



TESIS DE MAESTRÍA  
PEDECIBA BIOLOGÍA SUBÁREA: GENÉTICA

***“Análisis filogeográfico de la boga  
Leporinus obtusidens (Characiformes,  
Anostomidae) a lo largo de su rango de  
distribución en las cuencas del Río  
Uruguay y el Río Paraná”***

Lic. Lilian Mareney Rovira Montero

Orientador: Alejandro D'Anatro  
Coorientador: Alejandro Márquez Herney

## AGRADECIMIENTOS

*A mis tutores, Ale y Ale, por darme la oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto.*

*A los miembros del tribunal por aceptar ser parte del mismo.*

*A la CARU por el apoyo económico y a DINARA por permitirme utilizar el laboratorio.*

*A Carlos Fuentes por las muestras del Paraná.*

*A mis compañeros de laboratorio: los EX-LEIG, DGEN y DINARA.*

*A mi familia y amigos por estar ahí, como siempre. A Gus, por el día a día.*

# 1. ÍNDICE

---

1.	ÍNDICE.....	2
2.	RESUMEN .....	5
3.	INTRODUCCIÓN .....	6
3.1	DIVERSIDAD NEOTROPICAL .....	6
3.2	CUENCA DEL RÍO URUGUAY .....	6
3.3	CHARACIFORMES.....	8
3.3.1	ANTECEDENTES DEL GÉNERO <i>LEPORINUS</i> .....	8
3.4	DEFINICIÓN DE STOCK.....	10
3.5	FILOGEOGRAFÍA.....	11
3.6	MARCADORES MITOCONDRIALES.....	12
3.7	HIPÓTESIS.....	13
4.	OBJETIVOS.....	14
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	14
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1	ÁREA DE ESTUDIO.....	15
5.2	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL .....	16
5.3	AMPLIFICACIÓN .....	17
5.4	SECUENCIACIÓN.....	18
5.5	EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	18
5.6	ANÁLISIS DE ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL.....	19
5.6.1	Análisis de la Varianza Molecular .....	19
5.6.2	Índices $F_{ST}$ .....	20

5.6.3	Geneland.....	20
5.6.4	Estimaciones de flujo génico .....	21
5.7	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD.....	22
5.8	RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS SECUENCIAS .....	22
5.8.1	Árbol de distancia .....	23
5.8.2	Red de haplotipos .....	23
5.8.3	Morfotipos.....	23
5.9	DEMOGRAFÍA HISTÓRICA.....	24
5.9.1	Análisis de la distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“ <i>mismatch distribution</i> ” ).....	24
5.9.2	Test de Neutralidad.....	25
6.	RESULTADOS.....	26
6.1	CITOCROMO B .....	26
6.1.1	Amplificaciones .....	26
6.1.2	Análisis de la estructura poblacional .....	27
6.1.3	Índices de diversidad .....	33
6.1.4	Relación entre las secuencias.....	33
6.1.5	Demografía histórica .....	39
6.2	REGIÓN CONTROL.....	43
6.2.1	Amplificaciones .....	43
6.2.2	Análisis de la estructura poblacional .....	44
6.2.3	Índices de diversidad .....	48
6.2.4	Relación entre las secuencias.....	48
6.2.5	Demografía histórica .....	51
7.	DISCUSIÓN .....	55

8.	CONCLUSIONES .....	62
9.	PERSPECTIVAS.....	63
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	64
11.	ANEXO I .....	75

## 2. RESUMEN

---

*Leporinus obtusidens* es una especie migratoria muy común que se encuentra distribuida en Sudamérica en las cuencas de los ríos Paraná, Río de la Plata, Uruguay y San Francisco, y que presenta una gran importancia pesquera para nuestro país.

En este trabajo se analizó la variabilidad genética de *L. obtusidens* en base a la secuencia nucleotídica de los marcadores mitocondriales citocromo b y región control de individuos colectados en las cuencas del río Paraná y Uruguay en sus tramos medio e inferior.

Los resultados de los análisis de este trabajo, tanto para citocromo b como para región control, mostraron la presencia de dos poblaciones de *L. obtusidens* en las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay; una de estas poblaciones se distribuye en el Paraná Inferior y Uruguay Inferior y la otra en el Uruguay Medio. Ambas poblaciones presentan índices de diversidad nucleotídica y haplotípica diferentes, siendo mayores los correspondientes a la población del Uruguay Inferior-Paraná Inferior. La separación de *L. obtusidens* en dos poblaciones es compatible con la existencia de dos zonas de reproducción: una en el Paraná y otra en el Uruguay Medio. El modelo de migración que más se ajusta a los datos indica que el flujo génico se produce desde el Uruguay Medio al Uruguay Inferior-Paraná Inferior, pero no en sentido contrario.

Tanto el árbol de distancia como las redes de haplotipos mostraron una división en dos grupos, sin embargo, esta división no responde a una discriminación geográfica ya que ambos grupos están representados por individuos colectados tanto en el río Uruguay (en ambos tramos del río) como en el río Paraná.

Por otra parte, a partir de la observación de dos morfotipos de *L. obtusidens* se evaluó si estos presentan alguna correspondencia con los haplogrupos observados. Este análisis no mostró una correspondencia entre las diferencias morfológicas y genéticas lo cual indica una gran plasticidad fenotípica de esta especie.

La identificación de dos poblaciones de boga en la cuenca baja del Río de la Plata tiene consecuencias en el manejo de la especie dado que cada una de ellas debe ser manejada de manera independiente.

## 3. INTRODUCCIÓN

---

### 3.1 DIVERSIDAD NEOTROPICAL

Nuestro país se encuentra dentro de la Región Neotropical, la cual comprende a Sudamérica, Centroamérica e Islas del Caribe. Esta región biogeográfica es una de las más biodiversas del mundo. La ictiofauna de agua dulce Neotropical es una de las más ricas, de las 13.000 especies de peces de agua dulce estimadas para el planeta, aproximadamente 6.000 especies se encuentran en esta región (Reis et al. 2003).

La diversidad neotropical es muy antigua, y durante el período Cuaternario, el cual abarca los últimos 2,5 Ma, se habrían producido importantes empujes de diversificación. Durante este período, predominaron las eras de hielo, las cuales involucraron repetidos enfriamientos globales y el avance de las capas de hielo; la temperatura, las zonas marinas y la vegetación se comprimieron hacia el ecuador. Durante el Cuaternario los océanos ascendieron y descendieron en el orden de decenas de metros durante los períodos interglaciales y glaciales, respectivamente (Bracco et al. 2011). Estas oscilaciones climáticas severas habrían generado grandes cambios en la distribución de las especies, por ejemplo, algunas se extinguieron en gran parte de su distribución, otras se dispersaron a nuevos lugares o sobrevivieron en refugios. Tales cambios de distribución implicaron cambios demográficos considerables y proporcionaron oportunidades para que se produjera la adaptación. Estos cambios tienen efectos estocásticos y selectivos en la variación genética. Poblaciones y linajes se extinguen, los alelos se pierden en los cuellos de botella o por efecto fundador, las mutaciones que se producen a través del tiempo pueden propagarse por selección o expansión poblacionales locales (Hewitt 2000).

### 3.2 CUENCA DEL RÍO URUGUAY

El Río Uruguay nace en la Sierra Geral en el sudeste de Brasil en la confluencia de los ríos Canoas y Pelotas, en el límite entre los estados de Río Grande del Sur y Santa Catarina. El Uruguay recorre 938 km hasta la desembocadura del río Pepirí, y a partir de ahí transita 1.324 km hacia el sur,

marcando las fronteras entre Brasil y Argentina, y entre Uruguay y Argentina, hasta encontrarse con el río Paraná para formar el estuario del Río de la Plata, que desemboca en el Océano Atlántico.

Debajo de la desembocadura del río Pepirí se encuentra el Moconá, el desnivel más importante de este tramo, el cual divide al río Uruguay en Superior y Medio. Por debajo de la desembocadura del río Cuareim se encuentra la represa de Salto Grande, la cual es considerada la frontera entre el Uruguay Medio y el Uruguay Inferior; esta es una zona donde anteriormente se encontraban las cascadas de Salto Grande y que fue inundada en 1979 para construir la represa de Salto Grande (Zaniboni-Filho & Schulz 2003).

Las distintas secciones de la cuenca del río Uruguay tienen características hidrológicas diferentes. En el Uruguay Medio y Superior el lecho del río está profundamente canalizado; además, a diferencia del Uruguay Inferior, estas regiones presentan numerosas cascadas, rápidos y estrechos, y pocas islas y praderas ribereñas (Zaniboni-Filho & Schulz 2003).

El Uruguay Inferior se asemeja al Paraná Inferior, el cual se encuentra en la misma de latitud y un poco más al oeste. Desde el punto de vista icteogeográfico, estas zonas corresponden a las regiones Bajo Uruguay y Bajo Paraná, de acuerdo al esquema de ecorregiones mundiales de agua dulce de Abell et al. (2008).

Tanto en el Uruguay Inferior como en el Paraná Inferior, la diversidad de especies y la biomasa total de peces son altos teniendo en cuenta el clima subtropical, esto podría deberse a las extensas llanuras de inundación, las cuales favorecen la formación de lagos temporales poco profundos que permiten la acumulación de nutrientes (Zaniboni-Filho & Schulz 2003). Se estima que el número de especies de peces para la cuenca del río Uruguay es mayor a 230, encontrándose al menos 160 de ellas en nuestro país. La conexión entre el río Uruguay y el río Paraná a la altura del Río de la Plata permite que estos ríos sean utilizados como corredores por especies migradoras (Espinach Ros et al. 1990). Existe una gran afinidad entre la ictiofauna del río Uruguay y la del sistema del Paraná, cuyos elementos predominantes pertenecen a los órdenes Characiformes y Siluriformes, los cuales han experimentado la radiación adaptativa más importante conocida en los sistemas fluviales de Sudamérica, ocupando actualmente los más diversos ambientes y nichos ecológicos (Ringuelet 1975).

### 3.3 CHARACIFORMES

Dentro de los Ostariophysi, el orden Characiformes se destaca por ser uno de los más diversos contando con más de 1.700 especies descritas, pertenecientes a 18 Familias, distribuidas en América y África. En Sudamérica es donde se encuentra su mayor diversidad, con 14 familias y alrededor de 1.400 especies (Reis et al. 2003).

Los Characiformes son peces exclusivamente de agua dulce que, en general, se caracterizan por poseer cuerpo con escamas, dientes bien desarrollados y aleta adiposa (segunda aleta dorsal sin radios). Presentan una gran variación en su ecología y morfología, existiendo desde especies de más de un metro y 50 Kg de peso, a especies cuyas formas adultas no sobrepasan los 3 cm de largo (Weitzman & Vari 1988). Sus hábitos alimenticios también son muy diversos y pueden ir desde especies comedoras de materia orgánica del sedimento hasta comedoras de escamas o grandes depredadores de peces, anfibios, pequeñas aves y mamíferos.

En Uruguay, los Characiformes están representados por 10 familias que comprenden en el entorno de 70 especies. Dentro de estas familias, se encuentran algunas de gran importancia ecológica y económica para nuestro país como por ejemplo Prochilodontidae, Anostomidae, Bryconidae, Erithrynidae (Teixeira et al. 2011).

La familia Anostomidae (Characiformes) es un importante grupo de peces de agua dulce de la región Neotropical, el cual contiene 14 géneros y cuenta con más de 150 especies descritas. Las especies de esta familia se encuentran ampliamente distribuidas en las porciones cis-Andina y trans-Andina de América del sur (Garavello & Britski 2003).

#### 3.3.1 ANTECEDENTES DEL GÉNERO *LEPORINUS*

Con más de 90 especies, el género *Leporinus* es el más diversificado de los Anostomidae y uno de los géneros con más especies dentro de los Characiformes (Ramirez et al. 2016). Estudios basados en datos morfológicos (Sidlauskas & Vary 2008) y moleculares (Ramirez et al. 2016) indican que *Leporinus* es un grupo parafilético. Las especies de este género muestran una gran diversidad en tamaño, forma del cuerpo, posición de la boca, número de dientes y patrón de colores. Varias especies del género *Leporinus* representan un importante recurso pesquero para muchos países

de América del Sur; entre estas especies de gran importancia económica, encontramos a la "Boga" *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836).

*Leporinus obtusidens* es una especie migratoria de aguas profundas que se encuentra preferentemente en ambientes lóticos aunque presenta buena adaptación a zonas de grandes embalses. Su distribución en Sudamérica abarca las cuencas de los ríos Paraná, Río de la Plata, Uruguay y San Francisco. Realiza grandes migraciones con fines reproductivos y alimenticios. Es una especie omnívora que consume semillas, invertebrados y pequeños peces (Sverlij et al. 2013). Como componente de su dieta se encuentra el bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) (Penchaszadeh et al. 2000). Presenta un gran tamaño, pudiendo superar los 70 cm de largo y los 5 kg de peso. Su cuerpo es alargado y moderadamente comprimido, el perfil dorsal es relativamente curvado. La cabeza es ligeramente elongada y la boca es pequeña con 3 dientes en cada maxilar y dentario. Presenta 3 manchas oscuras en el cuerpo sobre la línea lateral y su color es amarillento a marrón claro, más oscuro dorsalmente (Britski et al. 2012).

En nuestro país, la boga se encuentra en el río Uruguay y sus principales afluentes, en el tramo inferior del río Negro, así como también en el río Santa Lucía y Río de la Plata. Se la pesca en sitios profundos entre otoño y primavera principalmente. Es una especie muy común y es la segunda con mayor importancia en la pesca artesanal, luego del sábalo, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1837) (Carolsfeld et al. 2003; Foti et al. 2008). Debido a su característica de especie migradora y a su importancia pesquera, la boga ha sido incluida en la lista de peces prioritarios para la conservación (Soutullo et al. 2013). A pesar de todo ello, poco se sabe de esta especie en nuestro país y su estatus de conservación no ha sido evaluado (UICN 2008). Estudios de marcaje-recaptura realizados para determinar las rutas y la cronología de las migraciones de las poblaciones de boga, sugieren que los sitios de reproducción y las áreas de cría de las poblaciones que sustentan las pesquerías del Uruguay Inferior estarían ubicados en el río Paraná (Sverlij & Espinach Ros 1986; Espinach Ros et al. 1990; Espinach Ros et al. 1998). Por otra parte, los resultados sobre deriva de larvas en sitios próximos a la represa de Salto Grande muestran que las larvas provenientes de desoves en el río Uruguay Medio pueden traspasar los obstáculos representados por el lago y la represa en cantidades significativas, e incorporarse al tramo inferior (CARU 2009; Fuentes et al. 2016). Tanto los tramos finales del río Uruguay como el Río de la Plata representan importantes áreas tróficas por la acumulación de sedimentos con alto contenido orgánico, el cual es consumido

por la boga a través de eslabones intermedios (poblaciones de bivalvos exóticos de los géneros *Corbicula* y *Limnoperna*) (CARU 2009). Estos resultados explican las observaciones de Quirós y Cuch (1989), que encontraron que las capturas del área estaban correlacionadas con los índices hidrológicos del río Paraná y no con los del propio río Uruguay. Además de estas poblaciones mayoritarias vinculadas con el río Paraná, los escasos desplazamientos ascendentes registrados en el río Uruguay, y especialmente la presencia de huevos y larvas, aunque en número reducido, aguas abajo de la represa de Salto Grande, plantean la posible existencia de poblaciones de boga propias del río Uruguay. Por otra parte, durante las campañas de colecta en el río Uruguay se ha observado la presencia de dos morfotipos de *L. obtusidens*. Por un lado, individuos elongados, de color amarillento y aleta caudal sin mancha, por otro, individuos jorobados, de color grisáceo y con mancha negra en lóbulo inferior de aleta caudal. Tanto en las estadísticas de pesca como para los pescadores ambos morfotipos son considerados como boga, es decir, como pertenecientes a la especie *Leporinus obtusidens*.

### 3.4 DEFINICIÓN DE STOCK

El concepto de stock ha sufrido numerosas modificaciones a lo largo del tiempo (Waldman 1999), siendo las definiciones más comunes las de enfoque “genético” y “operacional”. El enfoque genético define al stock como una unidad reproductivamente aislada, la cual es genéticamente distinta de otras. Esta definición de stock es equiparable a la definición de población desde el punto de vista genético. La definición operacional de stock sugiere que el stock corresponde a un grupo que comparte algunas características de interés para el manejo pesquero (Begg & Waldman 1999). De acuerdo a esta definición, la estructura poblacional es compleja y dinámica, y sobre esta estructura no sólo intervienen factores genéticos sino también factores ambientales, además, dentro de un stock los parámetros claves para la sustentabilidad del recurso, como el crecimiento, fecundidad y mortalidad resultan homogéneos (Gauldie 1988).

Para lograr un manejo pesquero eficiente es importante conocer la estructura del stock de las especies, ya que este conocimiento permite diseñar regulaciones de manejo apropiadas donde múltiples stocks puedan ser explotados diferencialmente (Ricker 1981). Cuando no existe un conocimiento de la estructura poblacional de una especie, la pesquería puede llevar a una

disminución no deseada de los stocks, lo cual puede tener consecuencias negativas no solo para el stock sino también para la especie en su totalidad (Reiss et al. 2009).

La identificación de stocks puede ser abordada a través de diversas disciplinas y/o metodologías. Begg & Waldman (1999) realizaron una revisión de los diferentes métodos de detección de stock los cuales se basan en técnicas muy variadas tales como marcaje recaptura, carga parasitaria, microquímica de otolitos, morfología y genética, entre otras.

En años recientes, diferentes técnicas moleculares han proporcionado nueva información sobre la variabilidad genética de varias especies de peces (Sivasundar et al. 2001; Yoon & Park 2002; Ferreira et al. 2015), permitiendo la delimitación de las unidades de manejo y la evaluación de las prioridades de conservación. Varias investigaciones han mostrado estructuración poblacional dentro de un sistema hidrográfico inclusive en peces que realizan grandes migraciones (Sivasundar et al. 2001; Sanches et al. 2012). Debido a que la boga es un importante recurso pesquero, existe un interés en conocer la estructura genética de esta especie, dado que, hasta la fecha, no se cuenta con estudios que caractericen la estructura poblacional de *Leporinus obtusidens*.

### 3.5 FILOGEOGRAFÍA

El término filogeografía fue introducido por Avise et al. (1987) y se define como el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas. Esta disciplina integra la filogenia y la genética de poblaciones para entender cómo los acontecimientos históricos contribuyeron a dar forma a la distribución geográfica actual de los genes, poblaciones y especies (Bermingham & Moritz 1998, Avise 2000).

El fenómeno de estructuración genética se da en la mayoría de las especies, afectando tanto a animales de baja dispersión, donde la divergencia entre individuos suele estar relacionada directamente con la distancia geográfica, como a animales de alta vagilidad, donde la estructura poblacional puede estar determinada por barreras geográficas o por filopatría (Avise 2009). Dado que la estructura de las genealogías de las poblaciones está influenciada por la historia demográfica, es posible hacer inferencias acerca de cambios temporales en los ambientes físicos y

bióticos de una población utilizando datos genéticos de la actualidad. En este sentido, en los estudios filogeográficos se obtiene información genética de los individuos de una determinada región para evaluar hipótesis filogeográficas, describir la evolución del aislamiento reproductivo de unidades de poblaciones e inferir los procesos subyacentes al origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad (Beheregaray 2008).

Por estas razones, la filogeografía ha tenido valiosas contribuciones a numerosas áreas de estudio, como por ejemplo, especiación (Hewitt 2001), biogeografía histórica (Avice 2000), evolución humana (Templeton 2005), biología de la conservación (Moritz & Faith 1998; Fraser & Bernatchez 2001), palaeoecología (Cruzan & Templeton 2000), definición de stocks (Beheregaray & Sunnucks 2001), entre otras.

### 3.6 MARCADORES MITOCONDRIALES

El ADN mitocondrial constituye la herramienta de trabajo fundamental para la filogeografía y ha sido ampliamente utilizado en las últimas décadas como herramienta para inferir relaciones filogenéticas entre los organismos, en particular los muy estrechamente relacionados (Beheregaray 2008). El uso de genes mitocondriales en estudios filogeográficos y filogenéticos se debe a una serie de características de este marcador. El ADN mitocondrial de los vertebrados es una molécula con una longitud que varía entre 15-20 mil pares de bases y que contiene 37 secuencias de las cuales 22 corresponden a ARN de transferencia, dos a ARN ribosomales (12s y 16s) y 13 ARN mensajeros, por lo que aproximadamente todo el genoma se encuentra destinado a funciones codificantes, siendo muy raro encontrar intrones, secuencias repetidas o pseudogenes (Avice 2000). Esta molécula presenta una alta tasa de evolución (entre 5 y 10 veces mayor en comparación con los genes nucleares) atribuida a un mecanismo de reparación ineficiente y a la alta concentración de especies reactivas del oxígeno presente en las mitocondrias. Otras características de esta molécula son su herencia maternal, su carácter haploide (lo cual conlleva a que su tamaño efectivo sea cuatro veces menor que el de un gen nuclear en los organismos diploides) y la ausencia de recombinación, por lo que el genoma mitocondrial se hereda como un único bloque (Ballard & Whitlock 2004).

Por otra parte, las distintas secuencias del ADN mitocondrial presentan diferentes tasas de mutación, así, las secuencias correspondientes a los ARN mensajero presentan una mayor tasa de evolución que las secuencias codificantes de ARN ribosomales, por lo que resultan buenos marcadores para el análisis de la diversidad génica a niveles bajos de jerarquía (familia, género y especie). De los 13 genes codificantes de proteínas que presentan las mitocondrias de los animales uno de los más utilizados en análisis moleculares es el citocromo b (Arif & Khan 2009).

Además de las secuencias codificantes, el ADN mitocondrial contiene una región no codificante de aproximadamente 1 Kb denominada Región Control, involucrada en los procesos de replicación y transcripción del ADNmt. La Región Control presenta un nivel de variación genética mayor cuando se lo compara con las secuencias codificantes de proteínas, debido a sus reducidas restricciones funcionales y presión selectiva (Arif & Khan 2009).

### 3.7 HIPÓTESIS

La distribución de la variación genética está estructurada de acuerdo a la hidrografía de las cuencas analizadas. Más específicamente, dado que la boga es un pez migrador y que existe una conexión entre las cuencas, se hipotetiza que las zonas bajas del Río Uruguay y el Paraná comparten un mismo stock, diferente del grupo conformado por los individuos del Río Uruguay medio.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Centrándose en la diversidad genética de las poblaciones naturales de *L. obtusidens*, el objetivo de este trabajo es realizar una evaluación de la variabilidad genética, basado en secuencias nucleotídicas de región control y citocromo b del genoma mitocondrial. Los resultados no sólo permitirán caracterizar a la estructura poblacional de *L. obtusidens*, sino que permitirán dar apoyo a los esfuerzos de recuperación y al mantenimiento de la diversidad de esta especie.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la estructura poblacional de *L. obtusidens* y definir los stocks presentes mediante marcadores moleculares de ADNmt.
- Estudiar si existe una correlación a nivel genético con los morfotipos observados.
- Hacer inferencias sobre la historia demográfica de esta especie a lo largo del rango de distribución analizado.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras empleadas en este estudio fueron colectadas en campañas de investigación del Programa de Conservación de la Fauna Íctica y los Recursos Pesqueros del Río Uruguay de la Comisión Administradora del Río Uruguay (C.A.R.U.) y otras realizadas por DINARA (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, MGAP). (Anexo 1)

La zona de estudio abarcó el Río Uruguay Inferior y su desembocadura en el Río de la Plata, el Uruguay Medio (tanto en su tramo compartido entre Uruguay y Argentina, como el compartido entre Argentina y Brasil) y el Río Paraná en sus tramos Inferior y Superior. El tramo medio del Río Uruguay compartido entre Uruguay y Argentina se corresponde con una zona que ha sido modificada por la construcción de la represa de Salto Grande

Los puntos de colecta fueron los siguientes (Figura 1):

Río Paraná superior: Posadas y Ayolas; río Paraná inferior: Santa Fe, Paraná y Rosario; río Uruguay Medio: San Javier (Misiones), Santo Tomé, Yapeyú y Villa Constitución; Río Uruguay Inferior: Ayuí, Salto, San Javier (Río Negro), Nuevo Berlín, La Concordia y Nueva Palmira.

Se incluyeron además, muestras colectadas en el río Negro en la localidad de Mercedes.

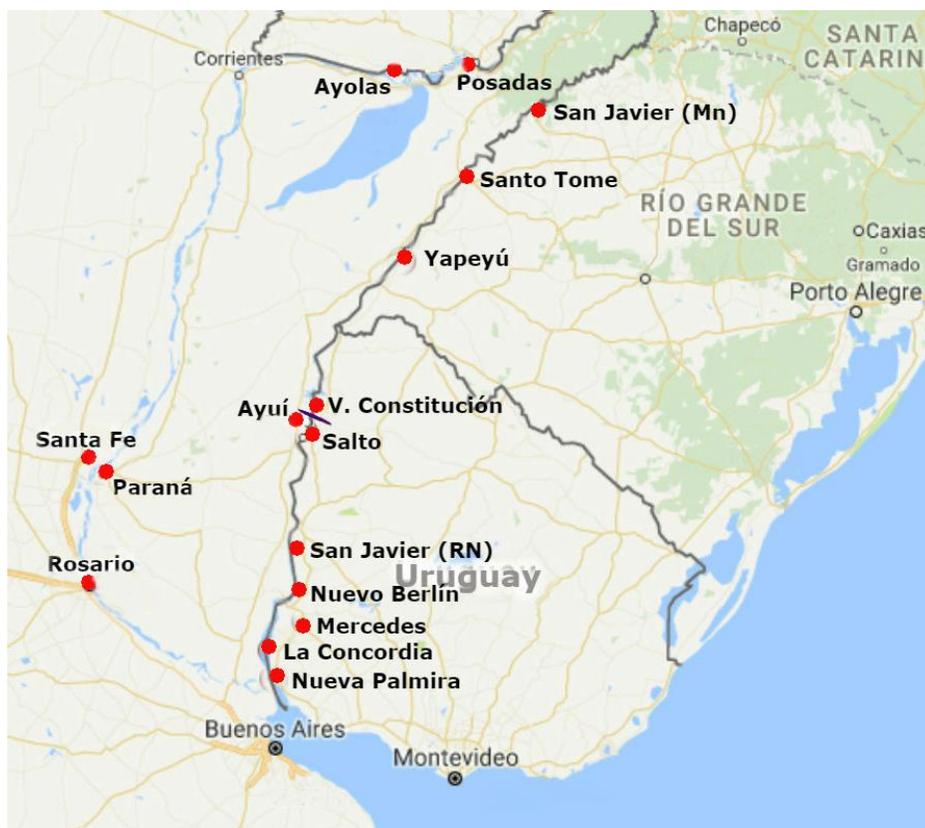


Figura 1 Mapa señalando las 16 localidades de muestreo en los ríos Uruguay, Paraná y Negro.

## 5.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL

La extracción de ADN total se realizó a partir de muestras de tejido muscular o aleta adiposa conservados en etanol 96°, empleando la técnica extracción salina (Miller et al. 1988). Este procedimiento consiste en la precipitación con alta concentración salina y etanol absoluto en frío. Comienza adicionando 500  $\mu$ L de buffer de lisis pH 8 (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS y 100 mM NaCl) y 3  $\mu$ L de proteinasa K (20  $\mu$ g/mL) a aproximadamente 20 mg de tejido. Posteriormente el tejido es homogeneizado mecánicamente y se deja incubando en baño a 55°C al menos 2 horas hasta la desintegración total del tejido. Finalizada la incubación se centrifuga por 15 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante se transfiere a otro tubo y se agrega 300  $\mu$ l de NaCl 5M y se centrifuga por 15 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante resultante se transfiere a otro tubo y se le agrega igual volumen de isopropanol en frío (-20 °C). Se homogeneizan lentamente las dos fases y se deja precipitando a -20 °C O/N. Posteriormente, se centrifuga durante 15 minutos a 15.000 rpm para precipitar el ADN. Se elimina el sobrenadante y se realiza un lavado del

precipitado con etanol 70% y se deja secar a 37°C durante 2 horas. Posteriormente se resuspende en 100µL de buffer TE 1X (10 mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA). Se almacena a 4°C por 2 días y luego a -20°C.

La concentración y pureza del ADN total se determinó mediante espectrofotómetro de microvolúmenes y/o electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1L): 242g de Tris-base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 10 mL de 0,5M EDTA pH 8) conteniendo Good View. Para esto último se mezclaron 3 µL de ADN genómico extraído con 2 µL de buffer de carga realizando una corrida electroforética durante 40 minutos a 80 V.

### 5.3 AMPLIFICACIÓN

La amplificación de los fragmentos de interés se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador automático Labnet Internation Multigene Optimax.

Para la amplificación del citocromo b fueron utilizados los oligonucleótidos L14735 y MVZ16 (Smith & Patton 1993). El fragmento amplificado esperado empleando estos oligonucleótidos es de aproximadamente 800 pb (Tabla 1).

Tabla 1 Secuencias nucleotídicas correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen citocromo b.

Fragmento amplificado	Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
Citocromo b	MVZ16	5' AAA TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT TRAT 3'
Citocromo b	L14735	5' AAA AAC CAC CGT TGT TAT TAT TCA ACTA 3'

Para la amplificación de la región control se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: PhePer y ProCor1 (Pereira et al. 2009). El fragmento amplificado empleando estos oligonucleótidos es de aproximadamente 1.000 pb (Tabla 2).

Tabla 2 Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de región control.

Fragmento amplificado	Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
Región control	PhePer	5' GCCCATCTTAACATCTTCAGTGTTATGC 3'
Región control	ProCor1	5' CCCAAACTAGTATTCTAA 3'

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C (3 min), 35 ciclos de 3 pasos: desnaturalización inicial de 94°C (1 min), *annealing* a 45°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min); por último una extensión final a 72°C (3 min). Para un volumen de reacción de 30 µL se utilizaron 1 mM Buffer 10X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada primer, 1U Taq, 5-50 ng ADN.

## 5.4 SECUENCIACIÓN

Los productos amplificados de los dos marcadores para todos los individuos analizados fueron enviados para su purificación y secuenciación al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Corea).

## 5.5 EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Para la edición de las secuencias de citocromo b y región control se utilizó el programa BioEdit 7.2.0 (Hall 1999)

El alineamiento de las secuencias se realizó en el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994), incluido en el programa MEGA 7 (Kumar et al. 2016), disponible en el sitio web <<http://www.megasoftware.net/>>.

## 5.6 ANÁLISIS DE ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL

Para los análisis poblacionales se utilizaron los marcadores mitocondriales citocromo b y región control. Se analizaron 186 secuencias para citocromo b y 146 para región control, de 13 localidades: Santa Fe, Paraná, Rosario, San Javier (Misiones), Santo Tomé, Yapeyú, Villa Constitución, Ayuí, Salto, San Javier (Río Negro), Nuevo Berlín, La Concordia, Nueva Palmira.

Las localidades de Posadas, Ayolas y Mercedes no fueron tenidas en cuenta para estos análisis debido al bajo número de individuos colectados en cada una de ellas.

### 5.6.1 Análisis de la Varianza Molecular

Para evaluar la existencia de una posible estructura poblacional en el conjunto de datos se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA). Este análisis estima los índices de estructura genética utilizando información sobre las distancias entre los haplotipos (número de mutaciones) y sus frecuencias en cada población (Excoffier et al. 1992). El AMOVA es una clase de medida análoga a los estadístico F, denominada estadístico- $\Phi$ , que considera niveles jerárquicos de diferenciación: entre grupos ( $F_{CT}$ ), entre poblaciones dentro de los grupos ( $F_{SC}$ ) y dentro de las poblaciones ( $F_{ST}$ ).

El análisis de la varianza molecular se realizó utilizando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), evaluando la varianza haplotípica y el número de mutaciones entre haplotipos. Los haplotipos fueron previamente definidos con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). La significación de los componentes de la varianza se calculó mediante 1.000 permutaciones no paramétricas.

Se analizaron las siguientes agrupaciones:

- 1 - Para determinar si existía una estructuración por río, se agruparon las muestras del río Paraná por un lado y las del río Uruguay por otro.
- 2- Teniendo en cuenta la proximidad geográfica de las muestras se analizó la siguiente agrupación: (Paraná Inferior) (Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio).

3- Teniendo en cuenta la proximidad geográfica y la conexión entre los ríos Paraná y Uruguay se agruparon las muestras de la siguiente manera: (Paraná Inferior + Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio).

4- Considerando la conexión entre los ríos y la división entre Uruguay Medio y Uruguay Inferior a la altura de la represa de Salto Grande, se agruparon por un lado las muestras del Paraná Inferior junto con las del Uruguay Inferior y por otro lado las muestras del río Uruguay Medio.

5- Un agrupamiento similar al anterior pero separando las muestras del Uruguay Medio: por un lado las correspondientes a San Javier (Misiones), Santo Tomé y Yapeyú (lo que se denominó Uruguay Medio 1), por otro lado las de Villa Constitución (correspondientes al embalse de Salto Grande, que denominamos Uruguay Medio 2) y por otro Paraná Inferior junto con Uruguay Inferior.

6- Por último, se agrupó por un lado las muestras del Paraná Inferior junto con las de las localidades más al sur del río Uruguay (Nueva Palmira y La Concordia), y por otro lado el resto de las localidades del río Uruguay.

### 5.6.2 Índices $F_{ST}$

Con el fin de determinar la posible existencia de estructuración poblacional se calcularon los valores de  $F_{ST}$  (Weir 1996) para nuestro conjunto de datos. Este coeficiente describe cuánto se diferencian genéticamente las poblaciones, así, si dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, no serán diferenciadas genéticamente y, por tanto, el  $F_{ST}$  será igual a cero. Por otro lado, si tienen frecuencias de alelos totalmente diferentes, el valor de  $F_{ST}$  será el próximo a 1.

El análisis de  $F_{ST}$  se llevó a cabo mediante la aplicación del software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) y se utilizó como método de distancia Kimura 2P y 1.000 permutaciones.

### 5.6.3 Geneland

Mediante la utilización del paquete del R GENELAND versión 4.0.6 (Guillot et al. 2005) se llevó a cabo un análisis de agrupamiento de los individuos aplicando un modelo Bayesiano, basado en el método de cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC). El número de grupos para este análisis se

determinó mediante 10 corridas MCMC independientes, permitiendo que  $K$  (número de poblaciones) variara entre 1 y 5. El número de iteraciones MCMC fue 100.000 por corrida con un “*thinning interval*” de 100. El análisis fue llevado a cabo utilizando únicamente los sitios variables, y se empleó el modelo de frecuencia de alelos no correlacionado. Este estudio se realizó tanto para las secuencias de citocromo b como para Región Control y se incluyeron todas las localidades de muestreo. Las coordenadas geográficas fueron identificadas para cada sitio mediante Google Earth (<https://www.google.com/earth/index.html>) y la incertidumbre para las coordenadas fue fijada en 2 grados.

#### 5.6.4 Estimaciones de flujo génico

Mediante la utilización del programa MIGRATE 3.6 (Beerli 2009) se pusieron a prueba distintos modelos de dispersión histórica, se estimaron los niveles de flujo génico entre las localidades y el tamaño poblacional.

Este programa permite la implementación de diferentes modelos de migración para determinar cuál es el que más se ajusta a los datos, así, se pueden poner a prueba modelos completos (el programa estima todos los tamaños poblacionales y tasas de migración pareadas en ambos sentidos), modelo de islas (Wright 1931) (supone una división en poblaciones de igual tamaño que intercambian alelos con la misma probabilidad), modelo *stepping-stone* (Kimura 1953) (supone que los intercambios genéticos ocurren únicamente entre poblaciones adyacentes, con igual probabilidad en ambos sentidos), y modelo *stepping-stone* asimétrico (permite que las tasas de migración entre poblaciones vecinas dependan del sentido de la migración).

El programa MIGRATE también permite estimar el tamaño efectivo poblacional escalado por mutación  $\Theta = 4N_e\mu$ , donde  $N_e$  es el tamaño efectivo de la población y  $\mu$  es la tasa de mutación por generación por locus, así como también las tasas de migración escaladas por la tasa mutacional  $M = m/\mu$ , donde  $m$  es la tasa de inmigración por generación entre las poblaciones.

La estrategia de búsqueda bayesiana se realizó utilizando los siguientes parámetros: una búsqueda mediante MCMC de  $5 \times 10^5$  pasos, seguidos por  $5 \times 10^6$  pasos con parámetros registrados cada 20 pasos. La distribución previa de los parámetros fue uniforme, con límites definidos después de corridas exploratorias.

La comparación de modelos se realizó utilizando *log-equivalent Bayes factors* (LBF) siguiendo el procedimiento descrito en el tutorial MIGRATE ([http://molevol.mbl.edu/wiki/Index.php/Migrate\\_tutorial](http://molevol.mbl.edu/wiki/Index.php/Migrate_tutorial)).

## 5.7 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

La diversidad genética es la variación del material genético existente entre los individuos de una misma especie, entre especies o grupos de especies, que es transmitida de generación en generación. En estudios de filogeografía y genética de poblaciones inferir la diversidad genética es necesario para describir patrones demográficos. En el análisis de ADN mitocondrial el término “haplotipo” es utilizado para referirse a la secuencia haploide de este ADN. Dentro de una población pueden encontrarse varios haplotipos que son definidos como una combinación de alelos que se heredan juntos.

Para calcular la diversidad genética se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Mediante la implementación de este programa se obtuvo el número de haplotipos por región, la diversidades haplotípica ( $h$ ) (probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes) (Nei 1987) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (probabilidad que dos sitios homólogos de secuencias de dos individuos tomados al azar, sean diferentes) (Tajima 1983).

## 5.8 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS SECUENCIAS

Para evaluar el modelo de evolución de sustitución nucleotídica que mejor se ajustara a los datos y así estimar las distancias genéticas entre individuos se utilizaron los métodos implementados en el programa MEGA 7 (Kumar et al. 2016) los cuales se basan en el criterio de información de Akaike (Akaike 1974) que compara simultáneamente entre 56 modelos anidados y no anidados tomando en cuenta la verosimilitud del modelo y los parámetros del mismo. Si bien el modelo sugerido para citocromo b era HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), se utilizó el modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) debido a limitaciones en el software, ya que en el programa utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos el modelo HKY no está entre los parámetros por defecto. Una vez

determinado el modelo de sustitución nucleotídica se realizó la reconstrucción filogenética de acuerdo al criterio de distancia.

### 5.8.1 Árbol de distancia

Los métodos de distancia involucran dos pasos: el cálculo de las distancias genéticas entre pares de especies y la reconstrucción de un árbol filogenético a partir de la matriz de distancia. Existen varios métodos de construcción de árboles a partir de datos de distancia, uno de ellos es Unión de Vecinos (Saitou & Nei 1987) (NJ, del inglés *Neighbour Joining*). Este método se basa en el principio de mínima evolución, en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas (Nei & Kumar 2000, Yang 2006) y fue utilizado para evaluar las relaciones de parentesco entre los individuos analizados. El apoyo de las ramas fue evaluado mediante bootstrap.

### 5.8.2 Red de haplotipos

Para describir la estructura geográfica de la variación genética observada se definieron los haplotipos mitocondriales presentes y su distribución por región mediante el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). Para observar la relación entre los haplotipos, así como sus frecuencias, se confeccionó una red de haplotipos utilizando el programa POPART (Population Analysis with Reticulate Trees) (<http://popart.otago.ac.nz>) el cual utiliza el método de Máxima parsimonia. Para este análisis se utilizó el algoritmo “Median Joining Networks” (Bandelt et al. 1999), el cual produce una red que contiene múltiples árboles plausibles en una sola figura, utilizando datos intraespecíficos de un gran número de muestras, pero con pequeñas diferencias genéticas.

### 5.8.3 Morfotipos

Para analizar se existe una correspondencia a nivel genético con los dos morfotipos encontrados, se seleccionaron 11 individuos de un morfotipo (elongados, color amarillento y aleta caudal sin mancha) y 10 del otro (jorobados, color grisáceo y con mancha negra en lóbulo inferior de aleta caudal), colectados en las localidades de Nuevo Berlín y La Concordia, y se construyó un árbol de distancia utilizando citocromo b como marcador molecular.

## 5.9 DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

### 5.9.1 Análisis de la distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“*mismatch distribution*”)

La historia demográfica de las poblaciones se evaluó mediante el análisis de la distribución de las diferencias de las frecuencias pareadas, “*Mismatch Distribution*”. Este análisis utiliza la diversidad molecular encontrada en el conjunto de datos y calcula la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos en la muestra.

Esta distribución generalmente es multimodal en muestras obtenidas a partir de poblaciones en equilibrio demográfico, y por lo general es unimodal en poblaciones que han atravesado una expansión demográfica reciente (Rogers & Harpending 1992) o una expansión de la distribución con altos niveles de migración entre poblaciones vecinas (Ray et al. 2003, Excoffier 2004). Si una población se limita inicialmente a un área muy pequeña y luego con el tiempo la distribución de la población aumenta en el espacio, la población resultante suele subdividirse ya que los individuos tienden a cruzarse con aquellos cercanos geográficamente en lugar de hacerlo con individuos que se encuentran alejados, por tanto, los cambios en el tamaño poblacional dejan marcas en la distribución geográfica de la variación genética.

Con el fin de evaluar si el conjunto de datos se ajusta a un modelo de expansión demográfica y/o espacial se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Este programa estima los parámetros de expansión demográfica repentina utilizando una aproximación de mínimos cuadrados, tal como se describe en Schneider & Excoffier (1999). Para la estimación de los parámetros de la expansión espacial también se utilizó una aproximación de mínimos cuadrados, de acuerdo a Excoffier (2004).

Para calcular el intervalo de confianza para los parámetros estimados se realizaron 100 pseudoréplicas de “*bootstrap*”. Como test estadístico se utiliza la suma de los desvíos al cuadrado (SSD, del inglés *sum of square deviations*) entre las distribuciones observadas y esperadas.

### 5.9.2 Test de Neutralidad

Los apartamientos del régimen de evolución neutral estricto se analizaron mediante los tests de Tajima (Tajima 1989) y Fu (Fu 1997), utilizando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Estos tests se utilizan para probar la ausencia de selección en un conjunto de datos. La hipótesis nula utilizada en dichas pruebas incluye tamaño de la población constante y una población no estructurada. Por lo tanto, utilizando un marcador supuestamente neutro, estas pruebas pueden indicar disminución, expansión y estabilidad de la población (Nielsen 2001). La significación de ambos estadísticos se calcula mediante la generación de muestras al azar utilizando una simulación basada en el modelo del coalescente.

El test de Tajima asume el modelo de sitios infinitos sin recombinación. El estadístico D se calcula en base al parámetro poblacional  $\theta$  ( $\theta=2N\mu$  para marcadores haploides, donde N es el tamaño poblacional efectivo y  $\mu$  es la tasa de mutación por generación). Compara dos estimadores de  $\theta$ , uno basado en el número promedio de diferencias pareadas y otro basado en el número de sitios segregantes (Nielsen 2001).

El test de Fu también asume sitios infinitos y ausencia de recombinación. El mismo se basa en la probabilidad (S) de encontrar un número de alelos igual o menor al observado, realizando un muestreo al azar bajo la teoría neutral. De acuerdo con Fu (1997), el estadístico  $F_s$  es más sensible a la expansión demográfica, mostrando, generalmente, valores altamente negativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CITOCROMO B

#### 6.1.1 Amplificaciones

Se obtuvieron 195 secuencias del gen mitocondrial citocromo b con un largo total de 919 pb a partir de individuos de *Leporinus obtusidens* colectados en los ríos Uruguay, Paraná y Negro (Tabla 3).

Tabla 3 Amplificaciones correspondientes a la secuencia de citocromo b obtenidas para cada punto de colecta y distribución de los haplotipos obtenidos.

Localidad		Nº de individuos	Nº Haplotipos
Uruguay Medio	Santo Tomé	3	3, 8
	Yapeyú	31	1, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14
	San Javier (Misiones)	2	15
	Villa Constitución	23	3, 4, 16, 17
	TOTAL Uruguay Medio	59	
Uruguay inferior	Ayuí	1	3
	Salto	9	1, 2, 3, 4, 10, 18, 19
	Nuevo Berlín	30	1, 3, 4, 7, 20, 21, 22, 23, 24, 25
	San Javier (R Negro)	3	1, 4, 26
	La Concordia	27	1, 3, 4, 27, 28
	Nueva Palmira	33	1, 3, 4, 10, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
	TOTAL Uruguay Inferior	103	
Paraná Superior	Ayolas	1	1
	Posadas	3	2, 3
	Total Paraná Superior	4	
Paraná Inferior	Paraná	12	3, 4, 5
	Santa Fe	1	4
	Rosario	11	1, 4, 6, 7
	TOTAL Paraná Inferior	24	
Río Negro	Mercedes	5	1, 4, 41
TOTAL SECUENCIADOS		195	

Para los análisis correspondientes a la estructura poblacional (excepto para Geneland) sólo se tuvieron en cuenta las localidades con un número significativo de individuos: Uruguay Medio, Uruguay Inferior y Paraná Inferior. Los individuos colectados en el río Negro (localidad de Mercedes) y Paraná Superior (localidades de Posadas y Ayolas) fueron incluidos en los análisis filogenéticos.

### 6.1.2 Análisis de la estructura poblacional

#### AMOVA

El test de AMOVA se realizó para evaluar la estructuración poblacional y determinar cuál es la mejor agrupación de localidades. Como se muestra en la Tabla 4, considerando el porcentaje de variación molecular explicado por los diferentes modelos, se encontró que la estructura poblacional que maximiza la varianza entre grupos ( $F_{CT}$ ) identifica un grupo en el río Uruguay Medio y otro grupo con individuos del Río Uruguay Inferior y del Paraná Inferior. No obstante, la consideración de dos grupos en el Uruguay Medio por un lado y un tercer grupo en el Uruguay inferior+Paraná inferior mejora el porcentaje de variación entre poblaciones dentro de los grupos (menor  $F_{SC}$ ).

Tabla 4 Análisis molecular de la varianza en los ríos Uruguay y Paraná. Se presentan los valores de AMOVA basados en el gen citocromo b para grupos de localidades:

(1) Paraná; Uruguay

(2) (Paraná inferior) (Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio)

(3) (Paraná inferior + Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio)

(4) Paraná Inferior + Uruguay inferior; Uruguay Medio

(5) Paraná Inferior + Uruguay inferior; Uruguay Medio 1 [San Javier (Mis) + Santo Tomé + Yapeyú]; Uruguay Medio 2 (Villa Constitución)

(6) Paraná Inferior + Nueva Palmira y La Concordia; el resto de las localidades del río Uruguay

Agrupación	Fuente de Variación	d.f.	Suma de Cuadrados	Porcentaje de Variación	Estadísticos	p-valor
1	Entre Grupos	1	0.351	-4.03	$F_{CT}$ : -0.04031	0.78788
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	3.715	6.31	$F_{SC}$ : 0.06061	<0.05
	Dentro de poblaciones	181	63.708	97.73	$F_{ST}$ : 0.02275	<0.05
2	Entre Grupos	2	0.969	-5.24	$F_{CT}$ : -0.05236	0.79961
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	3.098	8.39	$F_{SC}$ : 0.07969	<0.05
	Dentro de poblaciones	181	63.708	96.85	$F_{ST}$ : 0.03150	<0.05
3	Entre Grupos	1	0.719	-2.08	$F_{CT}$ : -0.02079	0.59824
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	3.348	5.89	$F_{SC}$ : 0.05772	<0.05
	Dentro de poblaciones	181	63.708	96.19	$F_{ST}$ : 0.03814	<0.05
4	Entre Grupos	1	2.636	7.01	$F_{CT}$ : 0.07008	<0.05
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	1.431	0.91	$F_{SC}$ : 0.00979	0.13978
	Dentro de poblaciones	181	63.708	92.08	$F_{ST}$ : 0.07918	<0.05
5	Entre Grupos	2	3.175	6.82	$F_{CT}$ : 0.06815	0.09775
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	0.892	0.62	$F_{SC}$ : 0.00667	0.31183
	Dentro de poblaciones	181	63.708	92.56	$F_{ST}$ : 0.07437	<0.05
6	Entre Grupos	1	0.388	-3.27	$F_{CT}$ : -0.03267	0.78788
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	3.678	7.14	$F_{SC}$ : 0.06917	<0.05
	Dentro de poblaciones	181	63.708	96.12	$F_{ST}$ : 0.03876	<0.05

## Índices $F_{ST}$

Los valores del estadístico  $F_{ST}$  basado en el análisis de las secuencias de citocromo b entre 3 regiones de muestreo: Paraná, Uruguay Medio, Uruguay Inferior se muestran en la Tabla 5. El río Uruguay Medio presenta valores significativos de  $F_{ST}$  con respecto al Paraná Inferior. A su vez, el río Uruguay Inferior presenta valores de  $F_{ST}$  significativos con relación al Uruguay Medio.

Tabla 5 Valores pareados del estadístico  $F_{ST}$  entre localidades, estimados a partir de secuencias de citocromo b para tres poblaciones muestreadas. Los valores en negrita corresponden a valores significativos ( $p < 0,05$ ) obtenidos mediante 1.000 pseudoréplicas.

	Paraná Inferior	Uruguay Medio	Uruguay Inferior
Paraná Inferior	—		
Uruguay Medio	<b>0.08471</b>	—	
Uruguay Inferior	-0.01390	<b>0.07446</b>	—

En la Tabla 6 se muestran los resultados de  $F_{ST}$  teniendo en cuenta la agrupación previamente determinada por AMOVA como la que mejor se ajusta a los datos. Al juntar las muestras como indicó el test de AMOVA, se observa un mayor grado de diferenciación.

Tabla 6 Valores pareados del estadístico  $F_{ST}$  entre localidades, estimados mediante secuencias de citocromo b para dos poblaciones. Los valores en negrita corresponden a valores significativos ( $p < 0,05$ ) obtenidos a partir de 1.000 pseudoréplicas.

	Uruguay Medio	Paraná Inferior+ Uruguay Inferior
Uruguay Medio	—	
Uruguay Inferior + Paraná Inferior	<b>0.19096</b>	—

## Geneland

El análisis de las secuencias de citocromo b con el programa Geneland dividió las muestras de *Leporinus obtusidens* en tres grupos ( $K=3$ ) para las 10 corridas. Sin embargo, para todas las corridas, al analizar los grupos se observó que uno de ellos no tenía ningún individuo asignado. Debido a esto, se decidió correr el programa nuevamente pero con  $K_{max}=2$ . Las 10 corridas agruparon a los individuos en dos poblaciones ( $k=2$ ); por un lado, todas las localidades del Río Paraná junto con las dos más al sur del río Uruguay (La concordia y Nueva Palmira), y por otro, el resto de las localidades del Río Uruguay (Figura 2).

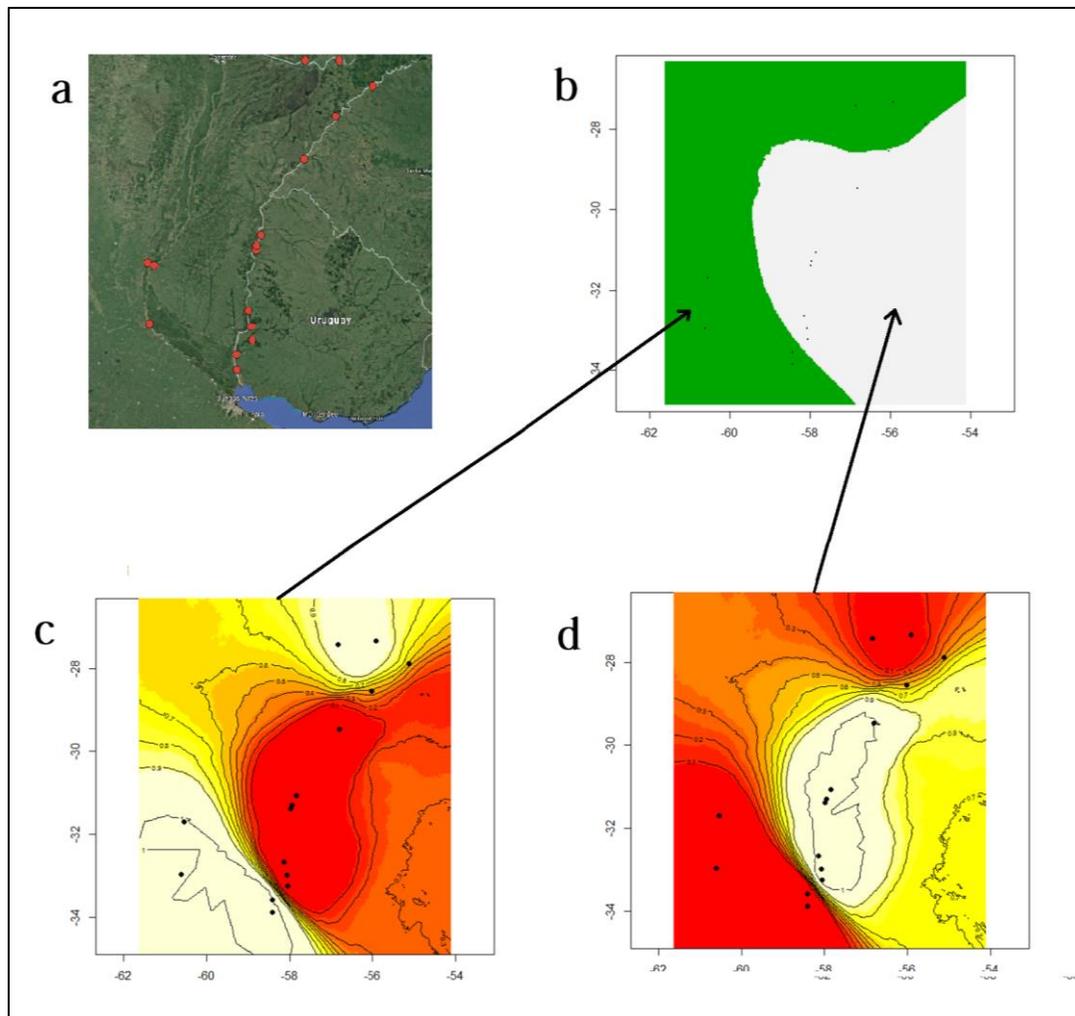


Figura 2 Mapa de con los puntos de muestreo (a) y resultados del análisis Geneland de la zona, basados en citocromo b, mostrando: (b) La organización espacial en dos grupos; en (c) y (d) se presentan los mapas de probabilidades a posteriori de cada grupo.

### Estimaciones de flujo génico

Los resultados obtenidos mediante la aplicación del programa Migrate 3.6.11 (Beerli 2009) se muestran en la Tabla 7.

Se consideró la existencia de dos poblaciones, las que se definieron de acuerdo a los resultados del AMOVA: Uruguay Inferior y Paraná Inferior (UI+PI) por un lado, y Uruguay Medio (UM) por otro. Cuatro modelos de migración fueron evaluados: (1) un modelo completo con 2 tamaños poblacionales y dos tasas de migración (de UI+PI a UM y de UM a UI+PI), (2) un modelo con 2 tamaños poblacionales y una tasa de migración de UM a UI+PI; (3) un modelo con 2 tamaños de poblacionales y una tasa de migración de UI+PI a UM a UM y (4) un modelo donde UI+PI y UM forman parte de la misma población panmíctica. Los resultados muestran que el modelo con mejores valores de verosimilitud fue el modelo 2 (con migración de UM a UI+PI, pero no a la inversa).

Tabla 7 Resultados obtenidos mediante la implementación del programa MIGRATE. Log Bayes factor (LBF) utilizando la integración termodinámica de diferentes modelos de flujo génico para 2 poblaciones de *Leporinus obtusidens* (PI+UI: Paraná Inferior + Uruguay Inferior; UM: Uruguay Medio);  $P_{Mi}$  es la probabilidad de elección del modelo. LmL: log de la verosimilitud marginal.

Modelo	Parámetros [Moda, 95 % IC]	Bezier LmL	LBF para el modelo	Posición del modelo	$P_{Mi}$
Completo	$\theta_{PI+UI} = 0,397 [0,212-1,98]$ $\theta_{UM} = 0,001 [0,0-0,032]$ $M_{UM \rightarrow PI+UI} = 5.010 [3.173,3-8.326,7]$ $M_{PI+UI \rightarrow UM} = 7.003,3 [2.253,3-10.000]$	-2.273,93	-20,18	3	0
UM $\rightarrow$ PI+UI	$\theta_{PI+UI} = 0,089 [0,032-1,038]$ $\theta_{UM} = 0,009 [0,0-0,041]$ $M_{UM \rightarrow PI+UI} = 4.270 [2.660-7.966,7]$	-2.263,84	0	1	0,98
PI+UI $\rightarrow$ UM	$\theta_{PI+UI} = 0,018 [0,0-0,051]$ $\theta_{UM} = 0,001 [0,0-0,039]$ $M_{PI+UI \rightarrow UM} = 2.896,7 [1.073,3-8.973,3]$	-2.267,51	-7,34	2	0,024
Panmítico	$\theta = 0,021 [0,000-0,052]$	-2.276,41	-25,14	4	0

### 6.1.3 Índices de diversidad

El análisis de la secuencia de citocromo b, de un largo total de 919 pb, mostró que la región correspondiente al Paraná Inferior+Uruguay Inferior presenta los valores más altos de diversidad haplotípica (0.797) y nucleotídica (0.028) (Tabla 8).

Tabla 8 Diversidad genética de *L. obtusidens* en río Uruguay Medio y río Paraná Inferior+Uruguay Inferior. n: tamaño de la muestra, k: número de haplotipos; H: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica.

Localidad	n	k	H	$\pi$
Uruguay Medio	59	13	0.5155 +/- 0.0795	0.018083 +/- 0.009132
Paraná Inferior+Uruguay Inferior	127	31	0.7967 +/- 0.0274	0.028051 +/- 0.013788

### 6.1.4 Relación entre las secuencias

#### Árbol de distancia

En el árbol de distancia se observa la existencia de dos grupos filogenéticamente diferentes, representados por individuos colectados tanto en el río Uruguay (en ambos tramos del río) como en el río Paraná (Figura 3).

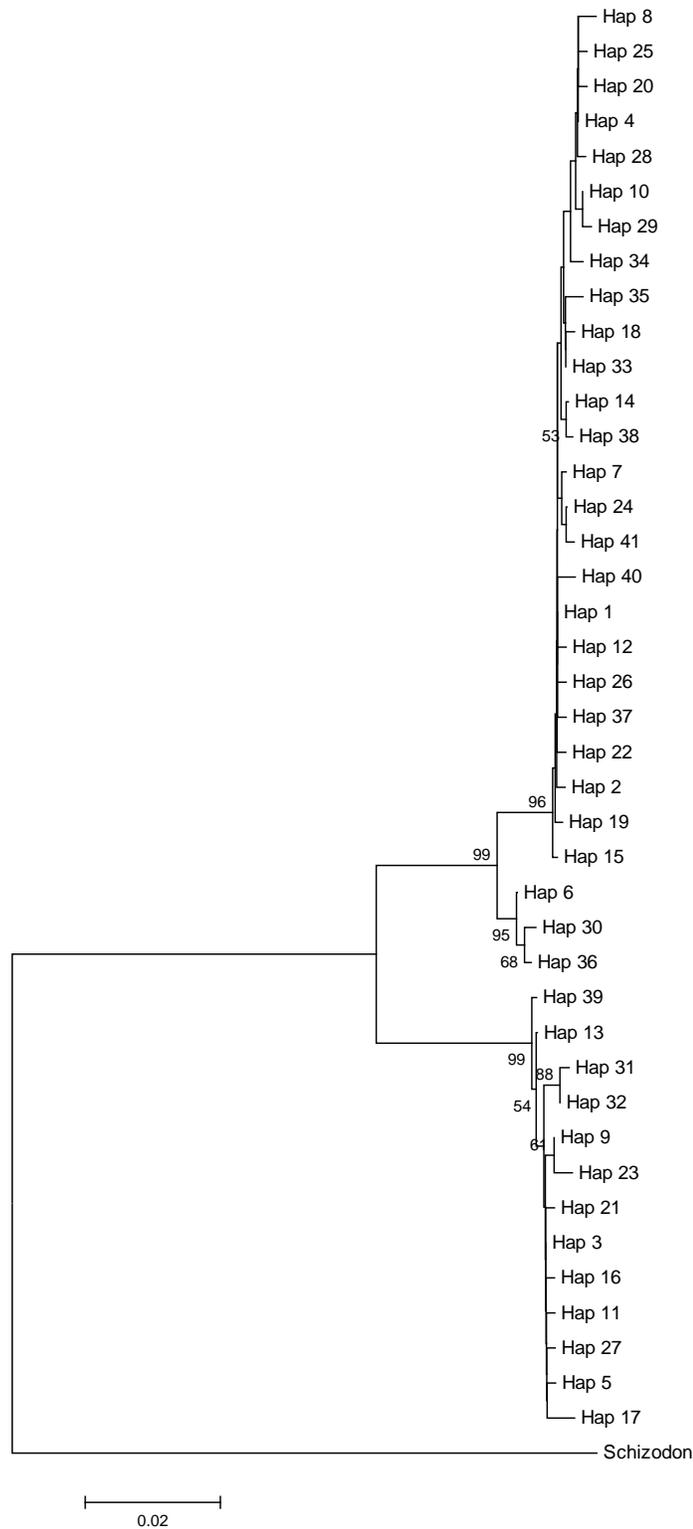


Figura 3 Árbol filogenético construido a partir de haplotipos utilizando el método de unión de vecinos. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de Tamura-Nei. El análisis involucró 42 secuencias de citocromo b. El apoyo de los nodos corresponde al soporte estadístico obtenido mediante 1.000 pseudoréplicas de bootstrap. El grupo externo utilizado para enraizar el árbol fue *Schizodon* sp.

A partir de estos resultados se definieron dos haplogrupos con los individuos de cada clado: haplogrupo A y haplogrupo B. Con el fin de determinar cómo se distribuyen estos haplogrupos en las diferentes regiones se calculó el porcentaje de cada uno de ellos en cada región (Tabla 9). De acuerdo a estos resultados, el Uruguay Medio tendría una mayor proporción del haplogrupo B con respecto al haplogrupo A, mientras que para la región correspondiente al Uruguay Inferior y Paraná Inferior esta diferencia no es tan marcada.

Tabla 9 Porcentaje de cada haplogrupo en cada una de las regiones.

	Haplogrupo A (%)	Haplogrupo B (%)
Uruguay medio	20	80
Uruguay Inferior	56	44
Paraná Inferior	46	54
Uruguay inferior + Paraná Inferior	54	46

## REDES DE HAPLOTIPOS

Para conocer mejor las relaciones entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos a partir de 195 secuencias de citocromo b (Figura 4). Esta red se construyó utilizando el método *Median Joining*. De un total de 195 individuos muestreados en 17 puntos de colecta, se encontró un total de 41 haplotipos, de los cuales 12 (~30%) son compartidos y 29 (~70%) fueron muestreados sólo una vez. En la red se visualizaron morfologías en forma de estrella con centro en 3 haplotipos. Todas las zonas de colecta presentaron haplotipos compartidos. Se observan tres haplotipos predominantes: Hap 1, Hap 3 y Hap 4. El haplotipo más común (Hap 3) estuvo presente en 92 individuos (47% del total de la muestra) y en todas las regiones de muestreo, excepto en el río Negro. El segundo haplotipo más frecuente (Hap 1) estuvo presente en 31 individuos (aproximadamente el 16% del total de la muestra) y se encontró en todas las zonas de muestreo. Por otra parte, el tercero más frecuente (Hap 4) estuvo presente en 23 individuos (aproximadamente el 12% de la muestra). En el Uruguay inferior y en el Paraná inferior hubo un predominio de los haplotipos 1 y 4 mientras que en el Uruguay Medio el Hap 3 fue predominante.

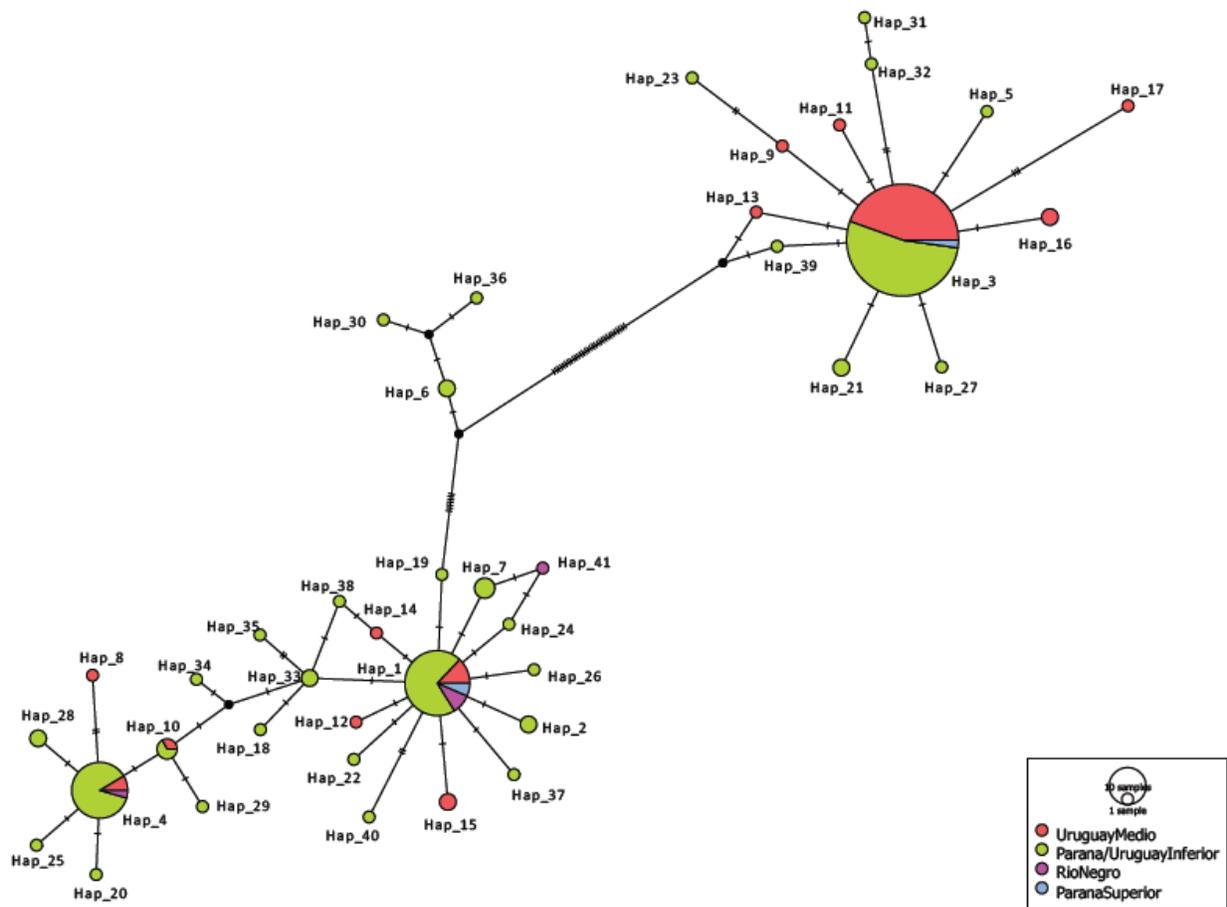


Figura 4 Red de haplotipos Median Joining correspondiente a 195 secuencias de citocromo b de 4 localidades: Uruguay Medio, Uruguay Inferior+Paraná Inferior, río Negro y Paraná Superior. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que comparten un haplotipo en particular.

## MORFOTIPOS

Durante las campañas de colecta se observó la presencia de individuos diferentes y se detectó la presencia de dos morfotipos de *L. obtusidens* (Figura 5). Tanto en las estadísticas de pesca como para los pescadores ambos morfotipos son considerados como boga, es decir, como pertenecientes a la especie *Leporinus obtusidens*. En base a esto, se decidió estudiar si los morfotipos presentan alguna correspondencia con los haplogrupos observados, es decir, si las diferencias genéticas encontradas se relacionan con las diferencias a nivel de fenotipo.

Breve descripción de los morfotipos:

Morfotipo A: Individuos elongados, color amarillento y aleta caudal sin mancha.

Morfotipo B: Individuos jorobados, color grisáceo y con mancha negra en lóbulo inferior de aleta caudal.



Figura 5 Morfotipos de *Leporinus obtusidens*: Izquierda morfotipo A, derecha morfotipo B.

Para llevar a cabo este análisis se seleccionaron 11 individuos de un morfotipo (A) y 10 del otro (B), y se construyó un árbol de distancia utilizando citocromo b como marcador molecular. Tal como se muestra en la Figura 6, se observó la presencia de los dos clados en el árbol con todos los individuos. No obstante, no se observó relación entre morfotipos y haplogrupos.

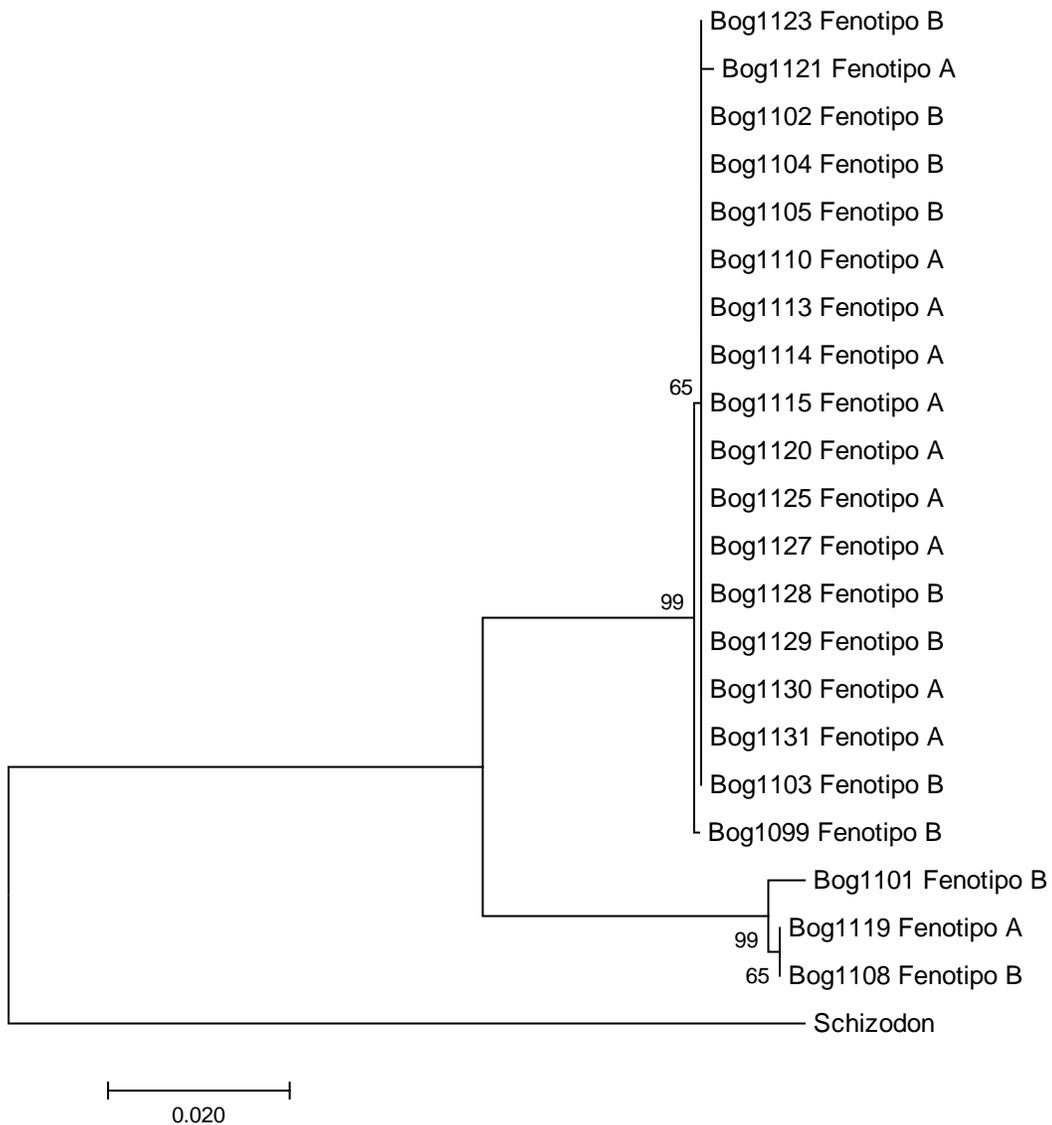


Figura 6 Árbol de distancia construido a partir de secuencias de citocromo b mostrando la relación entre los dos morfotipos (A y B). Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de Tamura-Nei. El soporte estadístico obtenido mediante 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. El grupo externo utilizado para enraizar el árbol fue *Schizodon sp.*

## 6.1.5 Demografía histórica

### MISMATCH DISTRIBUTION

Para determinar si las poblaciones han experimentado una expansión repentina se realizó el análisis de distribución de las diferencias pareadas (“*mismatch distribution*”). En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos para las cuencas del río Uruguay y Paraná juntas, así como también para cada una de las poblaciones identificadas (Población Uruguay Inferior + Paraná; Población del Uruguay Medio). Teniendo en cuenta que para este estadístico la hipótesis nula plantea que la población pasó por un proceso de expansión, los p- valores obtenidos ( $p > 0,05$ ) indicarían que no se descarta esta hipótesis.

En el análisis de expansión demográfica tanto para el conjunto de los datos, como para la población Río Paraná+Río Uruguay Inferior el p-valor para el estadístico SSD resultó mayor a 0,05 lo que indicaría que no existen evidencias estadísticamente significativas que permitan descartar la expansión demográfica. Lo mismo fue observado para la hipótesis de una expansión espacial en estas dos formas de agrupamientos de los datos.

En cambio, el p-valor del estadístico SSD fue  $<0,05$  en la población del Río Uruguay Medio mostrando estabilidad demográfica en esta población, pero sin descartar hipótesis de expansión espacial.

Tabla 10 Datos “Mismatch distribution” correspondientes a las cuencas del Paraná y Uruguay conjuntamente, y a las regiones Uruguay medio y Uruguay Inferior+Paraná.

Estadísticos	Paraná + Uruguay	Uruguay Medio	Paraná + Uruguay Inferior
<b>Expansión demográfica</b>			
Tau ( $\tau$ )	39,1 (5,6 – 132,1)	0	39,1 (0 – 104,1)
Thetao ( $\theta_0$ )	0,00352 (0 – 132,1)	0,51717 (0 - 0)	0,00176 (0 – 7,6)
Theta1 ( $\theta_1$ )	3,21071 (1,25 – 12,7)	3414,15758 (1,2–3404.2)	4,84402 (1,5 - 19,4)
SSD	0,08322	0,06434	0,07680
p-valor	0,14000	< 0,05	0,10000
<b>Expansión espacial</b>			
Tau ( $\tau$ )	38,67598 (26,9 – 5,2)	39,34180 (0,1 -170,6)	37,78156 (2,2 – 44,5)
Theta ( $\theta$ )	1,50117 (0 – 3,5)	0,51216 (0.0007 – 1,8)	2,83205 (0,08 – 5,6)
M	1,38707 (0,2 – 5,1)	0,57150 (0,002 – 5,4)	1,37603 (0,3 – 5,6)
SSD	0,03337	0,01273	0,03750
p-valor	0,63000	0,83000	0,39000

Por otra parte, los gráficos obtenidos a partir del análisis de “mismatch distribution” (Figura 7 y Figura 8) muestran una distribución con tendencia multimodal, lo cual se relaciona con una población estable.

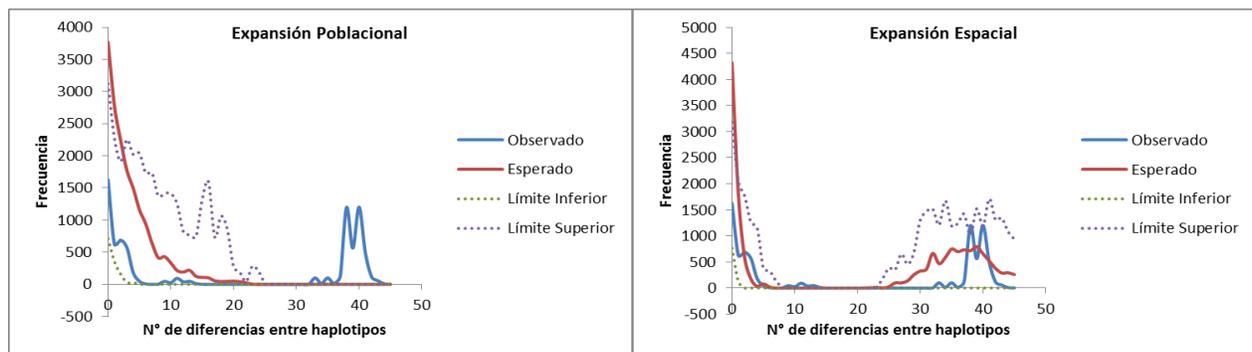


Figura 7 Mismatch distribution basada en la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre haplotipos de *Leporinus obtusidens* considerando el conjunto de los datos (río Uruguay y Paraná conjuntamente), obtenido con el marcador mitocondrial citocromo-b. A la izquierda expansión poblacional repentina, a la derecha expansión espacial. La frecuencia esperada está representada por la línea continua roja; la frecuencia observada está representada por la línea continua azul. Intervalos de confianza (método percentil): alfa=0,050. Basada en 100 réplicas.

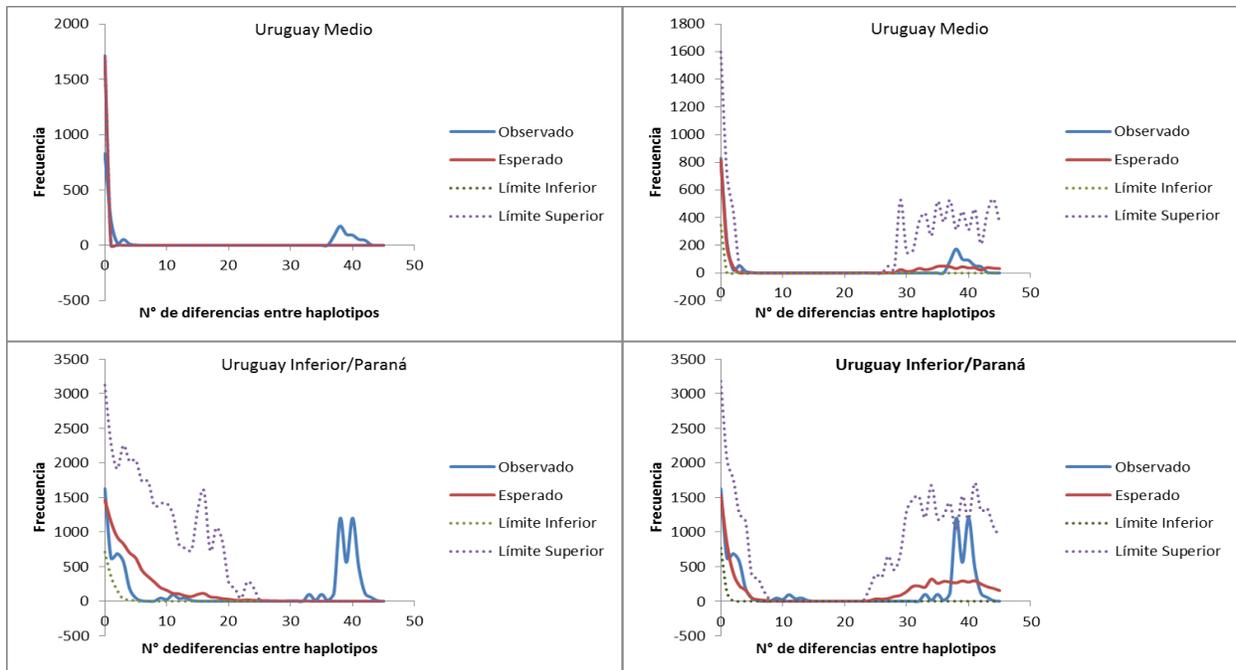


Figura 8 Mismatch distribution basada en la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre haplotipos de *Leporinus obtusidens* para cada una de las poblaciones, obtenido con el marcador mitocondrial citocromo-b. A la izquierda expansión poblacional repentina, a la derecha expansión espacial. La frecuencia esperada está representada por la línea continua roja; la frecuencia observada está representada por la línea continua azul. Intervalos de confianza (método percentil):  $\alpha=0.050$ . Basada en 100 réplicas.

Teniendo en cuenta que  $\tau = 2T\mu$ , es posible obtener una estimación del tiempo absoluto de los procesos demográficos. Para esto es necesario contar con una tasa de mutación. En este caso se utilizó la tasa de sustitución del citocromo b, un marcador más estable que región control, cuya tasa de sustitución es menos variable en peces, alrededor de  $2\% \text{ MA}^{-1}$  (Pereira et al 2009). En base a estos datos, la expansión estimada para *L. obtusidens* en los ríos Paraná y Uruguay es de aproximadamente 1.050.000 años antes del presente.

## TEST DE NEUTRALIDAD

En la Tabla 11 se muestran los resultados de los tests de Tajima y Fu realizados para evaluar si la distribución de mutaciones se ajusta a un modelo de neutralidad. Este análisis se llevó a cabo para el total de las muestras (Paraná + Uruguay Inferior) así como también para cada población (Paraná + Uruguay Inferior; Uruguay medio). Un alejamiento de la neutralidad se

evidencia cuando estos índices muestran valores significativamente negativos. No se obtuvieron resultados negativos significativos en ninguno de los casos.

Tabla 11 Test de neutralidad obtenido con el marcador citocromo b. Estadístico D correspondiente al test de neutralidad de Tajima y estadístico  $F_s$  correspondiente al test de neutralidad de Fu.

	<b>Estadísticos</b>	<b>Paraná + Uruguay</b>	<b>Uruguay Medio</b>	<b>Paraná Inferior + Uruguay Inferior</b>
<b>Test de Tajima</b>	Tamaño de la muestra	186	59	127
	Estadístico D	2,08619	0,67435	2,56148
	p-valor	0,97800	0,81100	0,99400
<b>Test de Fu</b>	No. de alelos	46	13	31
	Estadístico $F_s$	2,51729	7,22433	4,31007
	p-valor	0,77000	0,96600	0,87500

## 6.2 REGIÓN CONTROL

### 6.2.1 Amplificaciones

Para un total de 151 individuos de *L. obtusidens* colectados en los ríos Uruguay, Paraná y Negro, se amplificó y secuenció un fragmento de 1.107 pb correspondiente al marcador mitocondrial región control (Tabla 12).

Tabla 12 Amplificaciones correspondientes a la secuencia región control obtenidas en cada punto de colecta y distribución de los haplotipos.

Localidad		Nº de individuos	Nº de Haplotipos
Uruguay Medio	Santo Tomé	3	1, 10
	Yapeyú	30	1, 2, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
	San Javier (Misiones)	2	6
	Villa Constitución	23	1, 2, 10, 22, 23, 24, 25
	TOTAL Uruguay Medio	58	
Uruguay Inferior	Ayuí	1	26
	Salto	6	4, 5, 26, 27, 28
	Nuevo Berlín	30	1, 2, 4, 5, 6, 23, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35
	San Javier (R Negro)	2	36, 37
	La Concordia	8	1, 22, 38, 39, 40
	Nueva Palmira	18	1, 4, 6, 22, 41, 42, 43, 44 45, 46
	TOTAL Uruguay Inferior	65	
Paraná Inferior	Paraná	12	1, 2, 3, 4
	Santa Fe	1	8
	Rosario	10	4, 5, 6, 7, 9
	TOTAL Paraná	23	
Río Negro	Mercedes	5	4, 47, 48, 49, 50
TOTAL SECUENCIADOS		151	

Para los análisis correspondientes a la estructura poblacional sólo se tuvieron en cuenta las localidades con un número significativo de individuos: Uruguay Medio, Uruguay Inferior y Paraná Inferior. Los individuos colectados en el río Negro (localidad de Mercedes) fueron incluidos únicamente en los análisis filogenéticos.

### 6.2.2 Análisis de la estructura poblacional

#### AMOVA

El test de AMOVA, realizado para evaluar si se observa o no estructuración poblacional, mostró que la estructura que maximiza la varianza entre grupos (FCT) y minimiza la varianza entre las poblaciones dentro de los grupos (FSC), identifica la presencia de dos grupos: Uruguay Medio por un lado y Uruguay Inferior+Paraná inferior por otro (Tabla 13).

Tabla 13 Análisis molecular de la varianza en los ríos Uruguay y Paraná. Se presentan los valores basados en la secuencia de Región Control para grupos de localidades:

(1) Paraná; Uruguay

(2) (Paraná inferior) (Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio)

(3) (Paraná inferior + Uruguay Inferior + Villa Constitución) (Uruguay Medio)

(4) Paraná Inferior + Uruguay inferior; Uruguay medio

(5) Paraná Inferior + Uruguay inferior; Uruguay Medio 1 [San Javier (Mis) + Santo Tomé + Yapeyú]; Uruguay Medio 2 (Villa Constitución)

(6) Paraná Inferior + Nueva Palmira y La Concordia; el resto de las localidades del río Uruguay

Agrupación	Fuente de Variación	d.f.	Suma de Cuadrados	Porcentaje de Variación	Estadísticos	p-valor
1	Entre Grupos	1	0.326	-4.07	F <sub>CT</sub> : -0.04065	1.00000
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	3.375	5.59	F <sub>SC</sub> : 0.05371	<0.05
	Dentro de poblaciones	141	58.340	98.48	F <sub>ST</sub> : 0.01524	<0.05
2	Entre Grupos	2	1.277	-3.42	F <sub>CT</sub> : -0.03419	0.81134
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	2.424	6.55	F <sub>SC</sub> : 0.06337	<0.05
	Dentro de poblaciones	141	58.340	96.87	F <sub>ST</sub> : 0.03135	<0.05
3	Entre Grupos	1	0.845	-1.02	F <sub>CT</sub> : -0.01022	0.60508
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	2.856	4.61	F <sub>SC</sub> : 0.04560	<0.05
	Dentro de poblaciones	141	58.340	96.42	F <sub>ST</sub> : 0.03584	<0.05
4	Entre Grupos	1	1.954	4.42	F <sub>CT</sub> : 0.04424	0.10362
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	1.747	1.36	F <sub>SC</sub> : 0.01421	0.08895
	Dentro de poblaciones	141	58.340	94.22	F <sub>ST</sub> : 0.05782	<0.05
5	Entre Grupos	2	2.500	3.65	F <sub>CT</sub> : 0.03655	0.19453
	Entre poblaciones dentro de grupos	2	1.201	1.50	F <sub>SC</sub> : 0.01559	0.13783
	Dentro de poblaciones	141	58.340	94.84	F <sub>ST</sub> : 0.05156	<0.05
6	Entre Grupos	1	0.294	-2.89	F <sub>CT</sub> : -0.02894	1.00000
	Entre poblaciones dentro de grupos	3	3.407	5.80	F <sub>SC</sub> : 0.05635	<0.05
	Dentro de poblaciones	141	58.340	97.10	F <sub>ST</sub> : 0.02904	<0.05

## Índices $F_{ST}$

En la Tabla 14 se muestran los valores pareados del estadístico  $F_{ST}$  obtenidos a partir del análisis de las secuencias de región control. El Uruguay Medio presentó un valor de  $F_{ST}$  significativo con respecto al Uruguay Inferior.

Tabla 14 Valores pareados del estadístico  $F_{ST}$  entre localidades estimados mediante secuencias de región control para tres regiones muestreadas. Los valores en negrita corresponden a valores significativos ( $p < 0,05$ ) obtenidos a partir de 1.000 pseudoréplicas.

	Paraná	Uruguay Medio	Uruguay Inferior
Paraná	—		
Uruguay Medio	0.01381	—	
Uruguay Inferior	0.01067	<b>0.06617</b>	—

Teniendo en cuenta los resultados del test de AMOVA se realizó un nuevo análisis cuyos resultados se observan en la Tabla 15. Teniendo en cuenta la agrupación sugerida por el test de AMOVA, se obtuvo un valor de  $F_{ST}$  alto y significativo.

Tabla 15 Valores pareados del estadístico  $F_{ST}$  entre regiones estimados mediante secuencias de región control para dos poblaciones identificadas en AMOVA. Los valores en negrita corresponden a valores significativos ( $p < 0,05$ ) obtenidos a partir de 1.000 pseudoréplicas.

	Uruguay Medio	Uruguay Inferior / Paraná
Uruguay Medio	—	
Uruguay Inferior / Paraná	<b>0.28636</b>	—

## Geneland

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos mediante la implementación del programa Geneland a partir de secuencias de región control. Al igual que para citocromo b, pueden identificarse 2 grupos diferentes ( $k=2$ ), por un lado, todas las localidades del Río Paraná junto con las dos más al sur del río Uruguay, y por otro, el resto de las localidades del Río Uruguay.

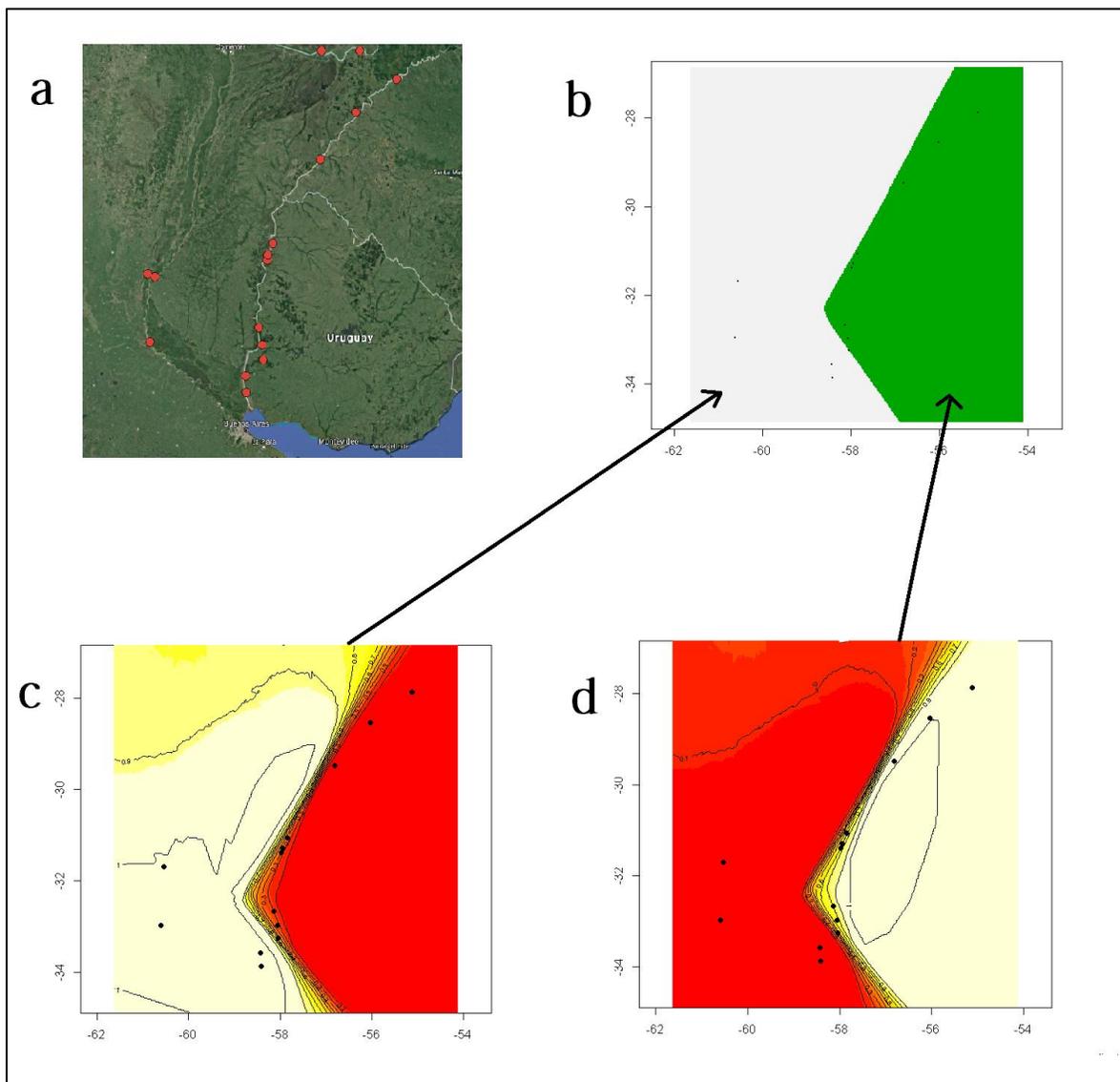


Figura 9 Mapa de con los puntos de muestreo (a) y resultados del análisis Geneland de la zona, basados en región control, mostrando: (b) La organización espacial en dos grupos; en (c) y (d) se presentan los mapas de probabilidades a posteriori para cada grupo.

### 6.2.3 Índices de diversidad

El análisis de la secuencia de región control, de un largo total de 1.107 pb, mostró que la región correspondiente al Uruguay Inferior+Paraná es la que presenta los valores más altos de diversidad haplotípica (0.883) y nucleotídica (0.04) (Tabla 16).

Tabla 16 Diversidad genética de *L. obtusidens* en río Uruguay Medio y río Uruguay Inferior + Paraná inferior, obtenidas con el marcador mitocondrial Región Control. n: tamaño de la muestra, k: número de haplotipos; H: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica.

Localidad	n	k	H	$\pi$
Uruguay Medio	58	21	0.7598 +/- 0.0589	0.023830 +/- 0.011780
Uruguay Inferior+Paraná	88	32	0.8835 +/- 0.0218	0.040809 +/- 0.019807

### 6.2.4 Relación entre las secuencias

#### Árbol de distancia

El árbol de distancia muestra una topología similar a la del citocromo b, con la presencia de dos clados con buen soporte de *bootstrap* (Figura 10).

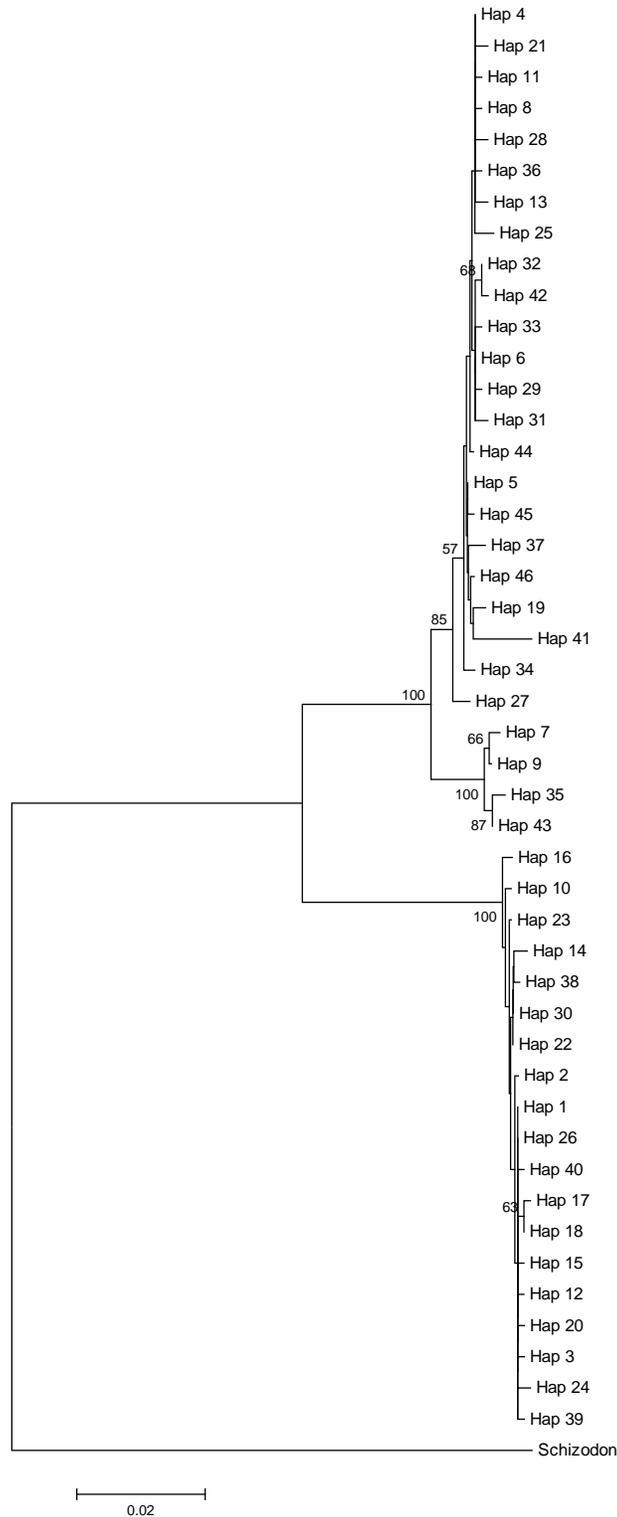


Figura 10 Árbol filogenético construido a partir de haplotipos utilizando el método de unión de vecinos. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de Tamura-3 parámetros. El análisis involucró 47 secuencias de región control. El apoyo de los nodos corresponde al soporte estadístico obtenido mediante 1.000 pseudoréplicas de *bootstrap*. El grupo externo utilizado para enraizar el árbol fue *Schizodon sp.*

### Redes de haplotipos

Para determinar las relaciones entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos utilizando el método de *Median Joining*, para la cual se incluyeron 151 secuencias de región control (Figura 11). Todas las regiones de colecta presentaron haplotipos compartidos y por lo menos un haplotipo único. De los 50 haplotipos presentes, 41 (82%) fueron muestreados sólo una vez. El haplotipo más común (Hap 1) estuvo presente en 50 individuos (33 % del total de la muestra) correspondientes a las regiones de muestreo Uruguay Medio y Paraná Inferior+Uruguay Inferior. Al igual que lo observado en citocromo b, los haplotipos se dividen en dos grupos separados por un número considerable de pasos mutacionales.

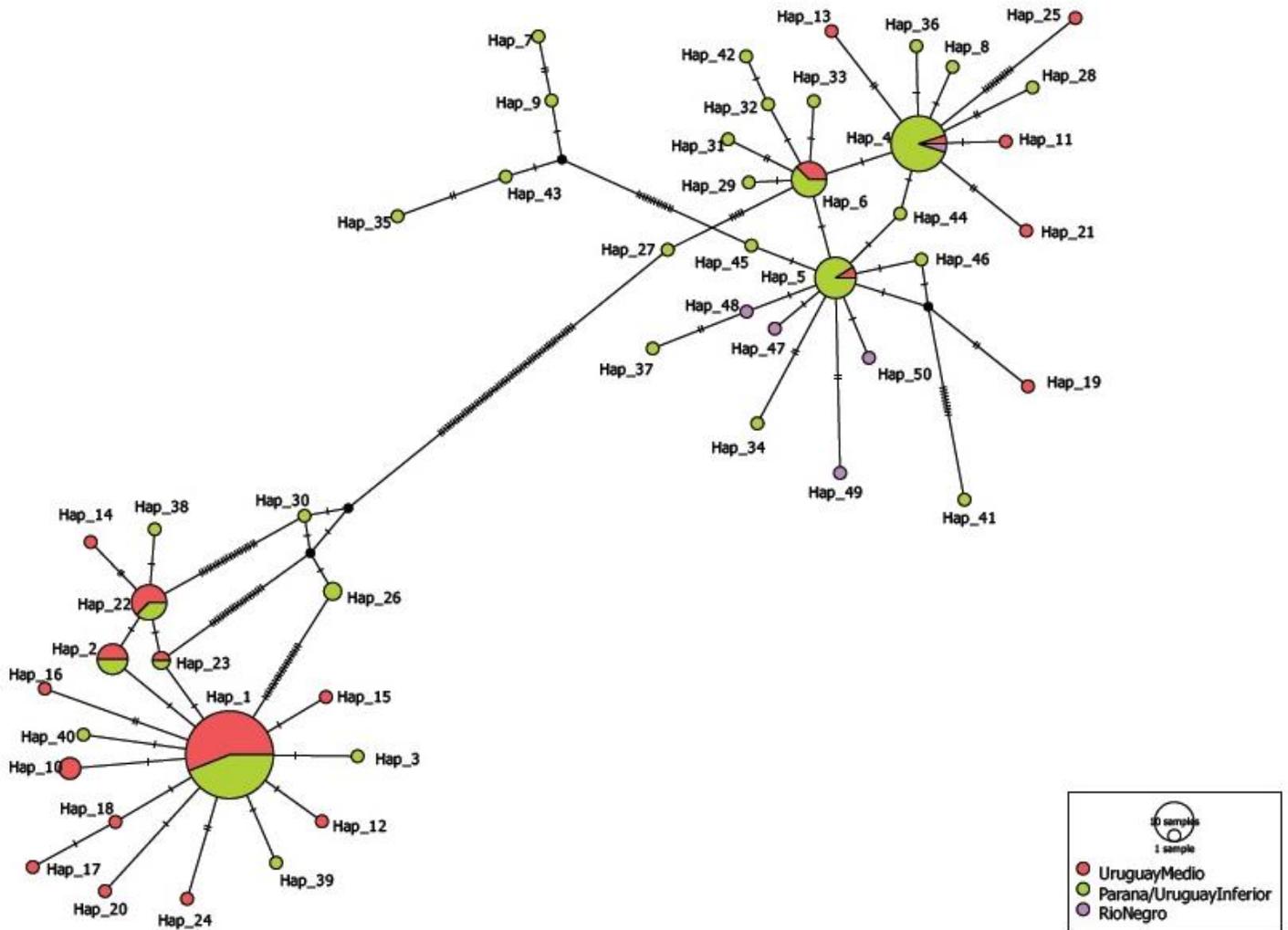


Figura 11 Red de haplotipos Median Joining correspondiente a 151 secuencias de región control de 3 localidades: Uruguay Medio, Paraná+Uruguay Inferior, río Negro. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que comparten un haplotipo en particular.

## 6.2.5 Demografía histórica

### Mismatch distribution

Para determinar si las poblaciones han experimentado eventos de expansión se llevó a cabo el análisis de “*mismatch distribution*”. Los resultados de este análisis para el conjunto de los

datos, y para las regiones Uruguay Medio y Paraná+Uruguay Inferior se muestran en la Tabla 17. De acuerdo a estos resultados ( $p > 0,05$ ), no se descartaría la hipótesis nula, por lo que las poblaciones podrían haber pasado por un proceso de expansión tanto demográfica como espacial.

Tabla 17 Resultados de mismatch distribution obtenidos a partir del marcador región control.

Estadísticos	Paraná + Uruguay	Uruguay Medio	Paraná + Uruguay Inferior
<b>Expansión demográfica</b>			
Tau ( $\tau$ )	78,4 (4,3 – 291,4)	0,3 (0 – 6,9)	78,3 (29,2 – 291,3)
Thetao ( $\theta_0$ )	0 (0 – 7,7)	2,01095 (0 – 1,3)	0,00176 (0 – 8,2)
Theta1 ( $\theta_1$ )	5,66209 (2,1 – 12,8)	11,32142 (1,2 – 214,7)	7,81787 (2,9 – 18,3)
SSD	0,07334	0,02661	0,07350
p-valor	0,14000	0,27000	0,06000
<b>Expansión espacial</b>			
Tau ( $\tau$ )	76,63073 (0,3 – 84,6)	77,61016 (1,9 – 82,8)	76,33723 (2,8 – 91)
Theta ( $\theta$ )	3,99140 (0,5 – 7,3)	2,43123 (0.0007 – 5,1)	4,99873 (0,2 – 8,3)
M	1,24288 (0,2 – 6,5)	0,37511 (0 – 8,6)	1,39591 (0,3 – 6,9)
SSD	0,04261	0,01824	0,04569
p-valor	0,32000	0,84000	0,14000

Por otra parte, los histogramas de las distribuciones de las diferencias pareadas muestran una distribución con tendencia multimodal, lo cual se relaciona con una población estable (

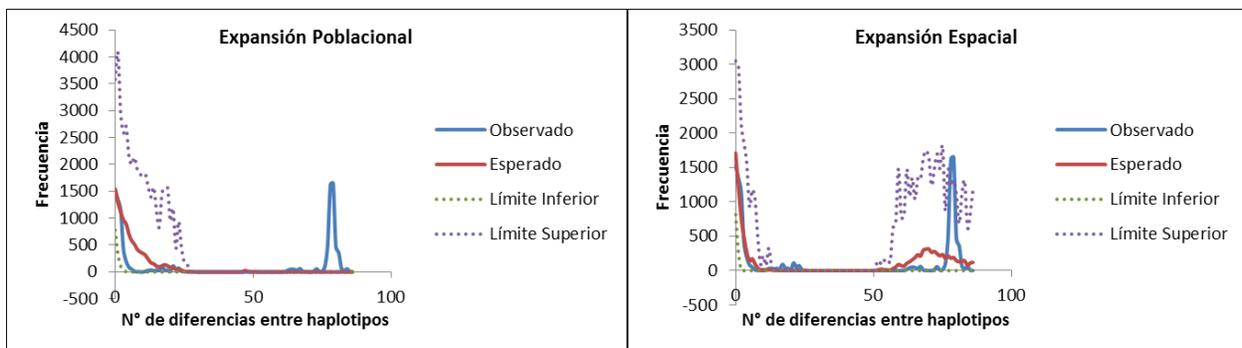


Figura 12 y Figura 13).

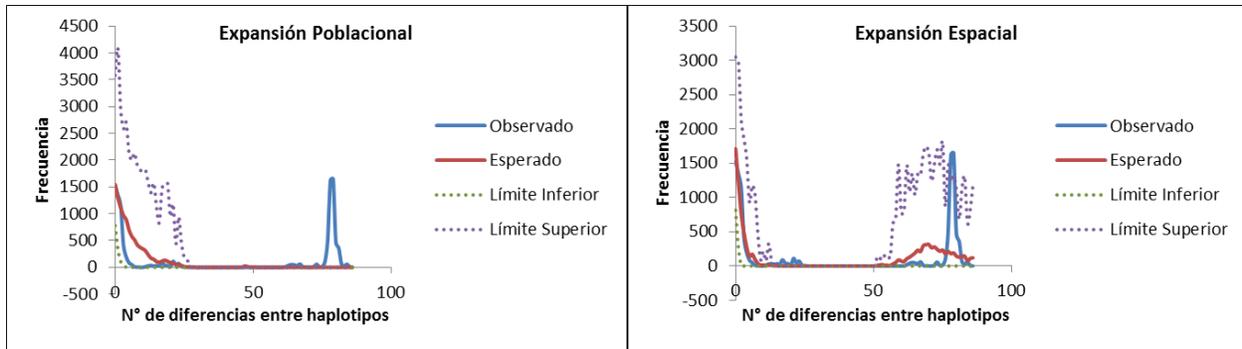


Figura 12 *Mismatch distribution* basada en la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre haplotipos de *Leporinus obtusidens* para las cuencas del río Uruguay y Paraná, obtenido con el marcador mitocondrial región control. A la izquierda expansión poblacional repentina, a la derecha expansión espacial. La frecuencia esperada está representada por la línea continua roja; la frecuencia observada está representada por la línea continua azul. Intervalos de confianza (método percentil):  $\alpha=0.050$ . Basada en 100 réplicas.

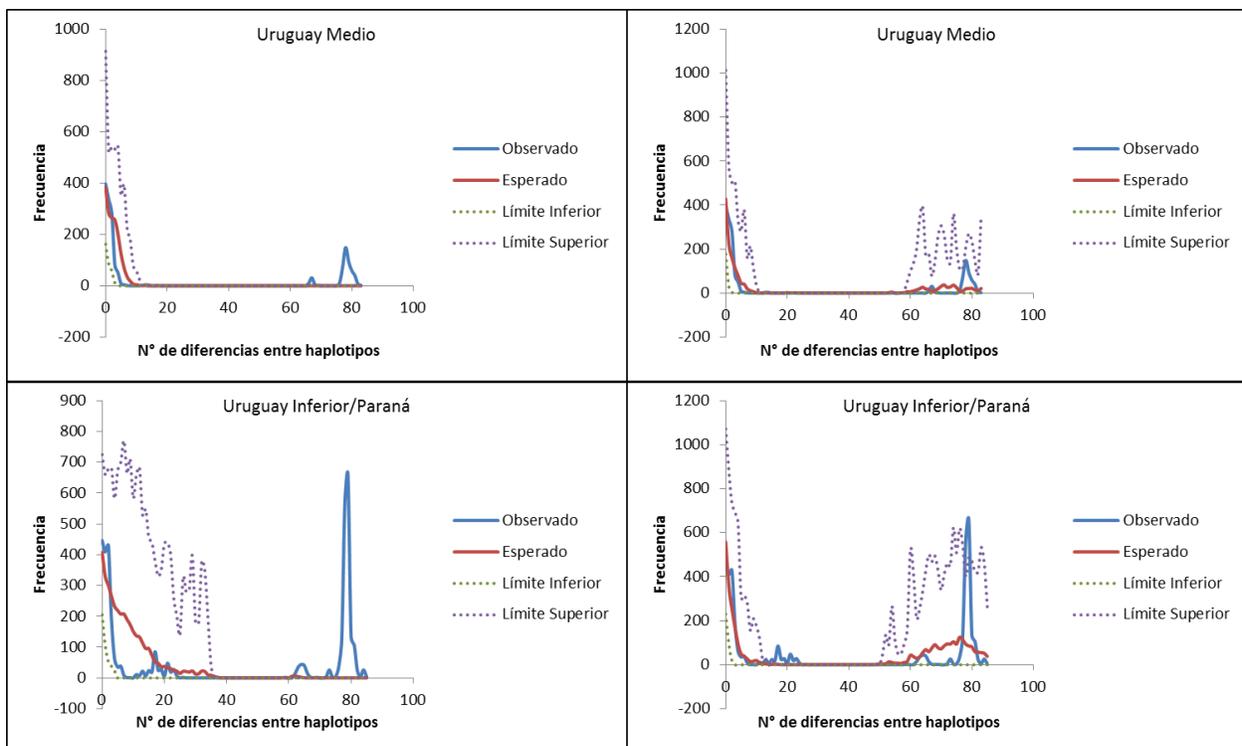


Figura 13 *Mismatch distribution* basada en la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas entre haplotipos de *Leporinus obtusidens* para cada una de las regiones, obtenido con el marcador mitocondrial región control. A la izquierda expansión poblacional repentina, a la derecha expansión espacial. La frecuencia esperada está representada por la línea continua roja; la frecuencia observada está representada por la línea continua azul. Intervalos de confianza (método percentil):  $\alpha=0.050$ . Basada en 100 réplicas.

## Test de neutralidad

En la Tabla 18 se muestran los resultados de los tests de Tajima y Fu realizados para evaluar si la distribución de mutaciones se ajusta a un modelo de neutralidad. Un alejamiento de la neutralidad se evidencia cuando estos índices muestran valores significativamente negativos. No se obtuvieron resultados negativos significativos en ninguno de los casos.

Tabla 18 Test de neutralidad obtenido con el marcador Región Control. Estadístico D correspondiente al test de neutralidad de Tajima (1989) y estadístico  $F_s$  correspondiente al test de neutralidad de Fu (1997).

	Estadísticos	Paraná + Uruguay	Uruguay Medio	Paraná Inferior + Uruguay Inferior
<b>Test de Tajima</b>	Tamaño de la muestra	146	58	88
	Estadístico D	2,65690	0,57340	2,85328
	p-valor	0,99700	0,80100	0,99900
<b>Test de Fu</b>	No. de alelos	46	21	32
	Estadístico $F_s$	6,77135	5,37766	8,69609
	p-valor	0,89500	0,91600	0,96100

## 7. DISCUSIÓN

---

Este estudio constituye el primer análisis filogeográfico de *Leporinus obtusidens*. El presente trabajo se centró en el estudio poblacional de *Leporinus obtusidens* utilizando los marcadores mitocondriales citocromo b y región control con el fin de evaluar la variabilidad genética de esta especie y caracterizar la población.

En años recientes, varios estudios genéticos en peces neotropicales de agua dulce han indicado estructuración en poblaciones pertenecientes a la misma cuenca hidrográfica (Piorski et al. 2008) incluyendo especies migratorias (Hatanaka et al. 2006; Sanches & Galetti 2007). Si bien las causas de esta estructuración son ampliamente debatidas, se han propuesto efectos históricos, ecológicos y antropogénicos para promover la diferenciación genética entre las poblaciones de peces de agua dulce (Hatanaka et al. 2006; Sanches et al. 2012).

Los resultados de los análisis de este trabajo mostraron la presencia de más de una población de bogas (*Leporinus obtusidens*) en las cuencas baja y media de los ríos Paraná y Uruguay. Esta diferenciación fue detectada tanto por citocromo b como por región control. Dado que la región de control es hipervariable y que, debido a que no juega un papel en la codificación, las tasas de mutación de este marcador tienden a ser de dos a cinco veces más altas que en otras regiones del genoma mitocondrial (Meyer 1993), resulta de utilidad para detectar cambios en las poblaciones. Por su parte, la variación observada en el citocromo b permitiría evaluar eventos más antiguos. De acuerdo a esto, la estructuración observada en este trabajo parece ser lo suficientemente antigua como para ser detectada con citocromo b, un marcador relativamente poco variable.

Los resultados de AMOVA para ambos marcadores muestran la existencia de dos agrupaciones como las más probables para explicar la relación entre las localidades muestreadas. Una de estas agrupaciones diferencia dos poblaciones, una correspondiente a los individuos del Paraná Inferior junto con los del Uruguay Inferior y otra con los individuos pertenecientes al Uruguay Medio. Por otro lado, de acuerdo a los resultados del AMOVA, se

presenta como posible una segunda agrupación la cual reconoce tres poblaciones; ésta agrupación separa los individuos del Uruguay Medio en dos grupos, por un lado los que se encuentran más al norte (San Javier, Santo Tomé y Yapeyú) y por otro los del embalse de la represa de Salto Grande (localidad de Villa Constitución) y mantiene la agrupación Uruguay Inferior-Paraná Inferior.

Si bien estas dos agrupaciones evidenciaron estructuración a través del test de AMOVA, debido a que los resultados muestran poca diferencia entre ellos se eligió la agrupación que tiene en cuenta dos poblaciones teniendo en cuenta los resultados obtenidos con Región Control, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el Uruguay Medio haya más de una población. La implementación de otros marcadores más sensibles a cambios recientes, como por ejemplo microsatélites, permitiría evaluar si existe esta diferenciación en el Uruguay Medio.

La separación de *L. obtusidens* en dos poblaciones es compatible con la existencia de dos zonas de reproducción: una en el Paraná y otra en el Uruguay Medio (CARU 2009; Fuentes et al. 2016). A su vez, el comportamiento de desplazamiento entre zonas de reproducción y alimentación se refleja en la homogeneidad entre los sectores inferiores del Paraná y del Uruguay. Resultados similares de estructuración poblacional han sido descritos para al menos otra especie migratoria, el sábalo (*Prochilodus lineatus*) (CARU 2009), y zonas de reproducción se han descrito para otras especies migradoras como el surubí (*Pseudoplatysoma coruscans*) y el dorado (*Salminus brasiliensis*) (Paolucci 2002).

Al igual que el test de AMOVA, los resultados de Geneland, tanto con citocromo b como región control, agruparon los individuos en dos poblaciones. Sin embargo, el resultado de este último análisis difiere en el lugar de corte, ya que agrupó por un lado los individuos del Río Paraná y las localidades más al sur del Río Uruguay (Nueva Palmira y La Concordia), y por otro lado al resto de las localidades del Río Uruguay, de los tramos inferior y medio. Esta estructuración puede sugerir que los individuos presentes entre el Río Negro y Salto provengan de la deriva de larvas desde el tramo medio al tramo inferior del río Uruguay, a través de la represa de Salto Grande, como fue observado por Fuentes et al. (2016).

Los resultados de  $F_{ST}$  apoyan lo observado con el AMOVA. Cuando se considera la división en dos poblaciones los valores de  $F_{ST}$  obtenidos son relativamente altos ( $F_{ST} = 0,19096$  para citocromo b y  $F_{ST} = 0,28636$  para región control) y significativos. Valores de  $F_{ST}$  inferiores ( $F_{ST} = 0,112$ ) a los encontrados en este trabajo fueron presentados por Sanches et al. (2007) para mostrar estructuración de poblaciones en *Brycon orthotaenia* en la cuenca del Río Miranda en Brasil.

Los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica correspondientes a la población del Uruguay Inferior-Paraná Inferior son mayores a los encontrados en el Uruguay Medio. Este resultado podría estar reflejando la presencia de una población de menor tamaño en el Uruguay Medio, más restringida en su distribución y por lo tanto con mayor endogamia, lo cual produciría una disminución de la diversidad. Por otra parte, la población del Uruguay Inferior-Paraná Inferior presentaría un área de distribución mayor por lo que la deriva genética no tendría tanto efecto.

En términos generales, los resultados mostraron niveles relativamente altos de diversidad haplotípicas (un valor promedio de  $H = 0,656$  para citocromo b y  $H = 0,822$  para región control) y niveles relativamente altos de diversidad nucleotídica (valor promedio  $\pi = 0.0231$  para citocromo b y  $\pi = 0,0323$  para región control) para las muestras de *L. obtusidens*. Tal como se esperaba, de acuerdo a las diferentes tasas de mutación de los marcadores, el gen citocromo b, más conservado, mostró valores más bajos de diversidad. Resultados similares fueron obtenidos por Martins et al. (2003), quienes estudiaron secuencias de región control en seis poblaciones de *L. elongatus* del río Paraná y detectaron niveles altos de diversidad haplotípica (0.958) y de diversidad nucleotídica (0.0351). Chiari y Sodré (1999) también encontraron evidencia de niveles elevados de polimorfismo genético en *L. obtusidens*, así como también en otras especies del género *Leporinus* (*L. elongatus*, *L. friderici*) y *Schizodon* (*S. intermedius* y *S. nasutus*), utilizando para su análisis marcadores isoenzimáticos. Resultados similares de diversidad se han reportado en varias especies de peces marinos (Grant & Bowen 1998) en base al análisis de secuencias de ADN mitocondrial. Los autores concluyen que los valores de diversidad son el resultado de expansión poblacional después

de un largo período de tamaño poblacional efectivo reducido o de un crecimiento rápido de la población acompañado por un aumento en la retención de nuevas mutaciones. Además, señalan que muchas de las especies que exhiben este patrón contrastante de diversidad parecen haberse originado en el Plioceno o Pleistoceno temprano.

Tanto el árbol de distancia como las redes de haplotipos muestran una división en dos grupos con una separación importante entre ellos. Sin embargo, esta división no responde a una discriminación geográfica ya que ambos grupos están representados por individuos colectados tanto en el río Uruguay (en ambos tramos del río) como en el río Paraná. No obstante, se observó que uno de los haplogrupos tiende a estar más representado en el Uruguay Medio. Dada la gran divergencia observada entre dos grupos, no puede descartarse la posibilidad de la existencia de dos especies ampliamente codistribuidas.

Estudios de divergencia de secuencias dentro del género *Leporinus* realizados por Avelino et al. (2015) mostraron la presencia de dos grupos de *L. obtusidens* ampliamente distribuidos en los ríos Paraná y Uruguay.

En la red de haplotipos se observa una topología en forma de estrella, con haplotipos centrales más frecuentes y haplotipos derivados separados por pocos pasos mutacionales, lo que indicaría una reciente divergencia de los mismos, hecho que suele observarse en poblaciones que atravesaron una expansión poblacional reciente (da Silva et al. 2016). Sobre esto puede agregarse que los análisis de *mismatch* no descartan la hipótesis de expansión. Para el caso del Uruguay Medio, únicamente los resultados obtenidos con región control indican una posible expansión, por lo que este evento podría haber sido más reciente en este tramo del río, de modo que sólo fue detectado por el marcador más variable. Además, de acuerdo a los resultados de este análisis, las expansiones demográficas fueron acompañadas por fenómenos de expansión espacial posiblemente debido a eventos ocurridos durante el Pleistoceno. Autores como Weitzman y Weitzman (1982), que hicieron un análisis de la biogeografía y diversificación evolutiva de los peces de agua dulce neotropicales, han sugerido que los cambios climáticos durante el plioceno y el pleistoceno habrían sido responsables de la evolución a nivel de especies. No obstante, los gráficos de

*mismatch* no muestran las típicas distribuciones unimodales de las poblaciones que han pasado por un evento de expansión, lo cual a su vez podría deberse a la presencia de los dos haplogrupos antes mencionados.

Las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu no mostraron los clásicos valores negativos que indicarían apartamientos de la neutralidad y expansión demográfica, sugiriendo que los loci analizados no están sometidos a apartamientos de la neutralidad y que las poblaciones no han sufrido una expansión poblacional, al menos recientemente. De nuevo, la presencia de más de un haplogrupo, podría ser responsable por estos valores positivos de estos índices.

En base a la observación de la presencia de dos haplogrupos diferentes y que en individuos muestreados se observaron diferencias morfológicas identificándose dos morfotipos (uno elongado y otro jorobado), se construyó un árbol de distancia con individuos de ambos morfotipos utilizando citocromo b como marcador molecular. Este análisis no mostró una correspondencia entre las diferencias morfológicas y genéticas, lo cual podría deberse a una gran plasticidad fenotípica de esta especie. Un hecho similar había sido observado en el sábalo, para el cual dos especies descritas en base a diferencias fenotípicas (*Prochilodus lineatus* y *Prochilodus scrofa*) fueron reconocidas como una sola especie (*P. lineatus*) luego de que estudios genéticos no mostraran diferencias entre ellas (Sivasundar et al. 2001, CARU 2009), es decir, los morfotipos descritos no estarían representando especies diferentes.

Los resultados de flujo génico obtenidos con el programa Migrate muestran que el modelo de migración que más se ajusta a los datos es aquel en el que el flujo génico se produce desde el Uruguay Medio al Uruguay Inferior-Paraná Inferior, pero no en sentido contrario. Estos datos concuerdan con las observaciones de Fuentes et al. (2016), quienes evaluaron el pasaje de peces en estadios tempranos a través de la represa de Salto Grande y encontraron que larvas correspondientes al desove en el Uruguay Medio son parcialmente transportadas a la sección inferior del río. El grado y el patrón de diferenciación entre las poblaciones está relacionado con la cantidad de flujo genético entre ellas, e incluso cuando se identifica una estructuración genética, las diferentes poblaciones pueden presentar algún intercambio de individuos (Pettersson et al. 2001; Narum et al. 2004; Jørgensen et al. 2005). El

mantenimiento de la diversidad genética depende de la preservación del flujo génico entre las poblaciones de un sistema (Laikre et al. 2005), el cual asegura la introducción de variación en las poblaciones, evitando la endogamia y la pérdida de variación genética en la especie en su conjunto.

Teniendo en cuenta que lo que separa el río Uruguay Medio del Uruguay Inferior es la represa de Salto Grande, podría argumentarse que esta construcción es la que genera la división de *L. obtusidens* en dos poblaciones. En este sentido varios autores han evaluado el efecto de represas hidroeléctricas en la estructura poblacional de peces. Garcez et al. (2011) evaluaron la influencia de un complejo de represas hidroeléctricas sobre la estructura genética de *P. lineatus* en la cuenca del Río Grande y concluyeron que, a pesar de un aparente corte en el flujo génico, no se habían producido diferencias significativas a corto plazo (50 años) y que la variabilidad genética no había disminuido. Resultados similares han sido reportados en otras especies como *Gadus morhua* (Poulsen et al. 2006) y *Colossoma macropomum* (Santos et al. 2007). En todos los casos, tamaños poblacionales efectivos grandes y períodos de tiempo cortos parecen ser los responsables de que no sea posible registrar un efecto de las represas sobre la variabilidad genética de las poblaciones de peces a nivel de ADNmt. Teniendo en cuenta esto, podría decirse que la represa de Salto Grande no sería la causa de la estructuración poblacional observada en *L. obtusidens*.

Las distintas secciones de la cuenca del río Uruguay tienen características hidrográficas diferentes; los tramos correspondientes al Uruguay Superior y Medio poseen características similares entre ellos y se diferencian del Uruguay Inferior (Zaniboni-Filho & Schulz 2003). De acuerdo con Iriondo y Kröhling (2008) el tramo inferior del río Uruguay está determinado por dos características ambientales importantes: la principal es la influencia directa del mar, que penetró profundamente en el valle durante la introgresión del holoceno; la otra es la gran abundancia de arena y sedimentos finos, que generan gran cantidad de bancos e islas. Estas diferencias hidrológicas entre las distintas secciones del río pueden haber llevado a un comportamiento diferencial de las poblaciones de peces pertenecientes al Uruguay Medio e Inferior, lo cual podría haber derivado en una diferenciación genética entre las

poblaciones de ambas secciones del río. A su vez, las características similares del Uruguay Inferior y Paraná Inferior, y la conexión existente entre ambos a la altura del Río de la Plata, permitiría que estos ríos sean utilizados como corredores por las especies migradoras como la boga, explicando la presencia de una sola población en esta región.

## 8. CONCLUSIONES

---

A partir de la secuencia de dos marcadores mitocondriales, citocromo b y región control, se detectó la presencia de dos poblaciones de *L. obtusidens* en las cuencas del río Paraná y río Uruguay Medio e Inferior; una de estas poblaciones se distribuye en el Paraná Inferior y Uruguay Inferior y la otra en el Uruguay Medio.

Teniendo en cuenta que esta estructura fue detectada por ambos marcadores y la baja tasa de mutación del citocromo b, la estructuración observada podría haberse originado como consecuencia de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno.

El modelo de migración que más se ajusta a los datos indica que el flujo génico se produce desde el Uruguay Medio al Uruguay Inferior-Paraná Inferior, pero no en sentido contrario. La separación de *L. obtusidens* en dos poblaciones es compatible con la existencia de dos zonas de reproducción: una en el Paraná y otra en el Uruguay Medio como se ha descrito para otras especies.

Tanto el árbol de distancia como las redes de haplotipos muestran una división en dos haplogrupos con una separación importante entre ellos. Sin embargo, esta división no responde a una discriminación geográfica ya que ambos grupos están representados por individuos colectados tanto en el río Uruguay (en ambos tramos del río) como en el río Paraná. Los haplogrupos no tienen una correspondencia con los morfotipos observados; lo cual mostraría una gran plasticidad fenotípica de esta especie.

La identificación de dos poblaciones de boga en la cuenca baja del Río de la Plata tiene consecuencias en el manejo de la especie dado que cada una de ellas debe ser manejada de manera independiente. Dicho de otra manera, deben considerarse como dos unidades de explotación pesquera diferenciadas, es decir, unidades de manejo o stocks diferentes.

## 9. PERSPECTIVAS

---

Un estudio filogeográfico como el desarrollado en esta tesis constituye una base para la caracterización de las poblaciones de *L. obtusidens* y el conocimiento de la influencia de eventos históricos sobre éstas. Es importante abordar otros aspectos y profundizar en los factores históricos y ecológicos para lograr un mayor entendimiento acerca de la dinámica de estas poblaciones.

Para completar este estudio, sería interesante aumentar el esfuerzo de muestreo en aquellas zonas menos representadas, como por ejemplo el Paraná Superior y el río Negro. Un muestreo más detallado podría revelar la existencia de más unidades de manejo.

Si bien el uso de dos marcadores de ADN mitocondrial permitió obtener resultados con un mayor nivel de confianza, un resultado más robusto podría obtenerse utilizando marcadores nucleares. Sería importante la incorporación de microsatélites o de Polimorfismos Simples de Nucleótidos (SNPs) los cuales aportarían mayor resolución permitiendo revelar una posible subestructuración y evaluar la influencia de la represa de Salto Grande, con los cambios que esta produjo en el río, sobre la distribución de la diversidad genética de la boga. Así, la implementación de estos marcadores más sensibles a cambios recientes, permitiría evaluar si existe una diferenciación en el Uruguay Medio, donde, de acuerdo a los resultados del AMOVA, podría existir más de una población. En este sentido, Villanova et al. (2015) desarrollaron 20 marcadores de microsatélites para *L. obtusidens*, y mediante las técnicas de secuenciación masiva, en constante desarrollo, se pueden obtener miles de SNPs mediante un abordaje simple; ambas aproximaciones parecen el camino a seguir para terminar de comprender la estructura poblacional de la boga dentro de su rango de distribución.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

---

Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Contreras Balderas, S., Bussing, W., Stiassny, M. L. L., Skelton, P., Allen, G. R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J. V., Heibel, T. J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H. L., Reis, R. E., Lundberg, J. V., Sabaj-Pérez, M. H., Petry P. (2008). Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, 58(5), 403-414.

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6), 716-723.

Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9-17.

Avelino, G. S., Britski, H. A., Foresti, F., & Oliveira, C. (2015). Molecular identification of *Leporinus* from the south portion of South America. *DNA Barcodes*, 3(1), 98-109.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489-522.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.

Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.

Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.

Beerli, P. (2009). How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? pp. 42–79 in Population Genetics for Animal Conservation (Conservation Biology, Vol. 17), edited by Bertorelle, G., Bruford, M. W., Hauffe, H. C., Rizzoli A., & Vernesi C. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Begg, G. A., & Waldman, J. R. (1999). An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries research*, 43(1), 35-44.

Beheregaray, L. B., & Sunnucks, P. (2001). Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Molecular Ecology*, 10(12), 2849-2866.

Beheregaray, L. B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17(17), 3754-3774.

Bermingham, E., & Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7(4), 367-369.

Bracco, R., García-Rodríguez, F., Inda, H., del Puerto, L., Castiñeira, C., & Panario, D. (2011). Niveles relativos del mar durante el Pleistoceno final-Holoceno en la costa de Uruguay. El Holoceno en la zona costera del Uruguay. CSIC-UdelaR, Facultad de Ciencias, Montevideo, 65-94.

Britski, H. A., Birindelli, J. L. O., & Garavello, J. C. (2012). A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 52(37), 441-475.

Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., & Baer, A. (2003). *Migratory Fishes of South America. Biology Fisheries and conservation status*. 372 pp.

CARU (2009). Programa de conservación de la fauna íctica y los recursos pesqueros del río Uruguay. Informe anual 2009.

Chiari, L., & Sodr , L. M. K. (1999). Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi-Characiformes). *Genetics and molecular Biology*, 22(4), 517-523.

Cruzan, M. B., & Templeton, A. R. (2000). Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(12), 491-496.

da Silva Cortinhas, M. C., Kersanach, R., Proietti, M., Dumont, L. F. C., D'Incao, F., Lacerda, A. L. F., Prata, P. S., Matoso, D. A., Noletto, R. B., Ramsdorf, W., Boni, T. A., Prioli, A. J., & Cestari, M. M. (2016). Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 148-157.

Espinach Ros, A., Sverlij, S., Mestre, J. P., Fabiano, G., & Amestoy, F. (1990). Desplazamientos migratorios de peces marcados en el tramo inferior del r o Uruguay. *Comisión Administradora del Río Uruguay*. Publicaci n No. 4.

Espinach Ros, A., Sverlij, S., Amestoy, F., & Spinetti, M. (1998). Migration pattern of the sábalo *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) tagged in the lower Uruguay River. *Verhandlungen-Internationale Vereinigung f r theoretische und angewandte Limnologie*, 26, 2234-2236.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13(4), 853-864.

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.

Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Frantine-Silva, W., Almeida, F. S., & Sofia, S. H. (2015). Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation Genetics*, 16(1), 151-166.

Foti R., Spinetti M., Mesones C., & Grünwaldt P., (2008). Pesquerías Artesanales; en Programa de conservación de la fauna íctica y los recursos pesqueros del río Uruguay. Informe anual 2006. CARU–DINARA – INIDEP.

Fraser, D. J., & Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular ecology*, 10(12), 2741-2752.

Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.

Fuentes, C. M., Gómez, M. I., Brown, D. R., Arcelus, A., & Espinach Ros, A. (2016). Downstream Passage of Fish Larvae at the Salto Grande Dam on the Uruguay River. *River Research and Applications*, 32(9), 1879-1889.

Garavello, J.C., Britski, H.A. (2003). Family Anostomidae (Headstanders). In: Reis, Roberto E.; Kullander, Sven O.; Ferraris, Jr., Carl J. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 71-86.

Garcez, R., Calcagnotto, D., Almeida-Toledo, D., & Foresti, L. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(3), 268-275.

Gauldie, R. W. (1988). Tagging and genetically isolated stocks of fish: a test of one stock hypothesis and the development of another. *Journal of applied ichthyology*, 4(4), 168-173.

Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415-426.

Guillot, G., Mortier, F., & Estoup, A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes*, 5(3), 712-715.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, 41, 95-98.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., & Galetti Jr, P. M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126(1-2), 153-159.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hewitt, G. M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular ecology*, 10(3), 537-549.
- Iriondo, M. H. & Kröhling, D. M. (2008). Cambios ambientales en la cuenca del río Uruguay: desde dos millones de años hasta el presente. Colección Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, 358 pp.
- Jørgensen, H. B., Hansen, M. M., Bekkevold, D., Ruzzante, D. E., & Loeschcke, V. (2005). Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14(10), 3219-3234.
- Kimura, M. (1953). Stepping-stone model of population Annual Report of the National Institute of Genetics. Japan, 3, 62-63.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054.
- Laikre, L., Palm, S., & Ryman, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(2), 111-119.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Martins, C., Wasiko, A. P., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1), 33-38.

Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 2, 1-38.

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.

Moritz, C., & Faith, D. P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7(4), 419-429.

Narum, S. R., Contor, C., Talbot, A., & Powell, M. S. (2004). Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, USA. *Journal of Fish Biology*, 65(2), 471-488.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.

Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.

Nielsen, R. (2001). Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*, 86(6), 641-647.

Paolucci, E. M. (2002). Actividad reproductiva del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) y otras especies de interés comercial y deportivo en el río Uruguay Inferior, estimada por la abundancia de estadios larvales en la deriva. Tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Penchaszadeh, P. E., Darrigran, G., Angulo, C., Averbuj, A., Brogger, M., Dogliotti, A., & Pirez, N. (2000). Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846 (Anostomidae) in the Rio de la Plata, Argentina. *Journal of Shellfish Research*, 19(1), 229-232.

- Pereira, A. N., Márquez, A., Marin, M., & Marin, Y. (2009). Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *Journal of fish biology*, 75(2), 321-331.
- Petterson, J. C. E., Hansen, M. M., & Bohlin, T. (2001). Does dispersal from landlocked trout explain the coexistence of resident and migratory trout females in a small stream? *Journal of Fish Biology*, 58(2), 487-495.
- Piorski, N. M., Sanches, A., Carvalho-Costa, L. F., Hatanaka, T., Carrillo-Avila, M., Freitas, P. D., & Galetti Jr, P. M. (2008). Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4), 1039-1050.
- Poulsen, N. A., Nielsen, E. E., Schierup, M. H., Loeschcke, V., & GrønkJaer, P. (2006). Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Molecular ecology*, 15(2), 321-331.
- Quirós, R., & Cuch, S. (1989). The fisheries and limnology of the lower Plata Basin. In *Proceedings of the International Large River Symposium*. *Can Spec Publ Fish Aquat Sci* (Vol. 106, pp. 429-443).
- Ramirez, J. L., Carvalho-Costa, L. F., Venere, P. C., Carvalho, D. C., Troy, W. P., & Galetti, P. M. (2016). Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. *Journal of fish biology*, 88(3), 1204-1214.
- Ray, N., Currat, M., & Excoffier, L. (2003). Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1), 76-86.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., & Wolff, W. J. (2009). Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10(4), 361-395.

- Ricker, W. E. (1981). Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(12), 1636-1656.
- Ringuelet, R. A. (1975). Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. *Ecosur*, 2 (3), 1-122.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552-569.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sanches, A., & Galetti Jr. P.M. (2007). Genetic evidence of population substructuring in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Brazilian Journal of Biology*, 67, 889 -895.
- Sanches, A., Galetti Jr, P. M., Galzerani, F., Derazo, J., Cutilak-Bianchi, B., & Hatanaka, T. (2012). Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1), 177.
- Santos, M. C. F., Ruffino, M. L., & Farias, I. P. (2007). High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71(sa), 33-44.
- Schneider, S., & Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3), 1079-1089.
- Sidlauskas, B. L., & Vari, R. P. (2008). Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(1), 70-210.

Sivasundar, A., Bermingham, E., & Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10(2), 407-417.

Smith, M. F., & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149-177.

Soutullo, A. Clavijo, C., Martínez-Lanfranco, J. A. (2013). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. snap/dinama/mvotma y dicyt/mec, Montevideo, 222 pp.

Sverlij, S. B., & Espinach Ros, A. (1986). El dorado, *Salminus maxillosus* (Pisces, Characiformes) en el Río de la Plata y Río Uruguay inferior. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 6, 57-75.

Sverlij, S. B., Delfino Schenke, R. L., Espinach Ros, A., & López, H. L. (2013). Peces del Río Uruguay: Guía ilustrada de las especies más comunes del Río Uruguay inferior y el embalse de Salto Grande. Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437-460.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.

Templeton, A. R. (2005). Haplotype trees and modern human origins. *American Journal of physical anthropology*, 128(S41), 33-59.

Teixeira de Mello, F; González-Bergonzoni, I. & Loureiro, M. 2011. Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP, 188 pp.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

UICN 2008. (2008). (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) Red List of Threatened Species. ([www.uicnredlist.org](http://www.uicnredlist.org)).

Villanova, G. V., Vera, M., Díaz, J., Martínez, P., Calcaterra, N. B., & Arranz, S. E. (2015). Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) using 454 shotgun pyrosequencing. *Journal of fish biology*, 86(3), 1209-1217.

Waldman, J. R. (1999). The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research*, 43(1), 237-246.

Weir, B. S. (1996). *Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, MA, USA.

Weitzman, S. H., & Weitzman, M. (1982). Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory [South America].

Weitzman, S. H., & Vari, R. P. (1988). Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101(2), 444-465.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97-159.

Yang, Z. (2006). *Computational molecular evolution*. Oxford University Press.

Yoon, J. M., & Park, H. Y. (2002). Genetic similarity and variation in the cultured and wild crucian carp (*Carassius carassius*) estimated with random amplified polymorphic DNA. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(4), 470-476.

Zaniboni-Filho, E., & Schulz, U. H. (2003). Migratory fishes of the Uruguay River. Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status. In Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Ed.). Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. (pp. 157-194) Washington DC: World Fisheries Trust/World Bank/IDRC.

## 11. ANEXO I

Lista de individuos de *Leporinus obtusidens* trabajados en este estudio. Se indican: origen de la muestra y región del genoma amplificada. Los individuos se encuentran catalogados en la Laboratorio de Bioquímica de Organismos Acuáticos, DINARA - MGAP.

Muestra	Localidad	Cuenca	Amplificación Citocromo b	Amplificación Región Control
B-229	Ayolas	Paraná Medio	X	
B-362	Santa Fe	Paraná Inferior	X	X
B-372	Posadas	Paraná Medio	X	
B-390	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-392	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-393	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-489	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-500	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-501	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-502	Yapeyú	Uruguay Medio		X
B-506	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-511	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-514	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-517	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-523	Santo tome	Uruguay Medio		X
B-524	Santo tome	Uruguay Medio	X	X
B-526	Santo tome	Uruguay Medio	X	X
B-557	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-564	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-567	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-570	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-579	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-580	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	
B-582	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-624	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-629	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-631	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-636	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-637	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-638	Salto	Uruguay Inferior	X	X
B-639	Salto	Uruguay Inferior	X	
B-640	Salto	Uruguay Inferior	X	
B-643	Salto	Uruguay Inferior	X	
B-652	Ayuí	Uruguay Inferior	X	X
B-707	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-714	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-723	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
B-727	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
B-881	Arapey	Uruguay Medio	X	
B-900	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-904	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X

B-909	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-911	Villa Constitución	Uruguay Medio		X
B-916	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	
B-917	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-919	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-949	San Javier (Misiones)	Uruguay Medio	X	X
B-950	San Javier (Misiones)	Uruguay Medio	X	X
B-951	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-952	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-954	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-955	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-956	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-957	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-958	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-959	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-960	Villa Constitución	Uruguay Medio	X	X
B-961	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-963	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-964	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-965	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-967	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-968	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-970	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-971	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
B-972	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-973	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-974	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-975	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-976	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-977	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-978	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-979	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
B-980	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-981	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-982	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-983	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-993	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
B-996	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-997	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-998	La Concordia	Uruguay Inferior	X	X
B-1004	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1005	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1007	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1008	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1010	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-1011	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1012	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-1014	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1015	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1016	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1017	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X

B-1019	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	
B-1020	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1023	Nueva Palmira	Uruguay Inferior	X	X
B-1024	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1025	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1026	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1027	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1028	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1029	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1030	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1031	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1032	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1033	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1034	Mercedes	Uruguay Inferior	X	X
B-1036	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1037	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1038	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1039	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1040	Yapeyú	Uruguay Medio	X	
B-1041	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1042	Yapeyú	Uruguay Medio		X
B-1043	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1044	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1045	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1046	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1047	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1048	Yapeyú	Uruguay Medio	X	
B-1049	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1050	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1051	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1052	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1053	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1054	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1055	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1056	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1057	Yapeyú	Uruguay Medio	X	
B-1058	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1059	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1060	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1061	Yapeyú	Uruguay Medio	X	X
B-1062	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1063	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1064	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1065	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1066	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1067	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1068	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1069	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1070	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1071	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
B-1072	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X

<b>B-1073</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1074</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1075</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1076</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1077</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1078</b>	Mercedes	Río Negro	X	X
<b>B-1079</b>	Mercedes	Río Negro	X	X
<b>B-1080</b>	Mercedes	Río Negro	X	X
<b>B-1081</b>	Mercedes	Río Negro	X	X
<b>B-1082</b>	San Javier (Río Negro)	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1083</b>	San Javier (Río Negro)	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1084</b>	San Javier (Río Negro)	Uruguay Inferior	X	X
<b>B-1099</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1101</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1102</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1103</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1104</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1105</b>	Nuevo Berlín	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1108</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1110</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1113</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1114</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1115</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1119</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1120</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1121</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1123</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1124</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1125</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1127</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1128</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1129</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1130</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1131</b>	La Concordia	Uruguay Inferior	X	
<b>B-1133</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1134</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1135</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1138</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1140</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1141</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1142</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1143</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1144</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1146</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1147</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1149</b>	Paraná	Parana Inferior	X	X
<b>B-1153</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1154</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1155</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1157</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1158</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X

<b>B-1159</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1160</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1161</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1162</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1165</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X
<b>B-1166</b>	Rosario	Parana Inferior	X	X