



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

Desarrollo de herramientas moleculares para la  
identificación genética de la corvina negra  
*Pogonias cromis*

*Lucía Anza*

**Orientadora:**

Dra. Graciela García

**Co-Orientador:**

Mag. Néstor Ríos

**Tribunal:**

Dra. Graciela Piñeiro

Dr. Marcelo Loureiro

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos  
Sección Genética Evolutiva  
Facultad de Ciencias  
UdelaR

Diciembre, 2018

# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecerles a mis tutores, la Dra. Graciela García y el Mag. Néstor Ríos por aceptarme en el laboratorio a pesar de haber llegado con la idea de estudiar fósiles, por permitirme llevar a cabo esa idea y hacerla material. Estoy muy agradecida porque han participado muy activamente en todo mi proceso de aprendizaje, siempre dispuestos a orientarme y ayudarme. Solo tengo palabras de gratitud hacia ambos.

También quisiera agradecerles a los miembros del Tribunal, la Dra. Graciela Piñeiro y el Dr. Marcelo Loureiro por haber aceptado formar parte del mismo y por su gran disposición en corregir esta tesina.

A Verónica Gutiérrez y Cristhian Clavijo por sus colaboraciones en mi formación.

A la Dra. Graciela Fabiano y a Cecilia Costa, que me han ayudado a coleccionar muestras.

A mis padres que me han apoyado todo este largo trayecto y a mi hermana, que siempre estuvo ahí para ayudarme y aconsejarme.

A mis amigas de siempre que han estado incondicionalmente y me han contenido en momentos difíciles.

A mis amigos los biólogos que han hecho los años de facultad los mejores y que siempre han estado ahí cuando yo los necesitaba.

# Índice

Resumen .....	i
1. Introducción .....	1
1.1. Características de la especie en estudio .....	1
1.2. Evidencias de restos antiguos de <i>Pogonias cromis</i> .....	2
1.3. Importancia de la especie como recurso pesquero .....	3
1.4. Aspectos a tener en cuenta para su conservación .....	3
1.5. Estudios de ADN mitocondrial .....	5
1.6. Estudios de ADN antiguo .....	7
1.7. Propuesta de trabajo .....	8
1.8. Hipótesis .....	9
1.9. Objetivo general .....	9
1.10. Objetivos específicos .....	9
2. Materiales y Métodos .....	10
2.A. <u>Material Fósil</u> .....	10
2.A.1. Obtención de muestras fósiles .....	10
2.A.2. Extracción de ADN .....	10
2.A.3. Desarrollo y síntesis de oligonucleótidos específicos .....	12
2.A.4. Amplificación de los genes COI y <i>cyt b</i> con oligonucleótidos universales en muestras fósiles .....	13
2.A.5. Amplificación de fragmentos cortos de los genes COI y <i>cyt b</i> utilizando los oligonucleótidos sintetizados en muestras fósiles .....	14
2.A.6. Confirmación de amplificación con oligonucleótidos universales y específicos en muestras actuales .....	15
2.A.7. Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas .....	15
2.B. <u>Material actual</u> .....	16
2.B.1. Obtención de muestras actuales .....	16
2.B.2. Extracción de ADN .....	16
2.B.3. Amplificación de los genes COI y <i>cyt b</i> .....	17
2.B.4. Secuenciación y análisis de secuencias obtenidas en muestras actuales .....	18
2.B.4.1. Alineamientos de las secuencias .....	18
2.B.4.2. Polimorfismos de los genes mitocondriales COI y <i>cyt b</i> en poblaciones actuales .....	18
2.B.4.2.1. Análisis de la diversidad de ambos marcadores mitocondriales .....	18
2.B.4.2.2. Test de neutralidad .....	20
2.B.4.3. Análisis filogenéticos .....	20
2.B.4.4. Análisis de Genética Poblacional .....	21
2.B.4.4.1. Inferencia de demografía histórica: "Mismatch distribution" .....	21
2.B.4.4.2. Red de haplotipos .....	21
2.B.4.4.3. Análisis de la estructura poblacional .....	22
3. Resultados .....	23
3.A. <u>Material fósil</u> .....	23
3.A.1. Extracción de ADN .....	23
3.A.2. Desarrollo y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos entre 100-300 pb de <i>P. cromis</i> .....	23
3.A.3. Amplificación, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas .....	

de muestras fósiles con oligonucleótidos universales .....	24
3.A.4. Amplificación, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas de muestras fósiles con oligonucleótidos específicos .....	25
3.A.5. Confirmación de amplificación con oligonucleótidos universales y específicos en muestras actuales .....	25
3.B. <u>Material actual</u> .....	26
3.B.1. Extracción de ADN .....	26
3.B.2. Análisis de los datos moleculares obtenidos basados en los genes COI y <i>cyt b</i> .....	26
3.B.2.1. Polimorfismos de los genes mitocondriales COI y <i>cyt b</i> en poblaciones actuales .....	26
3.B.2.1.1. Análisis de la diversidad de ambos marcadores mitocondriales .....	26
3.B.2.1.2. Test de neutralidad .....	29
3.B.2.2. Análisis filogenéticos: Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud .....	29
3.B.2.3. Análisis de Genética Poblacional .....	33
3.B.2.3.1. Inferencia de demografía histórica: "Mismatch distribution" .....	33
3.B.2.3.2. Red de haplotipos .....	35
3.B.2.3.3 Análisis de estructura poblacional .....	37
4. Discusión .....	39
4.A. <u>Material Fósil</u> .....	39
4.A.1. Análisis de los resultados obtenidos en restos óseos antiguos .....	39
4.A.2. Avances y dificultades en el trabajo con ADN antiguo .....	39
4.B. <u>Material actual</u> .....	43
4.B.1. Análisis de los datos moleculares obtenidos basados en los marcadores COI y <i>cyt b</i> .....	43
4.B.1.1. Niveles de variabilidad genética para <i>P. cromis</i> con los marcadores utilizados .....	43
4.B.1.2. Análisis filogenético y de estructura poblacional basados en los marcadores COI y <i>cyt b</i> .....	45
5. Conclusiones .....	48
6. Perspectivas .....	49
7. Bibliografía .....	52
8. Material suplementario y Anexos .....	65

## Resumen

*Pogonias cromis* es una especie estuario-dependiente de gran importancia para la pesca. Tiene un amplio rango de distribución a lo largo de las costas del Océano Atlántico Occidental, y es la especie de mayor tamaño dentro de los sciaénidos que habitan en el Río de la Plata. Presenta un carácter longevo y de lento crecimiento, indicando una baja tasa de mortalidad natural y una baja fecundidad relativa. Esto implica una menor capacidad de reposición de biomasa, haciéndola particularmente susceptible a la pesca. En el territorio brasileño es considerada en peligro de extinción. El registro fósil de la especie sugeriría un rango de distribución mayor para *P. cromis* en el territorio uruguayo desde hace por lo menos 6000 años. En este trabajo se propone la utilización de herramientas moleculares para identificar restos fósiles de peces hallados en la Formación Villa Soriano, a efectos de poner a prueba la evidencia derivada de la morfología ósea en base a la cual se sostiene la presencia de *P. cromis* en dicha Formación. En este estudio se comprueba de manera preliminar la efectividad de las herramientas desarrolladas para la identificación de la especie a partir de restos fósiles, en el marco de un enfoque de sistemática molecular. Como un segundo abordaje, en este trabajo se propone el estudio genético-poblacional de la especie para poder evaluar su estado de conservación. Para las muestras actuales de la especie, se encontraron valores bajos de diversidad en el sur de Sudamérica. Sin embargo, la diversidad genética es mayor en comparación con muestras analizadas del hemisferio norte. Los análisis de genética poblacional apoyan el aislamiento de la especie en dos poblaciones geográficamente distantes (norte y sur). Los estudios realizados pretenden aportar información para el manejo y conservación de este recurso pesquero.

# 1. Introducción

## 1.1. Características de la especie en estudio

La familia Sciaenidae, que incluye los peces conocidos como corvinas y pescadillas, forma uno de los grupos más grandes dentro de los peces teleósteos, comprendiendo 66 géneros y aproximadamente 291 especies en todo el mundo (Lo et al., 2015). Los sciaénidos se distribuyen desde áreas tropicales a templadas, encontrándose fundamentalmente en costas marinas, aunque algunas pocas especies habitan en ríos y estuarios (Chao et al., 2015). La mayoría de las especies marinas utilizan ambientes estuarinos como áreas de cría, o se mueven a lo largo de la orilla y márgenes de ríos estacionalmente para la reproducción (Chao et al., 2015).

La especie *Pogonias cromis* es un sciaénido, comúnmente llamado corvina negra, que se encuentra entre los principales peces costeros explotados en Uruguay (Defeo et al., 2009), siendo de gran importancia para la pesca deportiva o recreativa (Nion et al., 2013). Es una especie estuario-dependiente y se distribuye actualmente en América, a lo largo de la costa del océano Atlántico, desde Nueva Escocia, en Canadá, hasta el Golfo de San Matías, en Argentina (Urteaga y Perrotta, 2001; Macchi et al., 2002; Froese y Pauly, 2018). La corvina negra es la especie de mayor tamaño dentro de los sciaénidos que habitan el Río de la Plata (Macchi et al., 2002), pudiendo llegar a medir 120 cm de longitud (Cousseau y Perrotta, 2000). Chao (2003) describe las características morfológicas distintivas de la especie poniéndole énfasis en los siguientes caracteres diagnósticos: 11 espinas dorsales totales, entre 19 y 22 radios blandos dorsales; 2 espinas anales; de 5 a 7 radios blandos anales; un cuerpo gris plateado a muy oscuro; los juveniles presentan 4 o 5 franjas verticales laterales, que desaparecen con el crecimiento; aletas pélvicas y anal son generalmente oscuras; mentón con 5 poros y de 10 a 13 pares de pequeñas barbas que se encuentran a lo largo de los bordes medios de la mandíbula inferior.

Al igual que muchos otros sciaénidos, los juveniles de *P. cromis* viven en zonas estuarinas donde toleran un amplio rango de salinidad y de temperatura del agua (Blasina et al., 2010). Los adultos suelen ser comunes en las aguas costeras y de estuarios poco profundos, de no más de 15 metros de profundidad, y en ocasiones se encuentran más lejos de la costa (Urteaga y Perrotta, 2001; Nion et al., 2013). La época reproductiva en el hemisferio sur ocurre durante los meses

de setiembre a diciembre, siendo octubre el mes en el cual se ha registrado mayor frecuencia de aparición y actividad reproductiva en la Bahía de Samborombón, en Argentina (Urteaga y Perrotta, 2001). Esta especie se alimenta principalmente de organismos que se encuentran en los fondos marinos, como crustáceos, moluscos y otros peces (Froese y Pauly, 2018; Politis y León, 2010). La máxima edad reportada es de 45 años (Froese y Pauly, 2018), aunque en latitudes mayores hay evidencia de corvinas negras de hasta 59 años (Jones y Wells, 1998).

## **1.2. Evidencias de restos antiguos de *Pogonias cromis***

Existen numerosas evidencias de *P. cromis* en el registro fósil de América. En Estados Unidos se han encontrado restos en Delaware, Maryland Carolina del Norte, Virginia y Florida, que se corresponden a la época del Mioceno (Olsen, 1964; Bryant et al., 1992; Takeuchi y Huddleston, 2008). Para la época del Plioceno se han hallado registros de la especie en Carolina del Norte y Florida, y también del Pleistoceno en Florida, Maryland y Georgia (Alroy, 2000). En México se ha encontrado material fósil de la especie considerado dentro del Período Cuaternario (Pleistoceno tardío - Holoceno). En Sudamérica se han encontrado restos en Brasil del Pleistoceno (Souza-Cunha y Nunan, 1980; Buchmann y Filho, 1997) y en Argentina los restos hallados fueron datados como del Pleistoceno tardío – Holoceno (Cione y Torno, 1988; Fucks et al., 2005).

En el registro fósil de Uruguay existe evidencia de la presencia de *P. cromis*, que datan de la Época del Holoceno (Cione y Torno, 1988; Piñeiro y Verde, 1999). Según el estudio de la morfología general de los huesos de cráneos y vértebras descritos por Piñeiro y Verde (1999), las características que presentan los restos hallados se corresponden con las que presenta la especie actualmente. Estos restos fósiles fueron encontrados en las áreas más occidentales del Río de la Plata, en los departamentos de Colonia y San José, correspondientes a la Formación Villa Soriano, que datan del Holoceno (Piñeiro y Verde, 1999). La presencia de la especie en dichas áreas se le atribuye a una mayor salinidad del agua en dicho período (Piñeiro y Verde, 1999), lo cual amplía el área de distribución de esta especie durante el Holoceno. Sin embargo, actualmente, a pesar de su gran tolerancia a cambios en la salinidad, no hay registros de la especie hacia el oeste de la desembocadura del río Santa Lucía (Piñeiro y Verde, 1999).

### **1.3. Importancia de la especie como recurso pesquero**

Se han hallado numerosas evidencias arqueológicas que atestiguan la utilización de los recursos marinos por parte de los grupos humanos que han habitado las regiones costeras del litoral atlántico sudamericano (León et al., 2017). *Pogonias cromis* fue documentada en varios sitios arqueológicos de la costa del estuario del Río de la Plata, tanto en Argentina como en Uruguay, siendo la datación más antigua de 5000 años, lo que indica una temprana y continua explotación de esta especie (Erchini et al., 2015; González et al., 2016; Escosteguy et al., 2017). El gran tamaño de las corvinas negras proporcionaría una importante fuente de proteínas para la dieta de los cazadores-recolectores-pescadores, por lo cual la misma representaba un recurso destacado (Politis y León, 2010).

Actualmente, según datos presentes en el Boletín Estadístico Pesquero emitido por la DINARA en el 2014, el desembarque de la corvina negra es irregular, representando un 2 % del desembarque total del país, y es llevado a cabo por embarcaciones industriales y por la pesca artesanal, en ambos márgenes del Río de la Plata. Las cifras para Uruguay que se mencionan en el último boletín publicado son de 705 toneladas de desembarque total en el 2014, y 748 toneladas en el 2015, aumentando a un 3 % el desembarque de *P. cromis* en el 2015 (Boletín Estadístico Pesquero DINARA, 2015).

### **1.4. Aspectos a tener en cuenta para su conservación**

*Pogonias cromis* presenta un carácter longevo y de lento crecimiento, indicando una baja tasa de mortalidad natural, una baja fecundidad relativa, lo cual implica una menor capacidad de reposición de biomasa, haciéndola particularmente susceptible a la pesca (Urteaga y Perrotta, 2001). Estudios recientes realizados en Brasil, consideran a las especies de la familia Sciaenidae como vulnerables a la sobrepesca, la degradación del hábitat costero por la urbanización, la exploración de petróleo y la construcción de represas (Chao et al., 2015a). En el mismo artículo se ha señalado que las amenazas de la degradación de los hábitats pueden ser más graves que la presión de la pesca en especies de agua dulce, pero que la sobrepesca y la captura incidental son las principales amenazas a las especies estuarinas y marinas. De todas las especies de sciaénidos evaluadas, la que genera una mayor preocupación en el territorio brasileño es *P. cromis*, donde es considerada en peligro de extinción (Chao et al., 2015a). Sin embargo, dado a que se conserva, al menos, en aguas de Estados Unidos, es considerada globalmente por la UICN en la categoría de preocupación

menor (Chao et al., 2015b). La pesca indiscriminada y el desconocimiento de aspectos básicos de la biología de la especie pueden llevar a su extinción (Chao et al., 2015a). Además, las modificaciones de los ambientes acuáticos por acción antrópica, causan la fragmentación del hábitat natural y disminuyen la diversidad biológica de la especie, limitando su potencial evolutivo y su productividad en dichos ambientes (Chao et al., 2015a). En este sentido, es necesario el relevamiento de la diversidad genética y la determinación del estado actual de la especie *P. cromis* en el Río de la Plata y Océano Atlántico, así como sus ambientes asociados, con el fin de proporcionar información de utilidad para su conservación y para contribuir a la caracterización de este recurso pesquero.

Uno de los aspectos más importantes para el adecuado manejo pesquero es la identificación de diferentes segmentos dentro de una especie que está siendo explotada, lo que se denomina "stocks" (Leidig et al., 2015). Desde el punto de vista genético, el concepto de "stock" se vincula con aquellas subpoblaciones conespecíficas de peces donde se reconoce que la diferenciación genética puede estar asociada a la divergencia fenotípica entre ellas (Allendorf et al., 1988). El establecimiento de límites geográficos de un "stock" es dificultoso, ya que muchas especies tienen la capacidad de migrar grandes distancias, por lo cual se requiere el estudio de la combinación de datos genéticos con características de la historia de vida de una especie para el análisis de la estructura poblacional (Leidig et al., 2015). Para la especie *P. cromis* se han reportado diferencias en rasgos de la historia de vida (como la tasa de crecimiento, tamaño a la madurez, edad de madurez y la fecundidad relativa) de esta especie entre poblaciones del Golfo de México y la costa oeste del Océano Atlántico en Estados Unidos (Olsen et al., 2018). La importancia de esta diferenciación llevó a la distinción entre los "stocks" del norte del Golfo de México y el oeste del Atlántico Norte (Jones y Wells, 1998; Olsen et al., 2018). En la porción sur de la distribución de *P. cromis*, también se han destacado diferencias en rasgos reproductivos estudiados en la Bahía de Samborombón, en comparación con las poblaciones del hemisferio norte (Macchi et al., 2002). Estas diferencias han sido atribuidas a las variaciones en la salinidad (Olsen et al., 2018). Estudios que han examinado la estructura genético-poblacional de la especie en poblaciones del norte, utilizando ADN mitocondrial, han permitido distinguir subpoblaciones en el Golfo de México y el oeste del Océano Atlántico Norte (Gold et al., 1994; Gold y Richardson, 1998).

Las especies marinas habitantes de márgenes continentales que tienen alta capacidad de dispersión frecuentemente presentan altos niveles de flujo génico,

debido a que las poblaciones correspondientes a los extremos del área de distribución están conectadas por poblaciones intermedias, de manera que aumenta la mezcla genética y reduce el efecto de la distancia (Zhao et al., 2018). Esto se debe al intercambio genético entre las poblaciones adyacentes. Sin embargo, varios factores físicos que suceden a lo largo del margen continental, como corrientes costeras y desembocaduras de ríos, pueden aumentar la divergencia de la población y facilitar la especiación alopátrida (Zhao et al., 2018). También las oscilaciones climáticas periódicas, como el cambio de la temperatura de la atmósfera, las precipitaciones, la temperatura de superficie del mar, la salinidad, el nivel del mar, generan la remoción o la creación de barreras de forma periódica, lo que influye en las poblaciones de estas zonas (Zhao et al., 2018). En este sentido, se espera un alto flujo génico entre poblaciones próximas de la especie *P. cromis* y la divergencia mayor entre poblaciones que se encuentran separadas por estas barreras. Esta estructuración estaría acentuada por la evidencia de que la especie no migra grandes distancias (Leidig et al., 2015).

La necesidad de poder determinar la estructura genético-poblacional de la especie en subpoblaciones discretas o “stocks”, se relaciona con el desarrollo de regulaciones pesqueras a nivel local. La existencia de “stocks” separados, permitiría que las diferentes localidades puedan gestionarse de manera individual, lo que proporciona oportunidades para ajustar las reglamentaciones a las necesidades particulares de las subpoblaciones o “stocks” y para aquellos que manejan este recurso (Gold et al., 1994).

### **1.5. Estudios de ADN mitocondrial**

Los métodos utilizados históricamente para la identificación y clasificación de peces han sido en gran medida basados en las características morfológicas visibles (Ward et al., 2009). Actualmente se incluyen otras características, como la anatomía interna, la fisiología, el comportamiento, genes y aspectos de distribución geográfica, pero los caracteres morfológicos siguen siendo de mayor importancia en taxonomía (Ward et al., 2009). Sin embargo, no en todos los casos solo la morfología es informativa para la identificación específica, en especial cuando se trata de identificar peces durante etapas de su desarrollo ontogénico, especialmente en estadios larvarios, o cuando se examinan restos fragmentarios, parciales o procesados de organismos (Ward et al., 2009). El uso de marcadores moleculares para la identificación de especies en muestras

provenientes de diferentes fuentes está siendo cada vez más utilizado, fundamentalmente basado en la estrategia de códigos de barra de la vida (“DNA barcoding”) que utiliza un fragmento del gen citocromo oxidasa I (COI) para identificar especies animales (Hebert et al., 2003). Se ha utilizado preferentemente el ADN mitocondrial para la identificación de especies en muestras degradadas, debido a que cada célula contiene varios cientos de copias de esta molécula, a diferencia del genoma nuclear (O’Rourke et al., 2000). Por lo tanto, se espera un mayor éxito en la amplificación de un gen mitocondrial debido al mayor número de copias en una extracción, que en el caso de la amplificación de las secuencias nucleares (O’Rourke et al., 2000).

Además de permitir la identificación de especies, el ADN mitocondrial es elegido para la construcción de filogenias y estudios evolutivos, debido a su herencia uniparental y la ausencia de recombinación (Grant, 2015). La elevada tasa mutacional del ADN mitocondrial es la que define su gran utilidad para estudios de alta resolución de los procesos evolutivos (Brown et al., 1979). Esta elevada tasa se debe a la carencia o ineficiencia de ciertos complejos de reparación del ADN, por lo cual se acumulan más cambios en su secuencia en comparación con genes nucleares (Brown et al., 1979).

El fragmento de COI que suele ser amplificado, codifica para la porción terminal de una enzima de la cadena respiratoria de la mitocondria. La efectividad de este fragmento ha sido validada para la identificación a nivel de especie de varios grupos de animales (Waugh, 2007). En peces, esta región varía menos del 1 % dentro de una especie y generalmente varía más del 3 % entre especies, permitiendo diferenciar entre aproximadamente 99 % de las especies de peces (Ward et al., 2009). El gran potencial que presenta para la discriminación de especies, incluso aquellas que estén cercanamente relacionadas, se debe a la acumulación de cambios nucleotídicos sinónimos (Ward y Holmes, 2007). Sin embargo, este gen no solo es utilizado para la discriminación de especies, sino que también permite distinguir grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Cox y Hebert, 2001; Wares y Cunningham, 2001), por lo cual también se ha utilizado en estudios poblacionales y evolutivos en peces (ej. Xu et al., 2012; Lo et al., 2015). Otro gen mitocondrial que ha sido altamente utilizado para estudios de diferenciación genética y estructura poblacional, y en particular en peces, es el citocromo b (*cyt b*) (ej. Planes, 2001; Santos et al., 2006; García et al., 2008, 2014; Pereyra et al., 2010). Este gen también consiste en una subunidad de un complejo proteico transmembrana que forma parte de la cadena respiratoria mitocondrial. En comparación con el gen COI, *cyt b* presenta cambios

en la secuencia de aminoácidos que ocurren más rápidamente (Hebert et al., 2003). La utilización de ambos marcadores para el análisis de las poblaciones permite tener una visión integradora de los procesos evolutivos que ocurrieron en las mismas.

## **1.6. Estudios de ADN antiguo**

El término “ADN antiguo” hace referencia a los fragmentos de ADN extraídos de material biológico preservado o fosilizado (Brown y Brown, 1994). El primer trabajo que tuvo éxito en lograr extraer y demostrar la existencia de ADN antiguo fue realizado por Higuchi y colaboradores (1984), quienes lograron clonar fragmentos de ADN extraídos de la piel de un ejemplar de museo de unos 140 años de antigüedad de la especie quagga (*Equus quagga quagga*), un mamífero extinto emparentado con las cebras (Higuchi et al., 1984). El segundo trabajo exitoso en esta temática fue el realizado por Pääbo, quien pudo obtener fragmentos de ADN de una momia de un joven egipcio que fue datada en unos 2400 años (Pääbo, 1985). Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha logrado aumentar la eficacia de obtener fragmentos de ADN antiguo, ya que esta técnica permite aumentar el número de copias de un fragmento a partir de pocas o incluso una copia única del ADN original (Pääbo et al., 2004). Desde entonces, han surgido otros trabajos donde se descubrió la posibilidad de amplificar ADN antiguo proveniente de tejidos duros preservados, como huesos y dientes (Hagelberg et al., 1989; Horai et al., 1989; Hänni et al., 1990).

Existen varios estudios dedicados a la extracción y amplificación de ADN antiguo procedente de restos fósiles de peces (ej. Yang et al. 2004; Shirak et al., 2013; Royle, 2014; Flaming et al., 2018). El análisis de ADN antiguo ha sido empleado para identificar a nivel de especie, restos de organismos fósiles que no pudieron ser identificados a través de análisis morfológicos (Yang et al., 2004). El diseño de oligonucleótidos universales ha sido utilizado para identificar, en muestras de ADN antiguo, diferentes especies de peces provenientes de restos arqueológicos que solo habían podido ser asignadas como peces óseos de acuerdo a su morfología (Royle, 2014). En varios estudios se hace referencia a la dificultad que se presenta cuando se trabaja con ADN antiguo, existiendo una relación inversa entre el éxito en la amplificación y el tamaño del amplicón (Pääbo et al., 2004; Royle, 2014). Esto se debe a que en el ADN antiguo se incrementa la degradación, sobre todo de aquellos fragmentos de mayor tamaño, por lo tanto,

pueden no preservarse en restos fósiles (Pääbo et al., 2004). Debido a este fenómeno de degradación del ADN se requiere el uso de oligonucleótidos que amplifiquen fragmentos más cortos. En este sentido, la estrategia de diseñar oligonucleótidos para amplificar regiones más pequeñas dentro de genes extensamente utilizados como COI o *cyt b* ha sido previamente implementado en muestras degradadas o antiguas de peces (Yang et al. 2004; Shirak et al., 2013; Royle, 2014; Silva et al., 2017).

### **1.7. Propuesta de trabajo**

En un primer enfoque, este proyecto busca testear con técnicas de genética molecular si los restos óseos de fósiles encontrados en la Formación Villa Soriano, pertenecen a la especie *P. cromis*, tal cual ha sido descrito por Piñeiro y Verde (1999), basados en análisis morfológicos.

El uso de oligonucleótidos universales tiene la desventaja de tener una mayor habilidad para amplificar ADN de fuentes modernas contaminantes como el humano (Royle, 2014). Además, en muestras antiguas o mal conservadas el ADN puede encontrarse altamente degradado (Hajibabaei et al., 2006), siendo raramente preservados en restos antiguos los fragmentos de tamaño mayor a 500 pb que puedan ser amplificados (Pääbo et al., 2004). En este sentido, la implementación de oligonucleótidos universales para la amplificación de genes en muestras de ADN antiguo es limitada, debido a que estos oligonucleótidos suelen amplificar fragmentos de mayor tamaño (Hajibabaei et al., 2006). De acuerdo al estudio realizado por Hajibabaei y colaboradores (2006), el análisis de secuencias cortas de genes también podría permitir la identificación de especies, como las secuencias más largas, dependiendo el contenido informativo que contenga cada uno de esos fragmentos. En base a la propuesta de Shirak et al. (2013) es posible la síntesis de oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias de menor número de pares de bases que contengan suficiente información para identificar especies. El diseño de oligonucleótidos que permitan amplificar una región de pequeño tamaño es útil para la amplificación de ADN degradado, como se espera encontrar el ADN en restos fósiles (Royle, 2014). Entonces, la estrategia a seguir en esta tesina es el diseño de oligonucleótidos específicos para la especie *P. cromis* que sean capaces de amplificar fragmentos de ADN de un tamaño aproximado entre 100 y 300 pb, en dos genes mitocondriales, COI y *cyt b*. Estos oligonucleótidos serán testeados en la amplificación del ADN antiguo extraído de muestras óseas de fósiles, así como

en ADN actual de esta especie.

En un segundo enfoque, se busca aportar información sobre la variación genética de la especie *P. cromis* en el Río de la Plata y Océano Atlántico en Uruguay, entre tres localidades de muestreo, Montevideo, Maldonado y Rocha. De esta forma se podrá acceder a los niveles de variación genética en cada localidad y determinar la estructura genético-poblacional de la corvina negra a los efectos de contribuir con la implementación de políticas de conservación de este recurso pesquero. En esta tesina se utilizarán los genes mitocondriales, COI y *cyt b*, los cuales han resultado de gran utilidad para la identificación de especies, y para resolver relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos, así como también han sido muy utilizados en estudios de genética de poblaciones en varios sciaénidos (ej. Márquez, 2012), y en diferentes especies de peces (García et al., 2008, 2014; Ríos et al., 2017).

## **1.8. Hipótesis**

- 1) La especie *P. cromis* ha estado presente por lo menos desde hace 6000 años atrás en una extensa región costera de Uruguay, a pesar de que su distribución actual se ha desplazado hacia áreas del Río de la Plata medio, exterior y océano Atlántico.
- 2) Los niveles de variación genética en las poblaciones actuales de *P. cromis* en la costa uruguaya son bajos, lo cual alerta sobre el estado de las mismas a más largo plazo, en base a evidencias en el sur de Brasil.

## **1.9. Objetivo general**

Desarrollar herramientas de genética molecular para la identificación de *P. cromis*, tanto en trazas de ADN antiguo como en poblaciones modernas de la especie, a los efectos de confirmar el límite occidental de la distribución en el Río de la Plata hace 6000 años y conocer la diversidad y estructura genética de sus poblaciones actuales, contribuyendo a establecer bases para la conservación de este recurso pesquero.

## **1.10. Objetivos específicos**

- 1- Utilizar herramientas de genética molecular para corroborar que los restos óseos hallados en la Formación Villa Soriano pertenecen a la especie *P. cromis* como indican los estudios a nivel de morfología ósea.
- 2- Desarrollar y sintetizar oligonucleótidos específicos para la especie *P. cromis*

que permitan amplificar regiones de menor tamaño de los genes mitocondriales COI y *cyt b*.

3- Aplicar herramientas moleculares para la amplificación de los genes mitocondriales COI y *cyt b* en muestras poblacionales actuales de la especie *P. cromis* distribuida en diferentes localidades costeras del Río de la Plata y Océano Atlántico.

4- Detectar los niveles de diversidad genética y la estructura poblacional de la especie en costas uruguayas, mediante la utilización de diferentes programas computacionales a los efectos de generar información que sustente la conservación de este recurso pesquero.

5- Establecer las relaciones filogenéticas entre las muestras actuales a partir de las secuencias obtenidas, mediante la construcción de árboles de genes.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.A. Material Fósil**

#### **2.A.1. Obtención de muestras fósiles**

El material fósil consistente en restos de cráneos y vertebras encontrados en un yacimiento de la Formación Villa Soriano, en la localidad de Playa Pascual (departamento de San José), fue proporcionado por la Dra. Graciela Piñeiro del Instituto de Ciencias Geológicas, Departamento de Paleontología, Facultad de Ciencias.

#### **2.A.2. Extracción de ADN**

Se realizaron dos extracciones de ADN para los restos fósiles de acuerdo al protocolo modificado de Medrano et al. (1990) con adaptaciones realizadas en el laboratorio de la Sección Genética Evolutiva. Ambas extracciones se corresponden a una misma muestra de cráneo que fueron ingresadas en el catálogo del laboratorio como F6.1 y F6.2, respectivamente. Para estos restos óseos, en primera instancia, se fracturó el material con un martillo. Para minimizar el riesgo de contaminación, se sumergieron los fragmentos a utilizar para la extracción en hipoclorito de sodio al 5%, y se dejaron en un agitador unos 10 minutos. Luego se realizaron varios enjuagues con abundante agua destilada. Se expusieron a luz UV por 20 minutos los fragmentos y todos los instrumentos a

utilizar. Posteriormente, utilizando un mortero y brazo esterilizados, sobre un papel se practicó fragmentación mecánica hasta reducir el tamaño de la pieza a casi polvo. Este material fue colocado en un tubo eppendorf.

Posteriormente, se realizaron dos lavados del material con un mililitro de buffer STE 1X pH 8 (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8 y 100 mM NaCl) en frío. Se centrifugó en cada lavado a 6000 rpm durante 5 minutos cada vez y se descartó el sobrenadante. Luego se le agregó 550 µl de buffer de lisis pH 8 (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS y 100 mM NaCl) y 15,0 µL de Proteinasa K (10 mg/mL). Finalmente, se incubaron durante toda una noche en estufa a 55°C para la desintegración del tejido. Al siguiente día, en las dos horas previas a finalizar la incubación, se le agregó 6,0 µL de RNAsa (10 mg/mL). Finalizada la incubación, se centrifugó por 10 minutos a una velocidad de 12.000 rpm, a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf de 1,5 mL y se le agregó 350,0 µL de NaCl 5 M. Luego se centrifugó por 30 minutos a una velocidad de 12.000 rpm a temperatura ambiente. Se colocó aproximadamente 400,0 µL del sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se le agregó el doble de volumen de isopropanol en frío. Se agitó lentamente el tubo, para mezclar las dos fases y se mantuvieron a 4°C por 72 horas aproximadamente para que el ADN complete la precipitación. En el tercer día, la muestra fue centrifugada durante 30 minutos a 12.000 rpm, a temperatura ambiente. En los pasos siguientes, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet con 1,0 mL de etanol 70 %. Luego de cada lavado se realizó una centrifugación de 5 minutos a 6.000 rpm, a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El pellet se dejó secando en estufa a 55°C, aproximadamente una hora, se resuspendió en 50,0 µL de buffer TE 1X (100 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA) y luego se incubaron los tubos a 65°C en baño seco durante 20 minutos. Posteriormente se realizó un "spin" a los tubos en la centrífuga y se conservaron a -20°C.

La calidad del ADN extraído se verificó mediante una corrida de electroforesis en gel de acrilamida 6% (que contiene 12 mL de acrilamida al 6 %, 120 µL de persulfato de amonio y 12 µL de TEMED) en buffer TBE 1X pH 8,3 (TBE 5X (1 L): 54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico y 20 mL de 0,5 M EDTA pH 8), a 110 mV, durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Se sembraron 5 µL del ADN genómico extraído con 2 µL de buffer de corrida (Bromophenol Blue y Xylene Cyanol FF: 0,25 % Bromophenol Blue, 0,25 % Xylene Cyanol FF y 30 % Glycerol en H<sub>2</sub>O miliQ). El revelado del gel requiere 3 pasos: 1) una solución fijadora (20 mL de etanol 95°, 750 µL de ácido acético glacial y 150 mL de H<sub>2</sub>O destilada); 2)

una solución que contiene nitrato de plata (0,3 g AgNO<sub>3</sub> y 150 mL de H<sub>2</sub>O destilada) y una solución reveladora (contiene 4,5 g de hidróxido de sodio, 750 µL de Formaldehído y 150 mL de H<sub>2</sub>O destilada). Todas las soluciones y los reactivos utilizados fueron preparados de acuerdo al protocolo de Sambrook et al. (1989). También se midieron las concentraciones de ADN utilizando una modificación de la ley de Lambert-Beer, mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Scientific, 2009). A su vez, se evaluó la pureza de las muestras mediante la relación de absorbancias A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> y A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>. Los ácidos nucleicos absorben a una longitud de onda de 260 nm (Scientific, 2009). Valores de 1,8, para la relación 260/280 es considerado como ADN más puro, valores menores a 1,8, se explican por la contaminación con proteínas o fenoles que absorben a 280 nm. Para la relación 260/230, el rango de pureza aceptado estaría entre 1,8-2,2, valores por debajo de este rango indicarían la presencia de carbohidratos, proteínas y sales que absorben a 230 nm (Scientific, 2009). Medidas superiores a estos valores en las dos relaciones pueden indicar la presencia de proteínas, u otros contaminantes que absorban a longitudes de 260 nm (Scientific, 2009).

### **2.A.3. Desarrollo y síntesis de oligonucleótidos específicos**

Para el desarrollo de oligonucleótidos específicos que amplifiquen fragmentos de 100-300 pb, se utilizaron secuencias de COI y de *cyt b* depositadas en el GenBank pertenecientes a *P. cromis* y otros sciaénidos cercanamente emparentados con dicha especie según Lo y colaboradores (2015). Para este objetivo, se realizaron alineamientos de las secuencias utilizando la función CLUSTAL\_X (Thompson et al., 1997) implementada en el programa MEGA v 6 (Tamura et al., 2013). A partir del alineamiento se buscan las regiones más conservadas donde se ubicaron preferentemente los oligonucleótidos. Se utilizó el programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) para el diseño de oligonucleótidos que amplifican una región de entre 100 y 300 pb de los genes seleccionados. Se realizaron algunas modificaciones de las características por defecto del programa, las cuales incluyen las siguientes categorías: Máximo de tamaño permitido de un mononucleótido repetido (Max PolyX) a un valor de 3 nucleótidos; Número máximo de juegos de oligonucleótidos que el programa diseña ("N° to return") a un valor de 12 oligonucleótidos; dentro de la categoría de parámetros termodinámicos ("Table of thermodynamics parameters") se utilizó el criterio de Breslauer y colaboradores (1986). Fórmula usada para corregir el

cálculo de la T<sub>m</sub> (temperatura de separación de las hebras de ADN o temperatura de melting) de acuerdo a la concentración de sal: Schildkraut and Lifson (1965); el valor máximo de complementariedad (“Max self complementary”) a un valor de 5 nucleótidos. Para el tamaño del oligonucleótido se seleccionó un mínimo de 18 pb, un óptimo de 20 pb y para el máximo un valor de 23 pb. Para la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos, se define un mínimo de 57°C, un máximo de 64°C, y el óptimo de 60°C. El porcentaje de GC en la secuencia del oligonucleótido aceptado fue el siguiente: un mínimo de 40 %, un óptimo de 60 % y un máximo de 80 %. El rango del tamaño seleccionado para el fragmento a amplificar por los oligonucleótidos diseñados es de 100-300 pb.

Entre los oligonucleótidos que se obtuvieron mediante el programa, la elección de aquellos a sintetizar se realizó de acuerdo a que presentaran menor complementariedad tanto en su propia secuencia como entre el sentido y el antisentido, de manera de evitar la formación de estructuras secundarias; el valor de T<sub>m</sub> similar entre los pares de oligonucleótidos; y el largo del fragmento amplificado por cada par de oligonucleótidos. Se compararon las regiones donde se une cada oligonucleótido al ADN de la secuencia de cada gen mitocondrial de *P. cromis* para detectar el número de sitios no conservados en la secuencia de los oligonucleótidos, en relación al conjunto de secuencias alineadas de las especies emparentadas. Aquellos que presentaron mejores valores en cuando a las características de los oligonucleótidos y que presentaron mayor número de sitios conservados (aproximadamente más del 90%) fueron seleccionados.

Se evaluó la eficiencia en la amplificación de los oligonucleótidos seleccionados mediante el programa online Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools), considerando especialmente el potencial de formación de estructuras secundarias (Royle, 2014). Los oligonucleótidos seleccionados se enviaron a sintetizar a la compañía Macrogen Inc. (Corea).

#### **2.A.4. Amplificación de los genes COI y *cyt b* con oligonucleótidos universales en muestras fósiles**

Fragmentos de ambos genes se amplificaron utilizando la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el gen COI se utilizaron los oligonucleótidos HCO2198 y LCO1490 que permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 700 pb (Folmer et al., 1994). Los oligonucleótidos universales para peces denominados CB3H y GludgL (Palumbi et al., 1991) fueron utilizados para amplificar un fragmento de aproximadamente

800 pb del gen mitocondrial *cyt b*.

La amplificación por PCR fue realizada en un termociclador automático (Termociclador en gradiente marca Corbett Research). En un volumen de 20  $\mu\text{L}$  total de reacción, se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  del ADN genómico extraído de las muestras. Para la mezcla de reacción de 20  $\mu\text{L}$  finales para amplificación del gen COI, se incorporaron 2  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 0,8  $\mu\text{L}$  de LCO1490 y HCO2198 10  $\mu\text{M}$ , y 0,3  $\mu\text{L}$  de polimerasa Taq 5 U/ $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción de 20  $\mu\text{L}$  finales para la amplificación del gen *cyt b*, se incorporaron 2  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 0,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 0,6  $\mu\text{L}$  de CB3H y GludgL 10  $\mu\text{M}$ , y 0,2  $\mu\text{L}$  de polimerasa Taq 5 U/ $\mu\text{L}$ .

Los programas de amplificación consisten en una sucesión de pasos que incluyen desnaturalización inicial, seguida de una serie de ciclos que incluyen 3 fases: desnaturalización, “annealing” y extensión. A esto le sigue una fase final de extensión. Para la amplificación de la muestra fósil se probaron diferentes ajustes en cuanto al número de ciclos, la temperatura de “annealing”, y los tiempos para cada fase del ciclado, así como se ajustaron las concentraciones utilizadas en la mezcla para los componentes  $\text{MgCl}_2$ , oligonucleótidos, taq polimerasa y los desoxiribonucleótidos utilizados para la amplificación. También se realizaron diferentes diluciones, para mejorar la amplificación de las muestras. Se verificó la amplificación y el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante la visualización de bandas en una corrida de electroforesis en gel de acrilamida, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. En este caso, además de sembrar 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR junto a 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, se corrieron 3  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Invitrogen) junto con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de corrida.

### **2.A.5. Amplificación de fragmentos cortos de los genes COI y *cyt b* utilizando los oligonucleótidos sintetizados en muestras fósiles**

La amplificación por PCR también fue realizada en un termociclador automático (Termociclador en gradiente marca Corbett Research). En un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  del ADN genómico extraído de las muestras, se incorporaron 2  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 0,8  $\mu\text{L}$  de los oligonucleótidos diseñados a 10  $\mu\text{M}$ , y 0,3  $\mu\text{L}$  de polimerasa Taq 5 U/ $\mu\text{L}$ .

Se diseñaron programas de amplificación específicos para lograr el mayor

rendimiento de acuerdo con la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de estos oligonucleótidos. Además, se fueron ajustando las condiciones para la amplificación de dichos fragmentos en el material fósil, de manera de favorecer la reacción.

El resultado de la amplificación y de la obtención del fragmento de interés se visualizó mediante una corrida de electroforesis en gel de acrilamida como fue descrito anteriormente. Además de correr 5  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR junto a 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, se sembraron 3  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Invitrogen) junto con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de corrida.

### **2.A.6. Confirmación de amplificación con oligonucleótidos universales y específicos en muestras actuales**

Para la prueba de los oligonucleótidos universales con las muestras actuales se utilizaron los programas descritos anteriormente empleados para la amplificación de la muestra fósil. La prueba de los oligonucleótidos específicos se realizó mediante el programa de amplificación en donde se obtuvo mayor éxito con el material fósil, el mismo se describe a continuación: la fase de desnaturalización inicial a una temperatura de 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos que incluyen 3 fases: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, fase de “annealing” a 42°C por 45 segundos, y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto; finalmente, se realiza una fase de extensión a 72°C por 7 minutos.

La obtención de los fragmentos de interés se confirmó mediante una corrida de electroforesis en gel de acrilamida, sembrando los productos de PCR y el marcador de peso molecular junto al buffer de carga, como fue descrito en los apartados anteriores.

### **2.A.7. Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas**

Posteriormente a la amplificación, se realizó la purificación y secuenciación directa de los fragmentos obtenidos en un servicio comercial de secuenciación automático (Macrogen Inc., Corea).

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a su edición de forma manual utilizando el software FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.) en base a los electroferogramas correspondientes proporcionados por el servicio de secuenciación. Para la edición de las secuencias obtenidas, éstas se alinearon con otras secuencias de la misma especie depositadas en el GenBank utilizando CLUSTAL\_X. Las secuencias obtenidas a partir del material fósil fueron

contrastadas contra las secuencias disponibles en GenBank a través de una búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para poder comprobar mediante similitud de secuencias, si pertenece a la especie asignada en base a caracteres morfológicos.

## 2.B. Material actual

### 2.B.1. **Obtención de muestras actuales**

Se realizó un muestreo de 15 ejemplares de la especie *P. cromis* en el área costera del Río de la Plata y Océano Atlántico de las localidades de los Departamentos Montevideo, Maldonado y Rocha, en Uruguay (Figura 1, Anexo I). Las muestras de diferentes tejidos (trozos de músculo y/o de aletas) fueron conservadas en etanol 95°. Las mismas fueron obtenidas a través de la pesca artesanal, industrial y en pescaderías locales ubicadas en el área de muestreo.



**Figura 1.** Área de muestreo de la especie *P. cromis* en Uruguay. En los círculos se indica el número de muestras colectado en cada localidad señalada.

### 2.B.2. **Extracción de ADN**

Para las muestras de peces actuales se cortó un trozo de aproximadamente 20 mg de tejido, ya sea aleta, músculo o hígado, se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se continuó el protocolo adaptado de Medrano et al. (1990) descrito anteriormente para muestras de hueso, incorporando la homogenización mecánica del tejido mediante émbolos, pero sin el procesamiento anterior de lavados con hipoclorito de sodio al 5 % que requiere el material fósil.

La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma) 1 % en buffer TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1 L): 242 g de Tris-base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 10 mL de 0,5 EDTA pH 8), con Bromuro de Etidio a una concentración final de 5  $\mu$ L /100 mL. Para la electroforesis se sembraron 5  $\mu$ L del ADN genómico extraído, previamente homogenizado con 2  $\mu$ L de buffer de corrida (Bromophenol Blue y Xylene Cyanol FF: 0,25 % Bromophenol Blue, 0,25 % Xylene Cyanol FF y 30 % Glycerol en agua). La corrida del gel se realizó durante 40 minutos con una fuente de poder configurada a 80 V. Todas las soluciones y los reactivos utilizados fueron preparados de acuerdo al protocolo de Sambrook et al. (1989). En base a la calidad del ADN, se realizaron diferentes diluciones para favorecer la posterior amplificación.

### **2.B.3. Amplificación de los genes COI y *cyt b***

Los genes mitocondriales se amplificaron utilizando la metodología de PCR. En poblaciones de *P. cromis* actuales se utilizaron los oligonucleótidos universales, HCO2198 y LCO1490, que permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 700 pb del gen COI (Folmer et al., 1994). Para amplificar un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen mitocondrial *cyt b* se utilizaron oligonucleótidos universales empleados en peces, denominados CB3H y GludgL (Palumbi et al., 1991).

Se utilizaron diferentes programas de amplificación en el termociclador para la amplificación de los genes. El programa utilizado para la amplificación de un fragmento del gen COI implica las siguientes condiciones: una fase de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos que incluyen 3 fases: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, fase de “annealing” a 45°C por 1 minuto, y una fase de extensión a 72°C por 2 minutos; y una última fase de extensión final a 72°C por 7 minutos. Las condiciones del programa utilizado para amplificar un fragmento del gen *cyt b* consisten en una fase de desnaturalización inicial a una temperatura de 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos que incluyen 3 fases: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, fase de “annealing” a 46°C por segundos, y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos, y una fase de extensión final a 72°C por 7 minutos.

El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa como fue descrito en el apartado anterior. Se

incluyó, además del sembrado de 5 µL del producto de PCR junto a 2 µL de buffer de carga, 3 µL de marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Invitrogen) junto con 2 µL de buffer de corrida.

#### **2.B.4. Secuenciación y análisis de secuencias obtenidas en muestras actuales**

Posteriormente a la obtención de los fragmentos amplificados, se realizó la purificación y secuenciación directa en un servicio comercial de secuenciación automático (Macrogen Inc., Corea).

##### **2.B.4.1. Alineamientos de las secuencias**

Las 15 secuencias obtenidas (Anexo I), tanto para el marcador COI como para *cyt b*, fueron editadas manualmente en el programa FinchTV. Se alinearon con 21 secuencias obtenidas a través del GenBank para el marcador COI (Anexo II), y con dos secuencias para *cyt b* (Anexo III). El alineamiento del gen COI incluyó 11 secuencias pertenecientes a la laguna costera de Mar Chiquita; cinco provenientes de las costas atlánticas de Estados Unidos; y cinco más que no han sido georreferenciadas. En cuanto al marcador *cyt b*, una de las secuencias del alineamiento proviene de Estados Unidos, y la otra que se incluyó no ha sido georreferenciada. Además, se incluyeron en el alineamiento para cada marcador, cuatro secuencias de las especies seleccionadas como grupo externo, los sciaénidos *Sciaenops ocellatus* y *Umbrina cirrosa* (Anexo IV), que son especies cercanamente emparentadas a *P. cromis* según Lo et al. (2015). Estas secuencias también fueron obtenidas a través del GenBank. Los alineamientos se realizaron mediante el programa CLUSTAL\_X implementado en MEGA.

##### **2.B.4.2. Polimorfismos de los genes mitocondriales COI y *cyt b* en poblaciones actuales**

###### **2.B.4.2.1. Análisis de la diversidad de ambos marcadores mitocondriales**

Se determinaron los niveles de variabilidad genética mediante el relevamiento de diferentes parámetros de polimorfismos poblacional del conjunto de datos, distinguiéndose los grupos: Montevideo, Rocha, Maldonado, Uruguay (abarcando las tres poblaciones anteriormente mencionadas), Mar Chiquita, Estados Unidos, y todas las secuencias obtenidas de la especie en conjunto (*P. cromis*). Se calcularon los sitios variables o segregantes, que son los sitios que presentan

dos o más nucleótidos entre las secuencias comparadas, y los sitios parsimoniosamente informativos, aquellos que presenten dos variables cada una representada por al menos dos individuos (Nei y Kumar, 2000), para los diferentes grupos definidos.

También se calculó la diversidad nucleotídica, el promedio de las diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias, siguiendo la ecuación

$$\hat{\pi} = \sum_{i < j} \pi_{ij} / n_c$$

, donde  $\pi$  es la proporción de diferentes nucleótidos entre los individuos  $i$  y  $j$ , y  $n_c$  es el número total de comparaciones de secuencias  $[n(n-1)/2]$ , siendo  $n$  el número de secuencias de ADN examinadas (Nei, 1987).

También se detectaron los haplotipos dentro de las secuencias correspondientes a cada conjunto de datos y se calculó la diversidad haplotípica a través de la fórmula

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

, donde  $X_i$  es la frecuencia haplotípica de cada haplotipo ( $i$ ) en la muestra y  $n$  es el tamaño de la muestra. Esta fórmula es una modificación de la ecuación descrita por Nei (1987) (Librado y Rozas, 2009).

Los valores de sitios variables, sitios parsimoniosamente informativos, la diversidad nucleotídica, así como la detección de diferentes haplotipos en la muestra y la correspondiente diversidad haplotípica fueron obtenidos a través del programa DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017).

Se utilizó la herramienta "Model Test" implementada mediante el programa MEGA, para determinar el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajusta el conjunto de datos estudiado. Para ambos genes, COI y *cyt b*, el modelo de mejor ajuste fue el de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Este modelo estima el número de sustituciones nucleotídicas por sitio, teniendo en cuenta la diferencia entre la tasa de transiciones (sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina) y transversiones (sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa) al considerar la tasa de

sustitución y la frecuencia nucleotídica. Según este modelo, se analizaron las distancias dentro de los grupos definidos y entre los mismos, utilizando el programa MEGA.

#### **2.B.4.2.2. Test de neutralidad**

Para poder determinar si los datos se ajustan al modelo de neutralidad, se implementó el test de Tajima (Tajima, 1989), que examina la relación entre el número de sitios segregantes y la diversidad nucleotídica, en su estadístico D (Nei y Kumar, 2000). La significancia estadística de este test se calculó mediante la generación de muestras al azar, empleando una simulación de la teoría de coalescencia. Los valores también fueron obtenidos mediante el software DnaSP.

#### **2.B.4.3. Análisis filogenéticos**

Los alineamientos descritos para ambos genes fueron analizados mediante dos métodos de reconstrucción filogenética. El primero, Máxima Parsimonia, no se basa en un modelo de evolución molecular. A través de este método se reconstruyen árboles filogenéticos basados en el principio de máxima parsimonia, por el cual el menor número de pasos de un estado a otro (cambios evolutivos) es considerado como la mejor explicación para la relación entre taxa (Avice, 2004). En este método se utilizan los sitios variables que son parsimoniosamente informativos. Dado que el número de taxa es elevado (mayor a 20), una búsqueda exhaustiva demandaría demasiado tiempo, entonces se realizó una búsqueda heurística de acuerdo con el método "Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)" (Tamura et al., 2013). Este método selecciona y separa un subárbol del árbol principal, y lo vuelve a insertar en otro lugar del mismo para crear una nueva topología. Esto se repite de manera que se reconstruyen diferentes topologías a las cuales se le asocia una probabilidad. El procedimiento también se repite para cada subárbol y si la topología con mayor probabilidad entre los calificados proporciona una mejora suficiente sobre el mejor árbol actual, esa topología se convierte en el mejor árbol. Esto se repite hasta que no se obtengan mejoras de probabilidad significativas adicionales (Tamura et al., 2013). Para testear la robustez del árbol generado por este método se utilizó el test de bootstrap (Felsenstein, 1985), un método estadístico de muestreo aleatorio con reposición, estableciéndose 1000 pseudoréplicas. Este método fue implementado en el software MEGA.

El otro método utilizado, fue el de Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés). Este método sí requiere un modelo de sustitución de bases para

establecer una probabilidad a cada tipo de mutación en las secuencias estudiadas. La verosimilitud dado un conjunto de secuencias, basándose en un modelo de sustitución específico, es maximizada para cada topología, y la topología que presente la mayor verosimilitud es elegida para el árbol final (Nei y Kumar, 2000). El soporte de los nodos fue determinado a partir de 1000 pseudoréplicas de bootstrap, implementado en PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>), de acuerdo al algoritmo desarrollado por Guindon et al. (2010). En el entorno de PhyML se implementa el software “Selección de Modelo Inteligente”, SMS por sus siglas en inglés (Lefort et al., 2017), bajo el criterio AIC (“Akaike Information Criterion”; Akaike, 1974). SMS utiliza estrategias heurísticas para evitar testear todos los modelos, seleccionando, según el criterio AIC, aquel que presente la mayor verosimilitud según el conjunto de datos.

#### **2.B.4.4. Análisis de Genética Poblacional**

##### **2.B.4.4.1. Inferencia de demografía histórica: “Mismatch distribution”**

La distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas, también llamado “Mismatch distribution”, permite el estudio de eventos de cambios de tamaños poblacionales que ocurrieron en el pasado. A partir de la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas entre los individuos de la muestra en estudio, permite determinar si han experimentado una expansión o reducción demográfica (Rogers y Harpending, 1992). Una reciente expansión del tamaño poblacional presenta una distribución unimodal y el equilibrio demográfico representa una curva multimodal, reflejando de esta manera un proceso aleatorio de pérdida de diversidad por deriva génica (Rogers y Harpending, 1992). Los eventos de reducción poblacional o cuellos de botella frecuentemente presentan efectos opuestos a los fenómenos de expansión poblacional (Schneider y Excoffier, 1999). Para poder evidenciar la historia demográfica de la población de Uruguay, a partir del muestreo de las tres localidades, se construyó el gráfico de la distribución de diferencias en el programa DnaSP.

##### **2.B.4.4.2. Red de haplotipos**

Se reconstruyeron filogenias intraespecíficas, llamadas redes de haplotipos, utilizando el programa NETWORK versión 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999). Este programa se basa en el método de Máxima Parsimonia empleando el algoritmo “Median-Joining” para la construcción de redes en poblaciones, en ausencia de recombinación entre las secuencias estudiadas.

### 2.B.4.4.3. Análisis de la estructura poblacional

Se estimó el estadístico análogo al  $F_{ST}$  de Wright (1951) entre las localidades de manera de determinar la estructura poblacional y el valor indirecto de flujo génico (número de migrantes por generación) mediante el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). El estadístico de  $F_{ST}$  es calculado como el componente interpoblacional de la variación genética, que toma valores entre 0 y 1, representando 0 la ausencia de diferenciación y el 1 el valor máximo de diferenciación. Este valor se estima a partir de la siguiente fórmula matemática:

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

, donde  $n$  es el número total de copias del haplotipo dentro de la población  $i$ ,  $P$  es el número total de poblaciones,  $\text{SSD (AP)}$  es la suma de los cuadrados de las desviaciones entre las poblaciones,  $N$  es el número total de haplotipos,  $\text{SSD (WP)}$  es la suma de los cuadrados de las desviaciones dentro de las poblaciones, y  $\sigma^2_t$  es la varianza molecular total (Excoffier et al., 2005).

Para poder estimar el patrón de estructura poblacional del conjunto de datos, se utiliza el análisis de la varianza molecular (AMOVA), también, mediante el programa Arlequin. Esta herramienta evalúa la varianza a nivel de la frecuencia de haplotipos moleculares del conjunto de datos y el número de mutaciones entre los mismos. El AMOVA realiza un análisis a distintos niveles jerárquicos de estructura poblacional: entre poblaciones ( $F_{ST}$ ); entre poblaciones dentro de grupos ( $F_{SC}$ ); y entre grupos ( $F_{CT}$ ). La hipótesis de agrupamiento más plausible es aquella que maximiza la varianza entre grupos (mayor valor de  $F_{CT}$ ). La significación de los componentes de la varianza se estima mediante la implementación de 1000 permutaciones no paramétricas. Se utilizó la definición de haplotipos realizada mediante el software DNAsp.

## 3. Resultados

### 3.A. Material fósil

#### 3.A.1. Extracción de ADN

Se visualizaron trazas de ADN de bajo peso molecular para ambas extracciones en las correspondientes corridas electroforéticas realizadas, lo que estaría indicando la presencia de ADN degradado. Para la extracción F6.1, que se utilizó para la amplificación con oligonucleótidos universales, se obtuvo un valor de 61 ng/uL. La medición para F6.2 alcanzó un valor de 997,4 ng/uL, siendo la muestra utilizada en las PCR con los oligonucleótidos específicos diseñados en esta tesis. Ambas extracciones presentaron relaciones de absorbancia a 260/280 de 1,39 y 1,38, y para la relación A260/A230 de 0,76 y 0,59, respectivamente. Como los valores difieren de los rangos aceptados para el contenido de ADN puro, estos resultados pueden estar indicando la presencia de proteínas, carbohidratos y sales en ambas extracciones realizadas (Scientific, 2009).

#### 3.A.2. Desarrollo y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos entre 100-300 pb de *P. cromis*.

En cuanto a la síntesis de oligonucleótidos se obtuvieron 12 pares posibles a partir del programa Primer3Plus. De esos 12, se seleccionaron 3 pares de oligonucleótidos para el gen COI, mientras que para *cyt b* se seleccionaron 4 pares y un oligonucleótido "sentido". La secuencia y otras especificaciones de los mismos se encuentran en la Tabla 1. La eficiencia de los oligonucleótidos seleccionados mediante la utilización del programa online Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools) es alta, debido a que se determinó el nulo potencial de formación de estructuras secundarias tanto en su propia secuencia como entre los oligonucleótidos sentido y antisentido.

**Tabla 1.** Secuencias de los oligonucleótidos específicos para *Pogonias cromis*.

Nombre	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Gen que amplifica
PcCOI01F	20	GAGCCGGAATAGTAGGCACA	60.2	244	COI
PcCOI01R	20	GGGAGAAGCCAGAAGCTCAT	60.9		
PcCOI02F	20	CATGAGCTTCTGGCTTCTCC	60.1	231	
PcCOI02R	20	ATGGCGGGAGGTTTCATATT	60.5		
PcCOI03F	20	ATATGAAACCTCCCGCCATT	60.5	158	
PcCOI03R	20	TGGGTCTGAAGAAGGTTGTGT	60.5		
PcCytb01FI	20	CAACGGTGCCTCATTCTTCT	60.3	250	cyt b
PcCytb01R	20	ACCCACCTCAGATTCATTGG	59.8		
PcCytb01FII	20	TCACATTGGTTCGAGGCCTAT	60.5	215	
PcCytb01R	20	ACCCACCTCAGATTCATTGG	59.8		
PcCytb02F	20	CCGCCGTACCTTATGTAGGA	60.0	193	
PcCytb02R	20	GCGTCTGAGTTTAGGCCAAG	60.0		
PcCytb03F	20	CAGGCTCAAACAACCCACTT	60.1	233	
PcCytb03R	20	GATGGCGTAGGCAAATAGGA	60.1		
PcCytb04F	20	TCCTATTTGCCTACGCCATC	60.1	213	
PcCytb04R	20	GTTCTACGGGCATACCTCCA	60.0		

### 3.A.3. Amplificación, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas de muestras fósiles con oligonucleótidos universales

Los experimentos de amplificación mediante oligonucleótidos universales en la muestra F6.1, no lograron amplificar el fragmento de interés. En la amplificación de los fragmentos del gen COI no se visualizaron bandas en los geles, por lo cual no se enviaron a secuenciar. Para el gen *cyt b* se obtuvieron dos productos visualizados en los geles de aproximadamente 800 y 250 pb respectivamente. La secuenciación de los mismos y su posterior análisis contrastándolas con secuencias depositadas en el GenBank mediante el uso de la herramienta BLAST, permitió determinar que la de mayor peso molecular correspondía a

contaminación, debido a la homología obtenida con humano, mientras que para la banda de menor tamaño mostró baja homología con fragmentos menores a 50 pb para diferentes especies.

#### **3.A.4. Amplificación, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas de muestras fósiles con oligonucleótidos específicos**

Para las pruebas realizadas con F6.2, utilizando los oligonucleótidos diseñados, solamente se obtuvieron fragmentos amplificados empleando los pares de oligonucleótidos PcCOI02 (COI) y PcCytb04 (*cyt b*). Si bien se visualizaron bandas mediante electroforesis, las mismas presentaron un tamaño menor al esperado de acuerdo con el diseño que se llevó a cabo.

La secuenciación de los fragmentos obtenidos para las muestras de restos antiguos presentó cromatogramas con varios sitios con picos solapantes en una misma posición. Debido a ello, se procedió a la edición de las secuencias utilizando el código IUPAC. Posterior a su edición, las secuencias obtenidas fueron contrastadas en el programa BLAST. Se obtuvo baja cobertura (de 20 pb) y alta identidad con varias especies de peces para los fragmentos generados utilizando los oligonucleótidos específicos para COI, siendo el largo de las secuencias editadas 30 pb. Entre las especies resultantes de mayor identidad se encuentran varios sciaénidos, uno de los cuales es la especie *P. cromis*, con una cobertura entre de 66 % para la secuencia obtenida a partir del oligonucleótido sentido (PcCOI02F) y del 70 % para el antisentido (PcCOI02R), y 100 % de identidad para ambas secuencias (Ver Figuras S1 y S2 en Material Suplementario). Para el par de oligonucleótidos PcCytb04, se obtuvo baja cobertura (menor a 40 pb) y alta identidad (mayor a 85 %) para fragmentos cortos de las secuencias con diversas especies de varios grupos.

#### **3.A.5. Confirmación de amplificación con oligonucleótidos universales y específicos en muestras actuales**

En relación a las muestras actuales, la amplificación fue exitosa para el gen COI, obteniéndose bandas de aproximadamente 650 pb. Posteriormente a la secuenciación, fueron contrastadas con secuencias de GenBank, a través de una búsqueda BLAST, confirmándose la amplificación de un fragmento de dicho gen para la especie *P. cromis*.

En la amplificación del gen *cyt b*, se obtuvo una banda de aproximadamente 800 pb. En su posterior análisis mediante una búsqueda BLAST, se pudo confirmar

su correspondencia con un fragmento de dicho gen para la especie *P. cromis*. La eficiencia de los oligonucleótidos diseñados, PcCOI02 y PcCytb04, se pudo comprobar mediante la amplificación de fragmentos de aproximadamente 200 pb a partir de muestras actuales, obteniéndose más de un 97 % de identidad para la especie (Ver Figuras S3, S4, S5 y S6 en Material Suplementario).

### **3.B. Material actual**

#### **3.B.1. Extracción de ADN**

Se observaron diferentes calidades en las extracciones evaluadas mediante los geles de agarosa. En varias extracciones se observó el ADN genómico, sin embargo, en todas se visualizó un “smear” o chorrete. Esto estaría indicando la presencia de ADN degradado, lo que puede deberse a que las muestras no provienen de un tejido fresco, por lo cual el ADN no se mantiene íntegro en una banda de alto peso molecular.

#### **3.B.2. Análisis de los datos moleculares obtenidos basados en los genes COI y *cyt b***

En el presente trabajo se obtuvieron 15 secuencias correspondientes a un fragmento de 619 pb del marcador COI y 15 secuencias parciales de 799 pb del gen *cyt b* para la especie *P. cromis*.

##### **3.B.2.1. Polimorfismos de los genes mitocondriales COI y *cyt b* en poblaciones actuales**

###### **3.B.2.1.1. Análisis de la diversidad de ambos marcadores mitocondriales**

Los diferentes parámetros de polimorfismo poblacional del conjunto de datos se presentan en las Tablas 2 y 3 para COI y *cyt b*, respectivamente. El valor obtenido para la especie correspondiente a COI es moderado para la diversidad haplotípica y relativamente bajo para la diversidad nucleotídica. Para las poblaciones del Uruguay en general, y de Rocha en particular, la diversidad haplotípica y la nucleotídica son bajas. Para Montevideo la diversidad haplotípica es alta, y la nucleotídica es baja. Mientras que, para Maldonado, Estados Unidos y Mar Chiquita (Argentina) ambas diversidades son nulas. Para el marcador *cyt b*, en Uruguay se obtuvo una diversidad haplotípica alta y un valor de diversidad

nucleotídica bajo. Dentro de las localidades muestreadas, Maldonado presenta los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica más elevados, contrario a lo observado para el marcador COI.

En las tablas 2 y 3, se observa también que las distancias corregidas por el modelo Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) presentan valores relativamente bajos dentro de cada grupo.

Las distancias genéticas pareadas para las secuencias de cada localidad se incluyen en las Tablas 4 y 5, para COI y *cyt b*, respectivamente.

**Tabla 2.** Parámetros estadísticos de diversidad genética de *P. cromis* según la localidad de la muestra analizada para un fragmento de 619 pb del gen COI. Los resultados fueron obtenidos a partir de los programas DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017) y MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013).

Localidad	N° de secuencias	S	SP	N° de Haplotipos	H (D. E.)	$\pi$ (D. E.)	Distancia K2P (D. E.)
<i>P. cromis</i>	36	10	6	6	0,562 (0,072)	0,00437 (0,00065)	0,004 (0,002)
Estados Unidos	5	0	0	1	0,000 (0,000)	0,00000 (0,00000)	0,000 (0,000)
Uruguay	15	4	0	5	0,476 (0,155)	0,00086 (0,00032)	0,001 (0,000)
Montevideo	5	3	0	4	0,900 (0,161)	0,00194 (0,00052)	0,002 (0,001)
Maldonado	5	0	0	1	0,000 (0,000)	0,00000 (0,00000)	0,000 (0,000)
Rocha	5	1	0	2	0,400 (0,237)	0,00065 (0,00038)	0,001 (0,001)
Mar Chiquita	11	0	0	1	0,000 (0,000)	0,00000 (0,00000)	0,000 (0,000)

S = Número de sitios variables; SP = Sitios parsimoniosamente informativos; H = Diversidad Haplotípica (adaptada de Nei, 1987); D. E. = Desvío Estándar;  $\pi$  = Diversidad nucleotídica (Nei, 1987); Distancia K2P = Distancia corregida mediante el modelo Kimura 2 Parámetros (Kimura, 1980).

**Tabla 3.** Parámetros estadísticos de diversidad genética de *P. cromis* según la muestra analizada para un fragmento de 799 pb del gen *cyt b*. Los resultados fueron obtenidos a partir de los programas DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017) y MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013).

Localidad	N° de secuencias	S	SP	N° de Haplotipos	H (D. E.)	$\pi$ (D. E.)	Distancia K2P (D. E.)
Uruguay	15	6	1	6	0,648 (0,134)	0,00127 (0,00037)	0,001 (0,001)
Montevideo	5	1	0	2	0,400 (0,237)	0,00050 (0,00030)	0,001 (0,000)
Maldonado	5	6	0	5	1,000 (0,126)	0,00301 (0,00066)	0,002 (0,001)
Rocha	5	1	0	2	0,400 (0,237)	0,00050 (0,00030)	0,001 (0,000)

S = Número de sitios variables; SP = Sitios parsimoniosamente informativos; H = Diversidad Haplotípica (adaptada de Nei, 1987); D. E. = Desvío Estándar;  $\pi$  = Diversidad nucleotídica (Nei, 1987); Distancia K2P = Distancia corregida mediante el modelo Kimura 2 Parámetros (Kimura, 1980).

**Tablas 4.** Estimaciones de distancias genéticas sobre pares de secuencias de COI entre localidades. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los resultados fueron obtenidos mediante el programa MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013).

	1	2	3	4	5
1. Montevideo	---				
2. Maldonado	0,001	---			
3. Rocha	0,001	0,000	---		
4. Mar Chiquita	0,001	0,000	0,000	---	
5. Estados Unidos	0,011	0,010	0,010	0,010	---

**Tabla 5.** Estimaciones de distancias genéticas sobre pares de secuencias de *cyt b* entre localidades. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los resultados fueron obtenidos mediante el programa MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013).

	1.	2.	3.	4.
1. Montevideo	---			
2. Maldonado	0,001	---		
3. Rocha	0,001	0,001	---	
4. Estados Unidos	0,026	0,026	0,026	---

### 3.B.2.1.2. Test de neutralidad

En la Tabla 6 se presentan los valores del test de neutralidad de Tajima (1989). Para las secuencias de Estados Unidos, Maldonado y Mar Chiquita en el caso de COI, no fue posible calcular dicho parámetro debido al bajo número de secuencias y además no presentan polimorfismo en las mismas. El test de neutralidad para Uruguay (agrupando las tres localidades muestreadas), fue negativo y significativo, lo cual estaría indicando un apartamiento de la evolución neutral.

**Tabla 6.** Test de neutralidad (Tajima, 1989) realizado a partir de las secuencias correspondientes al gen COI y del gen *cyt b* para cada localidad. Los resultados fueron obtenidos a partir del programa DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017).

Localidad de las muestras	Estadístico D COI	Estadístico D <i>cyt b</i>
Montevideo	-1,048 (P > 0.10)	-0,817 (P > 0.10)
Maldonado	---	-1,146 (P > 0.10)
Rocha	-0,817 (P > 0.10)	-0,817 (P > 0.10)
Uruguay	-1,816 (P < 0.05) *	-1,586 (0.10 > P > 0.05)

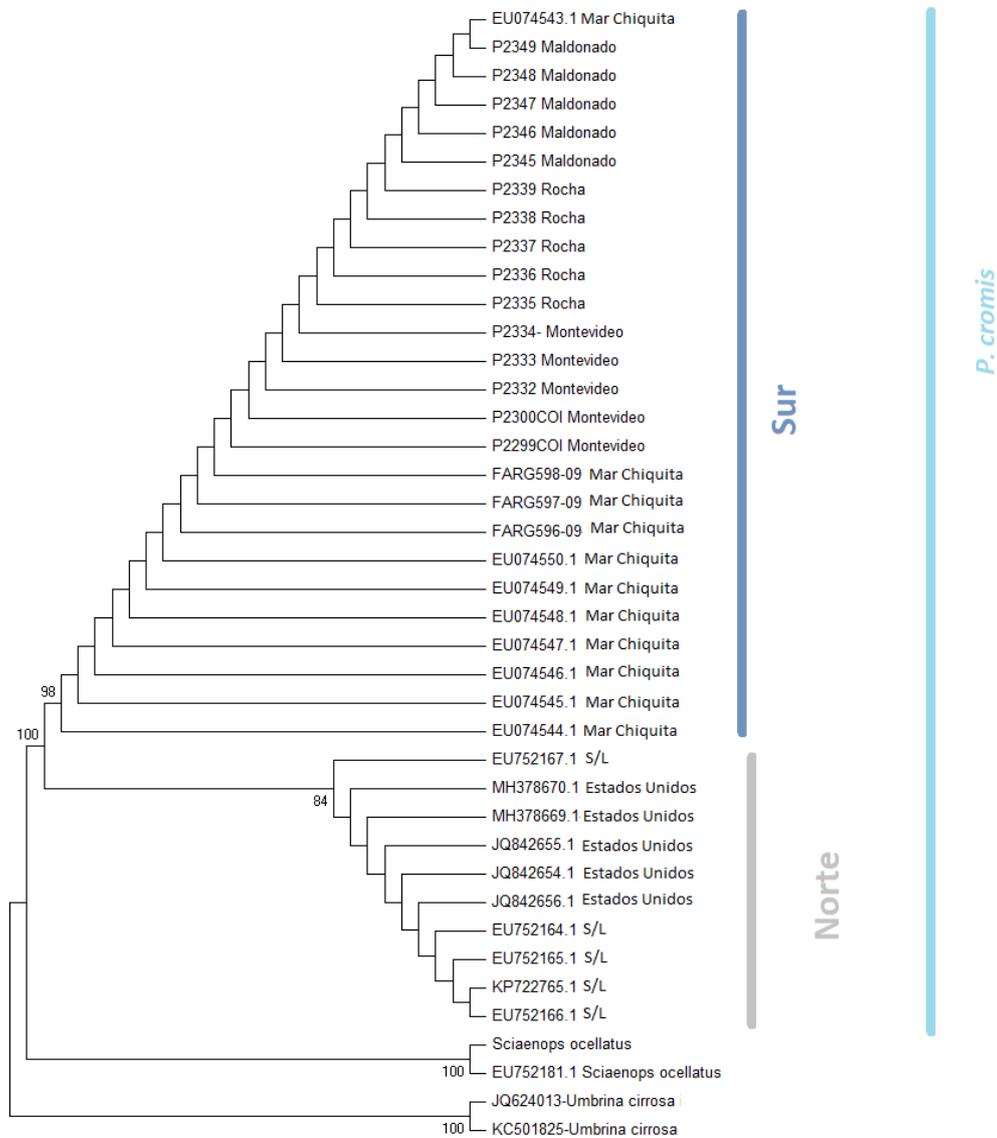
Los valores marcados con \* indican significancia estadística.

### 3.B.2.2. Análisis filogenéticos: Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud

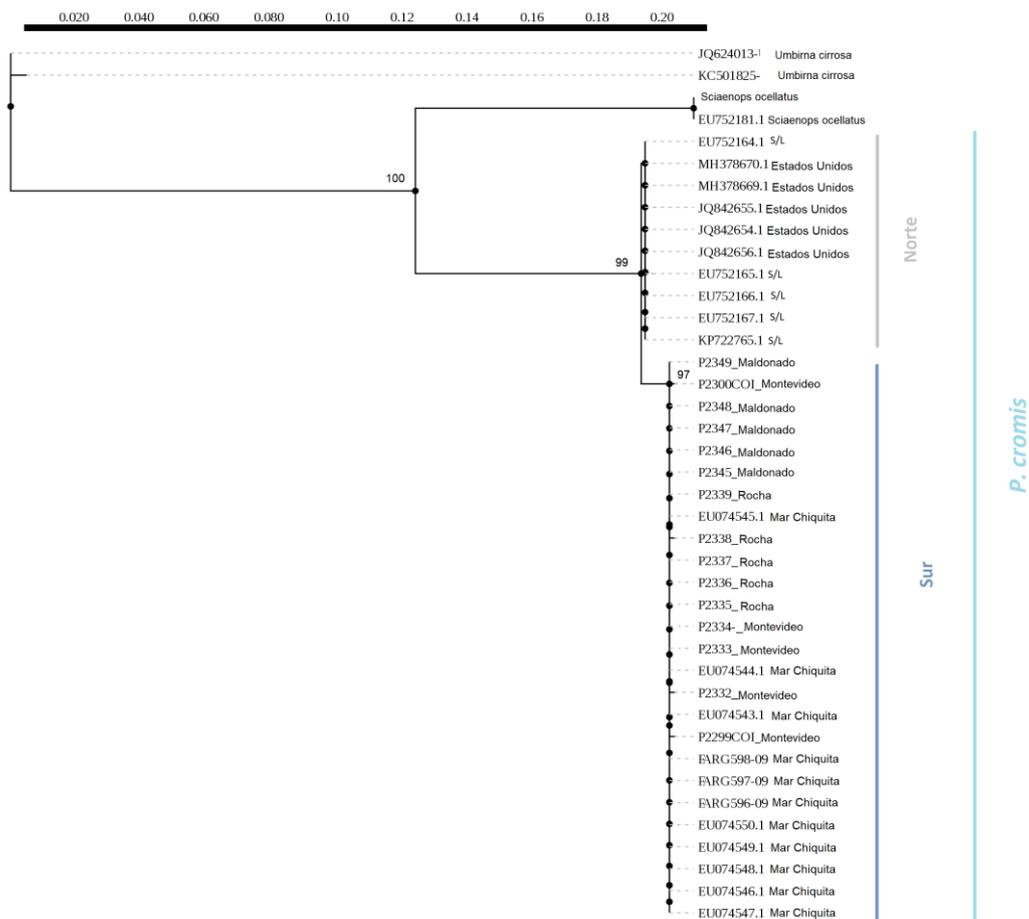
En las figuras 2, 3, 4 y 5 se observan las topologías obtenidas para ambos genes con todas las secuencias obtenidas en este trabajo, más secuencias de Estados Unidos y Mar Chiquita, y también incluyendo secuencias correspondientes al grupo externo seleccionado (*Umbrina cirrosa* y *Sciaenops ocellatus*).

Considerando ambos métodos de reconstrucción filogenética, se obtuvo una topología similar tanto para COI como para *cyt b*. En cuanto al soporte estadístico de los nodos, para el marcador COI, con ambos métodos de reconstrucción se apoya la monofilia de *P. cromis*, mientras que únicamente para el método de Máxima Parsimonia, los dos clados de las secuencias obtenidas de localidades del norte y del sur, presenta un soporte mayor a 75%. Para el marcador *cyt b*, mediante el método de Máxima Verosimilitud se obtuvo un soporte estadístico para la monofilia de *P. cromis*, mientras que para Máxima

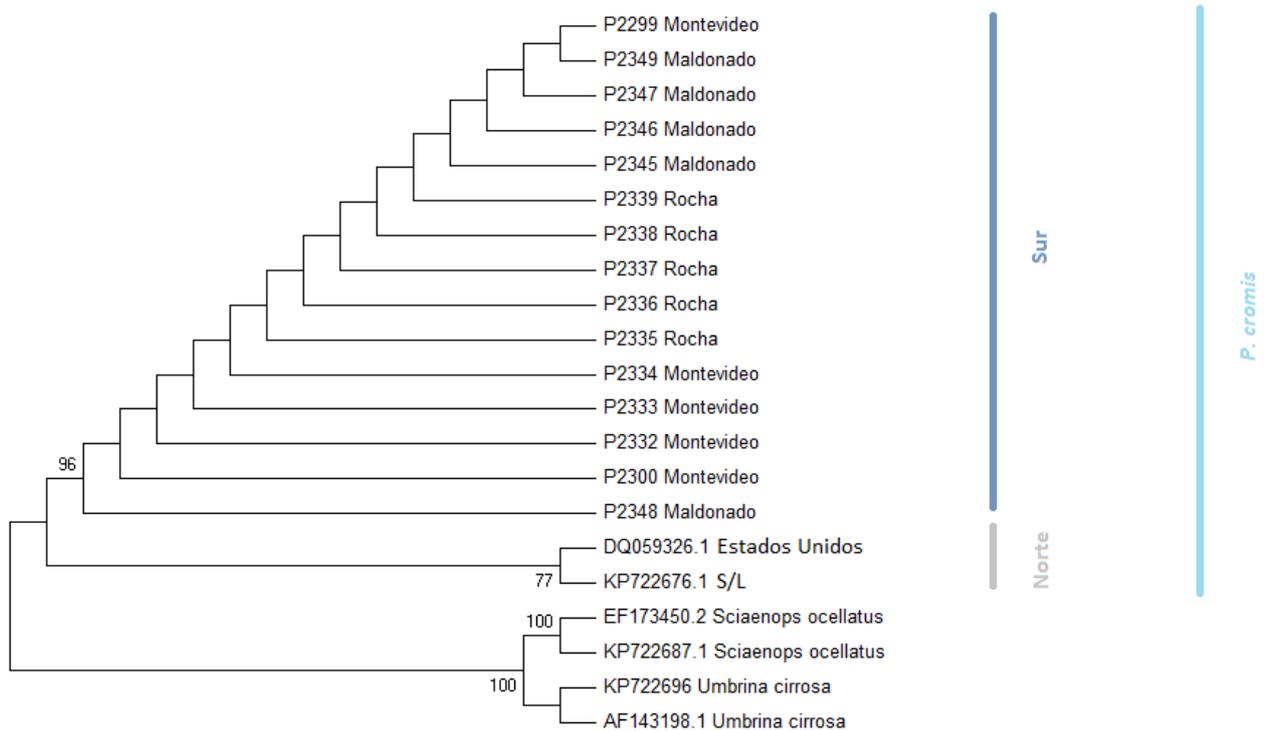
Parsimonia se obtuvo soporte en el nodo que soporta la monofilia de los clados del norte y del sur.



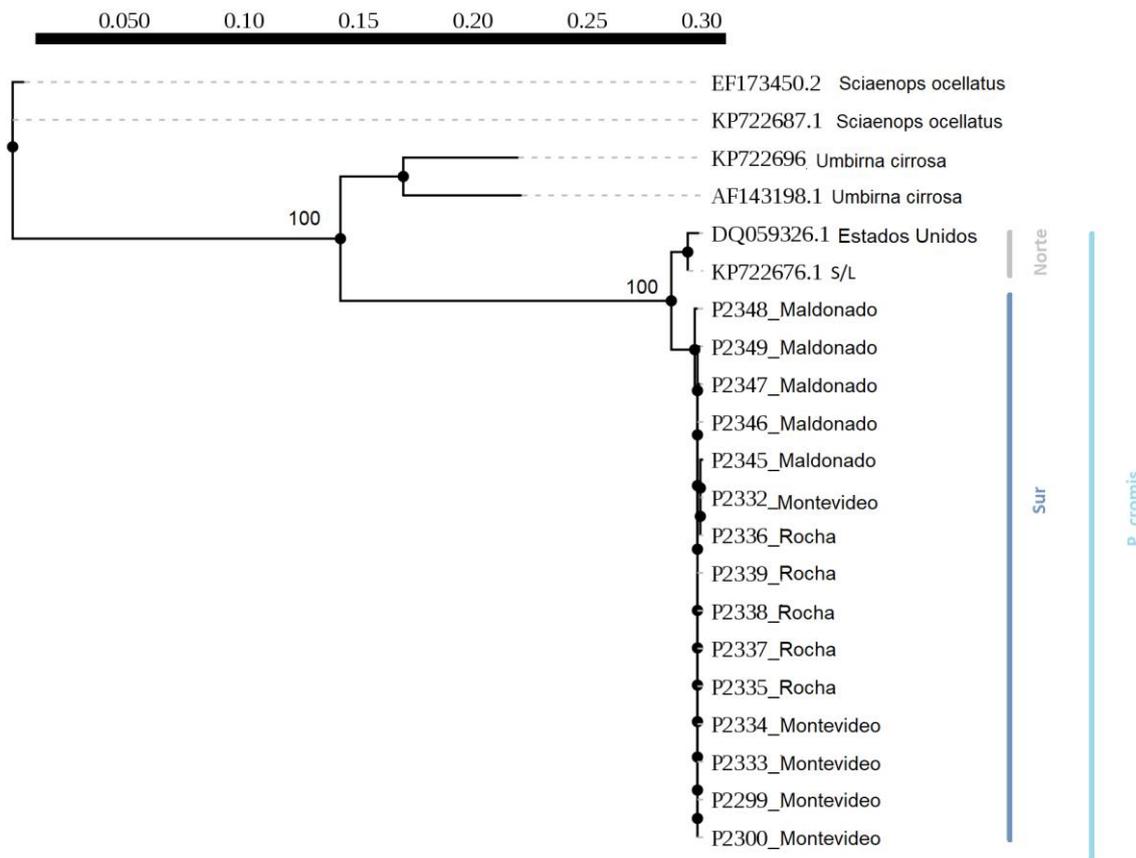
**Figura 2.** Topología obtenida mediante el método de Máxima Parsimonia para el gen COI, implementando en MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013). El valor de los nodos corresponde al soporte estadístico obtenido mediante 1000 réplicas de bootstrap (se muestran los valores mayores a 75 %). Se incluyen todas las secuencias obtenidas en este trabajo. La barra del extremo derecho (turquesa) señala las secuencias obtenidas de *P. cromis*. La barra interrumpida señala los clados del Sur (azul) y del Norte (gris). Las secuencias que se mencionan con la anotación “S/L” corresponden a aquellas que no han podido georreferenciarse. Las especies *Sciaenops ocellatus* y *Umbrina cirrosa* corresponden al grupo externo.



**Figura 3.** Topología obtenida, para el fragmento del gen COI, mediante el método de Máxima Verosimilitud (MV), donde el largo de las ramas es proporcional a la distancia. El soporte de los nodos fue determinado a partir de 1000 pseudoréplicas de bootstrap (se muestran los valores mayores a 75 %), implementado en PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). Se incluyen todas las secuencias obtenidas en este trabajo. La barra del extremo derecho (turquesa) señala las secuencias obtenidas de *P. cromis*. La barra interrumpida señala los clados del Sur (azul) y del Norte (gris). Las secuencias que se mencionan con la anotación “S/L” corresponden a aquellas que no han podido georreferenciarse. Las especies *Sciaenops ocellatus* y *Umbrina cirrosa* corresponden al grupo externo.



**Figura 4.** Topología obtenida mediante el método de Máxima Parsimonia para el gen *cyt b*, implementando en MEGA v 6.0 (Tamura et al., 2013). El valor de los nodos corresponde al soporte estadístico obtenido mediante 1000 réplicas de bootstrap (se muestran los valores mayores a 75 %). Se incluyen todas las secuencias obtenidas en este trabajo. La barra del extremo derecho (turquesa) señala las secuencias obtenidas de *P. cromis*. La barra interrumpida señala los clados del Sur (azul) y del Norte (gris). Las secuencias que se mencionan con la anotación “S/L” corresponden a aquellas que no han podido georreferenciarse. Las especies *Sciaenops ocellatus* y *Umbrina cirrosa* corresponden al grupo externo.

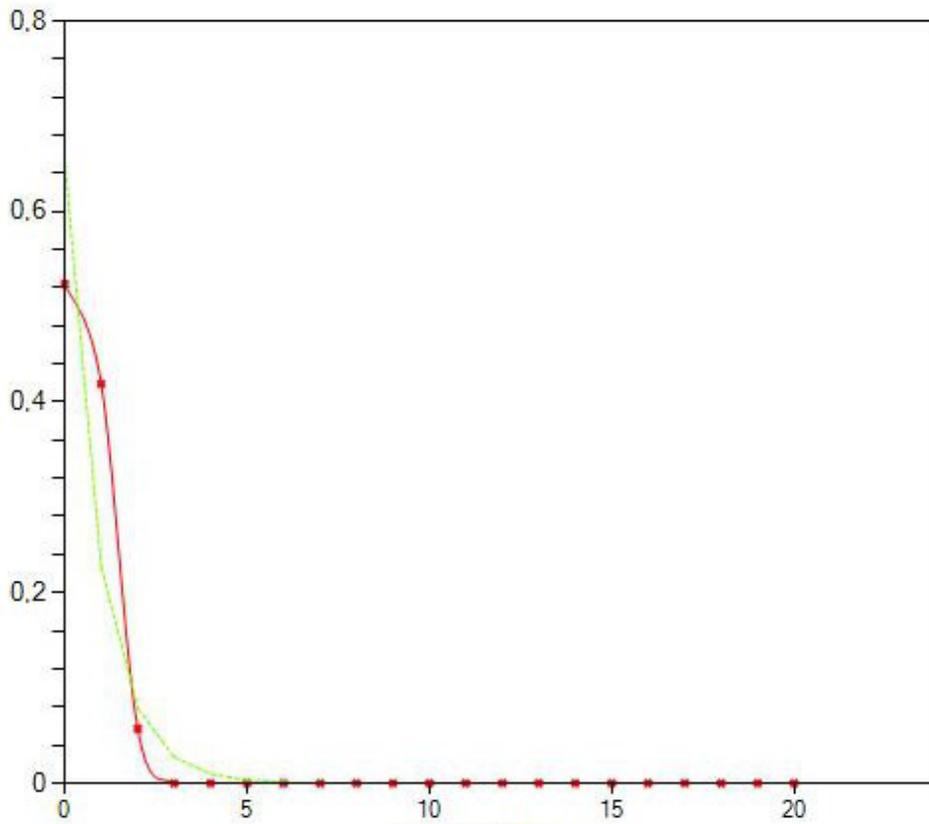


**Figura 5.** Topología obtenida, para el fragmento del gen *cyt b*, mediante el método de Máxima Verosimilitud (MV), donde el largo de las ramas es proporcional a la distancia. El soporte de los nodos fue determinado a partir de 1000 pseudoréplicas de Bootstrap (se muestran los valores mayores a 75 %), implementado en PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). Se incluyen todas las secuencias obtenidas en este trabajo. La barra del extremo derecho (turquesa) señala las secuencias obtenidas de *P. cromis*. La barra interrumpida señala los clados del Sur (azul) y del Norte (gris). Las secuencias que se mencionan con la anotación “S/L” corresponden a aquellas que no han podido georreferenciarse. Las especies *Sciaenops ocellatus* y *Umbrina cirrosa* corresponden al grupo externo.

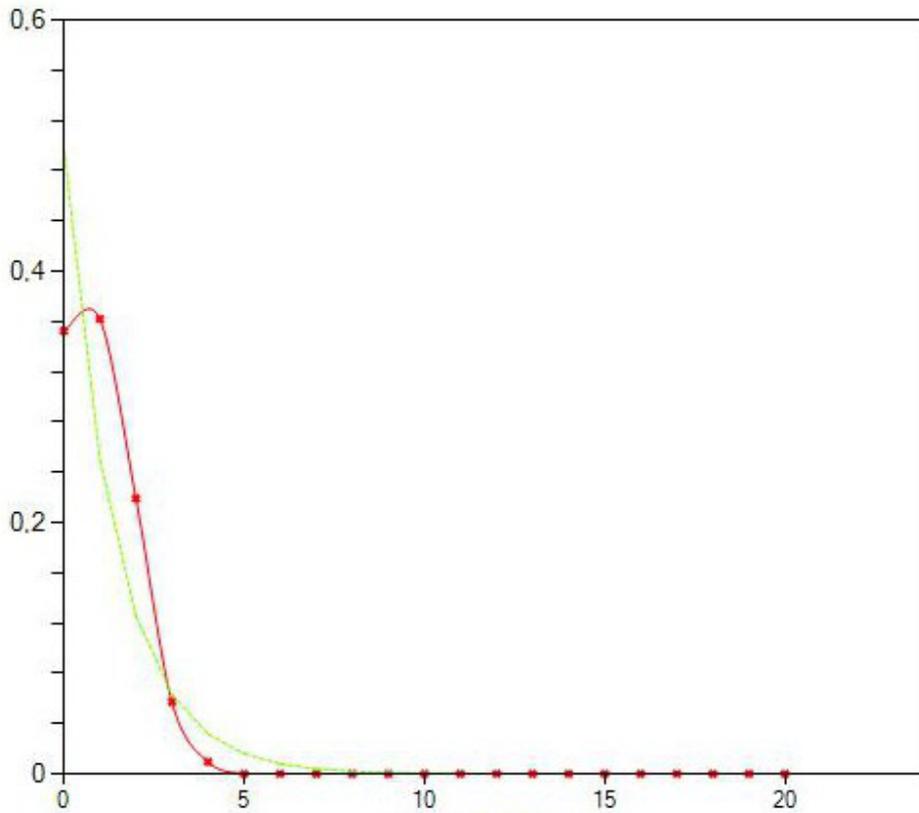
### 3.B.2.3. Análisis de Genética Poblacional

#### 3.B.2.3.1. Inferencia de demografía histórica: “Mismatch distribution”

Los análisis de la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas sobre las secuencias de *P. cromis* de Uruguay realizados a partir de los fragmentos de COI y de *cyt b* presentan una distribución unimodal con un pico en el valor cero (Figura 6) y cercano a cero (Figura 7), respectivamente. Los valores observados no se apartan de los esperados de acuerdo con el modelo de rápida expansión poblacional.



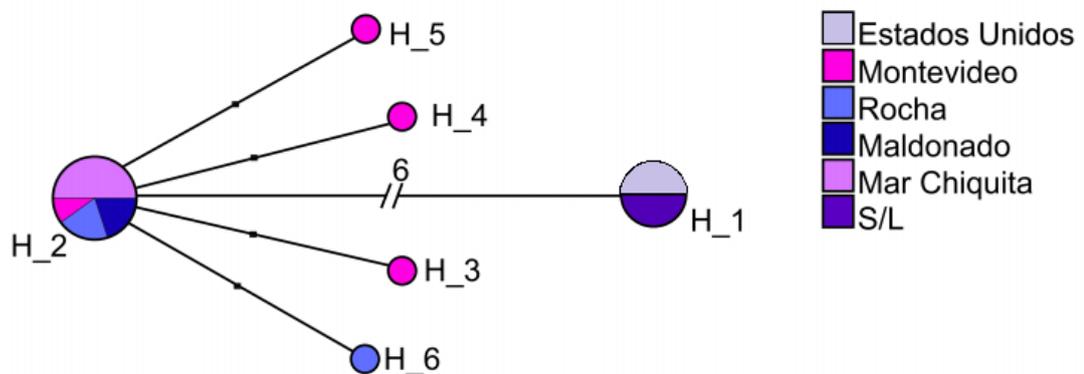
**Figura 6.** Gráfico del análisis "mismatch distribution" para secuencias del marcador COI de *P. cromis* de la costa uruguaya, obtenido mediante el programa DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017). En rojo se muestra la frecuencia de los observados y en verde la frecuencia de los esperados. En el eje horizontal se muestra el número de diferencias apareadas.



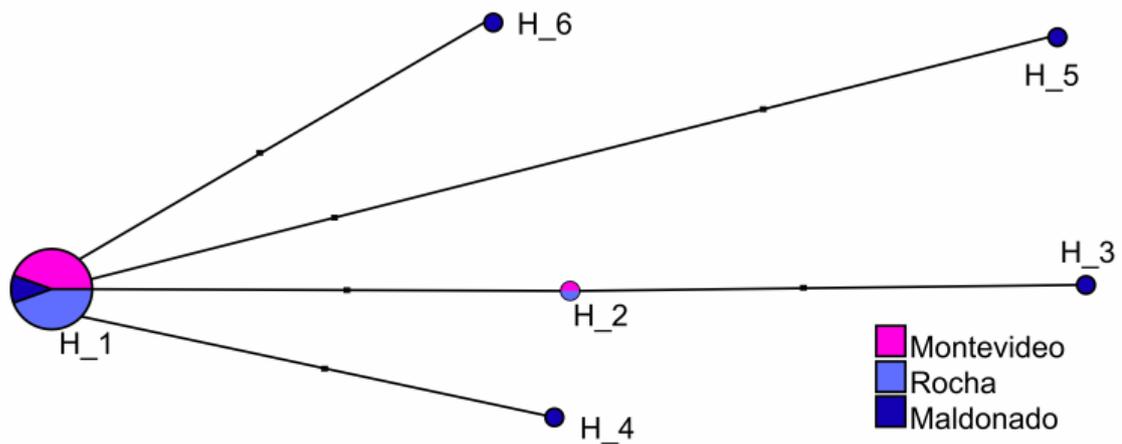
**Figura 7.** Gráfico del análisis "mismatch distribution" para secuencias del marcador *cyt b* de *P. cromis* de la costa uruguaya, obtenido mediante el programa DnaSP v. 6.00 (Rozas et al., 2017). En rojo se muestra la frecuencia de los observados y en verde la frecuencia de los esperados. En el eje horizontal se muestra el número de diferencias pareadas.

### 3.B.2.3.2. Red de haplotipos

En las Figuras 8 y 9 se presentan las redes de haplotipos para el gen COI y *cyt b*, respectivamente. La topología construida en base a secuencias de COI, presenta una forma de estrella, donde el haplotipo 2 (H\_2) está en mayor frecuencia, el resto de los haplotipos difieren de este por una única mutación, excepto el H\_1 que se encuentra separado por 6 pasos mutacionales del H\_2. En el caso de *cyt b*, solo se visualiza la red para las muestras colectadas en las costas uruguayas. Se observa una topología similar a la Figura 7, también presenta un haplotipo central, el H\_1, sin embargo, presenta más pasos mutacionales entre los diferentes haplotipos encontrados en las localidades Uruguay.



**Figura 8. Red de haplotipos para COI de *P. cromis*.** Se construye mediante el paquete informático NETWORK versión 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999). Cada círculo representa un haplotipo, donde el área del mismo representa la frecuencia del haplotipo en el conjunto de datos. Los puntos indican el número de pasos mutacionales que separan cada haplotipo. El haplotipo 1 (H\_1) cuya línea aparece interrumpida (/ /) se encuentra separado por 6 pasos mutacionales del haplotipo 2 (H\_2). Los colores indican las localidades donde está presente cada haplotipo. La referencia "S/L" indica aquellas secuencias cuya localidad no pudo ser identificada.



**Figura 9. Red de haplotipos para *cyt b* de *P. cromis*.** Se construye mediante el paquete informático NETWORK versión 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999). Cada círculo representa un haplotipo, donde el área del mismo representa la frecuencia del haplotipo en el conjunto de datos. Los puntos indican el número de pasos mutacionales que separan cada haplotipo. Los colores indican las localidades donde está presente cada haplotipo.

### 3.B.2.3.3 Análisis de estructura poblacional

Los valores de  $F_{ST}$  pareados basados en el gen COI son altos considerando las poblaciones del norte y del sur (mayores a 0,900), mientras que para las poblaciones del sur los valores son menores (Tabla 7). Este patrón también se observa en las estimaciones basadas en el gen *cyt b* (Tabla 8).

**Tabla 7.** Valores del estadístico  $F_{ST}$  pareados estimados mediante las secuencias de COI, entre las localidades analizadas en este estudio.

	1	2	3	4	5
1. Montevideo	---				
2. Maldonado	0,000	---			
3. Rocha	-0,000	-0,00	---		
4. Mar Chiquita	<b>0,169</b>	0,000	0,169	---	
5. Estados Unidos	<b>0,909</b>	<b>1,000</b>	<b>0,968</b>	<b>1,000</b>	---

Los valores en negrita corresponden a valores significativos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 8.** Valores del estadístico  $F_{ST}$  pareados estimados mediante las secuencias de *cyt b* entre las localidades estudiadas.

	1	2	3	4
1. Montevideo	---			
2. Maldonado	-0,111	---		
3. Rocha	-0,250	-0,111	---	
4. Estados Unidos	0,998	0,994	0,998	---

En cuanto al patrón de estructura poblacional estudiado mediante AMOVA, para COI (Tabla 9) se obtuvo que aquella estructura que maximiza la varianza entre grupos (95,57 %) y minimiza la varianza dentro de los grupos (3,95 %) para la especie *P. cromis* es la de dos grupos: Norte (Estados Unidos) y Sur (Montevideo, Maldonado, Rocha y Mar Chiquita). Para *cyt b* también se evaluó dicha hipótesis, obteniéndose resultados similares a COI (Tabla 10). Otras hipótesis evaluadas para determinar estructuración poblacional en el sur, no presentaron valores que pudieran apoyar la separación en subpoblaciones discretas en esta región (Tabla 11).

**Tabla 9. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para *P. cromis* basados en el gen COI.**

Se muestran dos de las hipótesis testeadas i) subdivisión en dos grupos: Norte (Estados Unidos) y Sur (Montevideo, Maldonado, Rocha, Mar Chiquita); ii) poblaciones divididas en tres grupos: Estados Unidos; Argentina; Uruguay (Montevideo, Maldonado y Rocha).

	AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F Estadísticos
i)	Entre grupos	1	25,19	2,98 Va	95,57	$F_{CT} = 0,956$
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	0,65	0,02 Vb	0,48	$F_{SC} = -0,109$
	Dentro de poblaciones	26	3,20	0,12 Vc	3,95	$F_{ST} = 0,961$
ii)	Entre grupos	2	25,30	1,30 Va	89,51	$F_{CT} = 0,895$
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	0,53	0,03 Vb	1,98	$F_{SC} = 0,189$
	Dentro de poblaciones	26	3,20	0,33 Vc	8,50	$F_{ST} = 0,914$

**Tabla 10. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para *P. cromis* basados en el gen *cyt***

**b.** Se muestra la hipótesis de subdivisión en dos grupos: Norte (Estados Unidos) y Sur (Montevideo, Maldonado y Rocha).

	AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F Estadísticos
	Entre grupos	1	195,86	104,31 Va	99,72	$F_{CT} = 0,997$
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	0,27	-0,04 Vb	-0,04	$F_{SC} = -0,136$
	Dentro de poblaciones	12	4,00	0,33 Vc	0,32	$F_{ST} = 0,996$

**Tabla 11. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para la población del sur de *P. cromis***

**basados en el marcador COI.** Se muestran dos de las hipótesis testeadas i) subdivisión en dos grupos por país: Argentina (Mar Chiquita) y Uruguay (Montevideo, Maldonado y Rocha); ii) poblaciones divididas en dos grupos por proximidad de localidades: Mar Chiquita y Montevideo vs Maldonado y Rocha.

	AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Estadísticos F
i)	Entre grupos	1	0,113	-0,02 Va	-12,41	$F_{CT} = -0,124$
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	0,533	0,02 Vb	16,06	$F_{SC} = 0,143$
	Dentro de poblaciones	22	3,200	0,15 Vc	96,35	$F_{ST} = 0,037$
ii)	Entre grupos	1	0,13	-0,01 Va	-7,15	$F_{CT} = -0,075$
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	0,51	0,02 Vb	12,18	$F_{SC} = 0,114$
	Dentro de poblaciones	22	3,20	0,15 Vc	94,96	$F_{ST} = 0,050$

## 4. Discusión

### 4.A. Material Fósil

#### 4.A.1. **Análisis de los resultados obtenidos en restos óseos antiguos**

La amplificación de los fragmentos de los genes COI y *cyt b* mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados fue exitosa como se pudo comprobar en las muestras de tejidos de corvinas actuales, obteniéndose más de un 97 % de identidad para la especie. Esto indicaría que los oligonucleótidos diseñados son específicos de *P. cromis* y que pueden ser utilizados para la identificación de la especie. Su especificidad los hace eficaces para el uso en análisis de ADN antiguo de restos arqueológicos que buscan identificar a esta especie. Un importante número de los intentos de amplificar fragmentos de estos genes a partir de muestras de ADN antiguo utilizando varios de los juegos de oligonucleótidos diseñados no fueron exitosos, ya que no se obtuvo un fragmento lo suficientemente grande e informativo para identificar la especie. Sin embargo, uno de los fragmentos amplificado y secuenciado utilizando el oligonucleótido PcCOI02, presenta homología con secuencias del marcador COI en diferentes grupos de peces, entre los que se encuentran varios sciaénidos, y en particular, *P. cromis*. Estos resultados descartarían la inespecificidad de los oligonucleótidos. La secuencia obtenida presenta gran parte de homología con el oligonucleótido (20 pb). Debe considerarse que la hibridación del oligonucleótido con el molde de ADN antiguo evidencia una importante complementariedad entre ellos. Por lo cual, se puede considerar que se parte de un templado que presenta homología, pero que parece estar muy degradado y con alteraciones en la secuencia, lo que es esperable en restos antiguos (Höss et al., 1996; Pääbo et al., 2004; Kemp y Smith, 2005; Royle, 2014).

#### 4.A.2. **Avances y dificultades en el trabajo con ADN antiguo**

El ADN antiguo ha sido recuperado en diferentes tipos de materiales biológicos como huesos, momias, pieles de museos y plantas fósiles (Brown y Brown, 1994). Los estudios de ADN antiguo proveen un gran potencial para la investigación en varias áreas de interés como lo son la antropología, la arqueología, la paleontología, la ciencia forense, la biología de la conservación y

ciencias evolutivas (Yang et al., 1998). Los fragmentos de ADN de animales presentes en colecciones de museos o de excavaciones paleo-arqueológicas pueden permitir la comparación directa con ADN actual de especies relacionadas mediante la obtención de sus secuencias, ofreciendo una valiosa herramienta para el estudio de las relaciones filogenéticas y evolutivas de las especies (Lindahl, 1993; Kemp y Smith, 2005).

De acuerdo a la visualización de las electroforesis en gel de las extracciones realizadas a las muestras de restos antiguos y la cuantificación de la concentración mediante espectrofotometría, existe evidencia de trazas de ADN en las muestras estudiadas en esta tesina. Sin embargo, la obtención de una concentración en el rango de los 997 ng/uL para una de las muestras, es demasiado elevada y no se corresponde con lo observado en la electroforesis. El ADN encontrado podría deberse a contaminación, no solo asociada a las personas que han manipulado el material, sino también a los microorganismos contaminantes que puedan encontrarse en su superficie (Brown y Brown, 1994). Entonces, el ADN total medido por espectrofotometría o estimado por la presencia de bandas en un gel de agarosa, no es necesariamente una indicación del contenido de ADN proveniente del material fósil. Debido a las tenues trazas visualizadas en el gel y a la baja amplificación de fragmentos podríamos considerar que el valor tan elevado obtenido mediante el espectrofotómetro se debe a otros compuestos que podrían estar absorbiendo a la misma longitud de onda que las bases del ADN. Cabe destacar que ambas extracciones realizadas presentaron una coloración amarronada, lo cual podría estar indicando la existencia de muchas impurezas que pueden influir en los valores obtenidos a través del espectrofotómetro. Ha sido mencionado que los huesos arqueológicos, en particular, presentan componentes de bajo peso molecular que pueden provenir del ambiente donde quedaron enterrados, y que los mismos pueden ser extraídos junto con el ADN, siendo potenciales inhibidores de las reacciones de PCR (Brown y Brown, 1994). En las muestras de ADN en las cuales se observa pigmentación es más probable que contengan estos inhibidores de PCR (Sensabaugh y Blake, 1993), lo que lleva a que la amplificación de muestras altamente pigmentadas sea nula o no detectable (Yang et al., 1997). Por lo cual, la extracción requiere un paso posterior a la misma que implique una estrategia de mayor purificación del ADN. En el estudio realizado por Yang et al. (1997), mediante el pasaje de las muestras a través de columnas de sílice se reduce visiblemente la coloración de las muestras y se logra la amplificación por PCR para las mismas. Las partículas de sílice, en presencia de un agente caotrópico

(como el isotiocianato de guanidinio), forman puentes salinos con polímeros de carga negativa, como el ADN, lo que permite que los contaminantes se eliminen mediante lavados anteriores a la recuperación del ADN con un buffer de elución adecuado (Höss y Pääbo, 1993; Alvis-Arango y Giraldo-Vásquez, 2015). Entonces, una estrategia a implementar a futuro, para poder optimizar la extracción de ADN y la posterior amplificación, sería la utilización de columnas de sílice de manera que se favorezca la purificación del ADN de la muestra pigmentada.

La incapacidad de poder amplificar el fragmento deseado con algunos de los oligonucleótidos diseñados se puede deber a varias razones que involucran no solo a las técnicas utilizadas, sino que también a la naturaleza del propio ADN. Los dos problemas principales asociados con el estudio del ADN antiguo es la degradación del mismo y la contaminación de las muestras antiguas con ADN moderno (Yang y Watt, 2005). La degradación espontánea es un proceso que ocurre en todas las macromoléculas biológicas (Lindahl, 1993). Naturalmente el ADN se encuentra sometido a varios factores que alteran su estabilidad química, siendo las causas más frecuentes los daños causados por hidrólisis y por oxidación de la cadena (Höss et al., 1996). Cuando el organismo está vivo, los mecanismos de reparación celular permiten conservar la información genética, reparando las modificaciones causadas (Lindahl, 1993). Cuando el organismo muere, el ADN deja de ser reparado y los daños se acumulan (Hofreiter et al., 2001), conduciendo a la fragmentación de la cadena y la alteración de la composición química de las bases (Kemp y Smith, 2005). El resultado de la acción de estos diversos procesos químicos y biológicos es que el ADN se encuentre altamente degradado (Pääbo et al., 2004) y en baja cantidad (Yang et al., 1998). Las pocas moléculas que se preservan en un material fósil están altamente fragmentadas y frecuentemente contienen lesiones en las bases (Pääbo et al., 2004). Por estos motivos, si están presentes en una extracción o la misma se contamina al preparar las muestras para la realización de la PCR, es altamente probable que solamente se amplifique el ADN contaminante, que generalmente presenta menos alteraciones en su estructura, en lugar del ADN de interés (Yang y Watt, 2005).

Para prevenir la contaminación de las muestras, se han propuesto varias medidas a tomar en cuenta para el trabajo con ADN antiguo. En primer lugar, separar físicamente lo que sería las actividades de preparación previa a la realización de la PCR y las actividades posteriores a la misma (Handt et al., 1994). En lo posible se deberían realizar ambas actividades en laboratorios

diferentes, y en particular dedicados al análisis del ADN antiguo, esto permite eliminar una fuente primaria de contaminación desde muestras actuales (O'Rourke et al., 2000). Es fundamental que se utilice material estéril como la superficie de trabajo, tubos, pipetas y algunos reactivos para la preparación de la reacción de PCR. En el caso de los oligonucleótidos y la enzima polimerasa, se sugiere una breve irradiación con UV, ya que una sobreexposición puede inactivarlos (O'Rourke et al., 2000). En la tesis de Royle (2014) en la que se analizaron muestras arqueológicas de peces del Holoceno Medio y Tardío, se destaca la necesidad de usar dos capas de guantes de látex o nitrilo, sobretodos y máscaras de cirugía en el laboratorio de ADN antiguo. También en este estudio se realizan enjuagues adicionales en las extracciones realizadas con HCl y NaOH para disolver los elementos finos. La separación de ambas etapas no fue físicamente posible, pero si se tomó la precaución de realizar la mix de PCR con los instrumentos a utilizar (guantes, tubos, pipetas, tips, hielo, gradillas y agua utilizada para la mix) irradiados en una cámara de UV, de manera de evitar posibles contaminaciones.

En cuanto a consideraciones de la PCR en particular, es conveniente no incluir controles positivos para evitar contaminación cruzada entre los tubos (O'Rourke et al., 2000). Los controles positivos representan una evidencia del funcionamiento correcto de la reacción de PCR. Sin embargo, como se debe usar una muestra de ADN que sea capaz de ser amplificada, se debería usar una muestra actual para garantizar la amplificación, esto podría llevar a dar falsos positivos en las muestras antiguas debido a contaminación. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR no deberían ser capaces de amplificar ADN proveniente de otras especies que no sean las de interés (Royle, 2014), por lo cual el diseño de oligonucleótidos específicos es de gran utilidad (Shirak et al., 2013). La consideración de no utilizar controles positivos sí fue empleada en el presente trabajo, ya que primero se testearon los oligonucleótidos diseñados con las extracciones de ADN antiguo y posteriormente se testearon con muestras de ADN actual. En cuanto a la especificidad en el diseño de los oligonucleótidos, se tomó en cuenta que la especie objetivo del presente trabajo era *P. cromis*, en base a la identificación morfológica de los restos a analizar y previamente determinados por Piñeiro y Verde (1999).

La explicación más plausible para la ausencia de amplificación de fragmentos mayores a 500 pb con muestras de ADN antiguo utilizando oligonucleótidos universales es que el molde de ADN en la extracción se encuentre fragmentado, debido a los posibles fenómenos de alteración de la secuencia mencionados, de

modo que evitaría el pegado de los oligonucleótidos. En cuanto a los resultados obtenidos en la presente tesina a partir del material fósil, los oligonucleótidos universales no permitieron discriminar entre *P. cromis* y otras especies de peces. Estos análisis deben profundizarse, se deberían realizar más estudios que permitan comprobarlo, siguiendo los criterios de autenticidad para el ADN antiguo descritos en Pääbo et al. (2004). La aplicación de técnicas de secuenciación masiva (Knapp y Hofreiter, 2010) y la realización de ajustes incorporando las precauciones mencionadas anteriormente de manera estricta, podrían profundizar y ampliar los resultados preliminares obtenidos.

Se puede concluir que los oligonucleótidos diseñados, que amplifican un fragmento de aproximadamente 200 pb, para la identificación de *P. cromis* fueron capaces de amplificar el fragmento esperado en las muestras actuales de dicha especie. Por lo tanto, estos oligonucleótidos se pueden considerar como adecuados para la identificación de la especie tanto en muestras actuales como en restos fósiles, dependiendo del grado de conservación de los mismos.

#### **4.B. Material actual**

##### **4.B.1. Análisis de los datos moleculares obtenidos basados en los marcadores COI y *cyt b***

###### **4.B.1.1. Niveles de variabilidad genética para *P. cromis* con los marcadores utilizados**

En cuanto a los parámetros de diversidad genética estudiados para la especie *P. cromis* en base al marcador COI, la diversidad haplotípica sería moderada, mientras que la diversidad nucleotídica sería baja, de acuerdo a Grant y Bowen (1998). En la categorización llevada a cabo por dichos autores, consideran como valores bajos a aquellos menores de 0,5 para la diversidad haplotípica y valores menores al 0,5 % para la diversidad nucleotídica. Además, estos autores proponen que la tendencia general entre ambos parámetros de diversidad se debería mantener entre los distintos marcadores mitocondriales (Grant y Bowen, 1998). Un patrón similar se ha observado para *Macrodon atricauda*, otro sciaénido de importancia comercial para la región sur del Atlántico Sudoccidental (Márquez, 2012). Sin embargo, *Cynoscion guatucupa*, plenamente explotado en la pesca uruguaya, presenta valores más elevados para la diversidad tanto haplotípica (0,999) como nucleotídica (0,0092) (Márquez, 2012). Se debe tener en cuenta que ambas especies tienen distribuciones menores a *P. cromis*, por lo cual, se podría esperar una menor diversidad (Zhao et al., 2018), sin embargo,

para el cálculo de dichos parámetros se utilizó la región control, cuya tasa mutacional es mayor en comparación con las demás regiones mitocondriales. El conjunto de datos obtenidos en esta tesina para el marcador *cyt b* representa una distribución reducida de la especie, por lo tanto, solo se analizó la diversidad a nivel de especie considerando el marcador COI.

Las muestras de la costa de Uruguay, presentaron valores de diversidad haplotípica y nucleotídica bajos para el marcador COI. Mientras que para *cyt b*, la diversidad haplotípica encontrada es alta y la nucleotídica es baja. Este último patrón se ha observado en estudios realizados con poblaciones del Golfo de México para *P. cromis*, donde también han encontrado la tendencia de una alta diversidad haplotípica (0,78) y una baja diversidad nucleotídica (0,48 %) (Gold, et al., 1994). En este trabajo se analizaron más de 300 ejemplares mediante el análisis de la variación de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial. Este patrón también se encontró, para el marcador COI, en otros sciaénidos (*Nibea albiflora* y *Miichthys miiuy*) que viven en los mares de la costa este de China (Xu et al., 2012, Xu et al., 2014). También se observó este patrón para otros sciaénidos, como *Menticirrhus americanus* para el Río de la Plata y La Paloma (Márquez, 2012); *Cynoscion guatupuca* del Atlántico sudoccidental (Fernández et al., 2011) y *Cynoscion acoupa* en la costa norte de Brasil (Rodrigues et al., 2008). Cabe destacar que estos autores utilizan la región control, que es más variable en comparación con los marcadores empleados en este trabajo. Sin embargo, como ya se ha mencionado, Grant y Bowen (1998) consideran que el patrón entre las medidas de diversidad se mantiene entre estos parámetros a lo largo del genoma mitocondrial.

En cuanto a las localidades de Uruguay, se observó diferencias en los resultados obtenidos para cada marcador. COI presentó valores más bajos de diversidad genética en comparación con los obtenidos por *cyt b*. Incluso las localidades muestreadas en este trabajo presentan diferencias en la diversidad genética para ambos marcadores. En este sentido, la localidad de Montevideo es la más diversa para el marcador COI, mientras que Maldonado es la más diversa para *cyt b*. Las contradicciones encontradas entre ambos marcadores, pueden explicarse debido al bajo número de muestras analizadas en este trabajo. Comparando con otras especies de sciaénidos explotadas por la pesca en Uruguay, los valores de diversidad encontrados en esta tesina son bajos. Por ejemplo, en la tesis de Márquez (2012), se encontró en general una mayor diversidad para muestras colectadas en localidades próximas a las de esta tesina, para las especies *M. atricauda* y *C. guatucupa*. En dicho trabajo, sin

embargo, *M. atricauda* de Montevideo presentó menor diversidad genética ( $H = 0,492$  y  $\pi = 0,001$ ) que *P. cromis* de la misma localidad, analizando el marcador COI. A su vez, en la localidad de Maldonado, *M. atricauda* también presentó valores más bajos de diversidad ( $H = 0,669$  y  $\pi = 0,002$ ) que *P. cromis*, basados en el marcador *cyt b*.

De acuerdo con la interpretación desarrollada por Grant y Bowen (1998), la tendencia de los valores de diversidad haplotípica altos y nucleotídica bajos, observados para el conjunto de datos de Uruguay del marcador *cyt b*, se atribuye a un proceso de expansión poblacional posterior a un período de bajo tamaño poblacional efectivo o cuello de botella; donde el rápido crecimiento poblacional potencia la aparición de nuevas mutaciones y haplotipos. Si bien, para el marcador COI, la diversidad haplotípica fue moderada, está en un valor muy cercano al límite que separa los valores bajos de los altos para Grant y Bowen (1998), mientras que la diversidad nucleotídica es sensiblemente más baja que los valores propuestos por los autores. Considerando que la relación entre ambas medidas de diversidad sería, entonces, similar a la mencionada en dicho trabajo, esto puede estar indicando que no necesariamente se apartaría de la hipótesis de cuello de botella y posterior expansión poblacional. Además, en el trabajo Grant y Bowen (1998) se menciona que es más relevante el patrón mostrado por los datos que el valor absoluto, de manera de independizar la comparación entre los diferentes estudios de ADN mitocondrial. De todas maneras, más datos de ambos marcadores serían necesarios para evaluar si mantienen una misma tendencia para las localidades de Uruguay.

El test de Tajima computado para Uruguay, arrojó un valor negativo y significativo. Por lo tanto, este conjunto de datos se apartaría de la evolución neutral, siendo el valor negativo un indicador de que la población ha pasado por un cuello de botella recientemente (Tajima, 1989; Xu et al., 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesina también se observaron para especies de elasmobranchios (Pereyra et al., 2010) e incluso en sciaénidos (Fernández et al., 2011), en donde se asocia el evento de reducción y expansión poblacional con las grandes fluctuaciones en el clima y en el nivel del mar, ocurridas durante el Pleistoceno en el sur de Sudamérica.

#### **4.B.1.2. Análisis filogenético y de estructura poblacional basados en los marcadores COI y *cyt b***

A partir de los resultados obtenidos de las reconstrucciones filogenéticas para los fragmentos de los dos genes estudiados, se reconoce el agrupamiento en dos

clados para los individuos del norte y del sur, lo que sugiere la diferenciación genética entre estas poblaciones geográficamente distantes. Esta diferenciación es soportada por el análisis de distancia genética y de  $F_{ST}$  pareados, ya que los valores más altos fueron observados entre las localidades del sur y la localidad de Estados Unidos. El AMOVA arrojó que la estructura más plausible para ambos marcadores es el agrupamiento en dos grupos, el grupo del norte y el del sur. Entonces, la divergencia encontrada a lo largo del Océano Atlántico y ambientes asociados, junto con la estimación indirecta de flujo génico a través de los valores de  $F_{ST}$  pareados, y la estructura poblacional hallada, sugieren aislamiento genético entre las poblaciones del norte y del sur. Esto podría estar asociado con factores físicos oscilatorios a lo largo de la costa atlántica, que alterarían la conexión entre las poblaciones a lo largo de su distribución (Zhao et al., 2018). La ausencia de flujo génico entre estas dos poblaciones también es apoyada por la evidencia de registros poco frecuentes en América Central y el Caribe (Froese y Pauly, 2018). Además, esta diferenciación geográfica también ha sido propuesta en base a estudios del comportamiento reproductivo de la especie (Tellechea et al., 2011). En trabajos anteriores, ya se ha evidenciado el efecto de aislamiento por distancia en poblaciones de *P. cromis* del Golfo de México, donde los individuos de localidades más cercanas son genéticamente más similares que aquellos de sitios más alejados (Gold et al., 1994). En este sentido, los resultados generales se ajustan a lo esperado para la especie, siendo la divergencia mayor a medida que las poblaciones se encuentran más alejadas. Si bien *P. cromis* presenta capacidades para migrar grandes distancias, estudios de captura y recaptura han reportado que la mayoría de los individuos son recapturados en la misma localidad donde fueron liberados, o en zonas adyacentes, hasta unos 100 km de distancia del sitio de liberación (Leidig et al., 2015). Esto contribuye a los resultados obtenidos en esta tesina en cuanto a la divergencia de las poblaciones distantes. Es necesario el relevamiento de poblaciones en regiones intermedias de la distribución de la especie para poder determinar si se agrupan en alguno de los dos clados obtenidos, o si corresponden a poblaciones que presentan intercambio génico con las poblaciones de los extremos, siguiendo el modelo de “stepping-stone” (Avice, 2000).

En cuanto a la población del sur, considerando el marcador COI, los bajos valores de  $F_{ST}$  sugieren un alto flujo génico entre los individuos de las cuatro localidades comparadas, lo que evita una más fuerte divergencia, como es esperado debido a su proximidad (Zhao et al., 2018). El AMOVA llevado a cabo

con el marcador COI para la población del sur, evidenció una baja estructuración poblacional ( $F_{CT} \leq 0$ ). Los resultados obtenidos no identifican una estructura poblacional para la región sur, como se ha visto también en otras especies de peces en esta región (ej. Pereyra et al., 2010; Fernández et al., 2011). Esto significa que, a pesar de factores ambientales diferenciales a los cuales pueden estar sometidas las diferentes localidades costeras (Montevideo, Maldonado, Rocha y Mar Chiquita), no existiría un aislamiento reproductivo entre las localidades del sur. Las bajas distancias genéticas encontradas entre dichas localidades también soportan la baja estructuración poblacional de *P. cromis* en este rango geográfico.

La distribución unimodal de las diferencias pareadas, o “mismatch distribution”, resultante para las muestras de la costa uruguaya, obtenidas con ambos marcadores, estarían indicando la ocurrencia de una expansión poblacional (Rogers y Harpending, 1992; Xu et al., 2012).

En cuanto a la red de haplotipos, para el marcador COI, presenta una topología en forma de estrella con diferentes haplotipos que rodean a un único central y más frecuente, que se encuentra en todas las localidades muestreadas del sur (Montevideo, Maldonado, Rocha y Mar Chiquita). Esta topología soporta la hipótesis de que la población del sur pasó por una expansión poblacional luego de un cuello de botella (Slatkin y Hudson, 1991). En el caso del marcador *cyt b*, la red de haplotipos presenta la misma topología en forma de estrella para el conjunto de muestras de Uruguay, confirmando que la población ha sufrido un cuello de botella y una posterior expansión poblacional. Estos eventos, como ya se ha mencionado, se vincularían con las fluctuaciones paleoambientales ocurridas durante el Pleistoceno en la región sur del Atlántico Sudoccidental. Sin embargo, también existe evidencia en el registro fósil de eventos de regresión del nivel del mar en el Holoceno, entre 2276 y 2830 años antes del presente, en la Formación Villa Soriano, que se extiende desde la desembocadura del río Negro hasta los márgenes de la laguna Merín (Martínez et al., 2006). Esta disminución en el nivel del mar podría haber afectado al tamaño de la población de *P. cromis* del sur. Entonces, es necesario la datación del evento de reducción poblacional evidenciado en la población del sur, para determinar con cuál de estos cambios ambientales puede estar asociado.

La población de Estados Unidos incluida en la red de haplotipos para el marcador COI, representa un único haplotipo, que se encuentra separado por 6 pasos mutacionales del central localizado en la región sur, apoyando los valores altos de distancias genéticas evidenciadas con ambos marcadores, en especial en el

gen *cyt b* (2,6%). El rango general de las distancias genéticas interespecíficas para otros teleósteos (Lakra et al, 2009, Ward et al., 2009) es superior a los valores de distancias obtenidos en esta tesina para las poblaciones del norte y del sur. Sin embargo, estos valores se encuentran próximos a los evidenciados, también en el trabajo de Lakra et al. (2009), entre dos especies de sciaénidos cercanamente emparentadas (*Johnius dussumieri* y *Johnius elongatus*), en base al marcador COI.

La distancia genética entre las localidades del sur, para ambos marcadores, son más bajas que los valores obtenidos en el trabajo de Lakra et al. (2009), dentro de otras especies de sciaénidos. Las bajas distancias observadas podrían estar indicando que los individuos de las localidades del sur son genéticamente más similares entre sí, apoyando una homogeneidad genética sobre este rango geográfico, como también ha sido observado para otras especies de esta región (ej. Pereyra et al., 2010).

En síntesis, los resultados obtenidos indican niveles de variación genética para la especie de moderados a bajos, para ambos marcadores mitocondriales, excepto cuando se incluyen juntas las poblaciones del norte y el sur, por la alta distancia genética existente entre ambas poblaciones. La baja diversidad genética encontrada en varias localidades puede estar alertando sobre el estado de conservación de esta especie. Sin embargo, si se comparan los valores obtenidos para las muestras de las localidades de las costas uruguayas con el resto de las regiones analizadas (Mar Chiquita y Estados Unidos), la diversidad es sensiblemente mayor. La baja divergencia genética entre las localidades de la costa uruguaya no permite la identificación de diferentes “stocks” en el sur, observándose una homogeneidad genética entre las mismas. Esto es apoyado por la carencia de una barrera física entre las localidades muestreadas del Río de la Plata y Océano Atlántico, como ha sido estudiado para otros grupos de peces en estas áreas geográficas (García et al., 2008; 2014; Pereyra et al., 2010).

## 5. Conclusiones

En este trabajo se han desarrollado oligonucleótidos de alta especificidad para el sciaénido *P. cromis*, que permitieron amplificar un fragmento de tamaño e información capaz de distinguir la especie. De manera preliminar se obtuvo con

uno de los oligonucleótidos sintetizados la amplificación de un fragmento de 30 pb del gen COI a partir de las muestras fósiles presentando homología con otros sciaénidos y con *P. cromis*. La dificultad para la amplificación de un fragmento mayor se puede deber a múltiples factores que implican las técnicas utilizadas, la naturaleza y el estado de preservación del material analizado.

En cuanto a los análisis con los ejemplares actuales de *P. cromis*, se puede concluir que, a escala de su distribución global, se distinguen dos poblaciones aisladas reproductivamente en el norte y en el sur. La población del sur es genéticamente más diversa que la población del norte. Particularmente en el sur, no se pueden distinguir subpoblaciones discretas o “stocks”, por el contrario, estas localidades presentarían flujo génico entre sí. Esta población del sur históricamente habría sufrido un cuello de botella y posteriormente una expansión poblacional, que habrían tenido lugar durante las glaciaciones del Pleistoceno, o más recientemente hacia el Holoceno. Si bien en Uruguay, *P. cromis* presenta una baja diversidad genética, se puede aceptar parcialmente la hipótesis basada en la evidencia regional de la especie, ya que, en comparación con las localidades de Mar Chiquita y Estados Unidos, existe una mayor variación entre los individuos colectados en las costas uruguayas que en las anteriores regiones mencionadas.

## 6. Perspectivas

Es de destacar que el presente trabajo buscó la puesta a punto de técnicas para trabajar con ADN antiguo, lo cual significa el inicio de una línea de trabajo, que requeriría un laboratorio estandarizado para trabajar con este tipo de muestras, de manera independiente a las modernas. Para estudios futuros en material fósil es necesario incorporar otras estrategias que han permitido la obtención de mejores resultados en otros laboratorios especializados en ADN antiguo. En cuanto a la extracción, podría utilizarse más cantidad en gramos de muestra para la extracción de material óseo antiguo, como fue usada (5 gramos) para huesos humanos de 5.000 años en Yang et al. (1997). Para optimizar la recuperación del ADN y a su vez minimizar el impacto de inhibidores de la PCR sería necesario utilizar kits de extracción con un número reducido de reactivos, de manera de disminuir el número de pasos donde puede contaminarse la muestra (Yang et al., 1998), implementando la purificación del ADN mediante columnas de

centrifugado de sílice. Siguiendo este protocolo se ha observado una mayor eficiencia para la purificación de ADN amplificable por PCR desde huesos antiguos humanos (ej. Yang et al., 1998). También, se podría tratar las muestras de ADN antiguo con uracil glicosilasa para reducir el número de sustituciones causadas por la desaminación de la base citosina que es leída por complementariedad como timina, causando alteraciones en la secuencia de bases (Hofreiter et al., 2001).

Otras modificaciones que podrían realizarse a futuro para lograr la identificación del pez fósil, es el diseño de oligonucleótidos que permitan la amplificación de un fragmento aún más pequeño, de aproximadamente 100 pb, lo cual aumentaría la posibilidad de amplificación (Pääbo et al., 2004) en un material tan antiguo como el que fue trabajado en este estudio (de por lo menos 6000 años, Piñeiro y Verde, 1999).

La superposición de picos en los cromatogramas obtenidos en este trabajo puede deberse a las múltiples secuencias contaminantes que mediante la metodología de secuenciación de Sanger no es posible diferenciar. La incorporación de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva podría arrojar varias lecturas en paralelo de las diferentes variantes de secuencias que se encuentran en la extracción, por lo tanto, podrían obtenerse secuencias discretas de las distintas especies presentes en la muestra (Knapp y Hofreiter, 2010; Hajibabaei et al., 2011; Moreno et al., 2016).

En cuanto al estudio poblacional de *P. cromis*, el tamaño de las muestras de individuos colectados podría estar afectando fuertemente los análisis demográficos (Grant, 2015). Para que los resultados sean más rigurosos en cuanto a la evaluación de la estructura genético-poblacional de esta especie es necesario extender la representación del área de muestreo en Uruguay. Además, la obtención de datos para la región central de la distribución de la especie es necesario para evaluar su estructuración poblacional a nivel global.

El estudio de genes de bajos niveles de polimorfismo pueden dificultar la correcta reconstrucción de la historia poblacional (Grant, 2015). En cuanto a los marcadores genéticos utilizados, podría considerarse que la variación no fue suficiente para determinar si la población del sur se encuentra subdividida en "stocks" o subpoblaciones discretas. Entonces una estrategia a seguir en futuros estudios es la utilización de regiones hipervariables como la región control, otra región mitocondrial ampliamente utilizada para estudios poblacionales en sciaénidos (ej. Seyoum et al., 2000; Rodrigues et al., 2008). Lo preferente para poder evaluar más adecuadamente la diversidad, es utilizar varias fuentes de

datos genéticos (Krishnamurthy y Francis, 2012). En este sentido, podría utilizarse loci de microsatélites, que son secuencias de ADN cortas repetidas en tándem dispersas por todo el genoma nuclear. Presentan herencia mendeliana codominante y un alto polimorfismo, debido a la variación en el número de repetidos (Chistiakov et al., 2006). Se destacan por presentar altas tasas mutacionales, estimadas entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  por generación en cada locus (Ellegren, 2000). Este tipo de marcador es de gran utilidad para inferir relaciones filogenéticas a niveles inferiores al de especie o entre especies que han divergido recientemente, así como para la determinación de diferentes “stocks” genéticos dentro de las poblaciones actuales (Chistiakov et al., 2006).

## 7. Bibliografía

- Akaike, H. 1974. *A new look at the statistical model identification*. IEEE Trans. Autom. Contr. 19, 716-723 pp.
- Allendorf, F. W.; Ryman, N.; Utter, F. M. 1988. *Genetics and fishery management. Past, present and future*. En: Population genetics and fishery management. Eds: Ryman, N.; Utter, F. Washington, USA. 1-19 pp.
- Alroy, J. 2000. *The Paleobiology database*. University of California -Santa Barbara. <http://paleodb.org/>.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. *Basic Local Alignment Search Tool*. Journal of Molecular Biology 215, 403– 410 pp.
- Alvis-Arango, A. A.; Giraldo-Vásquez, L. E. 2015. *Evaluación de los métodos fenol-cloroformo y columnas de sílice para extracción de ADN a partir de tejido óseo*. Colomb. Forense. 2,1, 69-74 pp.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 pp.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2° Edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, USA, 541 pp.
- Blasina, G. E.; Barbini, S. A.; Díaz de Astarloa, J. M. 2010. *Trophic ecology of the black drum, Pogonias cromis (Sciaenidae), in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina)*. Journal of Applied Ichthyology 26, 528–534 pp.
- Bandelt, H-J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. Mol Biol Evol 16:37-48 pp.
- Breslauer, K. J.; Frank, R.; Blöcker, H.; Marky, L. A. 1986. *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. Proc Natl Acad Sci USA, 83,11, 3746-50 pp.
- Brown, W. M.; George, M.; Wilson, A.C. 1979. *Rapid evolution of animal*

*mitochondrial DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4, 1967-1971 pp.

Brown, T. A.; Brown, K. A. 1994. *Ancient DNA: Using molecular biology to explore the past*. BioEssays 16,10, 719-726 pp.

Bryant, J. D.; Macfadden, B. J.; Mueller, P. A. 1992. *Improved Chronologic Resolution of the Hawthorn and the Alum Bluff Groups in Northern Florida, Implications for Miocene Chronostratigraphy*. Geol. Soc. Amer. Bulle 104, 208-218 pp.

Buchmann, F. S.; Filho, G. R. 1997. *Fosseis de vertebrados marinhos do Pleistoceno Superior na Porcao sul da planicie costeira do Rio Grande Do Sul, Brasil*. Notas Tecnicas 10, 7-16 pp.

Burnham, K. P.; Anderson, D. R. 2004. *Multimodel inference: understanding AIC and BIC in Model Selection*. Sociological Methods & Research, 33, 261–304 pp.

Chao, N. L. 2003. *Scianidae. Croakers*. En: The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. Eds: Carpenter, K.E. FAO species identification guide for fishery purposes, 1583-1653 pp.

Chao, N. L.; Frédou, F. L.; Haimovici, M.; Peres, M. B.; Polidoro, B.; Raseira, M.; Subirá, R.; Carpenter, K. 2015a. *A popular and potentially sustainable fishery resource under pressure—extinction risk and conservation of Brazilian Sciaenidae (Teleostei: Perciformes)*. Global Ecology and Conservation 4, 117–126 pp.

Chao, L.; Vieira, J. P.; Brick Peres, M.; Haimovici, M. 2015b. *Pogonias cromis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T193269A49230598.

Chistiakov, D. A.; Hellemans, B.; Volckaert, F. A. M. 2006. *Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics*. Aquaculture 255, 1–29 pp.

Cione, AL; Torno, A. 1988. *Records of Pogonias cromis (Perciformes, Sciaenidae) in Las Escobas Formation (Holocene) in Uruguay and Argentina. Zoogeographical and Evironmental Considerations*. Quat. South Amer. And

Antarctic Peninsula, 5, 73-82 pp.

Cousseau, M. B.; Perrotta, R. G. 2000. *Peces marinos de Argentina. Biología, distribución, pesca*. Publicaciones Especiales INIDEP, Mar del Plata, 167 pp.

Cox, A. J.; Hebert, P. D. N. 2001. *Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean*. Mol. Ecol. 10, 371–386 pp.

Defeo, O.; Horta, S.; Carranza, A.; Lercari, D.; de Álava, A.; Gómez, J.; Martínez, G.; Lozoya, J. P.; Celentano, E. 2009. *Hacia un Manejo Ecosistémico de Pesquerías. Áreas Marinas Protegidas en Uruguay*. Facultad de Ciencias-DINARA, Montevideo, 122 pp.

DINARA. 2014. *Boletín Estadístico Pesquero*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. 51 pp.

DINARA. 2015. *Boletín Estadístico Pesquero*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. 60 pp.

Ellegren, H. 2000. *Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference*. Trends Genet. 16, 551–558 pp.

Erchini, C., Ferrari, A., Tobella, M., Sosa, M. 2015. *Looking at the sea: Mt Site, River Plate Coast, Canelones, Uruguay*. Quaternary International 373, 34-44 pp.

Escosteguy, P. D.; Salemme, M. C.; González, M. I. 2017. *Tecnología ósea en la Depresión del Río Salado (provincia de Buenos Aires)*. Arqueología 23, 3, Dossier, 65-90 pp.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. *Arlequin ver. 3.0: An integral software package for population genetics data analysis*. Evol. Bioinform. Online 1: 47-50 pp.

Excoffier, L.; Lischer, H. E. L. 2010. *Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. Molecular Ecology Resources 10, 564-567 pp.

Felsenstein, J. 1985. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution 39, 783-791 pp.

Fernández Iriarte, P.J.; Alonso, M. P.; Sabadin, D. E.; Arauz, P.A.; Iudic, C. M. 2011. *Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic*. Scientia Marina 75, 4, 701-706 pp.

FinchTV 1.4.0. Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>

Flamingh, A.; Mallott, E.; Roca, A.; Boraas, A.; Malhi, R. 2018. *Species identification and mitochondrial genomes of ancient fish bones from the Riverine Kachemak tradition of the Kenai Peninsula, Alaska*. Mitochondrial DNA Part B 3, 1, 409-411 pp

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294-299 pp.

Froese, R.; Pauly, D. Editors. 2018. *FishBase*. World Wide Web Electronic Publication, version (06/2018), [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).

Fucks, E.; Aguirre, M.; Deschamps, C. M. 2005. *Late Quaternary continental and marine sediments of northeastern Buenos Aires province (Argentina): Fossil content and paleoenvironmental interpretation*. Journal of South American Earth Sciences 20, 45-56 pp.

García, G.; Vergara, J.; Gutiérrez, V. 2008. *Phylogeography of the Southern Atlantic menhaden *Brevoortia aurea* inferred from mitochondrial cytochrome b gene*. Marine Biology 155, 325–336 pp.

García, G.; Pereyra, S.; Gutierrez, V.; Oviedo, S.; Miller, P.; Domingo, A. 2014. *Population structure of *Squatina guggenheim* (Squatiniiformes, Squatinidae) from the south-western Atlantic Ocean*. Journal of Fish Biology 86, 186-202 pp.

Gold, J. R.; Richardson, L. R.; Furman, C.; Sun, F. 1994. *Mitochondrial DNA Diversity and Population Structure in Marine Fish Species from the Gulf of*

Mexico. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51 (Suppl. 1), 205-214 pp.

Gold, J. R.; Richardson, L. R. 1998. *Mitochondrial DNA Diversification and Population Structure in Fishes From the Gulf of Mexico and Western Atlantic*. The Journal of Heredity 89, 5, 404-414 pp.

González, M. Isabel; Escosteguy, Paula; Frère, M. Magdalena. 2016. *Estudio ictioarqueológico y la presencia de corvina negra en La Guillerma 5 (Depresión del río Salado, Provincia de Buenos Aires)*. III Encuentro Latinoamericano de Zooarqueología, Aracajú, Brasil.

Grant, W. S.; Bowen, B. W. 1998. *Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation*. The American Genetic Association 89, 415-426 pp.

Grant, W. S. 2015. *Problems and Cautions With Sequence Mismatch Analysis and Bayesian Skyline Plots to Infer Historical Demography*. Journal of Heredity, 00 (00), 1-14 pp.

Guindon, S.; Dufayard, J. F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W. et al. 2010. *New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0*. Systematic Biology 59, 307-321 pp.

Hagelberg, E.; Sykes, B.; Hedges, R. 1989. *Ancient bone DNA amplified*. Nature 342, 485 p.

Hajibabaei, M.; Smith, M. A.; Janzen, D. H.; Rodriguez, J. J.; Whitfield, J.B.; Hebert, P. D. N. 2006. *A Minimalist Barcode Can Identify a Specimen Whose DNA is Degraded*. Molecular Ecology Notes 6, 959–964 pp.

Hajibabaei, M.; Shokralla, S.; Zhou, X.; Singer, G. A. C.; Baird, D. J. 2011. *Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos*. PLoS ONE 6, 4, e17497.

Handt, O.; Höss, M.; Krings, M.; Pääbo, S. 1994. *Ancient DNA: methodological challenges*. Experientia 50, 524–529 pp.

Hänni, C.; Laudet, V.; Sakka, M.; Begue, A.; Stehelin, D. 1990. *Amplification de fragments d'ADN mitochondrial a partir de dents de d'os humains anciens*. Comptes rendus de l'Academie des Sciences, Paris, series III 310, 365-370 pp.

Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; deWaard, J. R. 2003. *Biological identification through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 270, 313-321 pp.

Higuchi, R.; Bowman, B.; Freiberger, M.; Ryder, O. A.; Wilson, A. C. 1984. *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature 312, 282-284 pp.

Hofreiter, M.; Jaenicke V.; Serre D., von Haeseler, A., Pääbo, S. 2001. *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*. Nucleic Acids Research 29, 23, 4793-4799 pp.

Horai, S.; Hayasaka, K.; Murayama, K.; Wate, N.; Koike, H.; Nakai, N. 1989. *DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis*. Proc. Japan. Acad. Series B 65, 229-233 pp.

Höss, M.; Pääbo, S. 1993. *DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method*. Nucl. Acids. Res. 21, 3913-3914 pp.

Höss, M.; Jaruga, P.; Zastawny, T. H.; Dizdaroglu, M.; Pääbo, S. 1996. *DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues*. Nucl. Acids. Res. 24, 1304-1307 pp.

Jones, C. M.; Wells, B. 1998. *Age, growth, and mortality of black drum, Pogonias cromis, in the Chesapeake Bay region*. Fish. Bull. 96, 451-561 pp.

Kemp B. M.; Smith, D. G. 2005. *Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth*. Forensic Science International 154, 53-61 pp.

Kimura, M. 1980. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol. 16,

111-120 pp.

Knapp, M.; Hofreiter, M. 2010. *Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives*. *Genes* 1, 227-243 pp.

Krishnamurthy, P. K.; Francis, R. A. 2012. *A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation*. *Biodiver. Conserv.* 21, 1901-1919 pp.

Laakkonen, H. M.; Lajus, D. L.; Strelkov, P.; Väinölä, R. 2013. *Phylogeography of amphi-boreal fish: tracing the history of the Pacific herring *Clupea pallasii* in North-East European seas*. *BMC Evolutionary Biology* 13, 67, 1-16 pp.

Lakra, W. S.; Goswami, M.; Gopalakrishnan, A. 2009. *Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes*. *Mol Biol Rep* 36, 831–839 pp.

Lefort, V.; Longueville, J. E.; Gascuel, O. 2017. *SMS: Smart Model Selection in PhyML*. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 9, 2422–2424 pp.

Leidig, J. M.; Shervette, V. R.; McDonough, C. J.; Darden, T. L. 2015. *Genetic Population Structure of Black Drum in U.S. Waters*. *North American Journal of Fisheries Management* 35, 464 -477 pp.

León, D. C.; Gutiérrez, M. A.; Politis G. G.; Bayón, M. C. 2017. *Análisis faunístico del sitio arqueológico la olla (sectores 3 y 4), costa sudoeste del litoral atlántico bonaerense*. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XLII*, 1, 107-131 pp.

Librado, P.; Rozas, J. 2009. *DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. *Bioinformatics* 25, 1451-1452 pp.

Lindahl, T. 1993. *Instability and decay of the primary structure of DNA*. *Nature (London)* 362, 709-715 pp.

Lo, P.; Liu, S.; Chao, N. L.; Nunoo, F. K. E.; Mok, H.; Chen, W. 2015. *A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and Early Miocene diversification of*

- croake. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 88, 132-143 pp.
- Macchi, G. J.; Acha, E. M.; Lasta, C. A. 2002. *Reproduction of black drum (Pogonias cromis) in the Río de la Plata estuary, Argentina*. *Fisheries Research* 59, 83–92 pp.
- Márquez, A. 2012. *Filogeografía comparada de sciaénidos del Atlántico Sudoccidental*. Tesis de doctorado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias – PEDECIBA, 118 pp.
- Martínez, S.; Rojas, A.; Ubilla, M.; Verde, M.; Perea, D.; Piñeiro, G. 2006. *Molluscan assemblages from the marine Holocene of Uruguay: composition, geochronology and paleoenvironmental signals*. *Ameghiniana* 43, 385–398 pp.
- Medrano, J.; Aasen, E.; Sharrow, L. 1990. *DNA extraction from nucleated red blood cells*. *Biotechniques* 8, 43 pp.
- Moreno, F.; Figueiro, G.; Mannise, N.; Iriarte, A.; González, S. Barbanti, J.M.; Cosse, M. 2016. *Use of next-generation molecular tools in archaeological neotropical deer sample analysis*. *Journal of Archaeological Science: Reports* 10, 403–410 pp.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, 512 pp.
- Nei, M.; Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Inc, USA, 333 pp.
- Nion, H.; Marín, Y.; Meneses, P.; Puig, P. 2013. *Distribución batimétrica de la familia Sciaenidae (Perciformes) en el Atlántico Sudoccidental y consideraciones sobre las pesquerías de los peces de esta familia*. *FRENTE MARÍTIMO* Vol. 23, 105 – 132 pp.
- Olsen, S. J. 1964. *The Stratigraphic Importance of a Lower Miocene Vertebrate Fauna from North Florida*. *J. Paleont.* 38, 477-482 pp.
- Olsen, Z.; McDonaldb, D.; Bumguardnerc, B. 2018 *Intraspecific variation in life*

*history strategies and implications for management: A case study of black drum (Pogonias cromis) in the Upper Laguna Madre, Texas USA.* Fisheries Research 207, 55–62 pp.

O'Rourke, D. H.; Hayes, M. G.; Carlyle, S.W. 2000. *Ancient DNA Studies in Physical Anthropology.* Annual Review of Anthropology 29, 217-242 pp.

Pääbo, S. 1985. *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA.* Nature 314, 644-645 pp.

Pääbo, S.; Poinar, H.; Serre, D.; Jaenicke-Despres, V.; Hebler, J.; Rohland, N.; Kuch, M.; Krause, J.; Vigilant, L.; Hofreiter, M. 2004. *Genetic Analyses from Ancient DNA.* Annual Review of Genetics 38, 645–679 pp.

Palumbi, S. R.; Martin, A. P.; Romano, S. L.; McMillan, W. O.; Stice, L.; Grabowski, G. 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR.* Department Of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, 45 pp.

Pereyra, S.; García, G.; Miller, P.; Oviedo, S.; Domingo, A. 2010. *Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (Mustelus schmitti).* Fisheries Research 106, 468-473 pp.

Piñeiro, G., Verde, M. 1999. *Osteología y paleoecología de sciaenidos (Teleostei, Perciformes) de la Formación Villa Soriano (Holoceno) de Uruguay.* Geociencias, IV, 19-27 pp.

Planes, S.; Doherty, P. J.; Bernardi, G. 2001. *Strong Genetic Divergence Among Populations Of A Marine Fish With Limited Dispersal, Acanthochromis Polyacanthus, Within The Great Barrier Reef And The Coral Sea.* Evolution, 55, 11, 2263–2273 pp.

Politis, G. G.; León, D. C. 2010. *Patrones adaptativos de los cazadores-recolectores-pescadores de la margen occidental del Paraná inferior-Plata.* En: Arqueología de cazadores recolectores en la cuenca del Plata. Eds: Cocco, G.; Feuillet Terzaghi, M. R. Santa Fe, Centro de Estudios Hispanoamericanos, 63-86 pp.

Ríos, N.; Bouza, C.; Gutiérrez, V.; García, G. 2017. *Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (Rhamdia: Heptapteridae)*. *Environmental Biology of Fishes* 100, 1047–1067 pp.

Rodrigues, R.; Schneider, H.; Santos, S.; Vallinoto, M.; Sain-Paul, U.; Sampaio, I. 2008. *Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (Cynoscion acoupa, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil*. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 2, 487-492 pp.

Rogers, A. R.; Harpending, H. 1992. *Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences*. *Mol. Biol. Evol.* 9, 3, 552-569 pp.

Royle, T. 2014. *Ancient DNA Analysis of Middle and Late Period Archaeological Fish Remains from Kamloops, British Columbia*. Tesis de maestría, 133 pp.

Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. 2017. *DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets*. *Mol. Biol. Evol.* 34, 3299-3302 pp.

Slatkin, M.; Hudson, R. R. 1991. *Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations*. *Genetics* 129, 2, 555-562 pp.

Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, 636-648 pp.

Santos, S.; Hrbek, T.; Farias, I. P.; Schneider, H.; Sampaio, I. 2006. *Population genetic structuring of the king weakfish, Macrodon ancylodon (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change*. *Molecular Ecology* 15, 4361–4373 pp.

Schildkraut, C.; Lifson, S. 1965. *Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration*. *Biopolymers* 3, 2, 195-208 pp.

Schneider, S.; Excoffier, L. 1999. *Estimation of past demographics parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA*. *Genetics* 152, 3, 1079-1089 pp.

Scientific, T. F. 2009. *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1. 0 User Manual*. Wilmington, DE, 19810.

Sensabaugh, G. F.; Blake, E. T. 1993. *DNA analysis in biological evidence: applications of the polymerase chain reaction*. Ed. Saferstein, R. *Forensic Science Handbook Volume III*, Englewood Cliffs NJ: Prentice-Hall, 416-452 pp.

Seyoum, S.; Tringali, M.D.; Bert, T. M.; McElroy, D.; Stokes, R. 2000. *An analysis of genetic population structure in red drum, Sciaenops ocellatus, based on mt DNA control region sequences*. *Fish Bull* 98, 127-138 pp.

Shirak, A.; Barkai, O.; Lernau, O.; Kahanov, Y.; Seroussi, E.; Ron, M. 2013. *DNA Barcoding Analysis of Fish Bones from a Shipwreck Found at Dor, Israel*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 65, 873 – 877 pp.

Silva, P. C.; Malabarba, M. C.; Malabarba L. R. 2017. *Using ancient DNA to unravel taxonomic puzzles: the identity of Deuterodon pedri (Ostariophysi: Characidae)*. *Neotropical Ichthyology*, 15, 1, e160141 [1 – 11 pp].

Souza-Cunha, F. L.; Nunan, G. W. A. 1980. *Pleistocenic marine vertebrates (Sciaenidae and Ballaenopteridae) from the littoral of Santa Vitoria do Palamar, RS, Brazil*. *Anais do Congresso* 31, 5, 3049-3055 pp.

Tajima, F. 1989. *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. *Genetics* 123, 585-595 pp.

Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar S. 2013. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729 pp.

Takeuchi, G.; Huddleston, R. 1998. *A New Early Miocene Species of Pogonias cromis (Teleostei: Sciaenidae) Based on Otoliths from California*. *Bull. Southern California Acad. Sci.* 107, 1-12 pp.

Tellechea J. S.; Norbis, W.; Olsson, D.; Fine, M. L. 2011. *Calls of the Black Drum (Pogonias cromis: Sciaenidae): Geographical Differences in Sound Production Hemisphere Populations*. J. Exp. Zool. 315, 48-55 pp.

Thermo Scientific Web Tools: [www.thermofisher.com/uy/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html](http://www.thermofisher.com/uy/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html)

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. 1997. *The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucleic Acid Research 25, 487 pp.

Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J. A. 2007. *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3*. Nucleic Acids Research 35 (Web Server issue), W71–W74.

Urteaga, J. R.; Perrotta, R. G. 2001. *Estudio preliminar de la edad, el crecimiento, área de distribución y pesca de la corvina negra, Pogonias cromis en el litoral de la Provincia de Buenos Aires*. INIDEP, Informe Técnico 43, 24 pp.

Ward, R. D.; Holmes, B. H. 2007. *An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes*. Molecular Ecology Notes 7, 899–907 pp.

Ward, R. D.; Hanner, R.; Hebert, P. D. N. 2009. *The Campaign to DNA Barcode All Fishes, FISH-BOL*. Journal of Fish Biology 74, 2, 329–356 pp.

Wares, J. P.; Cunningham, C. W. 2001. *Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal*. Evolution 12, 2455–2469 pp.

Waugh, J. 2007. *DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls*. BioEssays 29, 188–197 pp.

Wright, S. 1951. *The genetical structure of populations*. Annals of Eugenics 15, 323-354 pp.

Xu, D.; Lou, B.; Shi, H.; Geng, Z.; Li, S.; Zhang, Y. 2012. *Genetic diversity and population structure of Nibea albiflora in the China Sea revealed by mitochondrial COI sequences*. *Biochemical Systematics and Ecology* 45, 158–165 pp.

Xu, H.; Zhang, Y.; Xu, D.; Lou, B.; Guo, Y.; Sun, X.; Guo, B. .2014. *Genetic population structure of miiuy croaker (Miichthys miiuy) in the Yellow and East China Seas base on mitochondrial COI sequences*. *Biochemical Systematics and Ecology* 54, 240–246 pp.

Yang, D. Y.; Eng, B.; Dudar, J. C.; Saunders, S. R.; Wayne, J. S. 1997. *Removal of PCR inhibitors using silica-based spin columns: application to ancient bones*. *Can. Soc. For. Sci. J.* 30, 1-5 pp.

Yang, D. Y.; Eng, B.; Wayne, J. S.; Dudar, J. C.; Saunders, S. R. 1998. *Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Base Spin Columns*. *American Journal of Physical Anthropology* 105, 539–543 pp.

Yang, D. Y.; Cannon, A.; Saunders, S. R. 2004. *DNA Species Identification of Archaeological Salmon Bone from the Pacific Northwest Coast of North America*. *Journal of Archaeological Science* 31, 619– 631 pp.

Yang, D.Y.; Watt, K. 2005. *Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis*. *Journal of Archaeological Science* 32, 331-336 pp.

Zhao, Y.; Peng, W.; Guo, H.; Chen, B.; Zhou, Z; Xu, J.; Zhang, D.; Xu, P. 2018. *Population Genomics Reveals Genetic Divergence and Adaptive Differentiation of Chinese Sea Bass (Lateolabrax maculatus)*. *Marine Biotechnology* 20, 45–59 pp.

## 8. Material suplementario y Anexos

Descripción	“Score” Max	“Score” Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Actinopterygii environmental Nitrosococcus oceanii</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	JQ843196.1
<i>Bacillus sp.</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	CP026521.1
<i>Bacillus subtilis</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	CP025941.1
<i>Bacillus sp.</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	CP021911.1
<i>Pogonias cromis</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH379077.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG431835.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG431834.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG431833.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG431832.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG431831.1
<i>Channa gachua</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356798.1
<i>Channa gachua</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356795.1
<i>Channa gachua</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356783.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356778.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356777.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	KY356776.1
<i>Parambassis lala</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG954365.1
<i>Fowleria isostigma</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH160745.1
<i>Pogonias cromis</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH378670.1
<i>Pogonias cromis</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH378669.1
<i>Pogonias cromis</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH378668.1
<i>Channa stewartii</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MG736593.1
<i>Channa gachua</i>	40.1	40.1	66%	1.4	100%	MH197250.1

**Figura S1.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCOI02F para la muestra fósil. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*.

Descripción	"Score" Max	"Score" Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Taaningichthys paurolychnus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	MH777669.1
<i>Taaningichthys paurolychnus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	MH777623.1
<i>Monodactylus argenteus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	MH331800.1
<i>Chlorurus strongylocephalus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	MH331725.1
<i>Chlorurus gibbus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	MF123809.1
<i>Lateolabrax japonicus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	KU943419.1
<i>Molva dipterygia</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	LC146709.1
<i>Symbolophorus rufinus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	KJ555470.1
<i>Monodactylus argenteus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	KF930140.1
<i>Molva dipterygia</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	KC015694.1
<i>Pristimantis jubatus</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	JN371072.1
<i>Pseudojuloides atavai</i>	44.1	44.1	73%	0.088	100%	JQ839568.1
<i>Megalocottus platycephalus</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	MH016216.1
<i>Myoxocephalus aeneus</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	MH379082.1
<i>Pogonias cromis</i>	42.1	42.1	70%	0.35	100%	MH379077.1

**Figura S2.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCOI02R para la muestra fósil. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*.

Descripción	"Score" Max	"Score" Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Pogonias cromis</i>	348	348	97%	4,00E-92	98%	EU074547.1
<i>Pogonias cromis</i>	348	348	97%	4,00E-92	98%	EU074543.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	MH379077.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	MH378670.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	MH378669.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	MH378668.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	KX164000.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	KP722765.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	JQ842655.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	JQ842654.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	EU752166.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	EU752165.1
<i>Pogonias cromis</i>	337	337	97%	1,00E-88	97%	EU752164.1
<i>Otolithes sp.</i>	248	248	92%	5,00E-62	91%	KU499557.1
<i>Micropogonias altipinnis</i>	243	243	93%	2,00E-60	90%	KX401595.1
<i>Micropogonias altipinnis</i>	243	243	93%	2,00E-60	90%	KX401593.1

**Figura S3.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCOI02F para una de las muestras actuales. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*

Descripción	"Score" Max	"Score" Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Pogonias cromis</i>	344	344	95%	6,00E-91	99%	EU074547.1
<i>Pogonias cromis</i>	344	344	95%	6,00E-91	99%	EU074543.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	MH379077.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	MH378670.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	MH378669.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	MH378668.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	KX164000.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	KP722765.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	JQ842655.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	JQ842654.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	EU752166.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	EU752165.1
<i>Pogonias cromis</i>	333	333	95%	1,00E-87	98%	EU752164.1
<i>Otolithes sp.</i>	255	255	87%	3,00E-64	93%	KU499557.1
<i>Cynoscion jamaicensis</i>	237	237	94%	1,00E-58	89%	KY402381.1
<i>Cynoscion jamaicensis</i>	237	237	94%	1,00E-58	89%	KY402380.1

**Figura S4.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCOI02R para una de las muestras actuales. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*.

Descripción	"Score" Max	"Score" Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Pogonias cromis</i>	315	315	98%	4,00E-82	99%	KP722676.1
<i>Umbrina cirrosa</i>	233	233	97%	1,00E-57	91%	KP722696.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	231	231	98%	4,00E-57	91%	EF173450.2
<i>Sciaenops ocellatus</i>	226	226	98%	2,00E-55	90%	KP722687.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	226	226	98%	2,00E-55	90%	JQ286004.1
<i>Cilus gilberti</i>	209	209	98%	2,00E-50	88%	KP722618.1
<i>Pseudotolithus elongatus</i>	204	204	98%	9,00E-49	88%	EF456017.1
<i>Pseudotolithus brachygnathus</i>	200	200	97%	1,00E-47	88%	KP722678.1
<i>Umbrina bussingi</i>	198	198	98%	4,00E-47	87%	KP722694.1

**Figura S5.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCytb04F para una de las muestras actuales. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*.

Descripción	"Score" Max	"Score" Total	Cobertura	Valor E	Ident	Número de Acceso
<i>Pogonias cromis</i>	320	320	100%	9,00E-84	98%	KP722676.1
<i>Umbrina cirrosa</i>	243	243	100%	2,00E-60	91%	KP722696.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	224	224	97%	7,00E-55	89%	EF173450.2
<i>Cilus gilberti</i>	222	222	100%	2,00E-54	89%	KP722618.1
<i>Pseudotolithus elongatus</i>	220	220	100%	9,00E-54	89%	EF456017.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	219	219	97%	3,00E-53	89%	KP722687.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	219	219	97%	3,00E-53	89%	JQ286004.1
<i>Pennahia macrocephalus</i>	215	215	100%	4,00E-52	88%	KX576460.1
<i>Nibea miichthioides</i>	215	215	100%	4,00E-52	88%	KU738606.1
<i>Argyrosomus japonicus</i>	215	215	100%	4,00E-52	88%	KT184692.1

**Figura S6.** Resultados de la búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para el fragmento amplificado y secuenciado a partir del oligonucleótido PcCytb04R para una de las muestras actuales. En el recuadro coloreado se marcan los resultados para *P. cromis*.

**ANEXO I.** Lista de individuos de *P. cromis* colectados en este estudio. Se indican la localidad y el haplotipo al que corresponde cada ejemplar con respecto a los dos marcadores utilizados, COI y *cyt b*.

Individuos	Localidad	Haplotipo COI	Haplotipo <i>cyt b</i>
P2299	Montevideo	H_3	H_1
P2300	Montevideo	H_4	H_1
P2332	Montevideo	H_5	H_2
P2333	Montevideo	H_2	H_1
P2334	Montevideo	H_2	H_1
P2335	Rocha	H_2	H_1
P2336	Rocha	H_2	H_2
P2337	Rocha	H_2	H_1
P2338	Rocha	H_6	H_1
P2339	Rocha	H_2	H_1
P2345	Maldonado	H_2	H_3
P2346	Maldonado	H_2	H_1
P2347	Maldonado	H_2	H_4
P2348	Maldonado	H_2	H_5
P2349	Maldonado	H_2	H_6

**ANEXO II.** Lista de secuencias de *P. cromis* obtenidas del gen COI a partir de bases de datos. Se indica además el haplotipo correspondiente.

Número de acceso	Localidad	Haplotipo
<b>GenBank</b>		
EU074543.1	Argentina	H_1
EU074544.1	Argentina	H_1
EU074545.1	Argentina	H_1
EU074546.1	Argentina	H_1
EU074547.1	Argentina	H_1
EU074548.1	Argentina	H_1
EU074549.1	Argentina	H_1
EU074550.1	Argentina	H_1
KP722765.1		H_2
MH378670.1	Estados Unidos	H_2
MH378669.1	Estados Unidos	H_2
JQ842656.1	Estados Unidos	H_2
JQ842655.1	Estados Unidos	H_2
JQ842654.1	Estados Unidos	H_2
<b>BOLD</b>		
EU752167.1		
EU752166.1		H_2
EU752165.1		H_2
EU752164.1		H_2
FARG596-09	Argentina	H_1
FARG597-09	Argentina	H_1
FARG598-09	Argentina	H_1

**ANEXO III.** Lista de secuencias de *P. cromis* obtenidas desde GenBank para el gen *cyt b*.

Número de Acceso	Localidad
DQ059326.1	Estados Unidos
KP722676.1	

**ANEXO IV.** Lista de secuencias de las especies utilizadas como grupo externo, obtenidas del GenBank.

Número de acceso	Especie
EF173450.2	<i>Sciaenops ocellatus</i>
KP722687.1	<i>Sciaenops ocellatus</i>
EU752118.1	<i>Sciaenops ocellatus</i>
KP112396.1	<i>Sciaenops ocellatus</i>
JQ624013	<i>Umbrina cirrosa</i>
KC501825	<i>Umbrina cirrosa</i>
KP722696	<i>Umbrina cirrosa</i>
AF143198.1	<i>Umbrina cirrosa</i>