	0	0	3	0	1
Cuentas	73,68	0	3	0	1	0	14	1
Chuy	65,79	1	10	0	2	0	0	25
Total	69,19	10	73	14	39	4	18	40

Hembras

La raíz canónica 1 y la raíz canónica 2 del análisis canónico de la varianza representaron aproximadamente el 34% y el 28% de la varianza, respectivamente. Dado que la suma de las dos primeras raíces representa más del 60% de la varianza, se utilizaron estos dos factores para las representaciones gráficas. La correlación entre el tamaño del centroide y las raíces discriminantes (1 y 2) no mostró una relación lineal entre ambas variables. Valor r para raíz 1 = 0,2781; $p = 0,00005$, valor r para raíz 2 = 0,0489; $p = 0,4835$ (Anexos 11 y 12).

El análisis discriminante presentó diferencias significativas entre los grupos (Lambda de Wilks= 0,08460; $p < 0,05$). A lo largo de la raíz 1 se observa una discriminación de los individuos pertenecientes al grupo "Cuentas", hacia el lado positivo del eje y se observa también una leve discriminación, hacia el lado opuesto del grupo "Tacuarí" (Figura 20). Los individuos que se apartan de la forma consenso hacia la raíz positiva tienden a tener un cuerpo más alto y alargado, así como un hocico más comprimido, se observa un corrimiento de la posición de inicio de la aleta dorsal desplazándose hacia la parte postero-superior, mientras que los que se apartan del consenso hacia la raíz negativa tienden a tener una longitud del cuerpo más corta y un hocico más alargado, también se observa un corrimiento de la posición de inicio de la aleta dorsal pero esta vez desplazándose hacia la parte antero-inferior (Figura 21). A lo largo de la raíz 2 no se observa una clara discriminación de ningún grupo (Figura 20).

La discriminación de estos dos grupos, fueron significativos según las distancias cuadradas de Mahalanobis. En referencia a estas distancias, la mayor distancia (significativa) se observa para los grupos Sarandí-Cuentas, mientras que la menor distancia (significativa) es para los grupos Río Negro-Chuy. Las únicas distancias que no resultaron significativas fueron entre los grupos Sarandí-Tacuarembó y Sarandí-Tacuari (Tabla 17). Las distancias de Mahalanobis que no

resultaron significativas fueron los pares Tacuarí – Sarandí y Tacuarembó – Sarandí, probablemente se deba al bajo número de datos para la localidad de Sarandí (3 individuos).

En cuanto a la matriz de clasificación muestra que aproximadamente el 75% del total de los individuos fueron asignados correctamente al grupo. El grupo que presenta el mejor porcentaje de clasificación (aprox. 86%) es Cuentas (Tabla 19).

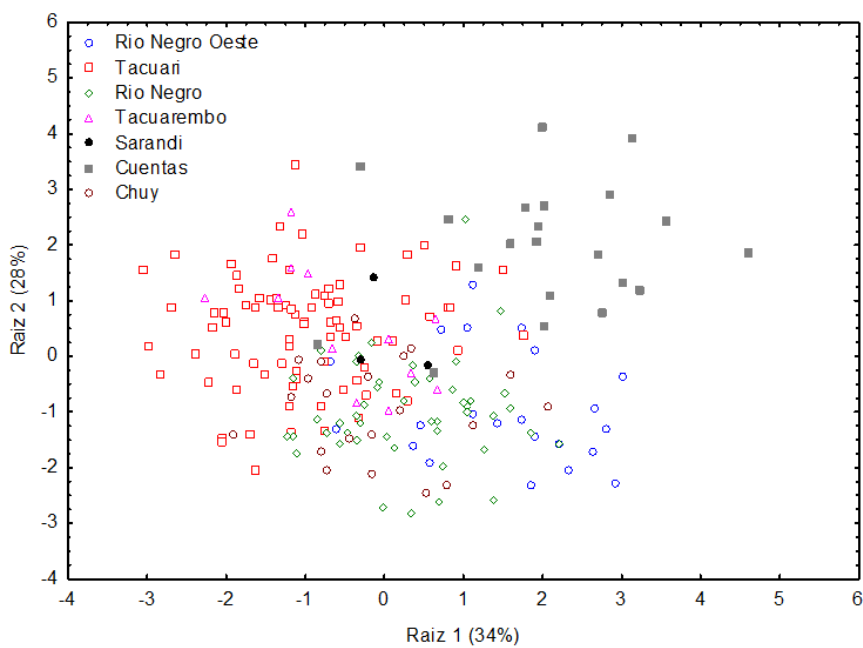


Figura 20. Raíz 1 vs. Raíz 2 de función lineal discriminante realizado para matriz de las deformaciones parciales entre individuos hembras de los distintos grupos.

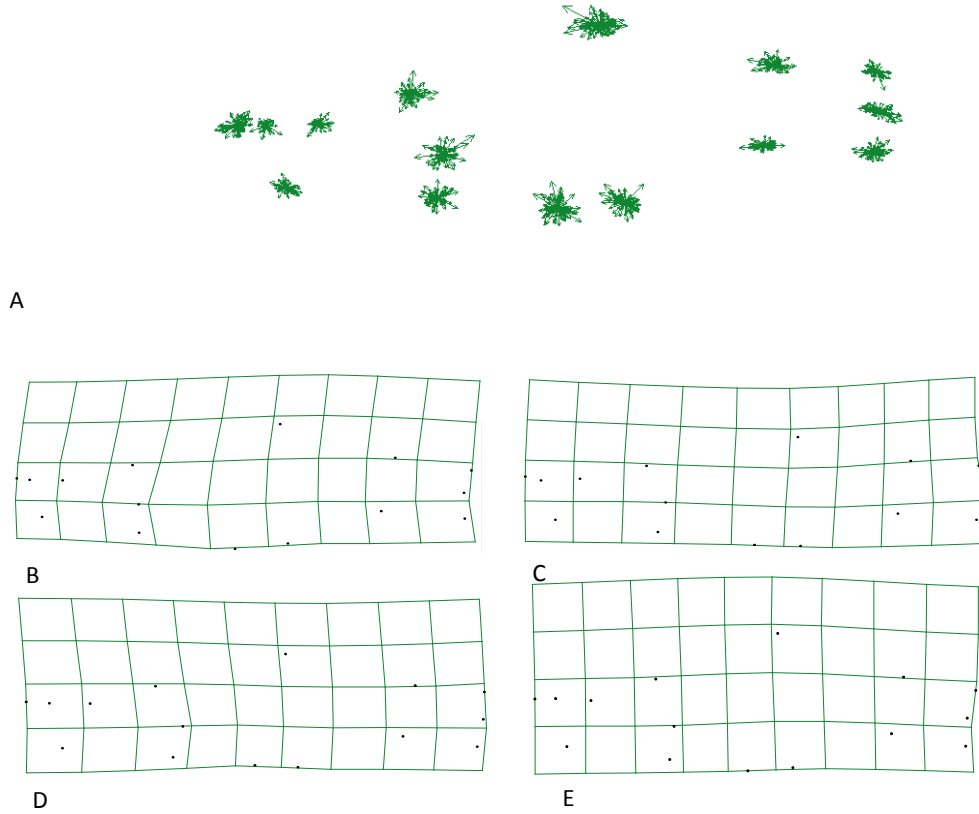


Figura 21. Gradilla **A** forma consenso de las hembras, con representación gráfica de los vectores de todos los datos tomados para cada landmark. Gradillas **B** y **C** representan las deformaciones negativas y positivas de las hembras, respectivamente, de Raíz 1. Gradillas **D** y **E** representan las deformaciones positivas y negativas de las hembras, respectivamente, de Raíz 2. Valor estadístico de Lambda de Wilks: 0,146, $p < 0,000$.

Tabla 18. Distancias cuadradas de Mahalanobis (hembras) entre los centroides de los grupos analizados en base a los caracteres morfométricos. Valores sobre la diagonal = distancias; valores por debajo de la diagonal = valor estadístico asociado a la distancia ($p < 0,05$)

	Rio Negro Oeste	Tacuarí	Rio Negro	Tacuaembó	Sarandí	Cuentas	Chuy
Rio Negro Oeste		10,17	7,281	12,36	17,26	13,47	9,235
Tacuarí	<0,0001		5,032	5,242	14,68	12,08	5,456
Rio Negro	<0,0001	<0,00001		7,988	18,42	12,21	3,901
Tacuaembó	<0,0001	0,0050	<0,00001		17,51	13,81	9,506
Sarandí	0,0304	0,0527	0,0090	0,0572		21,77	16,86
Cuentas	<0,0001	<0,0001	<0,00001	<0,0001	0,0032		14,71
Chuy	<0,0001	<0,0001	0,0035	<0,0001	0,0384	<0,0001	

Tabla 19. Matriz de clasificación de los individuos (hembras) de *A. arachan* según los grupos definidos para el análisis discriminante.

	%	Rio Negro Oeste	Tacuari	Rio Negro	Tacuarembó	Sarandí	Cuentas	Chuy
Rio Negro Oeste	68,18	15	3	4	0	0	0	0
Tacuari	82,93	0	68	8	1	0	4	1
Rio Negro	72,34	2	5	34	1	0	2	3
Tacuarembó	50,00	0	4	2	6	0	0	0
Sarandí	66,67	0	1	0	0	2	0	0
Cuentas	85,71	0	2	1	0	0	18	0
Chuy	66,67	0	3	4	0	0	0	14
Total	75,48	17	86	53	8	2	24	18

Correlación entre Matriz genética y Matriz morfológica

Se realizó el Test de Mantel entre la matriz genética de citocromo b (F_{ST}) y la matriz del análisis discriminante (Distancias de Mahalanobis), para hembras y para machos, por separado.

El índice de correlación entre la matriz de los índices de F_{ST} y la matriz de las distancias de Mahalanobis de los machos resultó significativo, aunque con un valor relativamente bajo. Sin embargo la correlación entre la matriz de los índices de F_{ST} y la matriz de las distancias de Mahalanobis de las hembras no resultó significativo y el valor fue aún menor.

Tabla 20. Índice de correlación y su valor p asociado para la correlación entre la matriz genética de citocromo b (índices de F_{ST}) y la matriz de las distancias de Mahalanobis obtenidas del análisis discriminantes de los machos y para la correlación entre la matriz genética de citocromo b (índices de F_{ST}) y la matriz de las distancias de Mahalanobis obtenidas del análisis discriminantes de las hembras. Análisis realizado con el complemento XLSTAT del Microsoft Excel (2207).

	F_{ST} cytb (A)/Dist. Mahalanobis Machos (B)	F_{ST} cytb (A)/Dist. Mahalanobis Hembras (B)
r (A/B)	0,434	0,259
Valor p	0,001	0,052

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis apoyan, de manera parcial, la primera hipótesis propuesta. Esta predice encontrar mayor diversidad genética en las poblaciones localizadas aguas abajo, por lo tanto en los cursos de agua de mayor orden. En este trabajo la diversidad genética aumentó claramente hasta los cursos de orden 6, con una posterior disminución en órdenes superiores. Esta caída de la diversidad puede deberse a la baja vagilidad que presentan los peces anuales. Los resultados encontrados por Thomaz et al. (2016), son para especies de peces fluviales, con

mayor vagilidad que los anuales. Diferencias en la capacidad dispersiva podría tener como consecuencia que el flujo del sistema dendrítico en el que habita no esté directamente afectando al flujo génico entre sus poblaciones, ya que los charcos se encuentran alejados, en diferente grado, del curso principal del río. En el trabajo de Thomaz et al. (2016) se encontró también que las poblaciones que se encontraban en la confluencia de los ríos presentaban la mayor diversidad genética encontrada, siendo que la misma comenzaba a disminuir aguas abajo de la confluencia. Tal vez en el presente trabajo puede estar sucediendo algo similar con las poblaciones que se encuentran en las localidades de órdenes mayores (>6).

La diversidad haplotípica fue alta para ambos marcadores moleculares. La diversidad haplotípica y nucleotídica para el marcador citocromo b fue similar a la encontrada para *A. charrúa* (especie emparentada con *A. arachan*) (García et al., 2014). La alta variabilidad genética, morfológica y cromosómica, parece ser una característica de varias especies de este género (Vaz-Ferreira & Melgarejo, 1984; García et al., 1993; Loureiro, 2004). Por otra parte, valores relativamente bajos de diversidad nucleotídica y altos de diversidad haplotípica podrían revelar rápidos crecimientos de la población a partir de una población ancestral pequeña (Avice, 2000).

La predicción planteada a partir de la segunda hipótesis, propone que individuos de una misma localidad geográfica son genéticamente y morfológicamente más similares entre sí. Esta predicción se cumple para el marcador mitocondrial, que representa una clara estructura de la variabilidad genética de acuerdo a la estructura de las cuencas actuales. Sin embargo, la variación genética encontrada para el marcador nuclear no refleja la misma estructura que las cuencas actuales, por lo que dicho marcador podría estar mostrando un patrón de otro momento de la historia de las cuencas. Estos son resultados esperables dadas las diferentes tasas evolutivas de los marcadores utilizados (Avice et al., 1994) y también debido al tamaño efectivo poblacional (N_e), ya que el marcador mitocondrial tiene su N_e reducido a la cuarta parte y por lo tanto el tiempo de coalescencia para este marcador es menor, el tiempo transcurrido puede haber sido suficiente para el marcador mitocondrial como para eliminar los alelos que pasaron de una cuenca a otra, pero no así para el marcador nuclear. Por otra parte, el marcador morfológico muestra cierto grado de estructura aunque su variación no refleja exactamente el patrón de las cuencas hidrográficas actuales. Lo cual también es esperable debido a la potencial influencia de otros factores (por ej: selección natural por competencia, de predación etc.) en su variación. El cambio en la forma de los individuos también puede

deberse a la respuesta del fenotipo al ambiente (plasticidad fenotípica). El cambio fenotípico de un organismo es a menudo responsabilidad de la heterogeneidad ambiental. Tanto el gradiente ambiental de la estructura física y las diferencias en las interacciones ecológicas, como la predación y competencia son importantes representantes de dicha heterogeneidad (Eklov, 2005).

Con formato: Español (Uruguay)

Los valores encontrados de los índices de F_{ST} y los resultados del análisis AMOVA sugieren una estructura poblacional alta y bajo flujo génico, ya que la divergencia genética resultó muy alta incluso para poblaciones que se encuentran a pocos kilómetros de distancia. Esto se observa para ambos marcadores moleculares, aunque para el marcador nuclear muchos de estos valores no resultaron significativos. Para el marcador mitocondrial los índices fueron menores entre localidades cercanas, sobre todo entre las localidades dentro del curso principal del Río Negro, sugiriendo gran conexión entre estas; incluso con la localidad Cololó, que se encuentra sobre el Río Negro a gran distancia del resto. Sin embargo no se encontró una correlación entre los índices de F_{ST} y la distancia geográfica (Km) entre las localidades (ver Tabla 11). Las diferentes poblaciones ubicadas sobre el curso principal del Río Negro se conectarían entre sí durante los períodos de grandes inundaciones; escenario similar al propuesto por García et al. (2006, 2012), para las poblaciones de peces anuales que se distribuyen en la Laguna Merín y en las cuencas bajas del ríos Uruguay y Paraná. El concepto de conectividad funcional ha sido definido por Taylor et al., (1993) como "el grado en el cual el paisaje facilita o impide el movimiento entre los recursos de parches". Esta zona del Río Negro, es una gran planicie y la misma podría estar representando una zona de alta conectividad entre las poblaciones. Los humedales asociados al Río Negro podrían estar funcionando como un gran corredor entre las localidades de esta zona.

La topología en forma de estrella observada en la red de haplotipos del marcador mitocondrial correspondiente a las poblaciones del Río Negro (curso principal) podría estar evidenciando un evento de expansión poblacional reciente, ya que se trata de un marcador considerado neutro, por lo cual su evolución no sería directamente afectada por eventos selectivos, a no ser por algún efecto de hitch-hiking de otro gen (Avice, 1987). El haplotipo central más frecuente, probablemente sea el haplotipo ancestral (Avice, 2009). Los valores encontrados para los test de neutralidad para este grupo resultaron en ambos casos negativos y significativos, reforzando la hipótesis de que este grupo haya experimentado recientemente una expansión poblacional, siguiendo el criterio de Slatkin y Hudson (1991). El test de Fu es más sensible cuando existe expansión poblacional o "hitchhiking" (selección por ligamiento), lo que

reforzaría la hipótesis de que el apartamiento del equilibrio entre la deriva y la mutación de este gen para la población en cuestión esté dado por una expansión poblacional reciente. Esta evidencia también se encuentra apoyada por el análisis de las diferencias pareadas para esta población donde la curva de los valores observados se ajusta de muy buena manera a la curva de los valores simulados, sugiriendo que la población ha experimentado una expansión reciente (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). La expansión demográfica es más fácil de evidenciar en gen mitocondrial, debido al menor tamaño efectivo poblacional (Avise, 2000).

A modo general se observa que en la red de haplotipos para las variantes haplotípicas mitocondriales los haplotipos correspondientes a la cuenca del Río Negro se encuentran en una posición intermedia entre los haplotipos correspondientes al Río Tacuarí y los haplotipos correspondientes al Río Yaguarón, ambos ríos pertenecientes a la cuenca de la Laguna Merín (ver Figura 8). Este resultado estaría apoyando la hipótesis de dos posibles eventos de captura de cuenca, uno entre el Río Negro y el Río Tacuarí y otro entre el Río Negro y el Río Yaguarón. Además un haplotipo perteneciente a la población de Molles (cuenca Río Negro) queda agrupado junto a los haplotipos del Paso de Melo (Yaguarón), reforzando la hipótesis del posible evento de captura a la altura del Río Yaguarón.

La estructura observada a nivel de esta red de haplotipos se contrasta con lo encontrado para la especie *A. charrua* (García et al., 2006) donde no se observa estructura de los haplotipos de acuerdo a la localidad de procedencia, sino un único haplotipo central más frecuente y el resto en baja frecuencia y con pocas diferencias respecto al anterior. Esto puede deberse a la diferente distribución de las especies, ya que *A. charrua* se distribuye a lo largo de la cuenca baja de la laguna Merín, donde los humedales son más extensos y probablemente sean mayores las conexiones entre los charcos. Sin embargo, el ambiente de la cuenca del Río Negro y de la parte alta de la laguna Merín son topológicamente muy diferentes habiendo mayores barreras entre las diferentes cuencas. Por ejemplo en esta red se observa que los haplotipos correspondientes a la localidad de Chuy, se encuentran agrupados entre sí, pero separados de muchos pasos mutacionales del resto de los haplotipos, encontrándose el haplotipo más cercano (cuenca del Tacuarí) a 10 pasos. Esta localidad se encuentra en una zona alta de la cuenca y posiblemente la conexión entre esta localidad y el resto no sea muy frecuente, lo que favorecería que la deriva génica tenga mayor impacto sobre esta población. Esto podría mostrar la importancia de la altitud y por tanto la topografía, como barrera para el

flujo entre las poblaciones de peces anuales y modelación de las poblaciones debido al paisaje. Dorn et al. (2011), encontraron un patrón en la distribución de varios clados del género anual africano *Nothobranchius* asociado al gradiente altitudinal de la región en la que habitan. Estos resultados posicionan a la población del Chuy como una posible población de interés en cuanto a la conservación de esta especie por estar genéticamente muy diferenciada del resto de las poblaciones, presentando un solo haplotipo compartido con otra población (Tacuarí).

Todas las secuencias de la cuenca de Sarandí corresponden a un único haplotipo endémico, el haplotipo más similar a este corresponde a un haplotipo de la cuenca del Río Tacuarí (Conventos) y no a una población del Río Negro, como sería más esperable por la cercanía geográfica. Este resultado es congruente con el encontrado mediante el análisis de clústers para el marcador nuclear, que adjudica a la población de Sarandí con mayor probabilidad de pertenencia al clúster del cual forman parte las poblaciones de la cuenca del Tacuarí y no del Río Negro. De todas formas esta localidad de Sarandí actualmente se encuentra retirada del curso principal del Río Negro a una distancia considerable (24Km). Estos resultados indican la importancia de conservar esta población dada su identidad y baja diversidad genética.

La red de haplotipos del marcador nuclear difiere de la obtenida con el citocromo b. En esta red no se observa la estructura marcada de las cuencas, las localidades comparten los haplotipos entre cuencas distintas, sugiriendo mayor flujo génico para este marcador. Por ejemplo, el haplotipo más frecuente es compartido por individuos de localidades de la cuenca del Río Negro, Tacuarí y Yaguarón. La distribución de los demás haplotipos en la red, sugiere una gran conexión entre estas tres cuencas. Al tener un tamaño efectivo poblacional mayor, por tratarse de un marcador nuclear, puede que el tiempo no haya sido suficiente para que las poblaciones se diferenciaron según la configuración actual de las cuencas. El número de clústers que mejor explica el agrupamiento de las poblaciones para el marcador nuclear, mediante el análisis del Geneland fue tres y se observa nuevamente una gran conexión entre las cuencas de Tacuarí, Río Negro y Yaguarón, ya que la población del Río Yaguarón queda agrupada con la mayoría de las localidades de la cuenca del Tacuarí y el Chuy con el Río Negro.

Tanto las redes de haplotipos como los clústers encontrados con Geneland con ambos marcadores, posicionan a las localidades de Tacuarembó como una unidad aislada del resto, lo que sugiere cierto nivel de aislamiento, quizás producido por el Río Negro actuado como barrera, impidiendo la dispersión de individuos desde y hacia la cuenca del Tacuarembó. En un estudio realizado en otra especie de pez anual, *Nothobranchius furzeri*, se propone a un río de

la región donde habita, como barrera entre clados de dicha especie (Bartakova et al., 2013). También es posible que la barrera se deba a que entre las localidades del Río Tacuarembó y las localidades del Río Negro el ambiente no sea propicio para el desarrollo de peces anuales, generando una barrera de dispersión entre ambos drenajes. Además, el modelo de mejor ajuste en el análisis de migración (desarrollado más adelante) del marcador mitocondrial pone a la población Tacuarembó aislada del resto y para el marcador nuclear como receptora de pocos migrantes desde el Río Negro.

Para el marcador mitocondrial a partir del análisis realizado con Geneland se encuentra como más probable que las poblaciones se agrupen en cinco clústers. En este caso el Chuy queda como una población diferente al resto, reforzando la idea de aislamiento de esta localidad y rápida diferenciación genética, probablemente debido al mayor impacto de la deriva génica sobre esta población. Cabe destacar que este análisis agrupa a la población del Río Yaguarón con la población del Sarandí. Esto difiere a lo esperado, ya que ambas localidades se encuentran separadas espacialmente y aparentemente no conectadas. Sin embargo la población de Sarandí presenta una única variante alélica, puede que esta variante haya desaparecido o no haya sido muestreada en poblaciones intermedias. Por otro lado, en la red de haplotipos del marcador nuclear, la localidad Sarandí comparte variantes con las poblaciones del Río Tacuarembó (muy cercanas geográficamente).

En cuanto a los resultados obtenidos para la evaluación de la direccionalidad del flujo génico entre las poblaciones, se observa que el parámetro M (migración escalada por la mutación) es asimétrico entre las poblaciones. Para el marcador mitocondrial la tasa M más grande es la que representa la migración desde Río Negro hacia Yaguarón y en el sentido contrario sería 5 veces y media menor, sin embargo el aporte de migrantes entre todas las poblaciones que intercambian es relativamente bajo (<1 migrante por generación). Para el caso del marcador nuclear, el modelo que mejor se ajustó a los datos es el que propone a la población del Río Negro como fuente, apoyando de esta manera la hipótesis de capturas de cuencas propuesta por Ribeiro (2006), que propone que los drenajes del margen pasivo del continente (costeros) son los que capturan los drenajes del escudo de tierras altas. La tasa M es de tres órdenes mayor en dirección al Río Tacuarí que al Tacuarembó. Lo que estaría mostrando una gran conexión pasada entre las cuencas del Río Negro y Tacuarí. La contribución de la migración asimétrica en ríos (Morrissey & Kerckhove, 2009; Paz-Vinas et al., 2013) y el rol de la conectividad (Labonne et al., 2008) a nivel de metapoblaciones ha sido previamente demostrado ser un factor importante en el mantenimiento de la variación genética. Muchos

estudios biogeográficos han demostrado que la evolución de las cuencas de los ríos pueden modelar la distribución de las variantes genéticas (Mayden, 1988; Bănărescu, 1990; Matthews, 1998) y las relaciones filogeográficas entre drenajes de agua dulce (Near & Keck, 2005; Kozak et al., 2006; Schwarzer et al., 2011). En contraste, factores intrínsecos como el tamaño corporal, la fecundidad y la vagilidad, también se espera que estén relacionados con la diversidad genética, a través de su influencia en el tamaño efectivo poblacional y flujo génico (Crispo et al. 2006; Faulks et al. 2010).

Por otro lado, también ha sido demostrado que las diferencias en la calidad del hábitat, las interacciones sociales o factores abióticos (por ejemplo, viento, corrientes oceánicas, el caudal del río o de la gravedad) con frecuencia generan una dinámica fuente-sumidero que impone un flujo de genes asimétrico en las poblaciones naturales (Kaweesi & Holt, 2002). En este caso la población de Río Negro se habría comportado en el pasado como una fuente para el resto de las poblaciones aportando migrantes en mayor grado. Esta gran conexión entre estas dos cuencas, apoya la teoría de la captura de cuenca como posible agente estructurador de la variación genética. Además la dirección de mayor flujo génico se observa desde Río Negro hacia Tacuarí, lo cual refuerza la hipótesis propuesta para capturas de cuencas por Ribeiro (2006). En general, la geodispersión por captura de cuencas ha contribuido a la formación de la ictiofauna de toda la cuenca de América del Sur tropical, región dentro de la cual habitan los Rivúlidos. Esto quiere decir que la ictiofauna de todos estos drenajes de cuencas está compuesta por distintos orígenes geográficos (Hubert & Renno, 2006; Capítulo 2), un fenómeno referido como "*mosaic macroevolution*" (Bouchard, 2004). En un estudio del grupo *Gymnotus coatesi* (Albert et al., 2004), uno de los principales resultados es la importancia del rol de las barreras semi-permeables, en la vicarianza y la geodispersión, ayudando a construir altos niveles de riqueza intra-específica regional. Cuencas semipermeables facilitan la mezcla y separación de la fauna acuática mediante la creación y erosión de las barreras entre ríos de cuencas vecinas.

La tasa de migración encontrada desde Río Negro hacia Yaguarón y lo encontrado en la red de haplotipos para citocromo b, donde dentro del grupo de haplotipos de Yaguarón aparece un individuo del Río Negro (Cañada de los Molles) que comparte haplotipo, sugiere una conexión reciente entre estas dos cuencas. Estos resultados podrían estar apoyando parcialmente la topología encontrada en esta zona, en forma de codo, que podría representar un segundo evento independiente de captura de cuencas (Loureiro et al., 2011). El reordenamiento de drenaje ha sido ampliamente propuesto como un mecanismo geomorfológico general de

translocación de peces de agua dulce en otras regiones del mundo (Bishop, 1995; Waters et al, 2001; Burridge y otros, 2006; Craw et al., 2007). Los procesos geológicos pueden causar reordenamientos de drenajes, aislando o conectando sistemas de ríos (Smith 1981; Richardson & Gold 1995; Waters & Nordt 1995). Por ejemplo una división entre drenajes previamente conectados, puede producir similares patrones de distribución genética de especies simpátricas (Waters et al. 2001). Para el caso particular de los peces anuales, se observa el mismo patrón de distribución para tres especies más del género *Austrolebias*: *A. quirogai*, *A. vazferreirai*, y *A. juanlangi* (Loureiro et al., 2011).

Los resultados obtenidos para los marcadores morfológicos fueron distintos para el caso de los machos y las hembras. Esto resulta razonable ya que los factores que influyen sobre la forma de los individuos podrían estar actuando de distinta manera frente a los dos sexos; esto se puede ver reflejado en el gran dimorfismo sexual que presentan los peces anuales. La importancia de la selección sexual en peces del género *Austrolebias* es considerada como un factor evolutivo importante implicado en la generación de variabilidad en estos organismos (Hass et al., 1976; Passos et al., 2014). Diferencias en la elección de pareja por parte de las hembras de las distintas cuencas pueden generar variaciones en la forma de los individuos, generando una presión sobre la modelación de la forma en el caso de los individuos machos. Se ha demostrado que las hembras de *Austrolebias* prefieren machos de mayor tamaño (Passos et al., 2013).

Para ambos sexos, la distancia de Mahalanobis entre los individuos de las localidades correspondientes al curso principal del Río Negro y los de la localidad ubicada al oeste del Río Negro es relativamente alta. Esto queda contrastado con el marcador mitocondrial donde la localidad al oeste del Río Negro se agrupa dentro de la misma población que las demás localidades del Río Negro. Lo que nos sugiere que los mecanismos (interacción con otras especies, selección sexual, etc.) que estarían actuando sobre la variación en la forma son distintos a los que modelan la evolución de los marcadores moleculares neutros, evaluados en este trabajo.

Además en el análisis discriminante realizado para los machos se observa una discriminación del grupo Río Negro oeste.. Esto nos podría estar sugiriendo, que los individuos de dicha localidad evolucionaron adaptaciones locales (en lo que respecta a la forma de los individuos), como respuesta al ambiente (plasticidad fenotípica), o que los factores que afectan en la forma de los individuos presentan una tasa evolutiva mucho más acelerada que los marcadores

moleculares, siendo que dicha localidad ha estado aislada desde muy recientemente y que no ha transcurrido el tiempo suficiente como para ver este patrón en el citocromo b (Cherry et al., 1978). En un estudio realizado en una especie del género *Austrolebias* con marcadores morfométricos se ha sugerido que la variación de dichos marcadores estaría asociada solamente al patrón filogeográfico (D'Anatro & Loureiro, 2005).

Los machos de las localidades Cuentas y Chuy se ubicaron en extremos opuestos de la variación morfométrica en el análisis discriminante. Los individuos de Cuentas tienden a tener una forma más robusta, mientras que los de Chuy son estilizados. En Cuentas, *A. arachan* comparte el hábitat con otras especies de peces anuales: *A. quirogai*, *A. vazferreirai* y *A. juanlangi* (Loureiro et al., 2011); mientras que en Chuy, *A. arachan* no cohabita con otras especies de peces anuales. Una posible explicación es que factores ecológicos como la competencia con otras especies de peces anuales, podrían estar influenciando la variación de la forma de los individuos (Eklov, P. & Svanback, R., 2005). Por otra parte, la discriminación de los individuos pertenecientes a la cuenca del Chuy es concordante con lo encontrado para el marcador mitocondrial, tal vez reforzando la hipótesis de aislamiento como el factor que promueve su identidad morfológica.

Se observan ciertas concordancias entre los resultados encontrados para el marcador mitocondrial y el marcador morfométrico, como la diferenciación de las poblaciones Cuentas y Chuy (en el caso de los machos), así como la unidad de la cuenca del Río Tacuarembó como una unidad bien definida, tanto para el marcador morfológico como para el marcador mitocondrial. El análisis de correlación entre ambas matrices, morfológica vs. mitocondrial resultó significativo para el caso de los machos, aunque con un bajo índice de correlación. Esto estaría apoyando las concordancias parciales encontradas para ambos marcadores, al menos para el caso de los machos. Sugiriendo que algunos de los mecanismos modeladores de la variación genética y morfométrica podrían ser compartidos.

Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo, se observa que si bien existe congruencia entre los resultados observados para los marcadores moleculares y morfológicos, también hay diferencias entre los mismos, lo que nos sugiere que los factores que subyacen a ambos tipos de marcadores

podrían ser distintos, además de las diferencias en las tasas evolutivas a la que están sometidas dichos marcadores (Cherry *et al.*, 1978).

Por otra parte queda evidenciado que existen factores de configuración de los ríos, así como factores geomorfológicos, que han influenciado la distribución de las variantes genéticas. La distribución de la diversidad genética en el paisaje está determinada por al menos tres grandes clases de factores, los cuales incluyen: procesos geológicos, características intrínsecas y características del paisaje (Waters, 2015). Si bien no se cumple exactamente la predicción de la primera hipótesis planteada, en parte se logra apreciar la relación de la diversidad génica de acuerdo a la ubicación de las localidades respecto a la topología de los ríos, siendo en general mayor la diversidad encontrada cuando las poblaciones se encuentran más alejadas de las cabeceras de los ríos.

Los resultados de este trabajo indican la importancia de los eventos de geodispersión (captura de cuencas) en la estructuración de la variación. Además, de acuerdo a la topología de la red de haplotipos y el análisis de clusters poblacionales se evidencia que estos fenómenos de captura de cuencas habrían ocurrido más de una vez y en sectores diferentes de la cuenca del Río Negro.

Las poblaciones del Río Tacuarembó presentaron una unidad evolutiva apoyada por todos los análisis y marcadores, lo cual indica que deberían ser consideradas como una unidad de conservación diferente de las restantes.

En cuanto a la estructura poblacional e historia demográfica de la especie, sería interesante amplificar otros marcadores moleculares neutros que permitan inferir la historia demográfica de esta especie, pero con distinta tasa evolutiva, como por ejemplo microsatélites (marcadores hipervariables) a partir de los cuales se podría obtener resultados que representen una historia más reciente de la especie y de la región en la cual habita.

En cuanto al marcador nuclear utilizado en el presente trabajo, sería importante evaluar si dicho marcador presenta copias parálogas en el genoma de *Austrolebias arachan* y si dichas copias divergieron de la original. Para esto sería útil contar con el genoma anotado de la especie.

Por otro lado sería importante incluir análisis para inferir tiempos de divergencia entre las poblaciones con el fin de estimar tiempos de los posibles eventos geomorfológicos ocurridos en la zona. Sin embargo, no se cuenta con registros fósiles para este género, por lo cual se

tendrían que utilizar relojes moleculares que hayan sido propuestos para taxa cercanos en la escala evolutiva. Tampoco se tiene dataciones de los eventos geomorfológicos de captura de cuencas, por lo que es imprescindible avanzar en ese sentido.

Muchos análisis de genética del paisaje han comparado patrones filogeográficos entre especies que se encuentran co-distribuidas en la misma región (Bermingham & Moritz, 1998) y se ha encontrado que muchas de esas especies tienden a tener estructuras genealógicas similares. Estos patrones compartidos sugieren que la biogeografía histórica no ha sido solo modelado por la distribución de una especie en su rango, sino que también han moldeado concordantemente la arquitectura genética de regiones de biotas particulares (Avice, 2009). Sería de suma importancia comparar los patrones obtenidos para *A. arachan* con los de otras especies que habitan la misma región (incluyendo especies con diferente vagilidad) para inferir de manera más robusta patrones de distribución más generales y procesos geomorfológicos que involucren a la biota de la región.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. C., Berns, C. M., Kozak, K. H., & Wiens, J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1668), 2729–38. <http://doi.org/10.1098/rspb.2009.0543>
- Abell et al. (2008). Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience*, 58(5): 403-414.
- Agnése, J. F., Zentz, F., Legros, O., & Sellos, D. (2006). Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(2), 332–346. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.018>
- Albert, J. S., Crampton, W. G. R., Thorsen, D. H., & Lovejoy, N. R. (2004). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, 2, 375–417.

- Albert, J. S., & Reis, R. E. (2015). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Allcock, A. L., Chauvet, M., Crandall, M., Given, D., Hall, S., Iriondo, J., Lewinsohn, T., Lynch, S., Mace, G., Solé-Cava, A., Stackebrandt, J., Templeton, A., & Watts, P. (1995). Genetic diversity as a component of biodiversity. Cambridge University Press: 57-88.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(10), 697–709. <http://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Altner, M. & Reichenbacher, B. (2015). Kenyaichthyidae fam. nov. and *Kenyaichthys* gen. nov. - First record of a fossil aplocheiloid killifish (Teleostei, Cyprinodontiformes). *PLoS ONE*, *10*(4), 1–41. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123056>
- Amato, L. H. (1986). Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876, de Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Comunicaciones Zoológicas Del Museo Historia Natural de Montevideo*, *11*, 1-27.
- Ansar, A., Flyvbjerg, B., Budzier, A., & Lunn, D. (2014). Should we build more large dams? The actual costs of hydropower megaproject development. *Energy Policy*, *69*, 43–56. <http://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.10.069>
- Arezo, M. J., Pereiro, L., & Berois, N. (2005). Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology*, *66*(5), 1357–1370. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00688.x>
- Aters, J. O. M. W., Raw, D. A. V. E. C., & Oungson, J. O. H. N. H. Y. (2001). Genes Meet Geology : Fish Phylogeographic Pattern Reflects Ancient, Rather Than Modern, Drainage Connections, *55*(9), 1844–1851.
- Avise, J., Arnold, R., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Populatio Genetics and Systematics.
- Avise JC (1994). *Molecular Markers, Natural History & Evolution*. Chapman & Hall, New York.

- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)*, 36, 3–15
- Avise, J.C. Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522. and F.J. Ayala (eds.). 2009. In the Light of Evolution, Volume III. Two Centuries of Darwin. The National Academies Press, Washington, D.C. (414 pp.).
- Bănărescu, P. (1990) Zoogeography of fresh waters. Vol. 1: General distribution and dispersal of freshwater animals. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Bartáková, V., Reichard, M., Janko, K., Polačik, M., Blažek, R., Reichwald, K., Cellerino A. & Bryja, J. (2013). Strong population genetic structuring in an annual fish, *Nothobranchius furzeri*, suggests multiple savannah refugia in southern Mozambique. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 196. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-13-196>
- Beerli, P. (2008). Migrate version 3.0: a maximum likelihood and Bayesian estimator of gene flow using the coalescent.
- Beerli, P., & Palczewski, M. (2010). Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185(1), 313–326. <http://doi.org/10.1534/genetics.109.112532>
- Benda, L., Poff, N. L., Miller, D., Dunne, T., Reeves, G., Pess, G., & Pollock, M. (2004). The network dynamics hypothesis: how channel networks structure riverine habitats. *BioScience*, 54, 413–427.
- Bernardi, G. (2013). Speciation in fishes. *Molecular Ecology*, 22(22), 5487–5502. <http://doi.org/10.1111/mec.12494>
- Bermingham, E. and C. MORITZ (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7:367-369.

- Berois, N., Arezo, M. J., Papa, N. G., & Clivio, G. A. (2012). Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 595–602. <http://doi.org/10.1002/wdev.39>
- Berois, N., García, G., & de Sá, R. (2015). Annual Fishes. Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Ratón – London – New York. Taylor & Francis. 327 pp.
- Bishop, P. (1995). Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. *Progress in Physical Geography*, 19(4), 449-473.
- Bookstein, F. L. (1989). Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11, 567–585.
- Bookstein, F.L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Buckup, P. A., & Reis, R.E. (1997). Characidiin Genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) in Southern Brazil, with Description of Three New Species. *Copeia* 1997(3), 531-548.
- Burridge, C. P. B., Craw, D. C., & Waters, J. M. (2006). River Capture, Range Expansion, and Cladogenesis : The Genetic Signature of Freshwater Vicariance. *Evolution*, 60(5), 1038–1049.
- Burridge, C. P., Craw, D., Jack, D. C., King, T. M., & Waters, J. M. (2008). Does fish ecology predict dispersal across a river drainage divide? *Evolution*, 62(6), 1484–1499. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00377.x>
- Campbell Grant, E. H., Lowe, W. H., & Fagan, W. F. (2007). Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. *Ecology Letters*, 10, 165–175.
- Carrea, C., Cussac, V. E., & Ruzzante, D. E. (2013). Genetic and phenotypic variation among *Galaxias maculatus* populations reflects contrasting landscape effects between northern and southern Patagonia. *Freshwater Biology*, 58(1), 36–49. <http://doi.org/10.1111/fwb.12036>

- Carreon-Martinez, L., Johnson, T. B., Ludsin, S. A., & Heath, D. D. (2011). Utilization of stomach content DNA to determine diet diversity in piscivorous fishes. *Journal of Fish Biology*, 78(4), 1170–1182. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.02925.x>
- Carson, H. L. (1971) Speciation and the founder principle. *Stadler Genet. Symp.* 3, 51-70.
- Chakraborty, A., Sakai, M., & Iwatsuki, Y. (2006). Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1), 160–166. <http://doi.org/10.1111/J.1439-0426.2006.00718.X>
- Christie, M. R., & Knowles, L. L. (2015). Habitat corridors facilitate genetic resilience irrespective of species dispersal abilities or population sizes. *Evolutionary Applications*, 8(5), 454–463. <http://doi.org/10.1111/eva.12255>
- Collier, G. E., Murphy, W. J., & Espinoza, M. (2009). Phylogeography of the genus *Epiplatys* (Aplocheiloidea: Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 190–196. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.006>
- Cornuet J & G Luikart. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001–2201.
- Costa, W. (1990). Origin and Evolution of Annualism and Miniaturization in. *Journal of Comparative Biology*, 3(1), 33–92. Retrieved from http://www.killiclub.org/pagina/articulos/Gran_trabajo_anuales_Costa.pdf
- Costa, J. E. (1998). Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *Journal of Computational Biology*, 3 (1), 34-92.
- Costa, W. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213, 1–162.
- Costa, W. (2009). Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 20(2), 179–191.

- Costa, W. (2010). Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. *Journal of Biogeography*, 37(10), 1995–2004. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02339.x>
- Coyne, J. a., & Orr, A. H. (2004). Behavioral and Nonecological Isolation. *Speciation*.
- Craw, D., Burridge, C., Anderson, L., & Waters, J- M. (2007). Late Quaternary river drainage and fish evolution, Southland, New Zealand. *Geomorphology*, 84(2007), 98-110.
- Creer, S. (2007). Choosing and using introns in molecular phylogenetics. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 3(0), 99–108.
- Cristescu, M. E., Adamowicz, S. J., Vaillant, J. J., & Haffner, D. G. (2010). Ancient lakes revisited: From the ecology to the genetics of speciation. *Molecular Ecology*, 19(22), 4837–4851. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04832.x>
- Cruickshank, T. E., & Hahn, M. W. (2014). Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Molecular Ecology*, 23(13), 3133–3157. <http://doi.org/10.1111/mec.12796>
- Cunha, H., & Solé-Cava, A. (2000). *Análise filogeográfica*.
- Cutter, A. D. (2013). Integrating phylogenetics, phylogeography and population genetics through genomes and evolutionary theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 1172–1185. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.06.006>
- Crispo E, Bentzen P, Reznick DN, Kinnison MT, Hendry AP (2006). The relative influence of natural selection and geography on gene flow in guppies. *Molecular Ecology*, 15, 49–62.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- D’Anatro, A., & Loureiro, M. (2005). Geographic variation in *Austrolebias luteoflammulatus* (Rivulidae). *Journal of Fish Biology*, 67(1), 849–865. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00791.x>

- Della Croce, P., Poole, G. C., Payn, R. A., & Izurieta, C. (2014). Simulating the effects of stream network topology on the spread of introgressive hybridization across fish populations. *Ecological Modelling*, 279, 68–77. <http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.02.014>
- DeSalle, R., & Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews. Genetics*, 5(9), 702–12. <http://doi.org/10.1038/nrg1425>
- Di Rienzo, A., Peterson, A., Garza, J., Valdes, A., Slatkin, M., & Freimer, N. (1994). Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3166–3170
- Dorn, A., Musilová, Z., Platzer, M., Reichwald, K., & Cellerino, A. (2014). The strange case of East African annual fishes: aridification correlates with diversification for a savannah aquatic group? *BMC Evolutionary Biology*, 14, 210. <http://doi.org/10.1186/s12862-014-0210-3>
- Dorn, A., Ng'oma, E., Janko, K., Reichwald, K., Polacik, M., Platzer, M., Cellerino, A., & Reichard, M. (2011). Phylogeny, genetic variability and colour polymorphism of an emerging animal model: The short-lived annual *Nothobranchius* fishes from southern Mozambique. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 739–749. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.010>
- Eklov, P., & Svanback, R. (2005). Predation Risk Influences Adaptive Morphological Variation in Fish Populations. *The American Naturalist*, vol. 167, no. 3.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <http://doi.org/10.1007/s00424-009-0730-7>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data, linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.

- Falush, D, M Stephens, & J Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data, dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes*, 7:574–578.
- Faulks LK, Gilligan DM, Beheregaray LB (2010). Islands of water in a sea of dry land: hydrological regime predicts genetic diversity and dispersal in a widespread fish from Australia's arid zone, the golden perch (*Macquaria ambigua*). *Molecular Ecology*, 19, 4723–4737.
- Ferrer, J., Malabarba, L. R., & Costa, W. J. E. M. (2008). *Austrolebias paucisquama* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), a new species of annual killifish from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 175–180. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200004>
- Fourcade, Y., Chaput-Bardy, A., Secondi, J., Fleurant, C., & Lemaire, C. (2013). Is local selection so widespread in river organisms? Fractal geometry of river networks leads to high bias in outlier detection. *Molecular Ecology*, 22(8), 2065–2073. <http://doi.org/10.1111/mec.12158>
- Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2), 915–925.
- Furness, A. I. (2015). The evolution of an annual life cycle in killifish: Adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biological Reviews*. <http://doi.org/10.1111/brv.12194>
- Freeland, J.R. (2003). *Molecular Ecology*.
- Friesen, V.L., Congdon, B.C., Walsh, H.E. et al. (1997). Intron variation in marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. *Mol. Ecol.*, 6, 1047–1058.
- Friesen, V. (2000). Introns. In: Baker AJ, ed. *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Ltd. p 274–294.
- García, G., Scvortzoff, E., Máspoli, M., & Vaz Ferreira, R. (1993). Analysis of karyotypic Evolution in Natural Population of *Cynolebias* (Pisces: Cyprinodontiformes, Rivulidae) using banding techniques. *Cytologia* 58, 85–94.

- García, G., Claramunt, S., & Lalanne, A. I. (2003). Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, 00, 1–10.
- García, G. (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(1), 75–87. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00346.x>
- García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, 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., Loureiro, M. & Tassinio, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti*. *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 243–248.
- García, G., Gutiérrez, V., Vergara, J., Calviño, P., Duarte, A., & Loureiro, M. (2012). Patterns of population differentiation in annual killifishes from the Paran??-Uruguay-La Plata Basin: The role of vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography*, 39(9), 1707–1719. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02722.x>
- García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B., Santiñaque, F., López-Carro, B., & Folle, G. (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1), 87–98. <http://doi.org/10.1007/s10709-014-9756-7>
- Ghedotti, M. J., Meisner, A. D., & Lucinda, P. H. F. (2001). New Species of *Jenynsia* (Teleostei: Cyprinodontiformes) from Southern Brazil and Its Phylogenetic Relationships *Copeia*, 2001(3), 726–736.
- González-Bergonzoni, I., Loureiro, M., & Oviedo, S. (2009). A new species of *Gymnogeophagus* from the río Negro and río Tacuarí basins, Uruguay (Teleostei: Perciformes) *Neotropical Ichthyology*, 7(1), 19-24, 2009.

- Guedj & Guillot, G. (2011). Estimating the location and shape of hybrid zones. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1119-1123.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. (2005a). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.
- Guillot, G., Mortier, F., & Estoup, A. (2005b). Geneland: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 708-711,
- Guillot, G. (2008). Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics*, 24, 2222-2228.
- Guillot & Santos, F. (2010). Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Molecular Ecology Resources*, 10(6):1082-1084, 2010.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Guinot, G., & Cavin, L. (2015). Contrasting "fish" Diversity Dynamics between Marine and Freshwater Environments. *Current Biology*, 25(17), 2314–2318. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.033>
- Goodier, S.A., Cotterill, F.P., O’Ryan, C., Skelton, P.H. & de Wit, M.J. (2011). Cryptic diversity of African tigerfish (Genus *Hydrocynus*) reveals palaeogeographic signatures of linked Neogene geotectonic events. *PLoS ONE*, 6, e28775
- Gower, J.C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40, 33–51
- Guo, S., & Thompson, E. (1992). Performing the exact test for Hardy Weinberg Proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Hajibabaei, M., & Singer, G. A. C. (2009). Googling DNA sequences on the World Wide Web. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 1, S4. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S14-S4>
- Hammer, Q., Harper D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9pp.

- Hardy, G.H. & Edwards, A. W. F. (1908). Hardy–Weinberg Equilibrium *Genetics* July 1, 2008 vol. 179 no. 3, 1143-1150; DOI: 10.1534/genetics.104.92940
- Hardy, O. J., & Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., & Heuertz, M. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, 163, 1467-1482.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., & Stoneking, M. (1993). The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34: 483-496.
- Hanfing, B., & Weetman, D. (2006). Concordant genetic estimators of migration reveal anthropogenetically enhanced source-sink population structure in the river sculpin, *Cottus gobio*. *Genetics*, 173, 1487–1501.
- Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322-1332.
- Hass, R. (1976). Sexual selection in *Nothobranchius guentheri* (Pisces: Cyprinodontidae). *Evolution*, 30, 614–622.
- Heaney, L. R. (2000). Dynamic disequilibrium: A long-term, large-scale perspective on the equilibrium model of island biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, 9, 59–74.
- Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1, 4. <http://doi.org/10.1186/1742-9994-1-4>
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 291–301. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.016>

- Hopken, M. W., Douglas, M. R., & Douglas, M. E. (2013). Stream hierarchy defines riverscape genetics of a North American desert fish. *Molecular Ecology*, 22(4), 956–971. <http://doi.org/10.1111/mec.12156>
- Hrbek, T., & Larson, a. (1999). The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution*, 53(4), 1200–1216. <http://doi.org/10.2307/2640823>
- Hubert, N., & Renno, J. F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33, 1414–1436.
- Kaneshiro, K.Y. (1976). Ethological isolation and phylogeny in the planitibia subgroup of Hawaiian drosophila. *Evolution* 30, 740-745.
- Kaneshiro, K. Y. (1980) Sexual isolation speciation and the direction of evolution. *Evolution* 34, 437-444.
- Kaweesi, T.J. & Holt, R.D. (2002). Evolutionary consequences of asymmetric dispersal rates. *American Naturalist* 160, 333-347.
- Kuhner, M. K. (2009). Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 86–93. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.007>
- Kozak, K.H., Blaine, R.A. & Larsen, A. (2006). Gene lineages and eastern North American palaeodrainage basins: phylogeography and speciation in salamanders of the *Eurycea bislineata* species complex. *Molecular Ecology*, 15, 191–207.
- Labonne, J., Ravigné, V., Parisi, B., & Gaucherel, C. (2008). Linking dendritic network structures to population demogenetics: The downside of connectivity. *Oikos*, 117(10), 1479–1490. <http://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16976.x>
- Lambert, R. (1940). Memoria Explicativa de una Carta Geológica de Reconocimiento del departamento de Río Negro. Instituto Geológico del Uruguay, Bol. N°. 28. Montevideo, Uruguay.

- Lawing, A. M., & Polly, P. D. (2010). Geometric morphometrics: Recent applications to the study of evolution and development: REVIEW. *Journal of Zoology*, 280(1), 1–7. <http://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00620.x>
- Leite, R. N., & Rogers, D. S. (2013). Revisiting Amazonian phylogeography: Insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity and Evolution*, 13(4), 639–664. <http://doi.org/10.1007/s13127-013-0140-8>
- Li, C., Riethoven, J.-J. M., & Ma, L. (2010). Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 90. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-10-90>
- Librado, P., & Rosas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lindenmayer, D. and Fisher, J. (2006). *Habitat Fragmentation and Landscape Change: An ecological and Conservation Synthesis*. Island Press
- Ling, N. (2001). Creating and destroying species: the “new” biodiversity and evolutionarily significant units among New Zealand’s galaxiid fishes. *Journal of Fish Biology*, 59, 209–222. <http://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1768>
- López-Fernández, H., Arbour, J. H., Winemiller, K. O., & Honeycutt, R. L. (2013). Testing for ancient adaptive radiations in neotropical cichlid fishes. *Evolution*, 67(5), 1321–1337. <http://doi.org/10.1111/evo.12038>
- Loureiro, M. (2004). *Sistemática Y Biogeografía De Los Peces Anuales De La Subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae)*. Tesis Doctorado. PEDECIBA, Montevideo.
- Loureiro, M., Azpelicueta, M. de las M., & García, G. (2004). *Cynolebias arachan* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a New Species of Annual Fish from Northeastern Uruguay. *Revue Suisse de Zoologie*, 111, 21–30.
- Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., & Arim, M. (2015). *Austrolebias* in Space Scaling from Ponds to Biogeographical Regions. In *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity and Evolution* (pp. 107–128).

- Loureiro, M., Duarte, A., & Zarucki, M. (2011). A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology*, 9(2), 335–342. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252011000200010>
- Loureiro, M., & García, G. (2004). *Cynolebias reicherti*, a New Annual Fish Species (Rivulidae: Cynolebiantinae) From Southern Laguna Merín Basin. *Acta Zoológica Lilloana*, 48(2), 13–25.
- Loureiro, M. & García, G. (2006). Transgresiones y Regresiones marinas en la costa Atlántica y lagunas costeras de Uruguay: efectos sobre los peces continentales. Pp: 545-555. En: Menafra R. Rodríguez-Gallego L., Scarabino F. & D. Conde (eds). Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo, 668 pp.
- Loureiro, M., & García, G. (2008). *Austrolebias reicherti* Loureiro & Garcia, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 15, 1–15.
- Loureiro, M., & Sá, R. O. De. (2015). Diversity of Aplocheiloidei. In *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity and Evolution* (pp. 1–31).
- Losos, J. B., & Schluter, D. (2000). Analysis of an evolutionary species-area relationship. *Nature*, 408, 847–850.
- Lowe, W.H., & Allendorf, F.W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity? *Mol. Ecol.* 19, 3038–3051
- Lucinda, P. H. F. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3(2), 259-270.
- 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. In *Phylogeny and classification of neotropical fishes*, (Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S., eds.) pp 13-48. Porto Alegre: Edipucrs.
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Perry, A., Martin, J., Elder, J., Bechler, D., & Avise, J. (2006). Microsatellite Documentation of Male-Mediated Outcrossing between Inbred Laboratory

- Strains of the Self-Fertilizing Mangrove Killifish (*Kryptolebias marmoratus*). *Journal of Heredity*, 97, 508-513.
- Maltagliati, F., Giuseppe, G. D. I., Barbieri, M., Castelli, A., & Dini, F. (2010). Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100, 910–923. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01482.x>
- Manel, S., Gaggiotti, O. E., & Waples, R. S. (2005). Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(3), 136–142. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2004.12.004>
- Manel, S., & Holderegger, R. (2013). Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(10), 614–621. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.012>
- Maruyama, T. (1969). Genetic correlation in the stepping stone model, with non-symmetrical migration rates. *Journal of Applied Probability*. 6, 463–477.
- Maruyama, T. (1970). Effective number of alleles in a subdivided population. *Theoretical Population Biology* 1, 273–306. [http://doi:10.1016/0040-5809\(70\)90047-X](http://doi:10.1016/0040-5809(70)90047-X)
- Marquez, A. (2012). Filogeografía Comparada de Sciaénidos del Atlántico Sudoccidental. *Tesis de doctorado*. PEDECIBA, Montevideo.
- Mateos, M., Sanjur, O. I., & Vrijenhoek, R. C. (2002). Historical Biogeography of the Livebearing Fish Genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution*, 56(5), 972–984. <http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01409.x>
- Matthews, W.J. (1998) Patterns in freshwater fish ecology. Chapman and Hall, London.
- Mayden, R.L. (1988) Vicariance biogeography, parsimony, and evolution in North American freshwater fishes. *Systematic Zoology*, 37, 329–355.
- Mayr, E. (1954). Change of genetic environment and evolution. *Evolution as a Process*. Retrieved from [http://www.sevin.ru/fundecology/speciation/mayr\(20\).pdf](http://www.sevin.ru/fundecology/speciation/mayr(20).pdf)

- McBryan, T. L., Healy, T. M., Haakons, K. L., & Schulte, P. M. (2016). Warm acclimation improves hypoxia tolerance in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, 219(4), 474–484. <http://doi.org/10.1242/jeb.133413>
- Miller S D & H Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16:215.
- Morrissey, M. B., & Kerckhove, D. T. de. (2009). The Maintenance of Genetic Variation Due to Asymmetric Gene Flow in Dendritic Metapopulations. *The American Naturalist*, 174(6), 875–889. <http://doi.org/10.1086/599011>
- Murphy, W. J., & Collier, G. E. (1996). Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae): implications for Caribbean and Central American biogeography. *Molecular Biology and Evolution*, 13(5), 642–649.
- Murphy, W. J., & Collier, G. E. (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. *Molecular Biology and Evolution*, 14(8), 790–799.
- Murphy, W. J., & Collier, G. E. (1999). Phylogenetic relationships of African killifishes in the genera *Aphyosemion* and *Fundulopanchax* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(3), 351–60. <http://doi.org/10.1006/mpev.1998.0566>
- Murphy, W. J., Nguyen, T. N. P., Taylor, E. B., & Collier, G. E. (1999). Mitochondrial DNA phylogeny of West African aplocheiloid killifishes (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(3), 343–50. <http://doi.org/10.1006/mpev.1998.0567>
- Murphy, W. J., Thomerson, J. E., & Collier, G. E. (1999). Phylogeny of the Neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(2), 289–301. <http://doi.org/10.1006/mpev.1999.0656>
- Near, T.J. & Keck, B.P. (2005) Dispersal, vicariance, and timing of diversification in *Nothonotus* darters. *Molecular Ecology*, 14, 3485–3496.

- Near, T. J., Dornburg, A., Eytan, R. I., Keck, B. P., Smith, W. L., Kuhn, K. L., ... Wainwright, P. (2013). Phylogeny and tempo of diversification in the superradiation of spiny-rayed fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(31), 12738–12743. <http://doi.org/10.5061/dryad.d3mb4>
- Ng'oma, E., Valdesalici, S., Reichwald, K., & Cellerino, A. (2013). Genetic and morphological studies of *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes) from Malawi with description of *Nothobranchius wattersi* sp. nov. *Journal of Fish Biology*, *82*(1), 165–188. <http://doi.org/10.1111/jfb.12001>
- Nichols, J.D. (2001) *Dispersal*. Oxford University Press.
- Osborne, M. J., Perkin, J. S., Gido, K. B., & Turner, T. F. (2014). Comparative riverscape genetics reveals reservoirs of genetic diversity for conservation and restoration of Great Plains fishes. *Molecular Ecology*, *23*(23), 5663–5679. <http://doi.org/10.1111/mec.12970>
- Ohta, T., & Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genome Research*, *22*, 201–204.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
- Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G. G., & Gonzalez, A. (2013). Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*, *119*(10), 891–897. <http://doi.org/10.1111/eth.12129>
- Passos, C., Tassinio, B., Reyes, F., & Rosenthal, G. G. (2014). Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PLoS ONE*, *9*(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101649>
- Paz-Vinas, I., Loot, G., Stevens, V. M., & Blanchet, S. (2015). Evolutionary processes driving spatial patterns of intraspecific genetic diversity in river ecosystems. *Molecular Ecology*, *24*(18), 4586–4604. <http://doi.org/10.1111/mec.13345>

- Paz-Vinas, I., Quéméré, E., Chikhi, L., Loot, G., & Blanchet, S. (2013). The demographic history of populations experiencing asymmetric gene flow: Combining simulated and empirical data. *Molecular Ecology*, 22(12), 3279–3291. <http://doi.org/10.1111/mec.12321>
- Ponce de León, J. L., León, G., Rodríguez, R., Metcalfe, C. J., Hernández, D., Casane, D., & García-Machado, E. (2014). Phylogeography of Cuban Rivulus: Evidence for allopatric speciation and secondary dispersal across a marine barrier. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 404–414. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.07.007>
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus data. *Genetics*, 155, 945–959.
- PROBIDES. 1999. Plan Director Reserva de Biosfera Bañados del Este/Uruguay-Rocha, 159 pp.
- Radinger, J., & Wolter, C. (2014). Patterns and predictors of fish dispersal in rivers. *Fish and Fisheries*, 15(3), 456–473. <http://doi.org/10.1111/faf.12028>
- Reis, R. E. (1998). Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of the available data. *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, EDIPUCRS, 603pp.
- Richardson LR, Gold JR (1995) Evolution of the *Cyprinella lutrensis* species group. III. Geographic variation in the mitochondrial DNA of *Cyprinella lutrensis* – the influence of Pleistocene glaciation on population dispersal and divergence. *Molecular Ecology*, 4, 163–172.
- Rissler, L. J., Hijmans, R. J., Graham, C. H., Moritz, C., & Wake, D. B. (2006). Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analyses: a case study of California herpetofauna. *The American Naturalist*, 167(5), 655–666. <http://doi.org/10.1086/503332>
- Rogers, A.R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3), 552–569.
- Rohlf, J.L. & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39, 40–59.

- Rousset, F., & Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140, 1413-1419.
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138
- Rueda, E. C., Carriquiriborde, P., Monzón, A. M., Somoza, G. M., & Ortí, G. (2013). Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genética*, 141(7-9), 401–407. <http://doi.org/10.1007/s10709-013-9739-0>
- Ruiz-González, A. (2010). Genética del Paisaje aplicada sobre una especie- objetivo de la Red de Corredores Ecológicos : la marta europea (*Martes martes*).
- Schwarzer, J., Misof, B., Ifuta, S.N. & Schlieven, U.K. (2011). Time and origin of cichlid colonization of the lower Congo rapids. *PLoS ONE*, 6, e22380.
- Scudder, T., 2005. The Future of Large Dams: Dealing with Social, Environmental, Institutional and Political Costs. Earthscan, London.
- Serra, S., Bessonart, J., Teixeira, F., Duarte, A., & Loureiro, M. (2014). Peces del Río Negro. DINARA, Montevideo. 200pp.
- Sexton, J. P., Hangartner, S. B., & Hoffmann, A. A. (2014). Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common? *Evolution*, 68(1), 1–15. <http://doi.org/10.1111/evo.12258>
- Siegel, A.F. & Benson, R.H. (1982). A robust comparison of biological shapes. *Biometrics* 38, 341–350.
- Simmons, M. P., & Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49(2), 369–381. <http://doi.org/10.1080/10635159950173889>
- Smith GR (1981) Late cenozoic freshwater fishes of North America. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1981, 163–193.

- Sneath, P.H. (1967). Trend-surface analysis of transformation grids. *J. Zool. (Lond.)* 151, 65–122.
- Stephens, M., & Donnelly, P. (2003). Report A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *Am. J. Hum. Genet.* 73(2002), 1162–1169. <http://doi.org/10.1086/379378>
- Stephen, J., & O'Brien. (2009). A Role for Molecular Genetics in Biological Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (13), 5748-5755.
- Slatkin, M. (1991): Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58, 167–175.
- Slatkin, M. & Hudson, R. R. (1991): Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555–562.
- Slatkin, M. (1995). A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 57-462.
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.
- Strahler, A. N. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions American Geophysical Union*, 38(6), 913–920. <http://doi.org/10.1130/0016-7606>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3), 585-595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Taylor, P.D., Fahrig, L. Henein, K., & Merriam, G. (1993). Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, 68(3), 571-572.

- Taylor, P. D., Fahrig, L., & With, K. a. (2006). Landscape Connectivity: A return to the basics. *Conservation Biology*, (14), 29–43. <http://doi.org/10.2307/3545811>
- Templeton, A. R. (1980). Modes of speciation and inferences based on genetic distances. *Evolution* 34, 719-729.
- Templeton AR. 2006. Population Genetics and Microevolutionary Theory.
- Thomaz, A., Christie, M., & Lacey, K. (2016). The architecture of river networks can drive the evolutionary dynamics of aquatic populations. *Evolution*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1111/evo.12883>
- Thompson, J. D., Higgins D. G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193–1213. <http://doi.org/10.1111/mec.12164>
- Van, O. C., Hutchinson, W., Wills, D., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Vari, R. P., & Malabarba, L. R. (1998). Neotropical ichthyology: an overview. Phylogeny and classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, EDIPUCRS, 603pp.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra, B., & Scaglia, S. (1964) Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Arch Soc Biol Montev.* 26, 44–49.
- Vaz-Ferreira, R., & Melgarejo, A. (1984). La distribución de las especies del género *Cynolebias* Steindachner, 1876 en el Uruguay, con notas sobre *C. alexandri* Castello y López, 1974. *Bol. Soc. Zool. Uruguay* 2, 41–46.
- Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *The Journal of Heredity*, 89(5), 438–450. <http://doi.org/10.1093/jhered/89.5.438>

- Waters MR, Nordt LC (1995) Late Quaternary floodplain history of the Brazos River in east-central Texas. *Quaternary Research*, 43, 311–319.
- Waters, J.M. & Wallis, G.P. (2001) Mitochondrial DNA phylogenetics of the *Galaxias vulgaris* complex from South Island, New Zealand: rapid radiation of a species flock. *Journal of Fish Biology*, 58, 1166–1180.
- Waters, J. M., Craw, D., Burridge, C. P., Kennedy, M., King, T. M., & Wallis, G. P. (2015). Within-river genetic connectivity patterns reflect contrasting geomorphology. *Journal of Biogeography*, (SEPTEMBER), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/jbi.12608>
- Wen-Hsiung, L., & Graur, D. (1991). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland Massachusetts. 285p.
- Wheeler, Q. D. (2009). *The New Taxonomy*. CRC Press, Boca Rotan, Florida.
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, 56(6), 875–878. <http://doi.org/10.1080/10635150701748506>
- Willis, S. C., Farias, I. P., & Ortí, G. (2013). Multi-locus species tree for the Amazonian peacock basses (Cichlidae: Cichla): Emergent phylogenetic signal despite limited nuclear variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 479–490. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.031>
- Willis, S. C., Farias, I. P., & Ortí, G. (2014). Testing mitochondrial capture and deep coalescence in amazonian cichlid fishes (Cichlidae: *Cichla*). *Evolution*, 68(1), 256–268. <http://doi.org/10.1111/evo.12230>
- 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.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*, 15, 323–354.
- Young, N., & Healy, J. (2003). GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 6. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-4-6>

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists. Elsevier (Vol. 59). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>

ANEXOS

Localidades/Marcadores	Citocromo b	EPIC 1835
Cololó	24	0
Paso Arriera	8	12
Paso Aguiar	10	16
Lechiguana	14	2
Paraje 329	9	14
Mazangano	10	10
Cda. de los Molles	10	18
Cerro de las Cuentas	10	20
Sarandí	8	14
Tacuarí	9	12
Codo	9	10
Tres Boliches	10	12
Chuy	8	16
Conventos	9	8
Caraguata	11	8
Yaguarí	11	6
Paso de Melo	9	18
Total	179	196

Anexo 1. Número de secuencias para cada marcador molecular, utilizado en el presente trabajo, para cada localidad de muestreo de *A. arachan*.

Lote	Localidad	Cuenca
7681	Bañados aledaños a Ruta 6	Río negro
7719	Río Negro oeste	Río negro oeste
7733	Cañada de la Arena	Arroyo Conventos
7809	Río Negro y Ruta 26	Río negro
8642	Ciudad de Melo	Arroyo Conventos
8673	Arroyo Sarandí	Arroyo Sarandí
8692	Paraje 329	Río Negro
8698	Las Cuentas	Arroyo Cuentas
8719	Río Negro oeste	Río Negro oeste
8747	Río Yaguarí y Ruta 26	Río Yaguarí
8763	Paso Pereira	Río Negro
9714	Paraje 329	Río Negro
9717	Cerro de Las Cuentas	Arroyo Cuentas
9722	Paso Mazangano	Río Negro
9723	Boliche Blanco	Arroyo Conventos
9730	Cañada de la Arena	Arroyo Conventos
9731	Arroyo Chuy	Arroyo Chuy
9732	Arroyo Caraguatá	Arroyo Caraguata
9737	Ruta 26 Km 331	Arroyo Caraguata
9738	Río Negro y Ruta 26	Río Negro
9739	Río Tacuarí	Río Tacuarí
11596	Río Negro oeste	Río Negro oeste
2641-88	Río Negro oeste	Río Negro oeste

Anexo 2. Número de lote de la colección de vertebrados de Facultad de Ciencias (ZVC-P) de los cuales se utilizaron individuos para la toma de los datos morfométricos.

Localidad	Categoría	Hd	π
Chuy	6	0,750	0,012
Conventos	4	0,806	0,079
Sarandí	4	0,000	0,000
Codo	4	0,417	0,011
Lechiguana	4	0,440	0,006
Cañada de los molles	5	0,533	0,035
329	7	0,583	0,009
Cuentas	5	0,644	0,015
Tres boliches	5	0,733	0,025
Cololo	8	0,773	0,017
Paso Aguiar	7	0,778	0,018
Tacuarí	6	0,786	0,050
Yaguari	6	0,818	0,019
Paso Arriera	6	0,857	0,020
Mazangano	7	0,867	0,024
Caraguatá	6	0,873	0,032
Paso de Melo	6	0,944	0,050

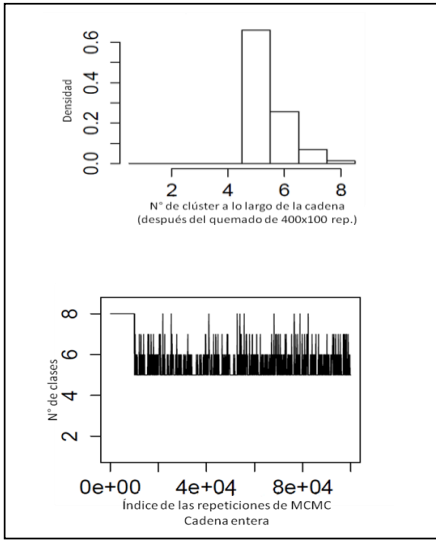
Anexo 3. Diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) calculada para cada localidad y las categorías asignadas a cada una de las localidades, según el criterio de su ubicación en la cuenca en relación a la cabecera de los ríos.

- | | | | |
|-----|---|-----|------------------------------|
| 1- | Chuy (4), Tacuari (1) | 32- | Aguiar (1) |
| 2- | Chuy (1) | 33- | Molles (1) |
| 3- | Chuy (2) | 34- | Aguiar (1) |
| 4- | Chuy (1) | 35- | Aguiar (1) |
| 5- | Tacuari (1) | 36- | Arriera (1) |
| 6- | Codo (1) | 37- | Arriera (1) |
| 7- | Codo (1) | 38- | Arriera (2) |
| 8- | Codo (7), Tacuari (4) | 39- | Mazangano (1) |
| 9- | Tacuari (1) | 40- | Paraje 329 (1) |
| 10- | Tacuari (1) | 41- | Lechiguana (4) |
| 11- | Tres Boliches (4) | 42- | Molles (1) |
| 12- | Tres Boliches (4) | 43- | Paraje 329 (1) |
| 13- | Tres Boliches (1) | 44- | Mazangano (1) |
| 14- | Conventos (3) | 45- | Cololo (1) |
| 15- | Conventos (1) | 46- | Caraguata (2) |
| 16- | Sarandi (8) | 47- | Yaguari (4) |
| 17- | Tres Boliches (1) | 48- | Yaguari (3) |
| 18- | Conventos (2) | 49- | Yaguari (1) |
| 19- | Conventos (3) | 50- | Yaguari (1) |
| 20- | Cololo (7), Mazangano (1) | 51- | Caraguata (4), Yaguari (2) |
| 21- | Cuentas (2), Mazangano (1) | 52- | Caraguata (1) |
| 22- | Cuentas (6), Mazangano (1) | 53- | Caraguata (1) |
| 23- | Cuentas (1), Mazangano (1) | 54- | Caraguata (1) |
| 24- | Cuentas (1) | 55- | Caraguata (1) |
| 25- | Cololo (5) | 56- | Caraguata (1) |
| 26- | Cololo (2) | 57- | Paso de Melo (1) |
| 27- | Paraje 329 (1), Aguiar (1) | 58- | Paso de Melo (1), Molles (1) |
| 28- | Cololo (1) | 59- | Paso de Melo (1) |
| 29- | Aguiar (1) | 60- | Paso de Melo (2) |
| 30- | Arriera (1) | 61- | Paso de Melo (1) |
| 31- | Arriera (3), Cololo (9), Lechiguana (10),
Molles (7), Paraje 329 (6), Mazangano
(4), Aguiar (5) | 62- | Paso de Melo (1) |
| | | 63- | Paso de Melo (2) |

Anexo 4. Secuencias por haplotipos de citocromo b (entre paréntesis la cantidad de secuencias de dicha localidad con dicho haplotipo)

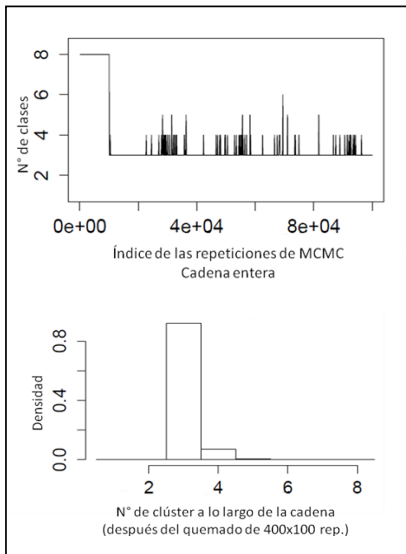
- 1- Yaguari (1)
- 2- Yaguari (1)
- 3- Caraguata (5), Yaguari (4)
- 4- Caraguata (1), Sarandi (2)
- 5- Sarandi (1)
- 6- Caraguata (1), Sarandi (1)
- 7- Melo (2)
- 8- Aguiar (1), Arriera (2), Codo (2), Chuy (4), Lechiguana (2), Mazangano (1), Melo (14), Sarandi (5), 329 (3).
- 9- Sarandi (3)
- 10- Conventos (1)
- 11- Aguiar (4), Codo (6), Conventos (3), Mazangano (1), Molles (5), Sarandi (2), Tres_Boliches (12), Tacuari (2), 329 (2)
- 12- Conventos (2)
- 13- Tacuari (2)
- 14- Arriera (3), Conventos (1), Tacuari (2)
- 15- Conventos (1)
- 16- Arriera (1)
- 17- Molles (6), Aguiar (10), Arriera (6), Codo (2), Chuy (10), Mazangano (7), Melo (2), 329 (8), Tacuari (5), Cuentas (20).
- 18- 329 (1)
- 19- Chuy (2), Tacuari (1), Mazangano (1)

Anexo 5. Secuencias por haplotipos EPIC 1835 (entre paréntesis la cantidad de secuencias de dicha localidad con dicho haplotipo)

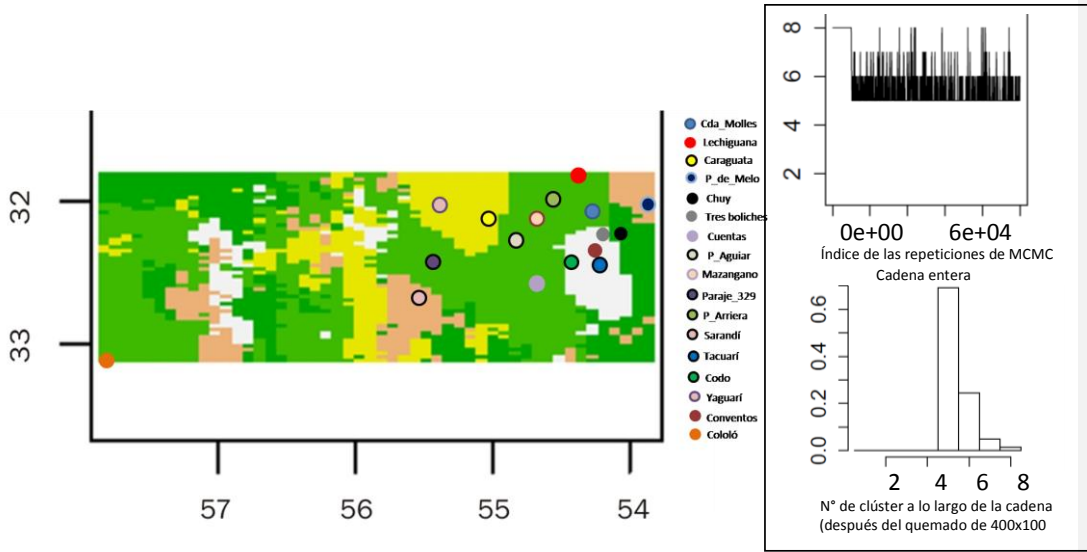


Anexo 6. Arriba: número de clúster encontrados m a través del análisis de 100000 iteraciones de MCMC. Abajo: gráfico de convergencia de la búsqueda del parámetro mediante el análisis de MCMC. Para el marcador citocromo b.

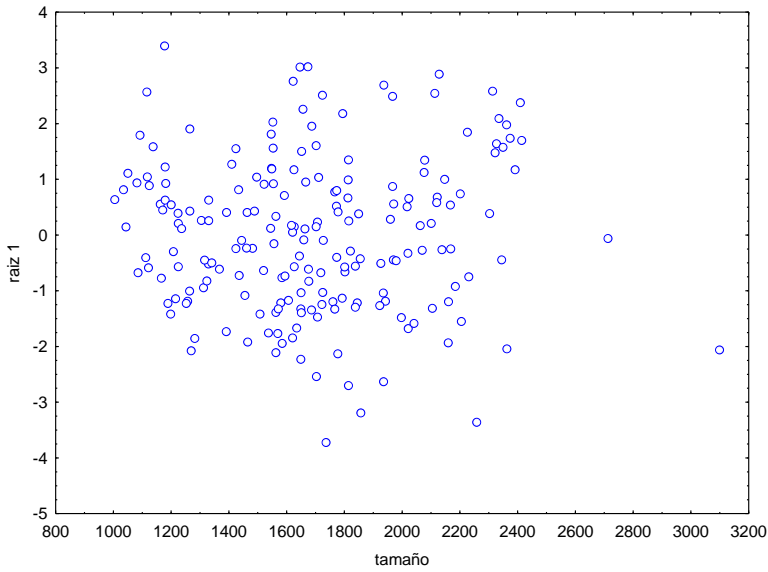
Anexo 7. Arriba: número de clúster encontrados m a través del análisis de 100000 iteraciones de MCMC. Abajo: gráfico de



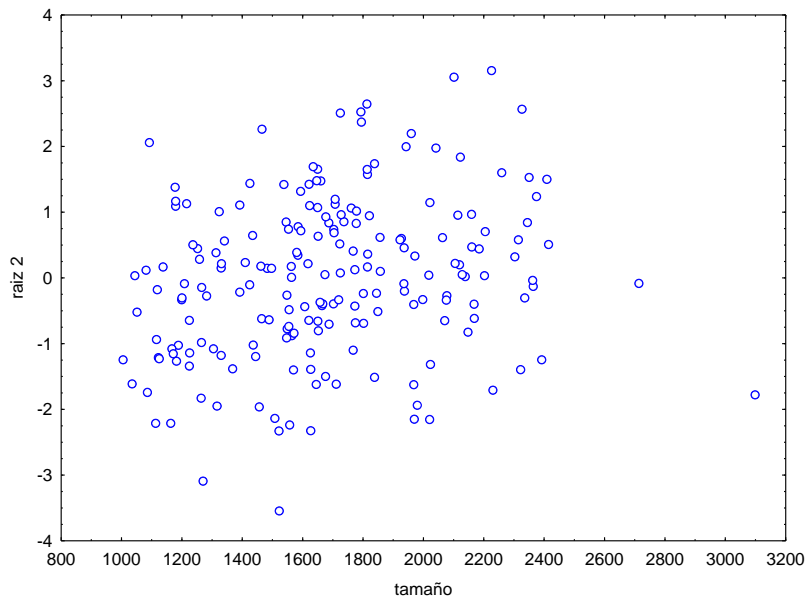
convergencia de la búsqueda del parámetro mediante el análisis de MCMC. Para el marcador EPIC_1835.



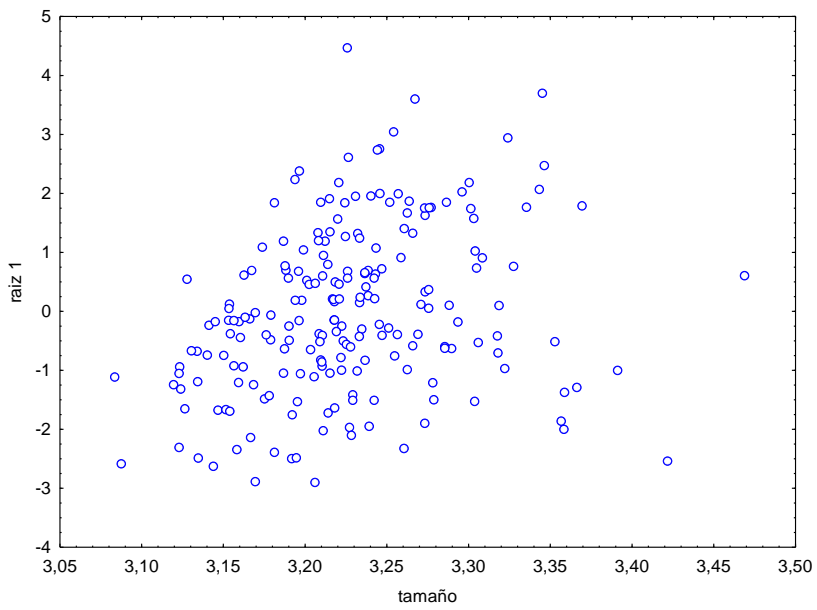
Anexo 8. A la izquierda: mapa del valor de asignación a cada uno de los 5 grupos inferidos para cada uno de los pixeles del área de estudio, para el marcador mitocondrial citocromo b, incluyendo los individuos de la localidad al oeste del Río Negro (Cololó). Los puntos representan las localidades de pertenencia de los individuos. A la derecha y arriba: número de clúster encontrados m a través del análisis de 100000 iteraciones de MCMC. A la derecha y abajo: gráfico de convergencia de la búsqueda del parámetro mediante el análisis de MCMC. Para el marcador citocromo b, incluyendo la localidad al oeste del Río Negro (Cololó).



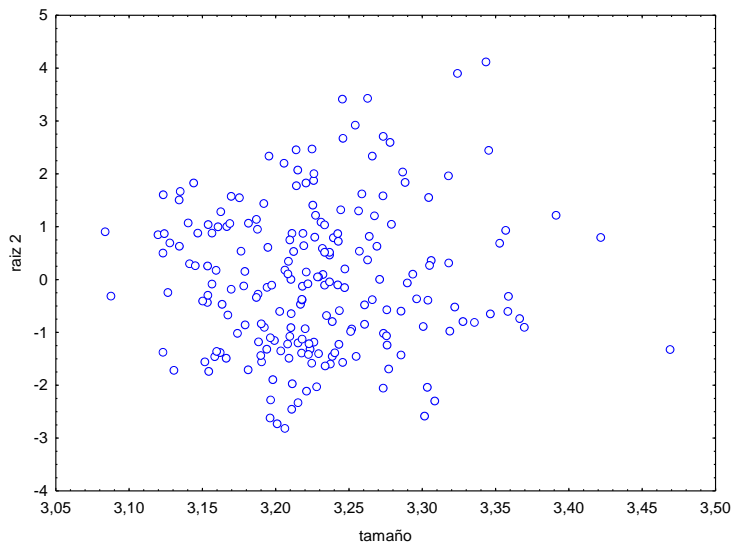
Anexo 9. Gráfica tamaño vs. Raíz 1 (machos) $r = 0,014$ | $p = 0,844$; $r^2 = 0,0002$



Anexo 10. Gráfica tamaño vs. Raíz 2 (machos) $r = 0,223$ | $p = 0,002$; $r^2 = 0,0498$



Anexo 11. Gráfica tamaño vs. Raíz 1 (hembras) $r = 0,2781$ | $p = 0,00005$



Anexo 12. Gráfica tamaño vs. Raíz 2 (hembras) $r = 0,0489$ | $p = 0,4835$