



Universidad de la República

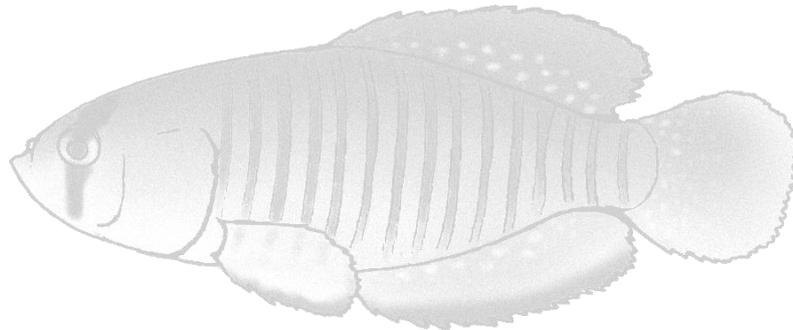
Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA

Subárea Zoología

Integración Metodológica aplicada a la Sistemática del grupo de especies

***"Austrolebias bellottii"* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**



Estudiante: Lic. Wilson Sebastián Serra Alanís

Orientadores: Dra. Graciela García, Dr. Marcelo Loureiro

Tribunal: Dr. Fernando Pérez Miles, Dra. Susana González, Dra. Leticia Bidegaray

Agosto de 2017

Agradecimientos

A mis familiares y amigos por el apoyo psicológico y los antiácidos ofrecidos en los momentos de mayor locura.

A mis tutores Graciela y Marcelo por su vasta o más bien infinita paciencia durante el largo y tortuoso desarrollo de mi formación académica.

A los integrantes del tribunal por su tiempo, gran disposición y aportes al desarrollo final de esta tesis.

A Inés y Fabrizio por el aguante, las semanas de terapia grupal e innumerables aportes durante el desarrollo y etapas finales de este proceso.

A Néstor por el autocontrol demostrado en los interminables meses de mi entrenamiento de laboratorio, y sus numerosos aportes a todo lo largo de la tesis

A las gemitas y jolgorianos por su ayuda en actividades tanto de campo como de laboratorio, y por obstruirme el paso cada vez que fantaseaba con la idea de escapar del sistema y no regresar nunca más.

A Luiz y Juliano de la UFRGS y a Matheus y Luis de Instituto Pró-Pampa, por su colaboración con la obtención y préstamos de los materiales procedentes de Rio Grande do Sul, así como fotografías de los animales vivos.

A la fermentación alcohólica por existir.

La investigación que da origen a los resultados de la presente tesis recibió para su desarrollo fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2014_1_102765, del Fondo Clemente Estable bajo el código FCE_1_2011_1_6884, y del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República - Ministerio de Educación y Cultura.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
El grupo de especies " <i>Austrolebias bellottii</i> "	3
Hipótesis	7
Objetivos Generales y Específicos	8
Materiales y Métodos	9
Estrategia general	9
Especímenes examinados	10
Análisis Genético	12
Análisis Morfológicos	22
Resultados	32
Análisis Genéticos	32
Análisis Morfológicos	49
Discusión	84
Análisis Genéticos	84
Análisis Morfológicos	91
Integración de resultados	95
Conclusiones y Perspectivas	103
Bibliografía	106
Anexos	117
Anexo 1: Ejemplares utilizados para los análisis genéticos	117
Anexo 2: Haplotipos obtenidos para el grupo <i>A. bellottii</i> s.s.	121
Anexo 3: Estructuración poblacional	122
Anexo 4: Lotes y descripción morfológica de cada uno de los grupos analizados ...	123
<i>Austrolebias bellottii</i>	123
<i>Austrolebias bellottii</i>	123
<i>Austrolebias apaii</i>	131
<i>Austrolebias</i> sp.1	139
<i>Austrolebias</i> sp.2	146
<i>Austrolebias melanoorus</i>	154
<i>Austrolebias univentripinnis</i>	163
<i>Austrolebias</i> sp.3	170

Resumen

El género de peces anuales *Austrolebias* fue revisado por Costa (2006), quien establece por primera vez una hipótesis filogenética para el género en su conjunto, y proponen una serie de agrupaciones de especies, una de las cuales fue denominada como “grupo *A. bellottii*”. La monofilia de dicho grupo fue basada en una serie de características morfológicas que resultan ser variables y/u homoplásicas respecto a las encontradas en otros clados. Por su parte, trabajos de sistemática molecular, señalan que el grupo tal y como fuera propuesto originalmente sería polifilético. A la problemática antes expuesta se suma la aparición de varias poblaciones potencialmente relacionadas al grupo por alguna de sus características morfológicas, pero que, por discordancias en cuanto a su morfología general o distribución geográfica despiertan dudas sobre su identidad específica. En este contexto el objetivo de esta tesis fue elaborar una nueva filogenia y caracterizar el grupo de especies *Austrolebias bellottii*, tomando en cuenta tanto información morfológica como genética. Mediante herramientas de la sistemática molecular se elaboró una nueva hipótesis filogenética del grupo basada en el gen mitocondrial citocromo b (Cyt-b), que incluyó a las poblaciones de *Austrolebias* formalmente descritas como parte del mismo y las potencialmente relacionadas. Además, con métodos automáticos como GMYC y ABGD, se propusieron especies hipotéticas a ser validadas tomando en cuenta el total de la información analizada. Por otro lado se realizó una revisión morfológica exhaustiva del grupo, haciendo hincapié en su morfometría, merística, osteología y patrones de coloración. Los análisis filogenéticos resultaron en una nueva hipótesis del grupo de especies *A. bellottii* que confirma la no monofilia del mismo como fuera propuesto por Costa. La nueva hipótesis fue apoyada por caracteres morfológicos. El grupo de especies *A. bellottii* en un sentido estricto estaría compuesto por 7 grandes linajes alopátricos, distanciados genéticamente entre un 3,3% y un 9,9%, y con baja estructuración genética entre sus poblaciones. De acuerdo con los métodos de delimitación automática, varios de estos linajes potencialmente corresponden a especies biológicas. Los métodos morfológicos logran hallar diferencias entre la mayoría de los integrantes de estos 7 linajes, excepto entre los denominados preliminarmente como *A. bellottii*, *A. apaii* y *Austrolebias* sp.1, y por otro lado *A. melanoorus* y *Austrolebias* sp.3. La integración de los distintos abordajes resulta en la propuesta de 5 especies, 3 de ellas formalmente reconocidas (*Austrolebias bellottii*, *A. melanoorus* y *A. univentripinnis*) y 2 nuevas para la ciencia (*Austrolebias* sp.2 y *Austrolebias* sp.3). Estas 5 especies se ordenarían en dos clados principales, “clado *A. melanoorus*” y “clado *A. bellottii*”. El “clado *A. melanoorus*” se ordena de la siguiente forma: *A. melanoorus* hermana de *Austrolebias* sp.3, y estas a su vez hermanas de *A. univentripinnis*. Por otro lado el “clado *A. bellottii*” presenta a *A. bellottii* compuesta por tres linajes, los que en su conjunto son parafiléticos respecto a *Austrolebias* sp.2. Por su parte *A. melanoorus* es morfológicamente críptica respecto a *Austrolebias* sp.3, y *A. bellottii* respecto a *A. univentripinnis*.

Introducción

Las especies son una de las unidades fundamentales en el la biología, son fundamentales para estudios en sistemática y los análisis comparativos en ecología, evolución, conservación y biogeografía (Agapow, 2005; Leaché & Fujita, 2012). Las mismas han sido y siguen siendo reconocidas en la inmensa mayoría de los casos en base a caracteres morfológicos, sin embargo el uso de caracteres genéticos se ha posicionado como una herramienta muy valiosa, que ha demostrado ser útil para el reconocimiento de linajes morfológicamente crípticos, varios de los cuales han sido elevados al estatus de especies (Rissler *et al.*, 2006). Por otra parte la especiación es un proceso continuo, lo cual implica que el uso de caracteres genealógicos irá acompañado de un cierto grado de incertidumbre (Leaché & Fujita, 2012). La problemática para el reconocimiento de especies es particularmente notoria en grupos que presentan “complejos de especies”, en los cuales estas son apenas distinguibles por caracteres morfológicos (Costa *et al.*, 2012), pero que a nivel genético pueden presentar evidencias de especiación múltiple simultánea, eventos de reticulado, introgresiones u otros (García *et al.*, 2009). Debido a esto el reconocimiento de las especies integrando abordajes de bases tanto morfológicas como genéticas se torna una necesidad (e.g.: Costa *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012; Novo *et al.* 2012; Puillandre *et al.*, 2012b), tanto para la comprensión de las mismas como de la diversidad biológica en su conjunto.

La existencia de complejos de especies ha sido documentada numerosas veces en peces de la familia Rivulidae, frecuentemente en géneros que presentan ciclo de vida anual (e.g.: *Hypsolebias* en Costa *et al.*, 2012; *Austrolebias* en García *et al.*, 2009 y García *et al.*, 2012). Este ciclo de vida único entre los vertebrados consiste en la deposición, por parte

de los adultos, de huevos resistentes a la desecación en el sustrato de las charcas temporales que habitan. Poco antes de secarse los adultos mueren, y cuando las condiciones ambientales vuelven a ser propicias los huevos que han permanecido latentes en el sustrato dan lugar a una nueva generación (Berois *et al.*, 2012). Debido a este tipo de hábitat tan particular en el que se encuentran y a su ciclo de vida, la dispersión de estos peces está bastante limitada y las poblaciones quedan aisladas con facilidad, lo que genera frecuentemente la diferenciación local de dichas poblaciones. En la región de la cuenca del Río de la Plata y sistema de lagunas Patos-Merín este grupo se halla representado principalmente por el género *Austrolebias* (Costa, 2006).

El género *Austrolebias* comprende unas 42 especies, distribuidas en el norte de Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay (Calviño *et al.*, 2016; Costa, 2006, 2014; García *et al.*, 2012; Loureiro *et al.*, 2011; Nielsen & Pillet, 2015; Volcan *et al.*, 2014). El género fue revisado por Costa en el año 2006, quien realiza una filogenia en base a caracteres morfológicos y propone cinco grupos de especies, algunos de los cuales considerará luego como subgéneros (Costa, 2008). El género se caracteriza por la ausencia de escamas en el espacio entre el borde de la boca y la región anterior del preopérculo y la porción ventral del opercular, urohial profundo, y una banda vertical oscura que atraviesa el ojo, y presentan un rango de tamaños que van desde los 35 a 150 mm de longitud estándar (Costa, 2006).

Grupo de especies “*Austrolebias bellottii*”

El grupo de especies “*Austrolebias bellottii*” (Clado A4) fue propuesto originalmente por Costa en el año 2006, para agrupar a todas las especies del género cuyas hembras presentaran radios medio-anteriores de la aleta anal alargados (“aleta triangular”):

Austrolebias melanoorus (Amato, 1986), *A. univentricipinnis* Costa & Cheffe, 2005, *A. vandenbergi* (Huber, 1995), *A. apaii* Costa, Laurino, Recuero & Salvia, 2006 (actualmente sinónimo junior de *A. bellottii* (Steindachner, 1881)), *A. bellottii* (Steindachner, 1881), *Austrolebias arachan* Loureiro, Azpelicueta & García, 2004, *A. viarius* (Vaz-Ferreira, Sierra-de-Soriano & Scaglia-de-Paulete, 1965), *Austrolebias charrua* Costa & Cheffe, 2001, *A. minuano* Costa & Cheffe, 2001, *A. adloffii* (Ahl, 1922), *A. nigrofasciatus* Costa & Cheffe, 2001, *A. nachtigalli* Costa & Cheffe, 2006, y *A. salviai* Costa, Litz & Laurino, 2006 (actualmente sinónimo junior de *A. reicherti* (Loureiro & García, 2004)). Sin embargo en la actualidad no existe consenso acerca de la composición del grupo, y las topologías de los árboles de parentesco entre sus especies difieren a veces de forma marcada en función de la metodología utilizada para la obtención de dichos árboles.

En el mismo trabajo Costa (2006) propone otro grupo anidado en el anterior, grupo de especies “*Austrolebias adloffii*” (Clado A5, Figura 1), definido en base a caracteres cromáticos, y que reuniría las últimas seis especies de las antes mencionadas. Un análisis filogenético posterior basado también en caracteres morfológicos (Costa, 2010), mantienen al “grupo *A. bellottii*” similar en su composición, pero incorporando a *Austrolebias patriciae* (Huber, 1995).

Por otro lado, las reconstrucciones filogenéticas basadas en caracteres moleculares (García *et al.*, 2002, 2012, 2014, Loureiro & García, 2008), apoyan solo parcialmente los resultados obtenidos en base morfológica. En líneas generales recuperan al grupo “*A. adloffii*” como un linaje no relacionado al resto del “grupo *A. bellottii*”, y este último incorporando a las especies del grupo “*A. robustus*” (Clado A1 en Costa, 2006). En cuanto

a *Austrolebias patriciae*, el trabajo de García *et al.* (2014) apunta a que sería una especie relacionada al “complejo de especies *A. alexandri*”, y no al “complejo *A. bellottii-robustus*”. Las distintas hipótesis en cuanto a conformación y relacionamientos del grupo han tenido distinto grado de aceptación e interpretación por otros autores, aunque todos parecen estar de acuerdo con la pertenencia de las siguientes especies en el grupo *A. bellottii*: *A. apaii*, *A. bellottii*, *A. melanoorus*, *A. vandenbergi* y *A. univentripinnis*.

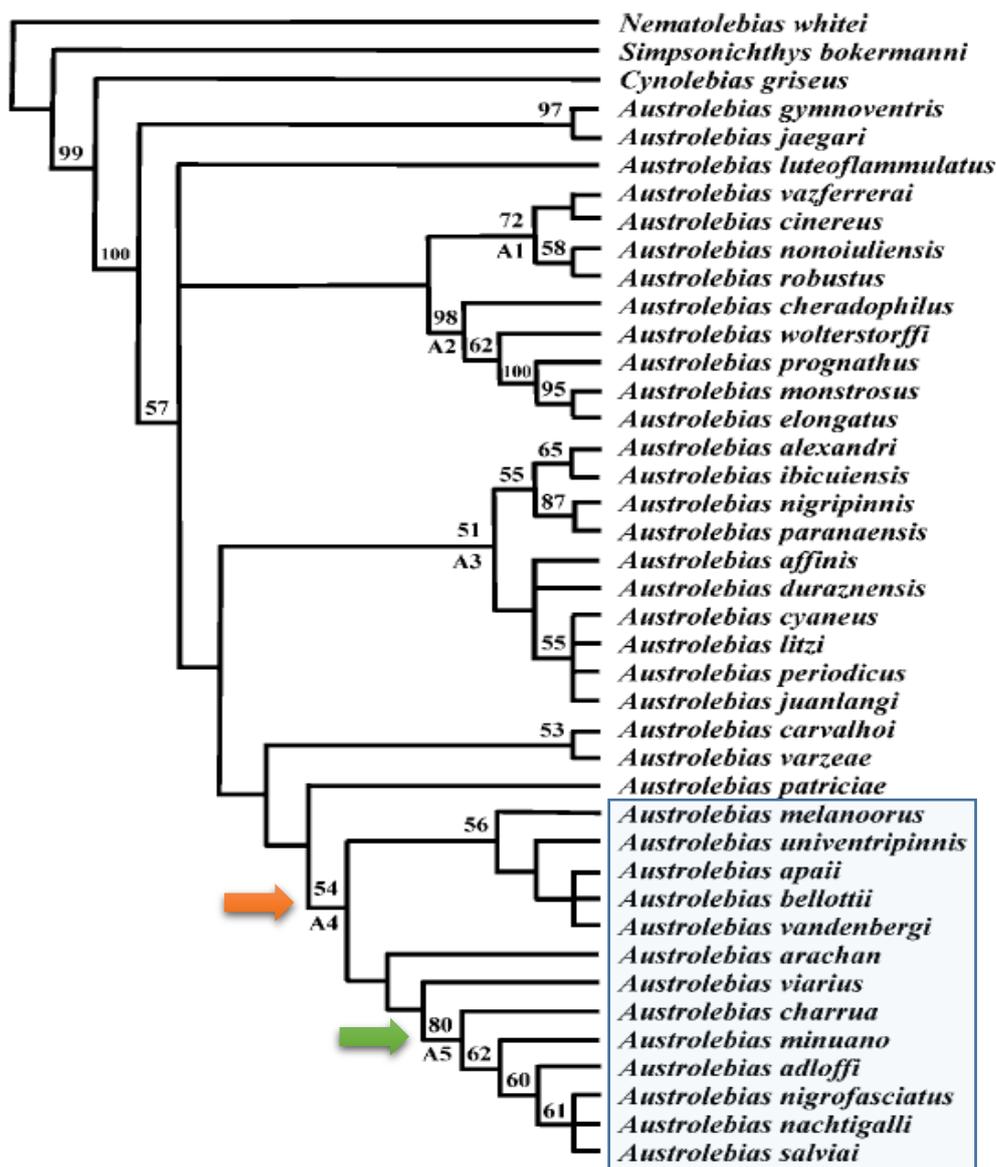


Figura 1. Reconstrucción filogenética del género *Austrolebias* tomado de Costa (2006). Árbol consenso estricto basado en caracteres morfológicos. Flecha anaranjada = Clado A4 “grupo *bellottii*”; flecha verde = Clado A5 “grupo *adloffii*”.

Además de la ya mencionada falta de consenso respecto a la conformación y relacionamiento del grupo, se suma el problema de la dudosa validez de alguno de sus taxa y la posibilidad de existencia de especies aún no reconocidas.

García y colaboradores publican en el 2012 un trabajo filogeográfico cuyo foco fueron las especies *Austrolebias apaii* y *A. bellottii*. En dicho trabajo se postula que ambos taxa serían sinónimos, lo que es formalizado por Calviño *et al.* (2016). Por otra parte presentaría tres linajes bien diferenciados, distribuidos a grandes rasgos uno en la cuenca del Río Uruguay, otro en la cuenca del Río Paraná, y el tercero en las cuencas platenses y atlánticas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (García *et al.*, 2012). La validez de *Austrolebias accorsii*, también resulta dudosa. Fue descrita por Nielsen & Pillet (2015), con ejemplares de acuario provenientes de la zona alta del Río Mamoré (cuenca amazónica) en Bolivia, y propuesta como integrante del grupo “*A. bellottii*”. Alonso *et al.* (2016) cuestionan algunos de los caracteres diagnósticos propuestos para distinguirla de *A. vandenbergi*, dado que los mismos fueron definidos en base a ejemplares senescentes, y en fotografías de ejemplares topotípicos adultos jóvenes F1 estos no se hallan presentes.

También en años recientes varias poblaciones morfológicamente similares a algunas de las especies antes mencionadas han sido halladas en Uruguay y Brasil, en la zona alta del Río Negro (cuenca del Río Negro), humedales del Río Queguay (cuenca del Río Uruguay) y la zona media y alta del Río Yaguarón (cuenca de la Laguna Merín). Varias de estas fueron consideradas como pertenecientes a alguno de los taxa previamente descriptos (Serra *et al.*, 2014; Volcan *et al.*, 2011, 2015), pero su localización geográfica lejana e

inconsistencias en algunos de sus caracteres morfológicos de tipo diagnósticos han llevado a dudar de la identidad de dichas poblaciones.

La correcta delimitación de los taxa en estudio, asumiendo diferentes conceptos de especie y la obtención de filogenias robustas y abarcativas, es de gran importancia para el desarrollo de una gran variedad de áreas del conocimiento. En el caso de las especies del género *Austrolebias* este tipo de trabajos resultan de vital importancia, no solo porque son utilizadas como organismos modelo para estudios evolutivos, ecológicos, de biología del desarrollo y biogeográficos (entre otros) (Berois *et al.*, 2014), sino porque además se trata de un grupo con gran cantidad de especies prioritarias para la conservación, tanto a nivel nacional como global (Loureiro *et al.*, 2007, 2013; Volcan *et al.*, 2009, 2010, 2015). En tal sentido la correcta delimitación de los taxa que lo componen es el primer paso para la elaboración y puesta en práctica de medidas de manejo. La presente tesis abordará dicha problemática con un enfoque multidisciplinario, utilizando evidencia morfológica (morfometría, merística y patrones de coloración) y molecular (marcador citocromo b), teniendo por objetivo principal la elaboración de una nueva filogenia y definición del grupo de especies *A. bellottii*.

Hipótesis.

Las especies del grupo *Austrolebias bellottii sensu* Costa (2006) conforman un linaje monofilético.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo general: Elaborar una nueva filogenia y caracterizar el grupo de especies *A. bellottii*, tomando en cuenta tanto información morfológica como genética.

Objetivos específicos:

- 1 – Elaborar una hipótesis filogenética basada en caracteres moleculares, que incluya las poblaciones de *Austrolebias* formalmente descritas y las potencialmente relacionadas al grupo (“grupo *A. robustus*” y spp. de las cuencas de los ríos Queguay, Negro y Yaguarón), y elaborar una hipótesis inicial de unidades específicas.
- 2 – Analizar morfológicamente los individuos de poblaciones englobadas dentro del grupo “*A. bellottii sensu stricto*”, que fuera recuperado en el análisis anterior.
- 3 – Discutir el conjunto de los datos para lograr una interpretación holística de la composición específica del grupo y relacionamiento entre sus especies.

Materiales y Métodos

Estrategia general

La problemática de la composición, reconocimiento y relacionamiento del grupo de especies *Austrolebias bellottii* fue abordada en tres etapas:

La primera etapa consistió en el uso de herramientas de la sistemática molecular. Se procedió inicialmente a delimitar el grupo para circunscribir los análisis posteriores a los taxa que queden efectivamente englobados dentro del mismo. Posteriormente se realizaron análisis más detallados de estos, con el fin de intentar establecer unidades taxonómicas operativas moleculares (MOTUs). Los resultados de esta etapa se contrastaron con los obtenidos de los análisis morfológicos.

La segunda etapa consistió en el uso de herramientas de la taxonomía clásica, basada en morfología y otros caracteres fenotípicos. Se tomaron individuos del grupo definido en la etapa anterior como “grupo *A. bellottii sensu stricto*”, y se los separó en siete unidades que fueron analizadas y caracterizadas fenotípicamente de forma exhaustiva. Estas siete unidades se definieron *a priori* considerando características fenotípicas externas, distribución geográfica y aspectos generales de la biología del grupo.

Finalmente se integraron y discutieron los resultados obtenidos bajo los distintos abordajes.

Especímenes examinados

Los individuos trabajados en la presente tesis corresponden a ejemplares diagnosticados morfológicamente como pertenecientes al grupo de especies *A. bellottii*. Para los análisis se consideraron las siguientes unidades taxonómicas operativas: *Austrolebias melanoorus* (procedentes de la cuenca del Río Tacuarembó), *Austrolebias univentripinnis* (provenientes de la cuenca del Río Yaguarón medio y bajo), *Austrolebias bellottii* (de las cuencas asociadas al Río de la Plata y Océano Atlántico en la Provincia de Buenos Aires, Argentina), *Austrolebias apaii* (entendida como las *A. bellottii* de la cuenca del Río Uruguay y costa platense uruguaya), *Austrolebias* sp.1 (provenientes de la región media del Río Paraná en Argentina, y consideradas actualmente como *A. bellottii*), *Austrolebias* sp.2 (originaria de la cuenca del Río Queguay y que preliminarmente no coincide cromáticamente con ninguna de las especies conocidas) y *Austrolebias* sp.3 (actualmente considerada como *A. melanoorus* pero distribuida en la zona alta de los ríos Negro y Yaguarón). (Figura 2)

La información de los individuos utilizados en análisis genéticos se detalla en la Tabla 1 del Anexo 1. Los ejemplares de referencia se hallan depositados en las siguientes colecciones biológicas: Facultad de Ciencias de la UdelaR (ZVC-P y GP) y Universidad Federal de Río Grande do Sul (UFRGS). Con fines comparativos se trabajó también con ejemplares pertenecientes a otros grupos, los que se listan al final de la misma tabla. Adicionalmente se utilizaron secuencias provenientes de la base de datos GenBank, las que se listan en la Tabla 2 del Anexo 1. *Austrolebias accorsii* no fue incluida en los análisis genéticos debido a que no se pudo conseguir material de la misma.

Para los análisis morfológicos se trabajó con ejemplares pertenecientes a las colecciones ictiológicas de la Facultad de Ciencias de la UdelaR (ZVC-P), del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MHNM) y de la Universidad Federal de Río Grande do Sul (UFRGS). La información vinculada a los lotes se detalla en el Anexo 4.

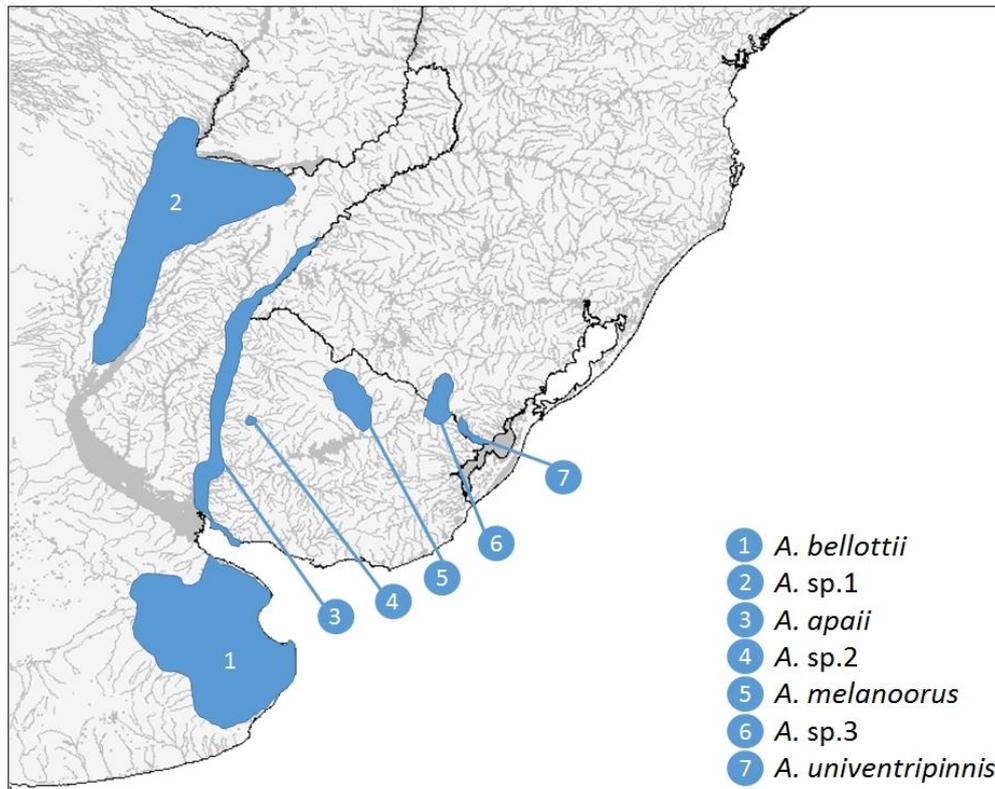


Figura 2. Distribución geográfica aproximada de las 7 unidades taxonómicas operativas consideradas en los análisis.

Análisis genético

Extracción de ADN total

La estrategia de extracción de ADN apuntó a obtener datos de 10 individuos por localidad (charco). Las extracciones de ADN total se realizaron siguiendo un protocolo modificado a partir del propuesto por Medrano *et al.* (1990). El proceso requiere de alrededor de una semana, con tres días de trabajo. En el primer día se realizaron dos lavados del tejido con un mililitro de buffer STE 1X (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8; 1 % SDS y 100 mM NaCl) pH 8 en frío (4°C), luego se le agregó 550 µl de buffer de lisis pH 8 (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1 % SDS y 100 mM NaCl) y finalmente 11 µl de Proteinasa K (10 mg/ml). A continuación se homogeneizó mecánicamente el tejido y se lo dejó incubando en durante una noche en estufa a 55°C. En el segundo día, una hora antes de finalizar la incubación se le agregó 6 µl de ARNasa (10mg/ml). Finalizada la incubación, se centrifugó por 10 minutos a 12.000 rpm, a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 5M para obtener una concentración final de NaCl 2M, esta mezcla fue centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante fue transferido a un nuevo tubo y se le agregó el doble de volumen de etanol absoluto en frío, estas dos mezclas no se homogenizan, formando dos fases. El tubo con la mezcla fue agitado lentamente, para mezclar las dos fases y fue dejado por 48 horas a 4°C a fin de que el ADN completara la precipitación. En el tercer día la muestra fue centrifugada durante 30 minutos a 12.000 rpm, a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces el precipitado con etanol 70 %, luego de cada lavado se realizó una centrifugación de 5 minutos a 6.000 rpm, a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se dejó secando

durante una hora en estufa a 55 °C, luego se resuspendió en 100 µl de buffer TE 1X (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA) y finalmente, luego de un baño a 65°C durante 20 minutos se conservó a -20°C.

La calidad del ADN extraído se testeó mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa (Sigma) 1% en buffer TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1L): 242g de Tris-base, 57,1mL de ácido acético glacial y 10mL de 0,5M EDTA pH 8), conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 5µL/100mL. En cada caso se sembró 5 µL del ADN genómico extraído con 2µL de buffer de corrida (Bromophenol Blue y Xylene Cyanol FF: 0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF y 30% Glycerol en agua). La corrida se realizó durante 40 minutos a 80 V y 150 mA.

Elección del marcador

Fue escogido para su amplificación y análisis el gen mitocondrial Citocromo b (Cyt-b), debido principalmente a la gran cantidad de secuencias pertenecientes al género *Austrolebias* ya depositadas en GenBank (ca. 140), y a que ha demostrado ser útil para resolver relaciones entre taxa con diferentes niveles de divergencia.

Amplificación y secuenciación de Cyt-b

Para la amplificación de las secuencias se utilizaron los oligonucleótidos universales GludgL (5'TGACTTGAARAACCAAYCGTTG3') y CB3H (5'GGCAAATAGGAARTATCATTC3') (Palumbi *et al.*, 1991), que amplifican fragmentos de aproximadamente 800 pares de bases. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador automático (PTC-100, MJ Research, Inc.). Para un volumen de 20µL se utilizaron 2µL del ADN genómico extraído de las muestras analizadas (126-216 ng de ADN), 2µL de buffer 10X, 0,6 a 0,8

μL MgCl_2 50mM, 0,4 μL de dNTPs 10mM, 1,0 μL de CB₃H y Gludg-L 10 μM y 0,2 μL de polimerasa Taq (5U/ μL). El programa utilizado consistió en el siguiente perfil de PCR: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 4 ciclos con desnaturalización a 94°C/1 min, *annealing* a 45°C/1 min y extensión a 72°C/1 min; 29 ciclos con desnaturalización a 94°C/1 min, *annealing* a 50°C/1 min y extensión a 72°C/1 min; extensión final a 72°C/7 min. El producto de PCR fue analizado mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 2%, en las condiciones que ya fueron detalladas. En este caso, además de sembrar 5 μL del producto de PCR junto a 2 μL de buffer de carga, se corrieron 3 μL del marcador de peso molecular (1kb ladder digerido con Hinf 1) (Invitrogen) junto con 2 μL de buffer de corrida. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en un solo sentido usando el primer CB₃H en los servicios comerciales de Macrogen Inc. con un Secuenciador Automático Perkin-Elmer ABI Prism 377 (MACROGEN, Seúl, Corea).

Alineamiento y edición

La edición de las secuencias se realizó de modo manual en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), tomando en cuenta los respectivos cromatogramas. El alineamiento de las secuencias se realizó de forma automática utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), implementado en el mismo programa, posteriormente se ajustó de modo manual y se verificó la ausencia de codones de terminación.

Delimitación del grupo de especies *A. bellottii* y análisis filogenéticos

Para circunscribir los análisis posteriores se realizaron reconstrucciones filogenéticas donde fueron incorporadas secuencias de la mayor variedad posible de especies del género *Austrolebias*, sumado a secuencias de individuos de algunas de las poblaciones

incógnita trabajadas en esta tesis. Como grupos externos se tomaron secuencias pertenecientes a especies de los géneros *Hypsolebias* (género cercanamente relacionado a *Austrolebias*) y *Notholebias* (género perteneciente a otra subfamilia dentro de la familia Rivulidae) (Anexo 1, Tablas 1 y 2).

El set de datos final de esta etapa constó de unas 44 secuencias de aproximadamente 748 bp. Se utilizaron dos métodos de reconstrucción filogenéticos, uno basado en modelos de evolución molecular (Máxima Verosimilitud) y otro no basado en modelos de evolución molecular (Máxima Parsimonia). La búsqueda y selección de modelos de evolución molecular que mejor ajustaran al set de datos fue implementada en el programa MEGA6, basado en el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (Schwarz, 1978; Tamura *et al.*, 2011).

El análisis de Máxima Parsimonia (MP) fue implementado en el programa MEGA6. La búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó en dos etapas, en la primera se construyó un árbol en base al algoritmo de intercambio de vecinos más cercanos (Nei & Kumar 2000), y posteriormente se aplicó el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting.

El análisis de Máxima Verosimilitud (ML) fue implementado en el programa MEGA6, en base al modelo previamente seleccionado de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985), con distribución gamma y sitios invariables. El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido tras aplicar el algoritmo BioNJ (Gascuel, 1997) a la matriz de distancias pareadas estimada usando *Maximum Composite Likelihood*.

Posteriormente el árbol fue refinado usando el algoritmo de intercambio de vecinos cercanos.

El grado de confianza asignado a los nodos en los árboles (tanto MP como ML) se evaluó mediante *bootstrapping* con 1000 pseudoréplicas. Valores iguales o mayores a 50% y 75% respectivamente fueron considerados robustos. Los valores de bootstrap de ML fueron obtenidos por el algoritmo nearest neighbor interchange (NNI).

Se consideró como “grupo *A. bellottii sensu stricto*” al grupo monofilético con soporte robusto que incluyera a la especie *Austrolebias bellottii*, y que no presentara anidados a alguno de los otros grupos de especies formalmente reconocidos (e.g.: grupo de especies *Austrolebias robustus*).

Habiendo circunscripto el grupo *A. bellottii* se procedió con las reconstrucciones filogenéticas, donde fueron considerados (idealmente) 10 individuos de cada una de las poblaciones englobadas en el grupo *A. bellottii*. Como grupo externo se tomaron secuencias de *Austrolebias vanderbergi*, *Austrolebias nachtigalli*, *Austrolebias nigripinnis*, de especies del grupo “*Austrolebias robustus*”, y *Plesiolebias glaucopterus* (Anexo 1, Tablas 1 y 2).

Se utilizaron distintos métodos de reconstrucción filogenéticos, dos basados en modelos de evolución molecular (Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) y otro no basado en modelos de evolución molecular (Máxima Parsimonia). La búsqueda y selección de

modelos de evolución molecular que mejor ajustaran a los sets de datos fue implementada en el programa MEGA6, basado en el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (Schwarz, 1978; Tamura *et al.*, 2011).

Los análisis de Máxima Parsimonia (MP) fueron implementados en el programa MEGA6. Los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) fueron implementados en el programa MEGA6, en base al modelo previamente seleccionado de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985), con distribución gamma. El grado de confianza asignado a los nodos en los árboles (tanto MP como ML) se evaluó mediante *bootstrapping* con 1000 pseudoréplicas. Valores iguales o mayores a 50% y 75% respectivamente fueron considerados robustos. Los valores de bootstrap de ML fueron obtenidos por el algoritmo *nearest neighbor interchange* (NNI).

En cuanto al modelo de Inferencia Bayesiana (IB), los soportes de probabilidad posterior fueron calculados mediante cadenas de Markov de Monte Carlo. Este análisis fue implementado con el paquete informático BEAST 1.8.2 (Drummond & Rambaut 2007) asumiendo el modelo de árbol a priori “Yule process”, y con el modelo evolutivo HKY con distribución gamma. La longitud de las cadenas fue de 10 millones de generaciones, con un muestreo de 1 cada 1000. La convergencia de las cadenas de Markov de Monte Carlo en una distribución estacionaria para todos los parámetros fue verificada mediante el programa TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2009). La búsqueda del árbol consenso se realizó con el programa TreeAnnotator 1.8.2 (Rambaut & Drummond 2011), 10% árboles fueron utilizados como burn-in, mientras que el resto sirvieron para la búsqueda. Para la datación de dicha reconstrucción filogenética se utilizó el reloj

molecular estricto, con una tasa evolutiva ajustada para ectotermos (Avice, 1994) de 0.02 mutaciones por sitio por millón de años (Brown *et al.*, 1979), para datar los nodos. Esta tasa de evolución ha sido utilizada con anterioridad para peces anuales (García *et al.*, 2012, 2014).

Delimitación de especies

Se propusieron hipótesis de especies mediante dos aproximaciones diferentes basadas en el uso de un único locus, General Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons *et al.*, 2006) implementado en la plataforma R con los paquetes APE (Paradis *et al.*, 2004) y SPLIT (Ezard *et al.*, 2009) a partir del árbol generado en BEAST, y Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012) disponible en línea (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). Ambos métodos son ampliamente utilizados para establecer hipótesis primarias de especies, con grado variable de concordancia respecto a resultados con base morfológica dependiendo del grupo biológico estudiado (Kekkonen *et al.*, 2015), aunque por regla general GMYC tiende a la sobreestimación de especies.

La primera de estas aproximaciones (GMYC) asume la “evolución independiente” de las especies. Se basa en la predicción de que esta evolución independiente comienza con la aparición de agrupaciones genéticas distintas, y que estas agrupaciones se encuentran separadas por ramas internas largas en una filogenia. El método delimita *clusters* genéticos similares, optimizando el grupo de nodos que definen la transición entre procesos inter e intraespecíficos. La optimización procede buscando la solución más probable para un modelo que combina la diversificación entre especies (basado en el

modelo de Yule, Nee *et al.*, 1994) y el ramificado genealógico dentro de una especie (basado en coalescencias neutrales, Hudson, 1990) (Fujisawa & Barraclough, 2013).

La segunda aproximación (ABGD) se basa en la asunción de que en la distribución de diferencias pareadas entre todas las secuencias de un set de datos típicos de los utilizados para *barcoding*, uno puede observar un *gap* entre la diversidad intraespecífica y la diversidad interespecífica (*barcode gap*). Este *gap* aparece cuando la moda de la distribución de la divergencia intraespecífica es menor que la(s) moda(s) de la divergencia interespecífica. En una primer etapa el método encuentra de forma automática el *gap* que divide la distribución entre la moda más significativa a valores bajos de esa distribución y la que le sigue. Habiendo detectado este valor umbral igual al valor del *gap*, el programa pasa a una segunda etapa donde computa una primera partición de candidatos a especie (por debajo del valor umbral dos secuencias serán consideradas como pertenecientes al mismo grupo, y por encima del mismo se considerarán de grupos diferentes). Finalmente vuelve a repetir el procedimiento sobre cada una de las agrupaciones hasta que no sucedan más divisiones (Puillandre *et al.*, 2012). Para el set de datos de esta tesis se utilizaron los parámetros por defecto (ancho relativo del *gap* = 1.5; divergencia intraespecífica mínima y máxima a priori = 0.001 y 0.100, respectivamente), salvo para el cálculo de distancias para lo que se seleccionó el modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980).

Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Para los distintos subgrupos definidos *a priori* dentro del “grupo *A. bellottii*” se contabilizó el número de sitios variables, los sitios filogenéticamente informativos y promedio de sitios segregantes (**S**). También se halló la tendencia general de transiciones/transversiones (**r**), y se realizó análisis de distancias intragrupo según el modelo Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980). Estos análisis fueron efectuados en el programa MEGA6. El Número de Haplotipos (**h**), Diversidad Haplotípica (**Hd**) (Nei, 1987), diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987), test de neutralidad de Tajima (**D**) (Tajima, 1989), y el test de neutralidad de Fu (**F_s**) (Fu, 1997), fueron realizados en el programa DnaSP versión 5.10 (Librando & Rozas, 2009). Las distancias pareadas entre los grupos fueron calculadas con el programa MEGA6.

Los haplotipos dentro del grupo “*A. bellottii sensu stricto*” fueron determinados usando el programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). En base a esta definición de haplotipos se construyó una red de haplotipos usando el programa PopART (<http://popart.otago.ac.nz>), para dicho análisis se utilizó el algoritmo Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999).

En base a los haplotipos definidos anteriormente se estimó el patrón de estructura poblacional para el grupo, mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) implementado en el programa Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La significación de los componentes de la varianza se calculó mediante 1000 permutaciones no paramétricas. Las poblaciones fueron definidas teniendo en cuenta las cuencas hidrográficas de origen de las muestras: Río Paraná (P), Río Uruguay (U), Río de la Plata

en Provincia de Buenos Aires (BA), Río Queguay (Q), Río Tacuarembó (T), Río Negro Alto (N), Río Yaguarón Alto (Ya) y Río Yaguarón Bajo (Yb) (Figura 3). Se probaron varias hipótesis de agrupación las que se detallan en la Tabla 1 del Anexo 3.

En el mismo programa se realizó un análisis de Fst pareados (Wright, 1951); para la significancia de este estudio se utilizaron 100 permutaciones.

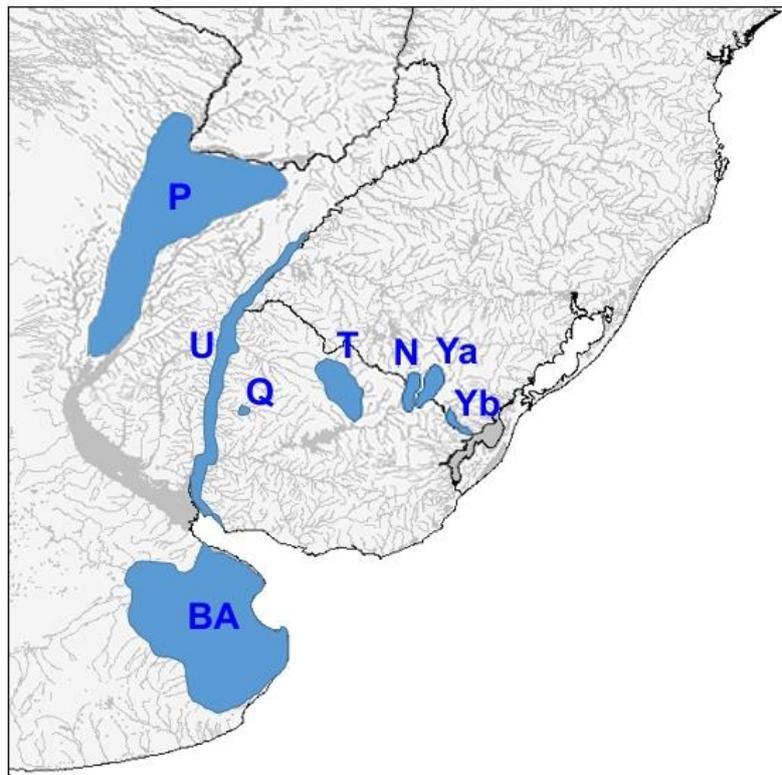


Figura 3. Unidades consideradas para los análisis de estructuración poblacional: Río Paraná (P), Río Uruguay (U), Río de la Plata en Provincia de Buenos Aires (BA), Río Queguay (Q), Río Tacuarembó (T), Río Negro Alto (N), Río Yaguarón Alto (Ya) y Río Yaguarón Bajo (Yb).

Análisis Morfológico

Morfometría lineal

Las medidas corporales fueron tomadas con calibre digital (resolución 0.01 mm), siguiendo en líneas generales la metodología utilizada por Costa (1995, 2006) (Figura 4). Las proporciones corporales se expresan como porcentajes en relación al Largo Estándar (%SL), con la excepción de las proporciones de la cabeza, las que se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza (%HL). Adicionalmente se tomó para ejemplares hembra la medida “altura máxima de la aleta anal”, correspondiente a la extensión del radio más largo de dicha aleta. Esta última medida también es expresada en función del largo estándar.

Los análisis y gráficos se realizaron utilizando el programa PAST 3.14 (Hammer *et al.*, 2001). Dado el marcado dimorfismo sexual, machos y hembras fueron trabajados por separado. Cada variable morfométrica fue analizada por separado. Inicialmente se calcularon los estadísticos básicos (mínimo, máximo, media y desvío estándar). Las variables en la que los datos cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), y posteriormente se utilizó una prueba Post Hoc de Tukey HSD para evaluar las diferencias entre los grupos. Las variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Dicho test basado en medianas no requiere del cumplimiento del supuesto de normalidad, y si bien técnicamente asume homogeneidad de varianza, el no cumplimiento de dicha asunción parece tener poco impacto (Logan, 2010). De forma similar a la prueba de ANOVA, el test de Kruskal-Wallis no nos dice qué grupos son diferentes en la mediana, para esto se

utilizó una prueba Post Hoc de Mann-Whitney. Los p-valores de esta prueba son mostrados con corrección por Bonferroni, por ser considerados más conservadores.

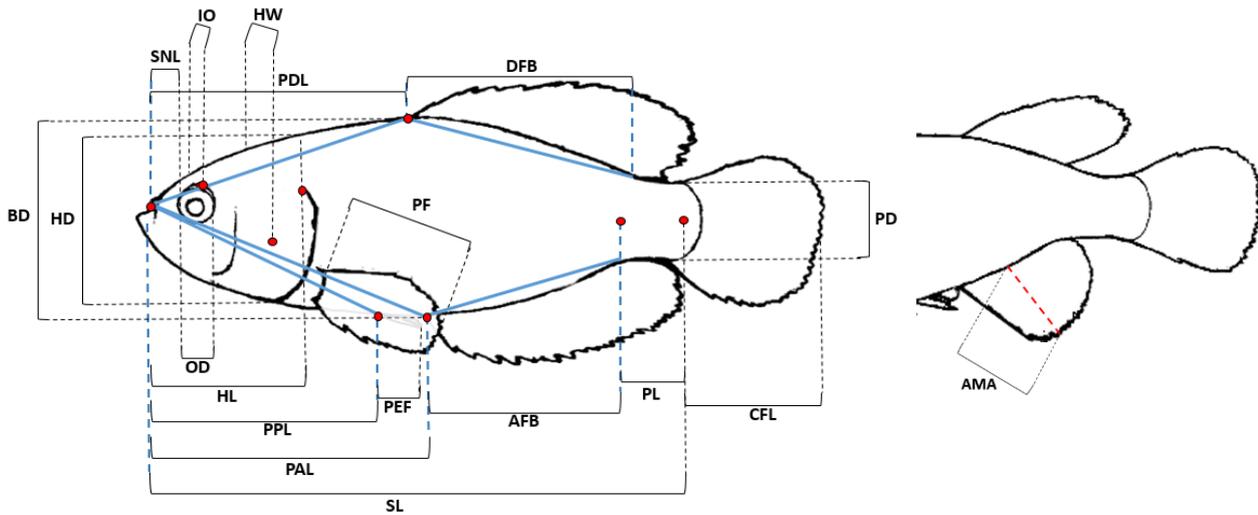


Figura 4. Medidas lineales consideradas: **AFB** - base de la aleta anal; **AMA** – altura máxima de aleta anal en hembras; **BD** – altura del cuerpo; **CFL** - largo de aleta caudal; **DFB** – base de la aleta dorsal; **HD** – alto de la cabeza; **HL** – largo de la cabeza; **HW** – ancho de la cabeza; **IO** – distancia interorbital; **OD** – diámetro del ojo; **PAL** – longitud pre-anal; **PD** – alto del pedúnculo; **PDL** – longitud pre-dorsal; **PEF** – longitud de las aletas pélvicas; **PF** – longitud de la aleta pectoral ; **PL** – largo del pedúnculo caudal; **PPL** – longitud pre-pélvica; **SL** – longitud estándar; **SNL** – largo del hocico.

Morfometría geométrica

La variación en la forma (“shape”) fue analizada a través de datos morfométricos utilizando marcos anatómicos homólogos (“landmarks”) del cuerpo de los ejemplares. Se seleccionaron 15 de estos marcos anatómicos para describir la forma general del cuerpo, los que se hallan detallados en la Figura 5. Las imágenes digitales fueron obtenidas con un escáner Microtek modelo ScanMaker4700. La digitalización de los marcos anatómicos y posterior tratamiento de los archivos previo a su análisis se realizó mediante el paquete de programas TPS.

Para cada ejemplar, cada uno de los marcos anatómicos quedaron definidos por coordenadas cartesianas ($x;y$), que luego fueron alineadas mediante una técnica de mínimos cuadrados conocida como superposición de Procrustes. En la misma, las configuraciones de los marcos anatómicos se rotan, trasladan y escalan, para retirar de los datos información tal como orientación, posición en la imagen y tamaño respectivamente. Este proceso de superposición produce un conjunto de coordenadas que localizan a cada espécimen en una superficie curva (Bookstein, 1991, Monteiro & Reis, 2000). Para proyectar los especímenes en un espacio de tangente lineal, de modo que la variación y covariación puedan ser analizadas con técnicas estadísticas multivariadas lineales, se utilizó la aproximación “thin plate spline” y de componentes uniformes (Bookstein, 1991). El resultado es un nuevo conjunto de variables contenidas en una nueva matriz, llamada matriz de peso (matriz de “partial warps” o “desplazamientos parciales”).

Una vez obtenida la matriz de peso se realizó sobre ésta un análisis discriminante, para analizar la importancia de los marcos anatómicos en el agrupamiento de los individuos en los distintos linajes. El propósito del análisis discriminante es explorar las diferencias entre grupos definidos a priori, estableciendo nuevos sistemas de coordenadas (variables canónicas) mutuamente ortogonales, buscando cuáles discriminan mejor los grupos, lo que no necesariamente coincide con las que presentan mayor variación (Manly, 2005; Zelditch *et al.*, 2004). El análisis antes mencionado fue llevado a cabo en el programa MorphoJ versión 1.05f (Klingenberg, 2011), y se realizó únicamente con fines exploratorios a modo de complemento con los morfométricos lineales.

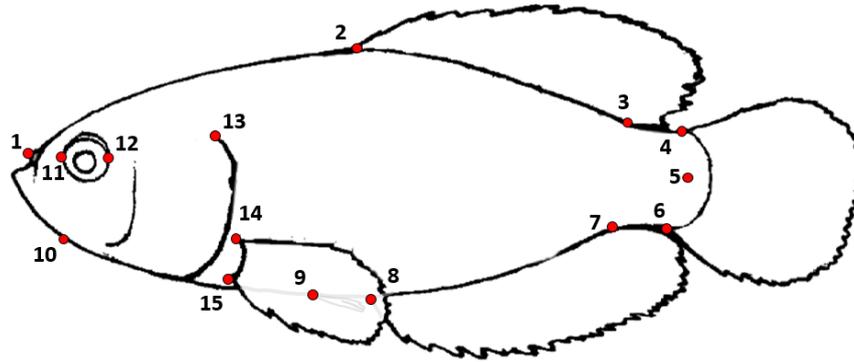


Figura 5. Marcos anatómicos considerados: **1** – punta del hocico; **2** – origen de la aleta dorsal; **3** – final de la aleta dorsal, **4** – origen dorsal de la aleta caudal; **5** – final del pedúnculo caudal; **6** – origen ventral de la aleta caudal; **7** – final de la aleta anal; **8** – origen de la aleta anal; **9** – origen de la aleta pélvica; **10** – unión de los ceratohiales con el basihiel; **11** – margen anterior del ojo; **12** – margen posterior del ojo; **13** – inserción del opérculo en la cabeza; **14** – origen dorsal de la aleta pectoral; **15** – origen ventral de la aleta pectoral.

Otras proporciones corporales

Además de las características ya detalladas se analizaron las siguientes proporciones relativas:

- 1) Para ambos sexos posición relativa del extremo distal de la aleta pectoral cuando es extendida posteriormente, respecto a diferentes estructuras de la región inferior del cuerpo (inicio de aletas pélvicas, papila urogenital, radios anales 1°, 2°, 3°, ..., n°).
- 2) Para ambos sexos posición relativa del extremo distal de las aletas pélvicas cuando son extendidas posteriormente, respecto a diferentes estructuras de la región inferior del cuerpo (papila urogenital, radios anales 1°, 2°, 3°, ..., n°).

Con el fin de poder hacer un análisis estadístico básico, la posición de las estructuras de la región inferior del cuerpo fue codificada como se señala en la Figura 6. Las variables fueron analizadas mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, y la diferencia entre grupos mediante una prueba Post Hoc de Mann-Whitney, con p-valores con corrección por Bonferroni.

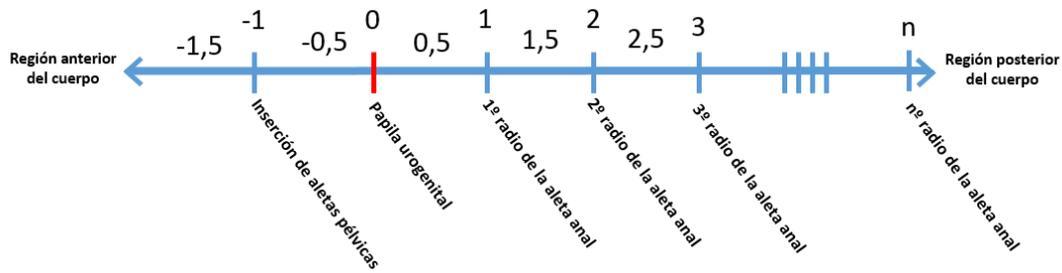


Figura 6. Escala arbitraria para la codificación de la posición relativa del extremo distal de aletas pélvicas y pectorales. Los números enteros marcan la posición de las estructuras de la región inferior del cuerpo. Los espacios entre las estructuras difieren en 0,5 respecto al valor anterior y el posterior. La papila urogenital se toma como punto cero de la escala, con valores positivos hacia la región posterior del cuerpo y negativos hacia la región anterior.

Variables merísticas

Las variables fueron analizadas mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las diferencias de los caracteres entre pares de grupos fueron evaluadas mediante una prueba Post Hoc de Mann-Whitney. Se analizaron para cada uno de los grupos las siguientes variables merísticas:

- 1) Series de neuromastos del sistema laterosensorial: se contabilizaron y compararon el número de neuromastos de 15 series de la región de la cabeza (Figura 7). Se tomó en cuenta la nomenclatura utilizada Costa (2006). Conteos para machos y hembras fueron analizados en conjunto ya que no se considera un carácter sexualmente dimórfico.

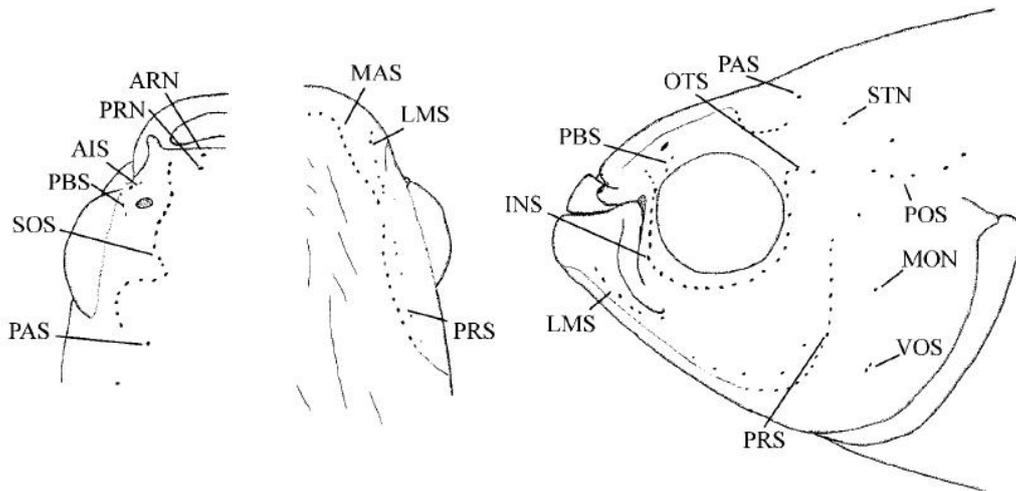


Figura 7. Series de neuromastos del sistema laterosensorial de *Austrolebias* (imagen adaptada de Costa, 2006): **AIS** = serie infraorbital anterior; **ARN** = neuromasto rostral anterior; **INS** = serie infraorbital; **LMS** = serie mandibular lateral; **MAS** = serie mandibular; **MON** = neuromasto opercular medio; **OTS** = serie ótica; **PAS** = serie parietal; **PBS** = serie preorbital; **POS** = serie de neuromastos post-óticos; **PRN** = neuromasto rostral posterior; **PRS** = serie preopercular; **SOS** = serie supraorbital; **STN** = neuromasto supratemporal; **VOS** = serie ventral opercular.

2) Series de escamas: se contabilizaron y compararon por separado para machos y

hembras de cada uno de los grupos las siguientes series de escamas:

a - número de escamas de la línea lateral

b - número de series de escamas transversales dorsales, contadas en diagonal desde el origen de la aleta dorsal hasta la línea lateral (esta última no incluida)

c - número de series de escamas transversales ventrales, contadas en diagonal desde el origen de la aleta anal hasta la línea lateral (esta última no incluida)

d - número de series de escamas transversales totales (la suma de las dos anteriores más una escama de la línea lateral)

e - número de series de escamas alrededor del pedúnculo caudal

f - número de series de escamas interpectorales, contabilizadas en V entre las inserciones ventrales de las aletas pectorales.

Además se tomó nota de la presencia o no de escamas sobre la base de la aleta anal y la disposición de las mismas.

- 3) Número de radios de las aletas: se contabilizaron y compararon por separado para machos y hembras de cada uno de los grupos, el número de radios totales de las aletas dorsal, anal, caudal, pectorales y pélvicas.
- 4) Órganos de contacto: se tomó nota en ejemplares macho de la presencia/ausencia y disposición de órganos de contacto en aletas; en caso de hallarse presente también se contaron el número máximo de órganos de contacto en escamas de los flancos.

Caracteres óseos

Se seleccionaron ejemplares de ambos sexos, los que primero fueron transparentados y luego se les aplicó una tinción diferencial para que fuesen fácilmente visibles los huesos (rojo) y cartílagos (azul). El procedimiento se detalla en Dingerkus & Uhler (1977).

De cada ejemplar se tomó nota de las siguientes características:

- 1) Cabeza: presencia ausencia de osificaciones dermosfenóticas; número de espinas epibranchiales e hipobranchiales del primer arco branquial; número de dientes de las placas faringobranchiales 2 y 3; largo del proceso ventral del hueso posttemporal (largo/corto/ausente); forma del cartílago basihial y proporción aproximada del largo de éste respecto al largo total del basihial (0-100%)
- 2) Vértebras: número de vértebras abdominales, número de vértebras caudales y número total (la suma de los dos anteriores).

- 3) Posición de aletas: posición del inicio de la aleta dorsal respecto de las espinas neurales y de los centros vertebrales; posición del inicio de la aleta anal respecto de las espinas pleurales y de los centros vertebrales. Las vértebras y espinas asociadas son numeradas de 1 a **n** partiendo de la vértebra más anterior. Los espacios entre espinas o entre centros vertebrales suman 0,5 al número de su vértebra anterior.
- 4) Origen de aleta anal respecto al origen de la aleta dorsal: Para ambos sexos posición relativa del origen de la aleta anal respecto al origen de la aleta dorsal. Para esto se tomó en cuenta la posición de estas aletas respecto a los centros vertebrales: cuando el valor observado para la aleta dorsal fue mayor que el observado para la aleta anal (dorsal>anal) se consideró a esta última como “anterior”; cuando los valores fueron iguales (dorsal=anal), se consideró a esta última como “igual”; cuando la dorsal presentó valores menores que la anal (dorsal<anal), se consideró a esta última como “posterior”.
- 5) Número de radiales proximales en la cintura pectoral.

Los caracteres cuantitativos fueron evaluados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, y las diferencias entre pares de grupos mediante una prueba Post Hoc de Mann-Whitney. Los p-valores de esta prueba son mostrados con corrección por Bonferroni. Para los conteos vertebrales y el análisis de la posición relativa de aletas, machos y hembras fueron analizados por separado. Para los restantes caracteres ambos sexos fueron analizados en su conjunto.

Patrones de coloración

Los datos de patrones de coloración se obtuvieron de tres fuentes principales:

- 1) Ejemplares de colección: caracteres como presencia/ausencia y número de manchas o barras oscuras en cuerpo y aletas, pueden ser obtenidos de ejemplares conservados, siempre que estos no se hallen deteriorados.
- 2) Fotografías de campo previas a fijación de animales: son particularmente útiles para observar patrones de coloración tales como presencia de reflejos o bandas brillantes que suelen perderse tras la fijación, así como la coloración general del cuerpo y aletas. Además sirven para comparar estos patrones posteriormente al fijado, dado que pueden ser observados los ejemplares guardados en colecciones.
- 3) Fotografías de aficionados provenientes de la web: estas pueden ser utilizadas con relativa seguridad ya que existe una arraigada cultura entre acuaristas y coleccionistas de peces anuales (“killifishes”), de mantener siempre asociada la información de procedencia a los ejemplares. Este tipo de imágenes son útiles en casos en los que los ejemplares de colección son escasos o se hallan decolorados, y que no se cuenta con fotografías de campo de los mismos. En el caso de especies externamente muy similares, la asignación de grupo a este tipo de imágenes se realizó principalmente en base a la procedencia geográfica.

Los patrones de coloración fueron analizados de modo cuanti y cualitativo:

- A) Bandeado de los machos: se compararon entre los grupos el número de bandas verticales o hileras de puntos en los costados del cuerpo. Para los mismos se tomaron los datos de las tres fuentes antes mencionadas.

- B) Manchas en los flancos de las hembras: para hembras de cada uno de los grupos se tomó nota de la presencia/ausencia de manchas negras en los flancos del cuerpo, y se comparó la cantidad de las mismas cuando estas se hallaron presentes.
- C) Caracteres no cuantitativos: por otro lado se elaboró para machos de cada uno de los grupos, una tabla comparativa con caracteres no cuantitativos como ser presencia/ausencia de manchas o bandas, disposición espacial de las mismas en aletas y cuerpo, presencia de iridiscencia, tonalidad de los colores, etc.

Otros

- 1) Para machos si la papila urogenital se halla unida al primer radio de la aleta anal, separada de este pero próximo en su base o completamente separados.
- 2) Para ambos sexos si las aletas pélvicas se hallan unidas por una membrana y aproximadamente en qué grado (0-100%)

Resultados

Análisis Genético

Delimitación del grupo de especies *A. bellottii*

En el análisis de Máxima Parsimonia (MP) se obtuvieron dos topologías igualmente parsimoniosas de 1573 pasos (CI = 0,362034; RI = 0,640428), que difirieron principalmente en las relaciones entre *A. patriciae*, especies del complejo *A. elongatus* y complejo *A. gymnoventris-luteoflammulatus*. En la Figura 8 se muestra la topología consenso estricto inferida a partir de ambas reconstrucciones. En cuanto al análisis de Máxima Verosimilitud (ML) (LogL= -7805.88) la reconstrucción obtenida se muestra en la Figura 9.

Tanto en el análisis de MP como en el de ML se recuperó un clado monofilético bien soportado (100% y 99% de soporte, respectivamente), que reúne a *A. bellottii* y especies afines, y que no presenta anidados a otros grupos de especies. En ambas reconstrucciones este grupo resulta ser hermano del grupo de especies *A. robustus* (*sensu* Costa, 2006). Por otra parte quedan excluidos del mismo *A. vandenbergi* y especies del grupo *A. adloffii*. Denominaré de aquí en más a este grupo como “grupo de especies *A. bellottii sensu stricto*”.

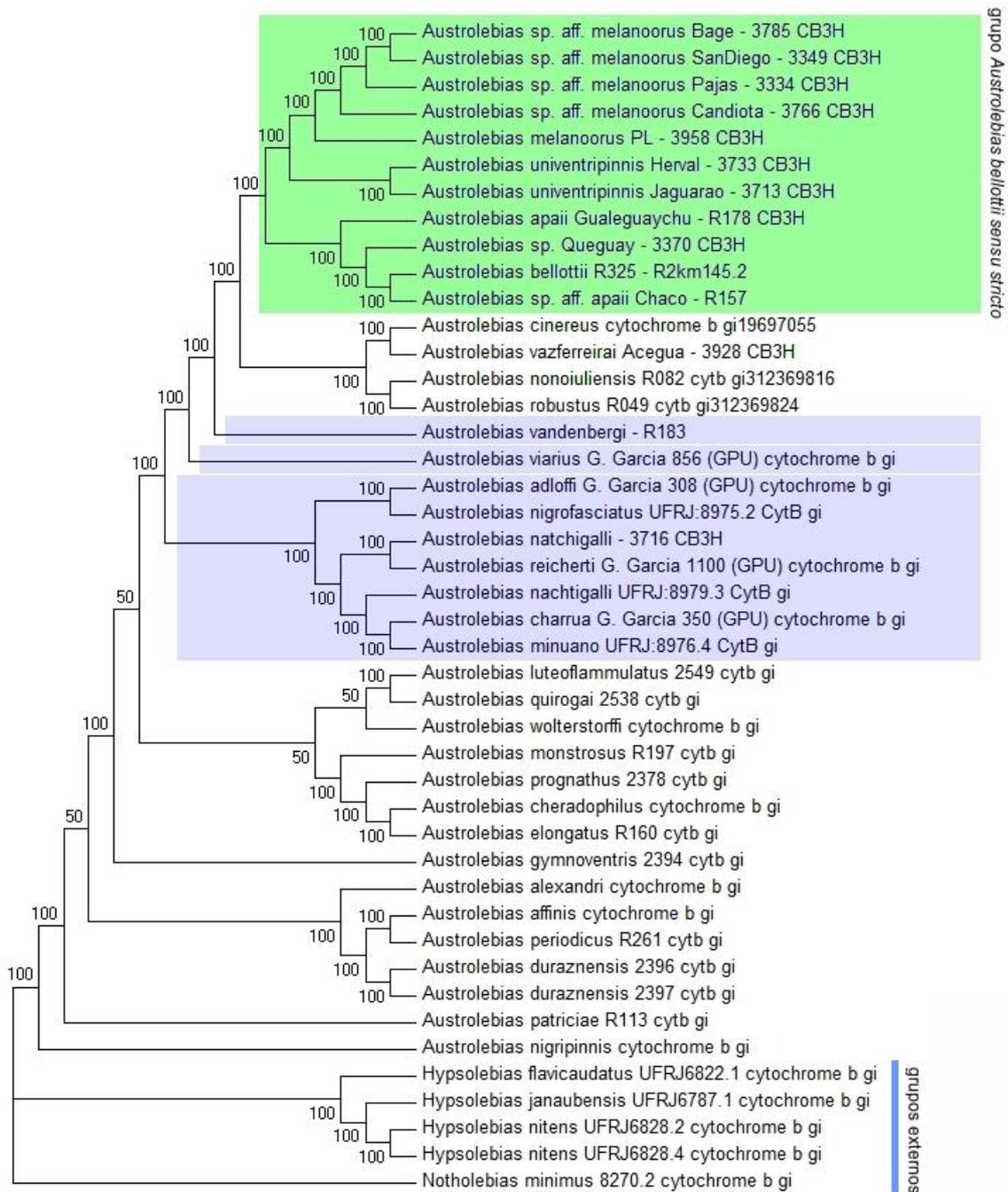


Figura 8. Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Austrolebias* obtenido mediante el consenso estricto de los 2 árboles más parsimoniosos (1573 pasos). Los números sobre los nodos representan los soportes de *bootstrap* mayores a 50 %. El recuadro verde señala las especies que serán consideradas como grupo *bellottii sensu stricto*. Los recuadros celestes señalan otros taxa considerados como pertenecientes al grupo *A. bellottii* de acuerdo a Costa (2006).

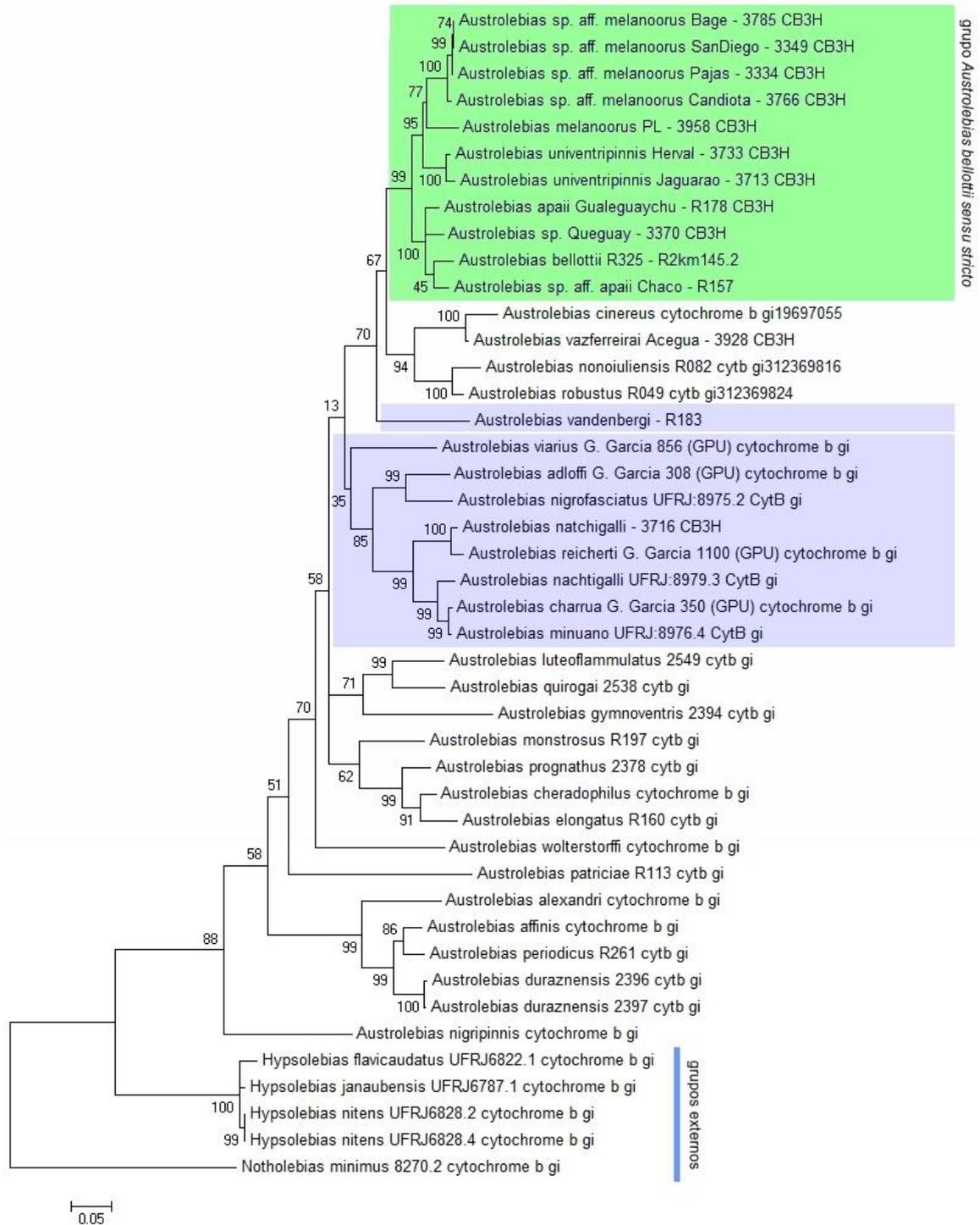


Figura 9. Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Austrolebias*, los números sobre los nodos representan los soportes de *bootstrap*. El recuadro verde señala las especies que serán consideradas como grupo *bellottii sensu stricto*. Los recuadros celestes señalan otros taxa considerados como pertenecientes al grupo *A. bellottii* de acuerdo a Costa (2006).

Grupo *A. bellottii* s.s.

En esta etapa se trabajó con un total de 152 secuencias de individuos pertenecientes al grupo de estudio, 128 obtenidas para esta tesis y 24 descargadas de GenBank. Los fragmentos de Cyt-b estudiados consistieron en aproximadamente 748 pares de bases.

Análisis filogenéticos

En los tres análisis filogenéticos realizados, Máxima Parsimonia (MP) (Figura 10), Máxima Verosimilitud (ML) (Figura 11) e Inferencia Bayesiana (Figura 12), se obtuvieron topologías similares, donde el grupo de especies *Austrolebias bellottii sensu stricto* (s.s.) presenta valores de soporte robustos en todos los casos (100%, 77% y probabilidad posterior de 1.00, respectivamente). El grupo está compuesto por 7 linajes principales agrupados en dos grandes clados, uno que reúne a *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3* (“clado *A. melanoorus*”), y otro que reúne a *Austrolebias bellottii*, *A. apaii*, *A. sp.1* y *A. sp.2* (“clado *A. bellottii*”). Dentro del “clado *A. melanoorus*” los grupos más estrechamente relacionados resultan ser *A. melanoorus* y *A. sp.3*, que conforman un clado hermano respecto a *A. univentripinnis*. Dentro del “clado *A. bellottii*” observamos dos clados monofiléticos recíprocos, uno que reúne a *A. bellottii* y a *A. sp.2*, y otro que reúne a *A. apaii* y a *A. sp.1*. Los valores de soporte de cada rama para los diferentes métodos se presentan en las respectivas figuras. Por otra parte no existe consenso entre los tres abordajes respecto al relacionamiento del grupo respecto a *A. vandenbergi* y al “grupo *A. robustus*”.

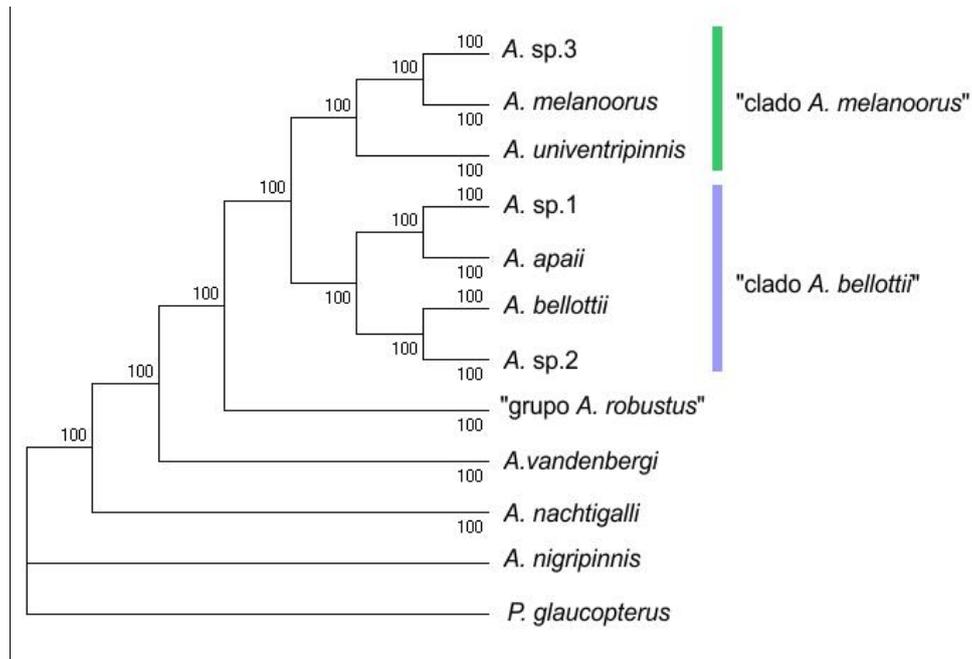


Figura 10. Árbol de Máxima Parsimonia para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s. obtenido mediante el consenso estricto de los 3 árboles más parsimoniosos (896 pasos; CI = 0,538462; RI = 0,934155). Los números sobre los nodos representan los soportes de *bootstrap* mayores a 50 %. Se señalan con barras de color los dos clados principales dentro del grupo: verde = “clado *A. melanoorus*”; azul = “clado *A. bellottii*”.

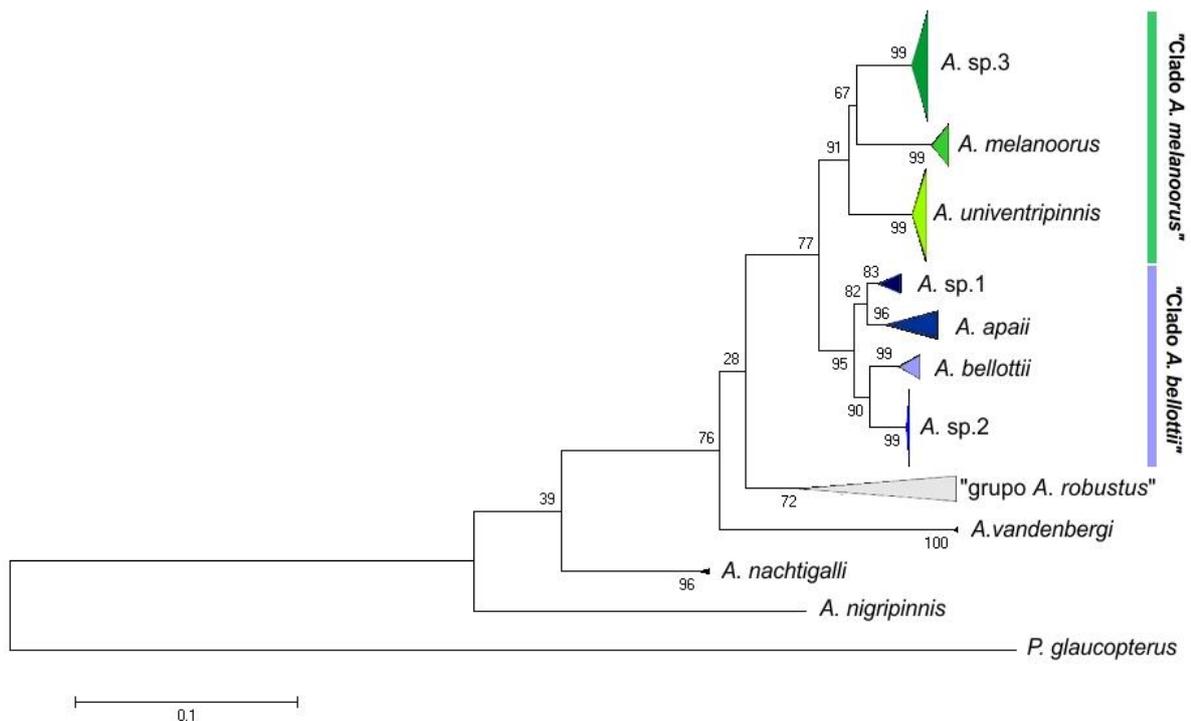


Figura 11. Árbol de Máxima Verosimilitud para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s., los números sobre los nodos representan los soportes de *bootstrap*. Se señalan con barras de color los dos clados principales dentro del grupo: verde = “clado *A. melanoorus*”; azul = “clado *A. bellottii*”.

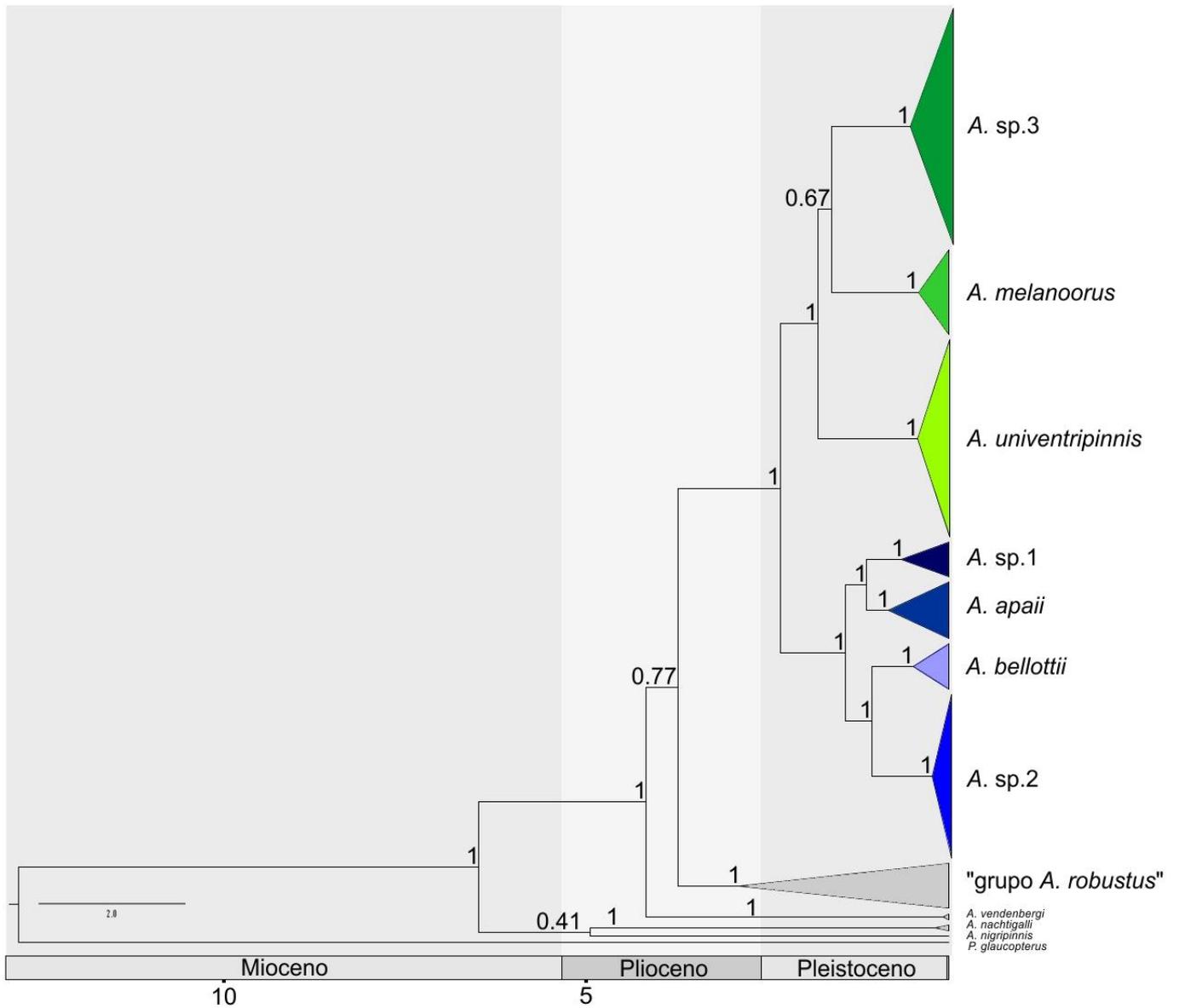


Figura 12. Árbol datado de Inferencia Bayesiana basado en el coalescente para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s.. Los números sobre los nodos representa el valor de probabilidad a posteriori para cada clado. En verde = “clado *A. melanoorus*”; azul = “clado *A. bellottii*”. La barra inferior resume la escala de tiempo en millones de años.

En lo que respecta a los tiempos de divergencia entre los distintos grupos (Figura 12), el grupo *A. bellottii* s.s. y el grupo *A. robustus* habría divergido hace aproximadamente unos 3.8 millones de años, durante el Plioceno. La diversificación dentro de grupo *A. bellottii* s.s. en sus siete linajes principales habría ocurrido de forma casi simultánea en el transcurso del Pleistoceno, aproximadamente entre unos 2,4 (separación clado *A. bellottii* versus clado *A. melanoorus*) y 1,1 (separación *A. bellottii* versus *A. sp.2*) millones de años antes del presente.

Delimitación de especies

Un total de 13 linajes evolutivamente independientes (9 clusters y 4 singletons) fueron estimados dentro del grupo *A. bellottii* utilizando el algoritmo GMYC (Figura 13). En este análisis *Austrolebias bellottii*, *A. sp.1* y *A. sp.3* fueron divididas en dos linajes evolutivamente independientes cada una, y apreciándose un singleton en *A. sp.1*. *Austrolebias apaii* se dividió en cuatro linajes, tres de ellos singletons. *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.2* permanecieron como unidades.

Utilizando el algoritmo ABGD se estimaron unos siete linajes evolutivamente independientes (Figura 13). En este análisis *Austrolebias apaii* y *A. sp.1* conformarían una única especie, con la excepción del individuo de *A. apaii* proveniente de la localidad de Artigas, el que fue identificado como una unidad independiente. *Austrolebias melanoorus*, *A. bellottii*, *A. univentripinnis*, *A. sp.2* y *A. sp.3* fueron reconocidas como especies diferentes.

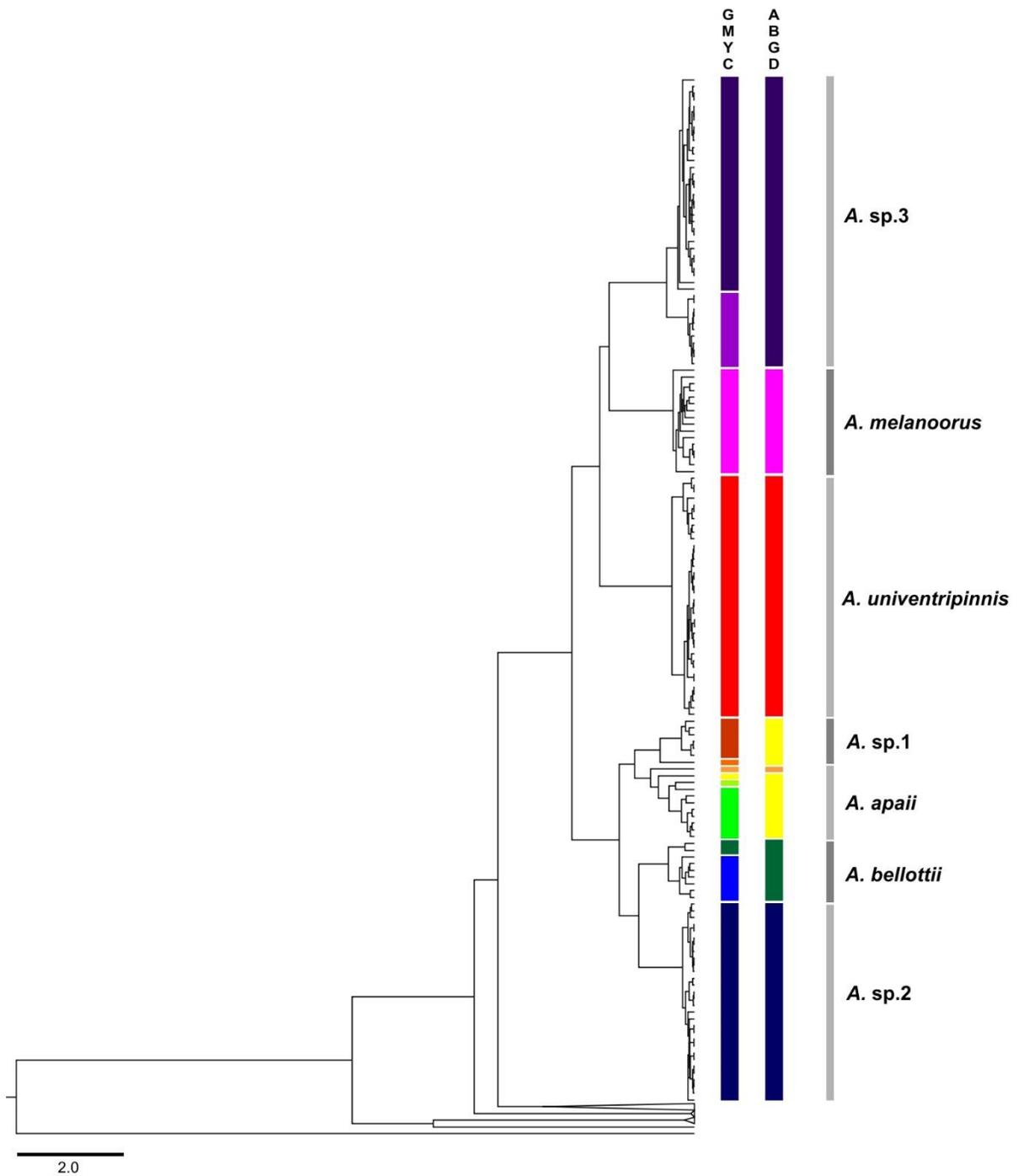


Figura 13. Delimitación de especies hipotéticas utilizando los algoritmos GMYC y ABGD. A la izquierda se muestra la topología del árbol obtenido en BEAST para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s., que fuera utilizado para implementar GMYC. En las barras de la derecha las especies hipotéticas obtenidas mediante cada uno de los métodos, se representan con diferentes colores. Las unidades establecidas *a priori* se muestran como barras grises.

Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Los resultados de los distintos análisis estadísticos realizados al set de datos se resumen en la Tabla 1. El grupo que presentó mayor número de sitios variables fue *A. melanoorus* (34), mientras que el que presentó menos fue *A. sp.2* (8). La mayor cantidad de sitios informativos se observó en *A. bellottii* (13) y la menor en *A. apaii* (2). En cuanto al número de sitios segregantes (**S**), el mayor valor se observó en *A. bellottii* (26) y el menor en *A. sp.2*. Los grupos en los que se halló el mayor y menor número de haplotipos fueron *A. sp.3* (11) y *A. apaii* (5) respectivamente. Por su parte la diversidad haplotípica más alta se observó en *A. sp.1* y *A. bellottii*, en ambos casos igual a 1,000, mientras que el valor más bajo lo presentó *A. apaii* (0.667). *Austrolebias bellottii* presentó los valores más altos tanto de diversidad nucleotídica como de distancia de Kimura 2P, mientras que los más bajos se observaron en *Austrolebias sp.2*.

Tabla 1. Parámetros estadísticos de diversidad genética para los grupos estudiados. Número de sitios segregantes (S); Diversidad Haplotípica (H) (adaptada de Nei 1987); Diversidad Nucleotídica (π) (Nei 1987). Estadístico D del test de Neutralidad de Tajima (1989); Estadístico Fs del test de Neutralidad Fu (1997); Tendencia general de transiciones/transversiones (r).

Grupo	Nº	bp	Sitios variables	Sitios informativos	S	Nº Haplotipos	H (d.s.)	π (s.d.)	Distancia Kimura 2P (Tv+TS) (d.s.)	D (*= p<0,05)	Fs	r
<i>A. apaii</i>	10	748	33	2	19	5	0,667 (0,163)	0,00910 (0,00465)	0,00926 (0,00221)	-1,95247*	1,085	0,87
<i>A. bellottii</i>	9	746	27	13	26	9	1,000 (0,052)	0,01370 (0,00251)	0,01387 (0,00267)	-0,35302	-3,113	1,04
<i>A. melanoorus</i>	16	747	34	6	20	9	0,850 (0,077)	0,00602 (0,00166)	0,00607 (0,00145)	-2,17187*	-2,637	1,54
<i>A. univentripinnis</i>	36	747	17	10	9	9	0,706 (0,077)	0,00308 (0,00053)	0,00309 (0,00128)	-0,60135	-2,344	2,55
<i>A. sp.1</i>	7	747	23	5	23	7	1,000 (0,076)	0,01060 (0,00298)	0,01074 (0,00224)	-0,89246	-2,004	3,15
<i>A. sp.2</i>	30	748	8	3	8	10	0,784 (0,053)	0,00170 (0,00025)	0,00171 (0,00079)	-1,36548	-5,478	0,51
<i>A. sp.3</i>	43	748	28	12	25	11	0,821 (0,031)	0,00661 (0,00089)	0,00668 (0,00178)	-0,96169	0,123	4,58

En cuanto a las distancias genéticas pareadas entre los grupos variaron entre 3,3% (*A. bellottii* vs. *A. sp.2*) y 9,9% (*A. melanoorus* vs. *A. bellottii*) (Tabla 2).

Tabla 2. Distancias pareadas entre los grupos analizados.

	<i>A. apaii</i>	<i>A. bellottii</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. sp.3</i>	<i>A. univentripinnis</i>
<i>A. apaii</i>							
<i>A. bellottii</i>	5.0%						
<i>A. melanoorus</i>	9.1%	9.9%					
<i>A. sp.1</i>	3.7%	3.9%	8.9%				
<i>A. sp.2</i>	4.5%	3.3%	8.9%	3.6%			
<i>A. sp.3</i>	8.4%	7.6%	5.2%	7.2%	7.8%		
<i>A. univentripinnis</i>	8.1%	8.7%	6.8%	7.6%	7.7%	5.3%	

Para el grupo *A. bellottii s.s.* se registraron un total de 35 haplotipos ($Hd=0.9239$) para los 151 individuos considerados, basados en un total de 446 sitios, de los cuales 103 fueron variables. Los haplotipos, localidades y grupos se resumen en la Tabla 1 del Anexo 2. La distribución geográfica de estos se puede visualizar en las Figuras 14 a 16. Cabe destacar que todos los grupos presentaron múltiples variantes haplotípicas, con la excepción de *Austrolebias sp.2*, que presentó tan solo una.

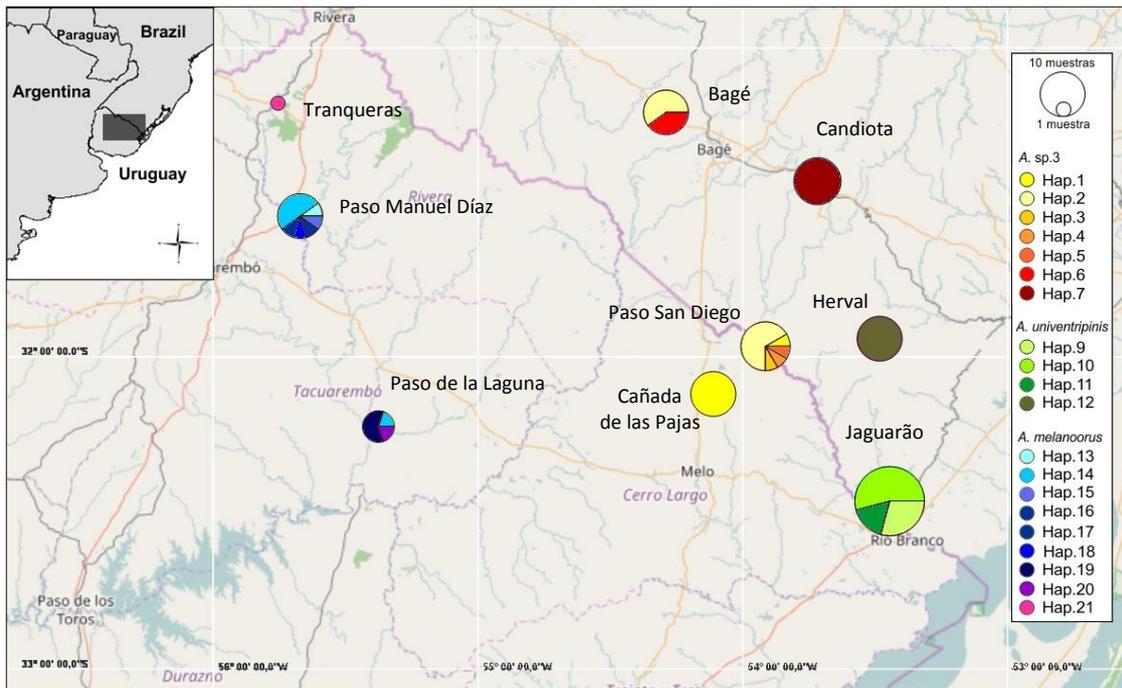


Figura 14. Distribución espacial de las diferentes variantes haplotípicas de *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3*. Los colores representan las variantes haplotípicas; el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

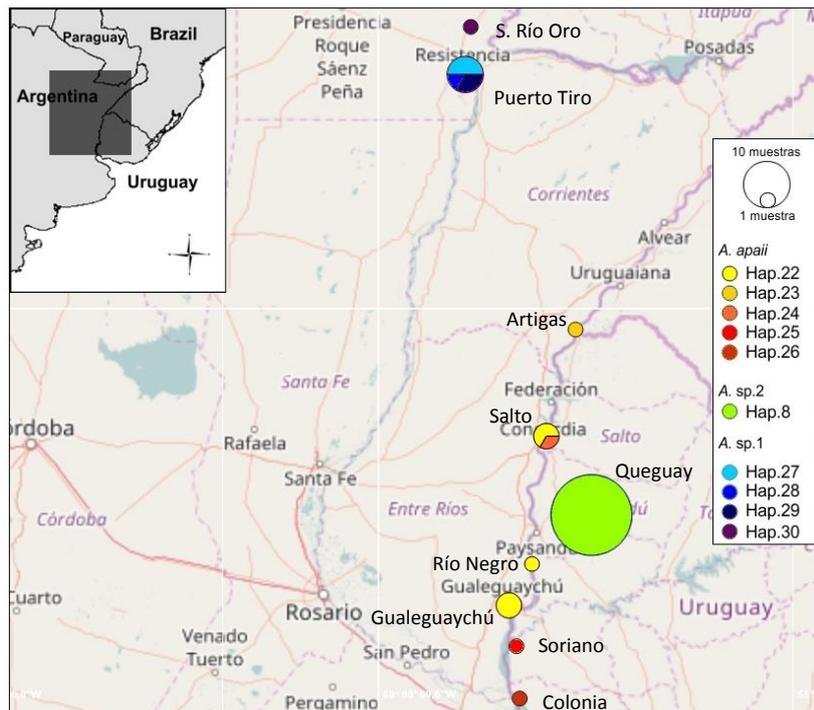


Figura 15. Distribución espacial de las diferentes variantes haplotípicas de *Austrolebias apaii*, *A. sp.1* y *A. sp.2*. Los colores representan las variantes haplotípicas; el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

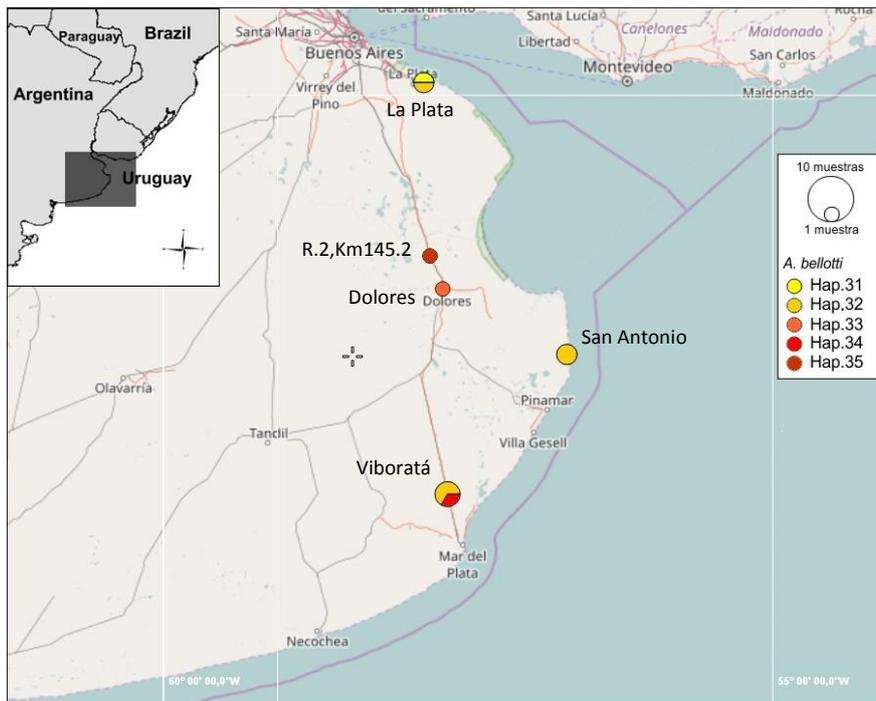


Figura 16. Distribución espacial de las diferentes variantes haplotípicas de *Austrolebias bellottii*. Los colores representan las variantes haplotípicas; el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

Red de haplotipos

La red de haplotipos para el grupo *A. bellottii* s.s. puede visualizarse en la Figura 17. La mayor distancia observada (más de 20 pasos mutacionales) es la que separa a los grupos del clado *A. bellottii* de los del clado *A. melanoorus*, siendo *Austrolebias bellottii* y *A. sp.3* los dos grupos más próximos de estos.

Dentro del clado *A. melanoorus*, pueden observarse claramente tres grandes agrupaciones de haplotipos, correspondientes a *Austrolebias melanoorus*, *A. sp.3* y *A. univentripinnis* (Figura 17). *Austrolebias melanoorus* se distancia 18 pasos mutacionales de uno de los ancestros hipotéticos de las distintas variantes de *A. sp.3*, y esta última se

distancia la misma cantidad de pasos respecto de *A. univentripinnis*. En *Austrolebias univentripinnis* puede observarse la existencia de 4 variantes haplotípicas diferentes, tres pertenecientes a Jaguarão distanciadas dos pasos mutacionales de la cuarta, proveniente de Herval (Hap_12). En *A.sp.3* se observan múltiples variantes haplotípicas, distanciadas como máximo por 6 pasos mutacionales, algunas de las cuales se encontraron en más de una localidad (Figura 14). Los ejemplares de la localidad de Candiota presentaron un único haplotipo (Hap_6), que además fue exclusivo de esa localidad, distanciado por tres pasos mutacionales del haplotipo más próximo de las restantes localidades (Hap_1). *A. melanoorus* también presentó múltiples haplotipos, uno de los cuales (Hap_14) fue compartido por las localidades de Manuel Díaz y Paso de la Laguna; Tranqueras presentó un único haplotipo, exclusivo (Hap_21), que se distanció 6 pasos mutacionales del más cercano (Hap_14).

Dentro del clado *A. bellottii*, pueden observarse 4 agrupaciones de haplotipos (aunque no tan marcadas como el caso anterior), correspondientes a *Austrolebias apaii*, *A. sp.1*, *A. sp.2* y *A. bellottii* (Figura 17). *A. apaii* se distancia unos 10 pasos mutacionales del ancestro hipotético con las distintas variantes de *A. sp.1*. *A. sp.1* a su vez se distancia 6 pasos respecto al ancestro hipotético común con *A. bellottii* y *A. univentripinnis*. Estas dos últimas se distancian entre sí por unos 12 pasos mutacionales. *Austrolebias apaii* presentó 5 variantes haplotípicas, una de las cuales (Hap_22) se halló presente en más de una localidad; el haplotipo 23 originario de Artigas se encuentra distanciado en 14 o más pasos mutacionales del resto de las variantes del grupo. *Austrolebias sp.1* presentó dos subconjuntos de haplotipos, correspondientes a sus dos localidades geográficas (Figura 15), distanciados entre ellos por 6 pasos mutacionales. *Austrolebias bellottii* presentó 5

variantes haplotípicas, una de las cuales (Hap_32) se halló presente en más de una localidad (Figura 16). Por su parte *Austrolebias* sp.2 presentó una única variante haplotípica (Hap_8), representada por una treintena de individuos.

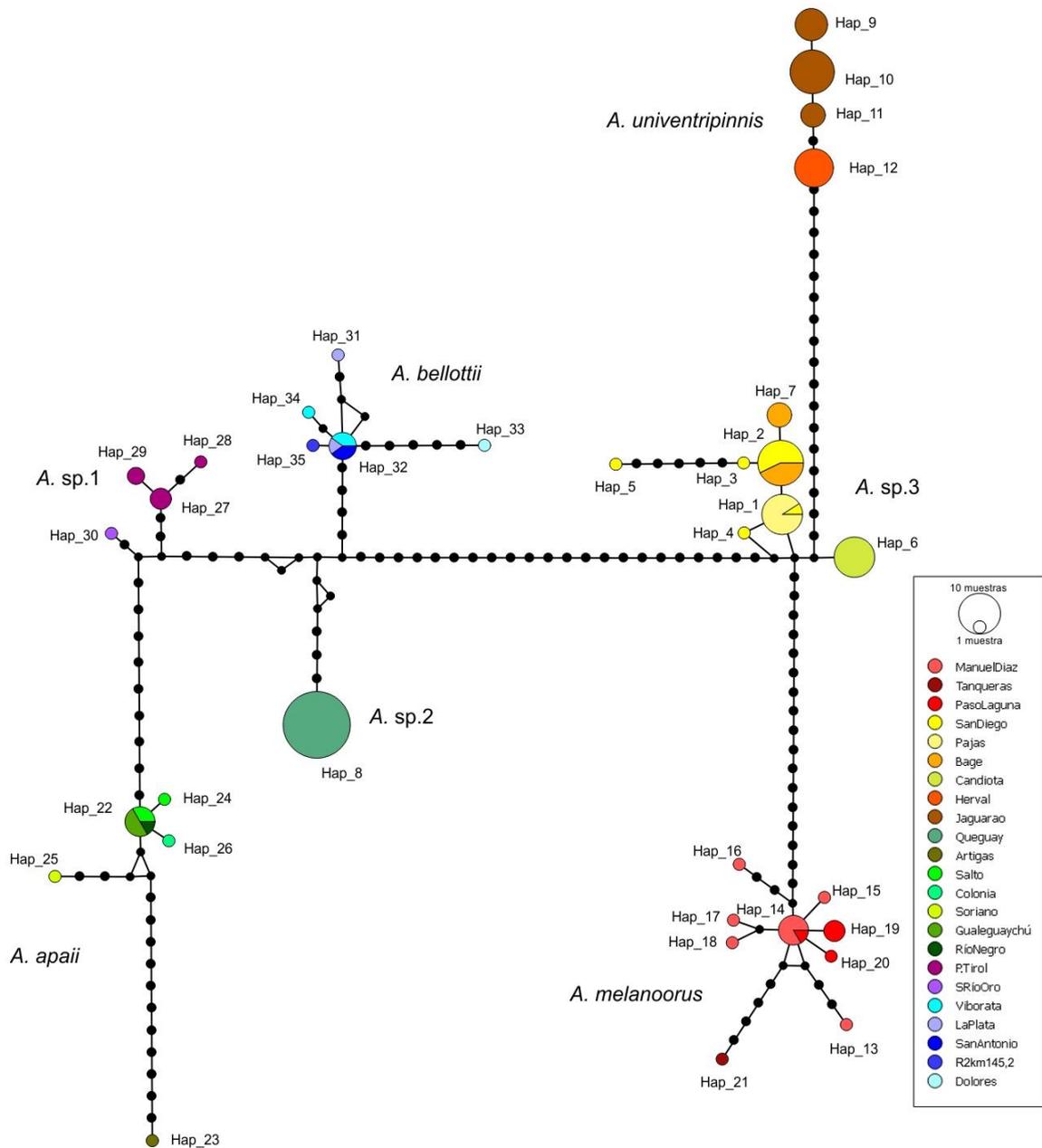


Figura 17. Red de haplotipos generada para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s., los puntos negros simbolizan pasos mutacionales, y los colores dentro de los círculos a las distintas localidades.

Análisis Molecular de Varianza

La estructura de poblaciones que optimizó la prueba de hipótesis de agrupamiento mediante AMOVA obteniendo el valor máximo de Fct (0,10551), máxima variación entre grupos (10,55%) y mínima dentro de grupos (88,02%), se conformó por seis grupos con las siguientes localidades: **1**-Río Negro (*A. sp.3*); **2**-Río Tacuarembó (*A. melanoorus*), **3**-Río Yaguarón Alto (*A. sp.3*), **4**-Río Yaguarón Bajo (*A. univentripinnis*), **5**-Río Queguay (*A. sp.2*) y **6**-Río Uruguay (*A. apaii*), Buenos Aires (*A. bellottii*) y Río Paraná (*A. sp.1*) (Tabla 3, Figura 18). Los valores de Fct obtenido para otras agrupaciones que fueron puestas a prueba, se resumen en la Tabla 1 del Anexo 3.

Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza genética a nivel macrogeográfico en las distintas cuencas que componen la distribución del grupo *A. bellottii* s.s.. La estructura con valor máximo de Fct (0,10551) está marcada por seis grupos conformados por las siguientes poblaciones: 1-Río Negro; 2-Río Tacuarembó, 3-Río Yaguarón Alto, 4-Río Yaguarón Bajo, 5-Río Queguay y 6-Río Uruguay, Buenos Aires y Río Paraná. Los valores de los componentes de la varianza que fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se señalan con un asterisco (*).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza
Entre grupos	2	9,424	0,05261*	10,55%
Entre poblaciones dentro de grupos	7	1,000	0,00713	1,43%
Dentro de poblaciones	141	33,333	0,43885*	88,02%

Los valores del estadístico Fst pareados se resumen en la Tabla 4. El valor más alto de Fst se obtuvo para las poblaciones de Río Negro y Río Queguay con un valor de 0.19381 entre sí. En contraste los valores más bajos ($F_{st} = 0$), se observaron para los pares de poblaciones Buenos Aires-Río Uruguay, Buenos Aires-Río Paraná y Río Paraná-Río

Uruguay, aunque en ninguno de los casos estos valores fueron estadísticamente significativos.

Tabla 4. Estadístico Fst pareados en base al gen Cyt-b entre pares de poblaciones de *Austrolebias* pertenecientes al grupo de especies *A. bellottii* s.s. Valores que resultaron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se marcan en negrita.

	Negro	Tacuarembó	Yaguarón Alto	Yaguarón Bajo	Queguay	Buenos Aires	Paraná	Uruguay
Negro								
Tacuarembó	0,10103							
Yaguarón Alto	0,13081	0,06514						
Yaguarón Bajo	0,17213	0,08732	0,13849					
Queguay	0,19381	0,10881	0,15935	0,17698				
Buenos Aires	0,10413	0,00438	0,06496	0,08865	0,11215			
Paraná	0,10823	0,00452	0,06726	0,09170	0,11624	0		
Uruguay	0,10261	0,00433	0,06412	0,08753	0,11062	0	0	

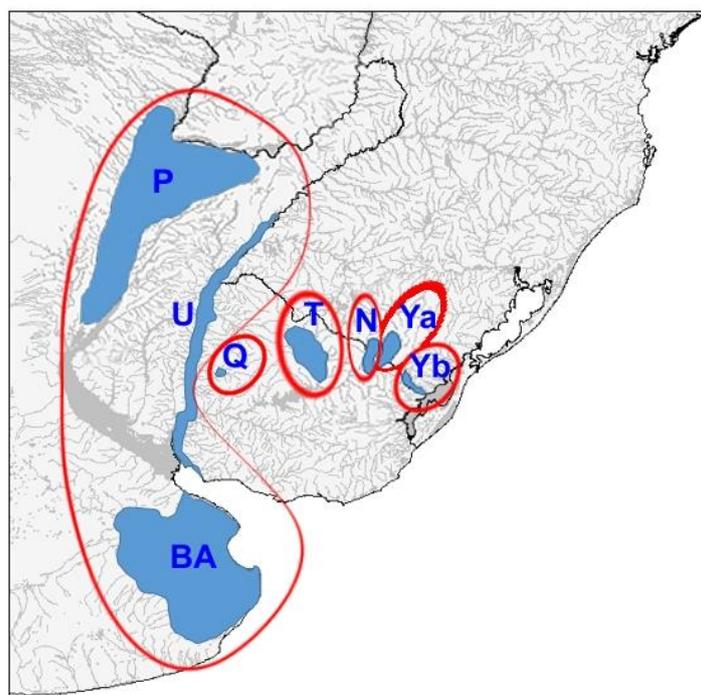


Figura 18. Estructura de poblaciones que optimizó la prueba de hipótesis de agrupamiento mediante en AMOVA obteniendo el valor máximo de Fct (0,10551). Río Paraná (P), Río Uruguay (U), Río de la Plata en Provincia de Buenos Aires (BA), Río Queguay (Q), Río Tacuarembó (T), Río Negro Alto (N), Río Yaguarón Alto (Ya) y Río Yaguarón Bajo (Yb).

Análisis Morfológico

Morfometría lineal

Los estadísticos descriptivos de las variables morfométricas lineales de cada uno de los grupos se resumen en las Tablas 1 a 7 del Anexo 4.

Para todas las variables analizadas se halló que existen diferencias significativas entre las proporciones corporales entre dos o más de los grupos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos estas diferencias estadísticamente significativas carecen de valor diagnóstico, debido al alto solapamiento de los rangos de variación de las proporciones.

En ejemplares machos, las variables consideradas que presentaron algún valor taxonómico fueron la distancia pre-pélvica, largo de la base de la aleta anal y el largo de las aletas pélvicas. Para la distancia pre-pélvica los grupos en los que se observó un menor solapamiento entre los rangos de datos fueron *Austrolebias* sp.1 versus *A.* sp.2 y *A. melanoorus*; para el largo de la base de la aleta anal el menor solapamiento se observó entre *A. apaii* y *A. melanoorus*; para el largo de las aletas pélvicas *A.* sp.3 versus *A. apaii* y *A.* sp.1 (Figura 19a a 19c).

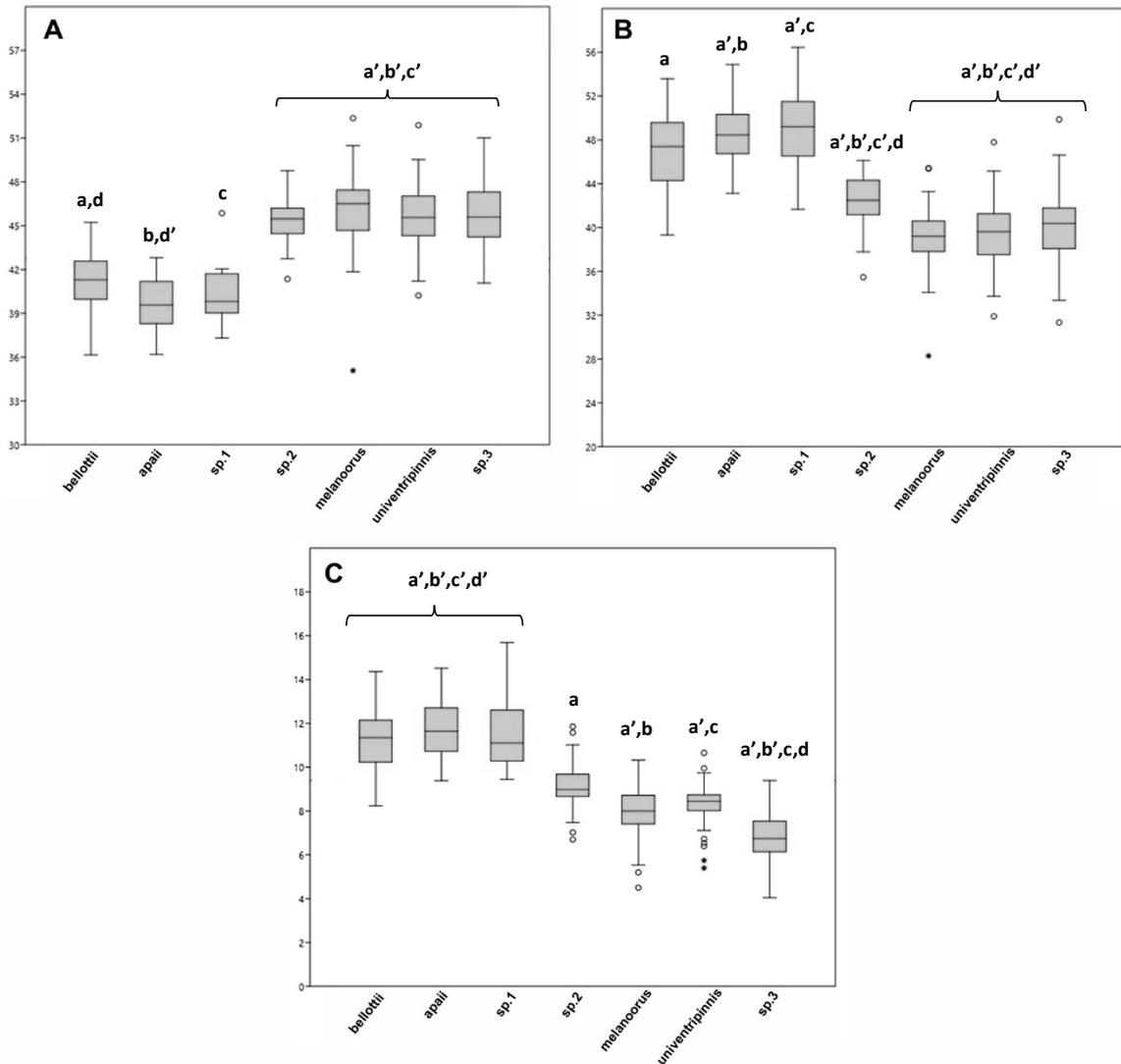


Figura 19. Morfometría lineal **machos**. Box plots para las variables morfométricas lineales distancia pre-pélvica (**A**), longitud de la base de la aleta anal (**B**), y largo de las aletas pélvicas (**C**), en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = variable expresada en porcentaje de la longitud estándar. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de los ejemplares hembras, las variables que se consideraron que presentaron algún valor taxonómico fueron las mismas que en el caso de los machos, agregándole la variable longitud pre-anal (Figura 20a a 20d). Para la distancia pre-anal se observó escaso solapamiento entre los rangos de variación de *Austrolebias* sp1 versus *A.* sp.2 y *A.*

melanoorus (Figura 20a); para la distancia pre-pélvica los grupos en los que se observó un menor solapamiento entre los rangos de datos fueron *Austrolebias*. sp.1 versus *A. melanoorus* (Figura 20b); para el largo de la base de la aleta anal se observó un no solapamiento de rangos entre *Austrolebias apaii* y *A. sp.1* versus *A. sp.2*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3* (Figura 20c); para el largo de las aletas pélvicas se observa un escaso solapamiento de los rangos de datos entre ejemplares de *A. sp.1* versus los de *A. melanoorus* y *A. sp.3* (Figura 20d).

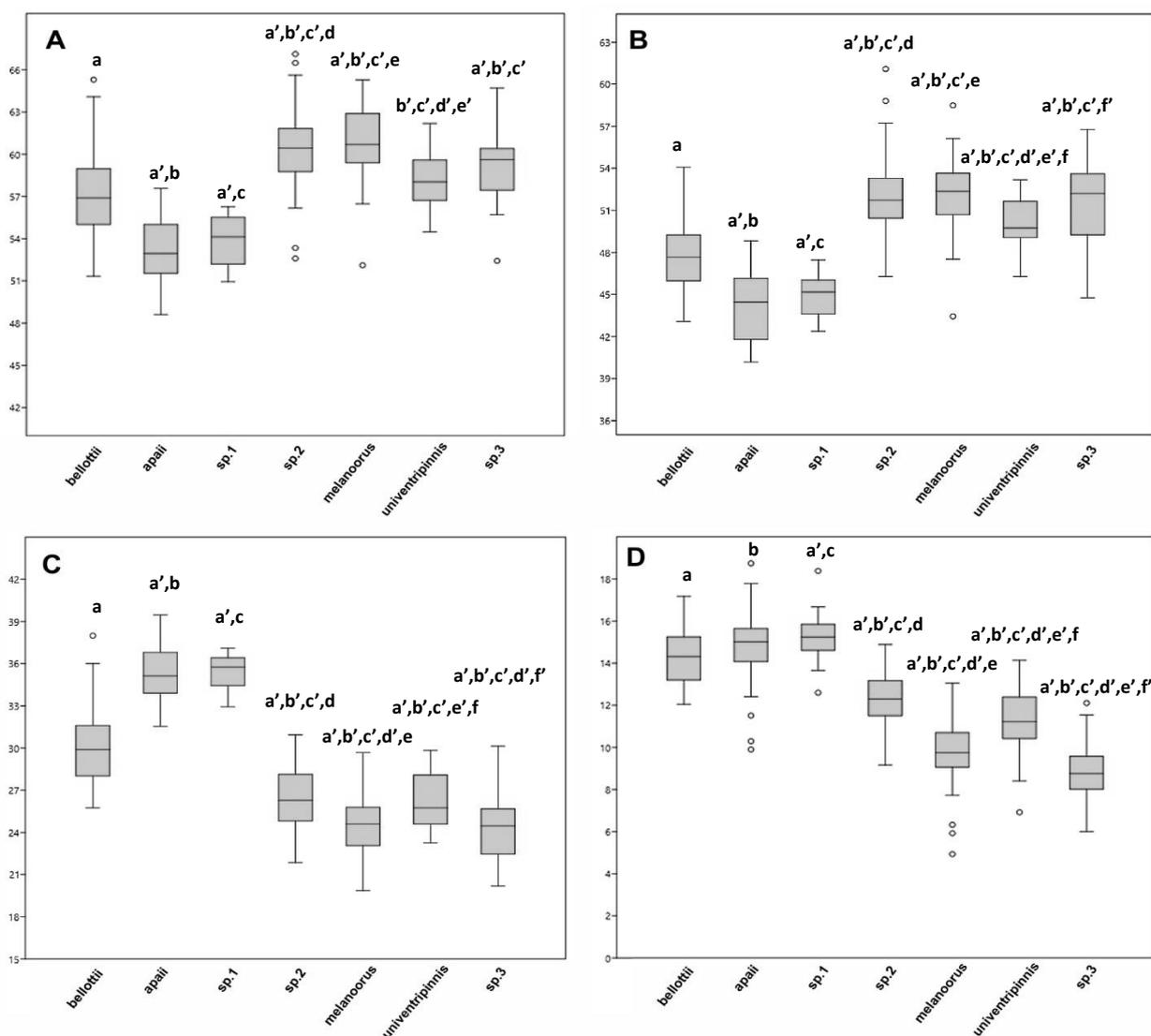


Figura 20. Morfometría lineal hembras. Box plots para las variables morfométricas lineales distancia pre-anal (A), distancia pre-pélvica (B), longitud de la base de la aleta anal (C), y largo de las aletas pélvicas (D), en ejemplares hembras. Eje X = grupos, eje Y = variable expresada en porcentaje de la longitud estándar. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales

marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Morfometría geométrica

Machos

El análisis discriminante muestra cierto solapamiento entre los grupos, sin embargo pueden distinguirse tres grandes agrupaciones (Figura 21). La primer Variable Canónica separa a *Austrolebias bellottii*, *A. apaii* y *A. sp1.* de individuos de *A. melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. sp.2* y *A. sp.3*. Los tres primeros se ubican hacia valores negativos del eje, que corresponden a ejemplares con aletas pélvicas e inicio de la aleta anal desplazados anteriormente. Los restantes cuatro grupos se distribuyen sobre la región positiva del eje, que corresponde a individuos con aletas pélvicas e inicio de la aleta anal desplazados posteriormente. Por su parte la Variable Canónica 2 discrimina entre ejemplares de *Austrolebias bellottii* hacia la región positiva del eje, y ejemplares de *A. apaii* y *A. sp.1* sobre la región negativa del mismo. Los valores positivos corresponden principalmente a ejemplares con cuerpo proporcionalmente altos y ojos pequeños, mientras que valores negativos se ven asociados a ejemplares más estilizados y con ojos proporcionalmente más grandes.

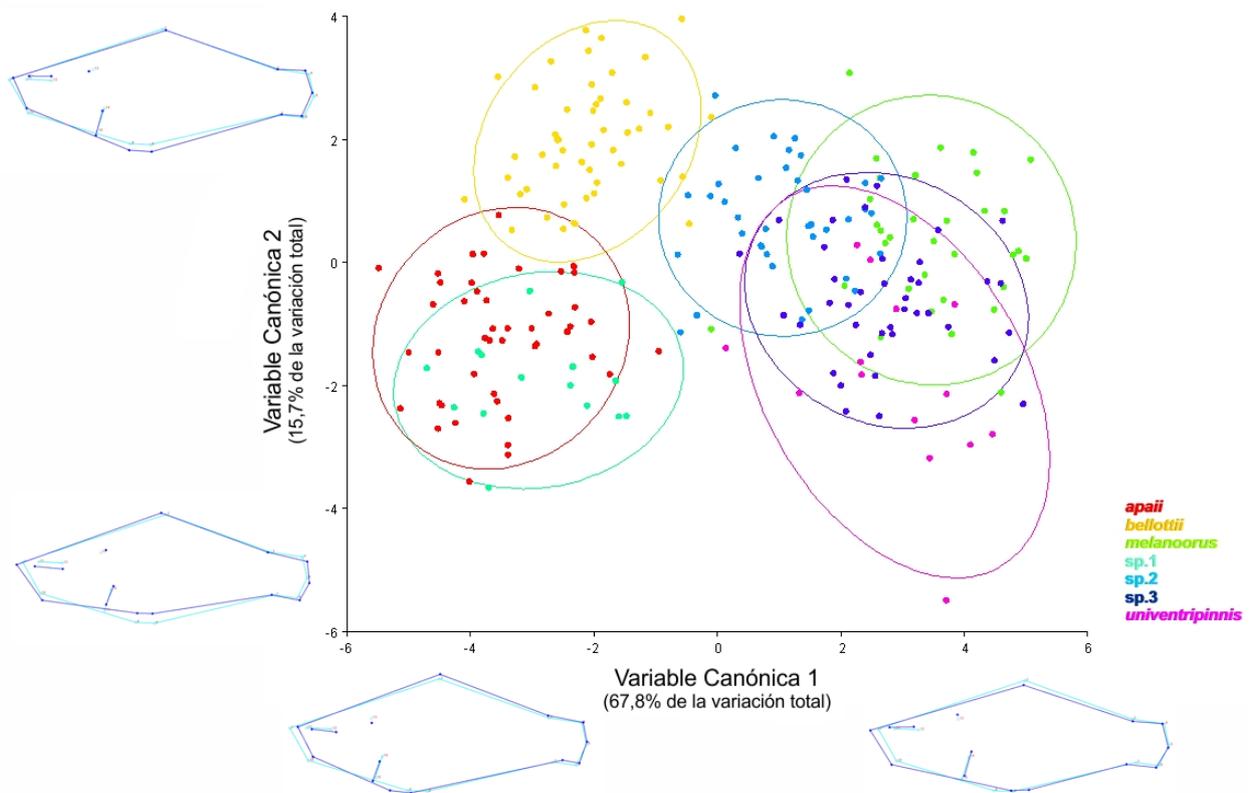


Figura 21. Proyección de los individuos machos sobre las dos primeras variables canónicas, realizadas en base a la matriz de peso del análisis de marcos anatómicos. Los distintos colores representan a cada uno de los grupos evaluados. En los *wireframe* (“esquemas de líneas”) a la izquierda y debajo del gráfico, se visualizan los cambios morfométricos que ocurren hacia los extremos de los ejes del mismo. Las líneas celestes de los *wireframe* representan la forma consenso, mientras las azules las deformaciones.

Hembras

En el caso de ejemplares hembras (Figura 22) también se observa una tendencia a la separación entre varios de los grupos analizados. La primer Variable Canónica reúne hacia valores positivos los grupos *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. sp.2* y *A. sp.3.*, y de estos separa hacia valores negativos primero a *A. bellottii*, y luego, con escaso solapamiento con el anterior a *A. apaii*. *A. sp.1.* tiene tendencia a separarse de estos dos últimos sobre valores positivos de la Variable Canónica 3. La Variable Canónica 1 describe principalmente los cambios sobre la posición relativa del inicio de las aletas dorsal, anal y pélvicas, con individuos de aletas desplazadas posteriormente hacia valores

positivos del eje, y anteriormente hacia valores negativos. La Variable Canónica 3 resume principalmente los cambios en altura del cuerpo, con individuos proporcionalmente más altos hacia valores negativos, y más estilizados hacia valores positivos del eje.

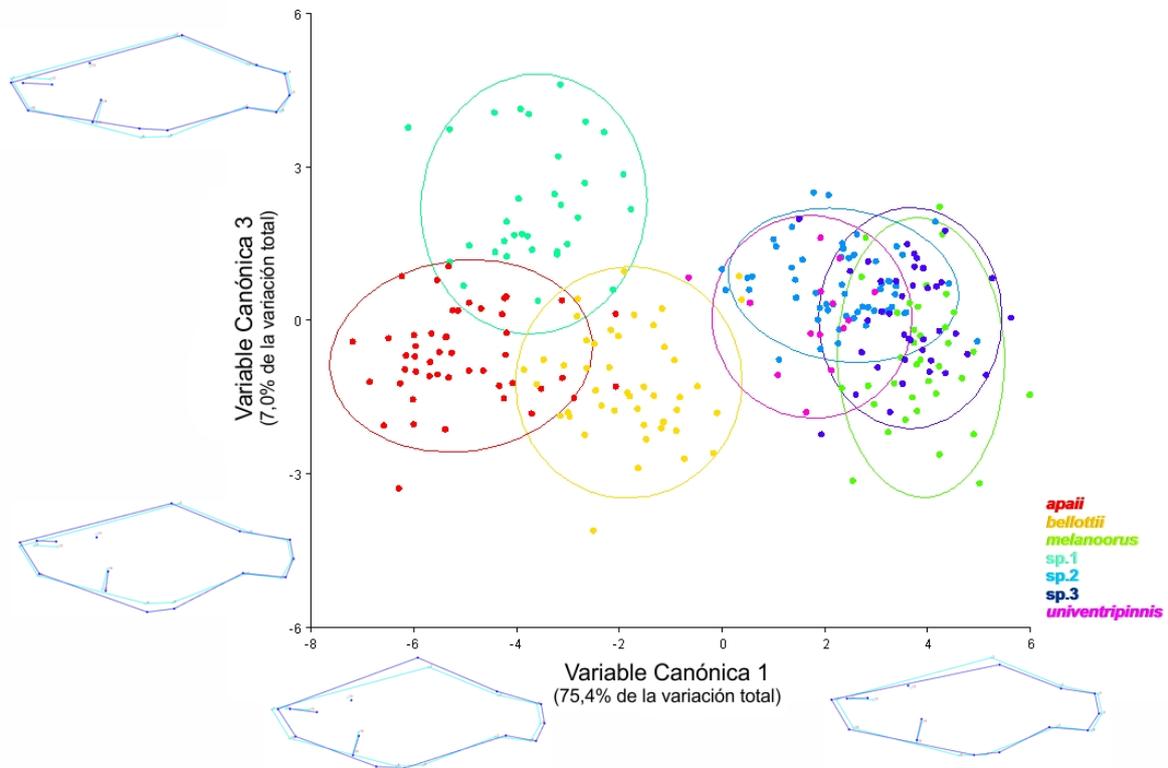


Figura 22. Proyección de los individuos hembras sobre la primera y tercera variables canónicas, realizadas en base a la matriz de peso del análisis de marcos anatómicos. Los distintos colores representan a cada uno de los grupos evaluados. En los *wireframe* (“esquemas de líneas”) a la izquierda y debajo del gráfico, se visualizan los cambios morfométricos que ocurren hacia los extremos de los ejes del mismo. Las líneas celestes de los *wireframe* representan la forma consenso, mientras las azules las deformaciones.

Otras proporciones corporales

Posición del extremo distal de la aleta pectoral

Tanto en ejemplares machos como hembras se observan diferencias estadísticamente significativas entre muchos de los grupos (Figura 23). Para ejemplares machos destaca la diferencia entre *Austrolebias apaii* versus *A. sp.2* y *A. sp.3*. En el caso de las hembras, destacan las diferencias entre *Austrolebias sp.1* versus *A. sp.2* y *A. sp.3*, así como entre *A. apaii* y *A. sp.2*.

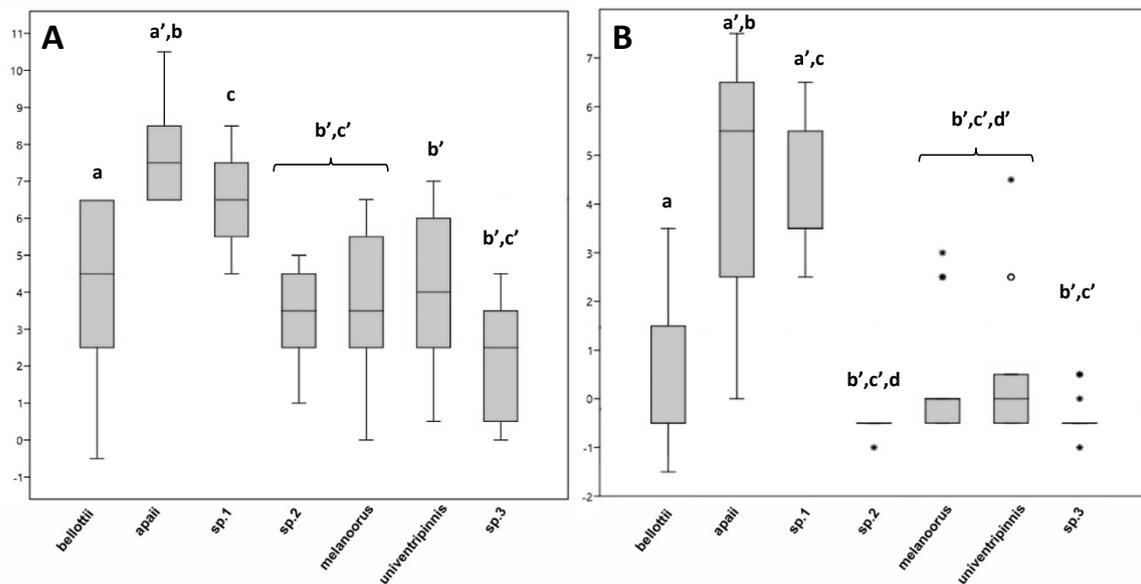


Figura 23. Box plots para la variable posición de la punta de la aleta pectoral respecto a estructuras de la región ventral. **A** = machos; **B** = hembras. Eje X = grupos, eje Y = número total de radios de la aleta. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Posición del extremo distal de las aletas pélvicas

Al igual que en el caso tanto para machos como para hembras se observan diferencias estadísticamente significativas entre muchos de los grupos (Figura 24). En ejemplares machos se observa un escaso solapamiento entre el rango de variación de *A. sp.1* versus *A. sp.3*, mientras en ejemplares hembras se observa escaso solapamiento entre *A. sp.1* respecto a *A. sp.2*, *A. melanoorus* y *A. univentripinnis*. Por otro lado no se observa solapamiento entre los rangos de *A. sp.1* y *A. sp.3* en ejemplares hembra.

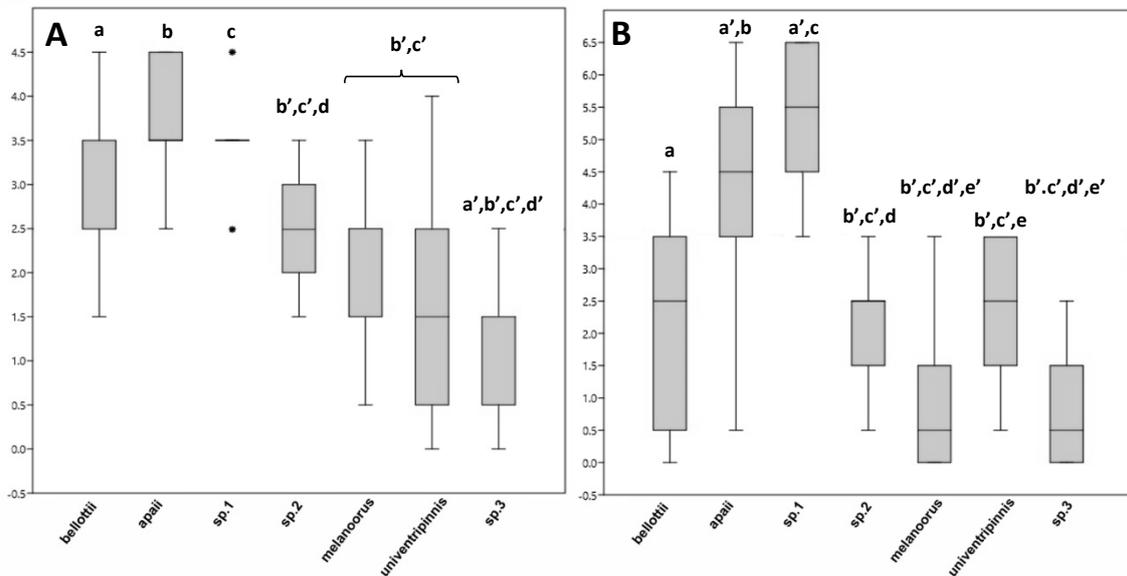


Figura 24. Box plots para la variable posición de la punta de las aletas pélvicas respecto a estructuras de la región ventral. **A** = machos; **B** = hembras. Eje X = grupos, eje Y = número total de radios de la aleta. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Variables merísticas

1) Series de neuromastos del sistema laterosensorial

Al comparar el número de neuromastos de las series del sistema laterosensorial entre los grupos, se observaron diferencias significativas entre muchos de ellos, sin embargo en la mayor parte de los casos estas diferencias no resultaron de utilidad diagnóstica. El único caso en el que se observó que dicha diferencia podría ser de utilidad fue para el número de neuromastos de la hemiserie rostral anterior entre *Austrolebias melanoorus* y *A. sp.2* (Figura 25), la que constó de 2 neuromastos en el 90% de los casos para la primera (10% con 3 neuromastos), y de 1 neuromasto en el 85% de los ejemplares revisados de la segunda (15% con 2 neuromastos).

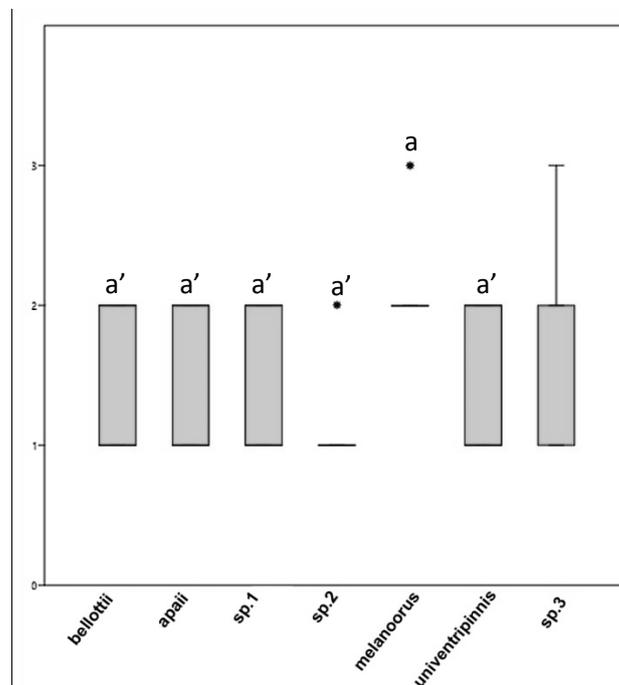


Figura 25. Box plots para la variable número de neuromastos rostrales anteriores. Eje X = grupos, eje Y = número de neuromastos. Rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

2) Series de escamas

Si bien existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en una gran cantidad de casos, en ninguno de ellos estas diferencias fueron de utilidad para distinguir claramente los grupos de estudio.

3) Número de radios en aletas

A pesar de observarse diferencias estadísticamente significativas en varios casos, la única variable que resultó de utilidad para diferenciar entre grupos fue, tanto para machos como para hembras, el número de radios de la aleta anal (Figura 26a y 26b). En ambos casos existen diferencias claras entre ejemplares de *Austrolebias* sp.1 y los ejemplares de *A. sp.2*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3*. En machos se observó además un escaso solapamiento entre los rangos de variación de *Austrolebias apaii* y *A. sp.2*

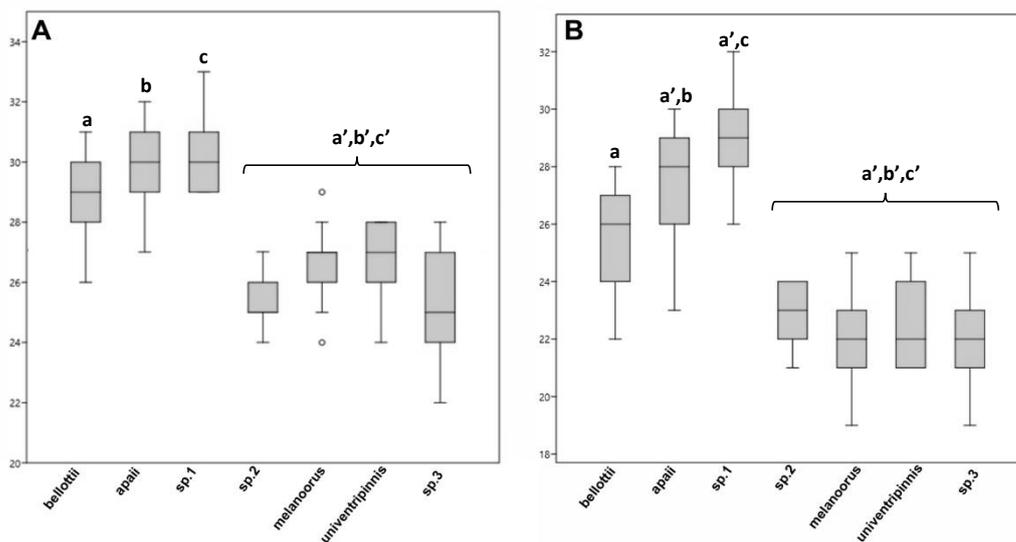


Figura 26. Box plots para la variable número de radios de la aleta anal. **A** = machos; **B** = hembras. Eje X = grupos, eje Y = número total de radios de la aleta. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

4) Órganos de contacto

Aletas

En los grupos analizados únicamente se encontraron órganos de contacto en las aletas pectorales de ejemplares machos. En la Tabla 5 se resume la cantidad de ejemplares analizados por grupo y el porcentaje de estos que presentaron órganos de contacto en las aletas pectorales. En la Figura 27 se grafica para los ejemplares que presentaron órganos de contacto, el número de radio pectoral máximo en el que se encontraron, tomando como radio 1 el primero del margen superior de la aleta y avanzando hacia la región inferior. Para la mayor parte de los casos se observó un alto grado de solapamiento en los rangos de variación de los datos.

Tabla 5. Número de ejemplares machos por grupo, en los que se analizó la presencia de órganos de contacto en aletas pectorales. Los porcentajes indican la proporción de estos que efectivamente presentaron órganos de contacto.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
15	16	10	15	16	16	16
100%	75%	50%	100%	93%	94%	75%

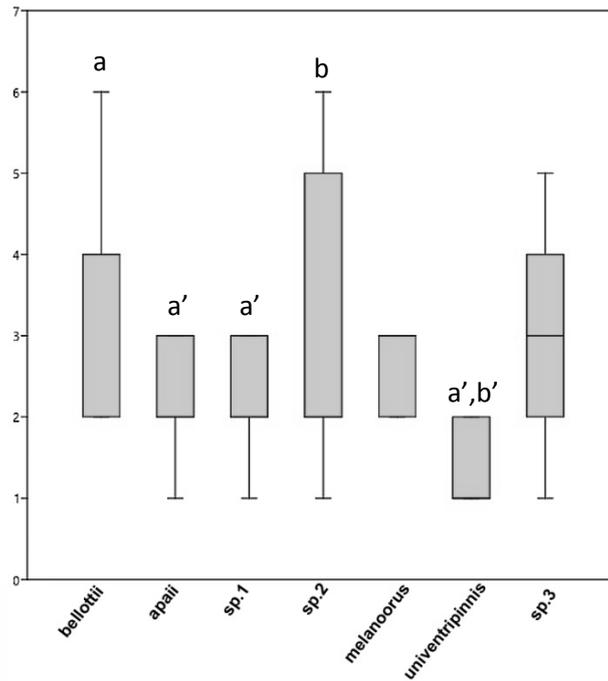


Figura 27. Box plots para la variable número de radios pectorales con órganos de contacto en machos. Eje X = grupos, eje Y = número total de radios. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Escamas

En los grupos analizados se encontraron órganos de contacto en escamas únicamente en ejemplares machos. En la Tabla 6 se resume la cantidad de ejemplares analizados por grupo y el porcentaje de estos que presentaron órganos de contacto en las escamas. Destaca la proporción relativamente baja (menos del 40%) de ejemplares con órganos de contacto presentes en *Austrolebias melanoorus* y *A. sp.3* versus los restantes grupos (60 a 100%).

En la Figura 28 se grafica, para los ejemplares que presentaron órganos de contacto, el número máximo de órganos por escamas. Resulta interesante la diferencia observada

entre los rangos e *A. sp.3* versus *A. melanoorus* y *A. univentripinnis*, sin embargo esta no fue significativa. Estas diferencias sí fueron significativas entre *A. univentripinnis* versus *A. bellottii* y *A. apaii*.

Tabla 6. Número de ejemplares machos por grupo en los que se analizó la presencia de órganos de contacto en escamas. Los porcentajes indican la proporción de estos que efectivamente presentaron órganos de contacto.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
16	16	10	15	16	16	16
100%	69%	90%	100%	38%	63%	31%

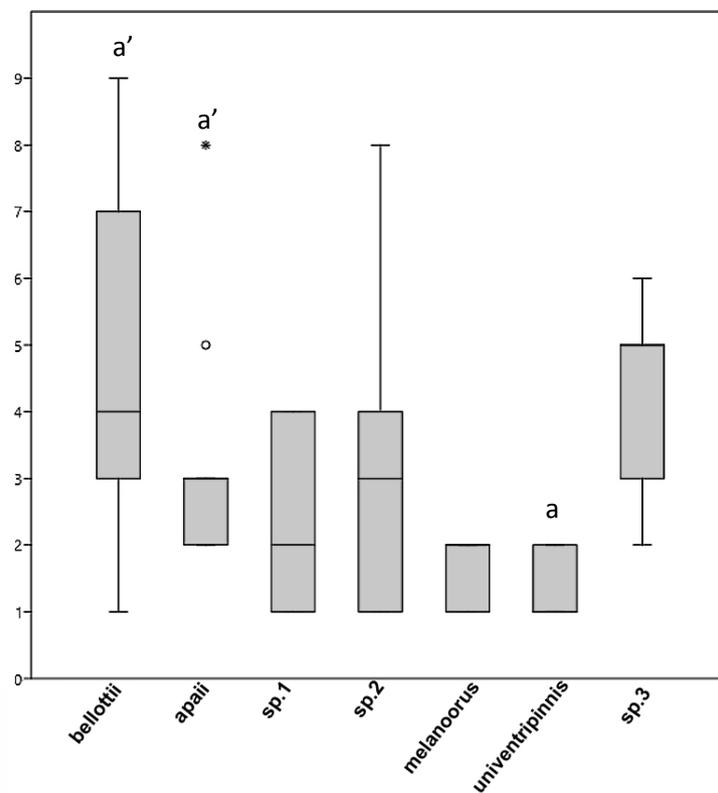


Figura 28. Box plots para la variable número máximo de órganos de contacto en escamas de ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = número máximo de órganos de contacto. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Caracteres óseos

Debido a que en algunos casos el N de datos fue muy bajo, por contarse con pocos ejemplares o por que estos no quedaron correctamente teñidos, no se realizó un tratamiento estadístico de los datos para la totalidad de las variables. En varios casos los machos de *Austrolebias* sp.1 no son incluidos debido a problemas en la tinción de los ejemplares, que no permitieron visualizar las estructuras.

1) Cabeza

Presencia de osificaciones dermosfenóticas

Se observaron dos tendencias principales, con *Austrolebias bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1* presentando osificaciones dermosfenóticas en la mayor parte de los ejemplares (77-100% de los individuos), mientras que en *Austrolebias* sp.2, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3*, estas osificaciones se hallaron presentes en pocos ejemplares (5-22% de los individuos analizados) (Tabla 7).

Tabla 7. Presencia de osificaciones dermosfenóticas para cada uno de los grupos. Se toma a machos y hembras en su conjunto. Los porcentajes indican la proporción de ejemplares que efectivamente presentaron las osificaciones.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
21	48	7	20	18	20	31
95%	77%	100%	5%	22%	15%	13%

Espinas del primer arco branquial

El número de espinas epibranciales varió entre 2 y 5. Se hallaron diferencias significativas entre *Austrolebias* sp.1 y *A.* sp.3, pero dado el solapamiento del rango de variación de los datos estas no se consideraron de utilidad diagnóstica.

El número de espinas hipobranciales varió entre 8 y 13 (usualmente 9 a 12). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas solo entre *Austrolebias apaii* y *A.* sp.2, pero al igual que en el caso anterior los rangos de variación se hallan solapados.

Número de dientes de las placas faringobranciales 2 y 3

Tanto para machos como para hembras el número de dientes de las placas faringobranciales 2 y 3 varió entre 2-13 y 16-48 respectivamente, sin embargo no se observaron grandes diferencias entre los grupos. La única excepción se observó entre machos de *Austrolebias bellottii* respecto a machos de *A. univentripinnis*, que presentaron de 5 a 10 y de 2 a 4 dientes respectivamente en el faringobrancial 2 (Figura 29).

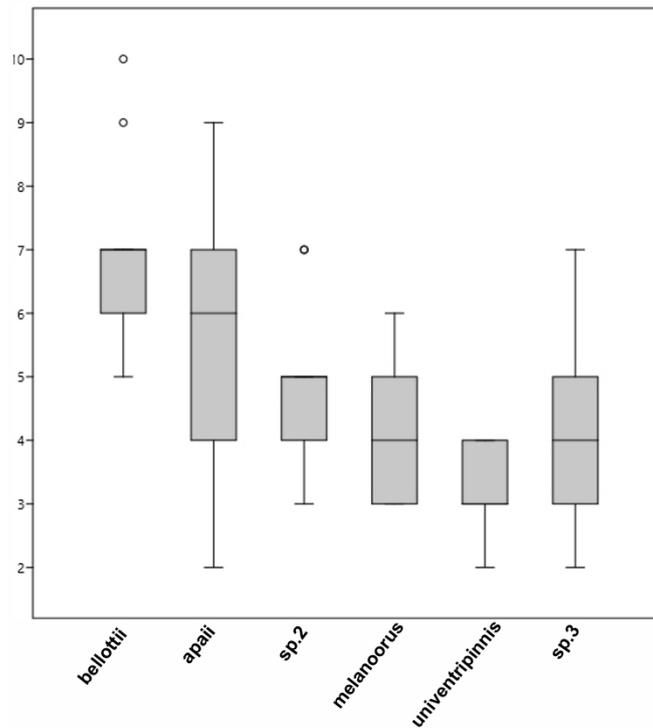


Figura 29. Box plots para la variable número de dientes en la placa faringobranquial en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = número de dientes. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*.

Proceso ventral del hueso posttemporal

El proceso ventral del hueso posttemporal se halló presente en la casi totalidad de los ejemplares analizados (más del 94% de los casos), siendo este usualmente largo (en más del 63% de los ejemplares analizados) (Tabla 8). No parece ser un carácter con utilidad diagnóstica, al menos para discernir entre los grupos de estudio.

Tabla 8. Largo del proceso ventral del hueso posttemporal para cada uno de los grupos. Los porcentajes indican qué proporción de ejemplares presentaron proceso largo, corto o ausente.

	<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
Nº	21	55	8	20	18	20	31
largo	76%	85%	63%	85%	83%	65%	74%
corto	19%	11%	37%	10%	11%	30%	26%
ausente	5%	4%	0%	5%	6%	5%	0%

Forma del cartílago basihial

La forma del cartílago basihial resultó ser extremadamente variable. Aún así se los clasificó en tres grandes grupos: 1) “simple”: cartílago ensanchándose de forma gradual hacia su extremo distal (Figura 30a); 2) “ancho”: ensanchándose de forma abrupta hacia su extremo distal (Figura 30b); 3) “Y-shaped”: con comisuras o una concavidad notoria en su margen distal (Figura 30c). A pesar de la gran variación de formas intra-grupo (Tabla 9), parece ser un carácter de utilidad sobre todo para distinguir a *Austrolebias* sp.2 de *A. bellottii*, *A. apaii*, *A. sp.1* y *A. univentripinnis*. La primera presenta un cartílago con forma de Y o con pequeñas comisuras en el 95% de los casos analizados, en contraste con un 3 a 0% en los otros cuatro grupos. Por su parte *Austrolebias melanoorus* y *A. sp.3* no presentaron ninguna tendencia demasiado marcada que pudiese ser de utilidad para distinguirlas de los demás grupos.

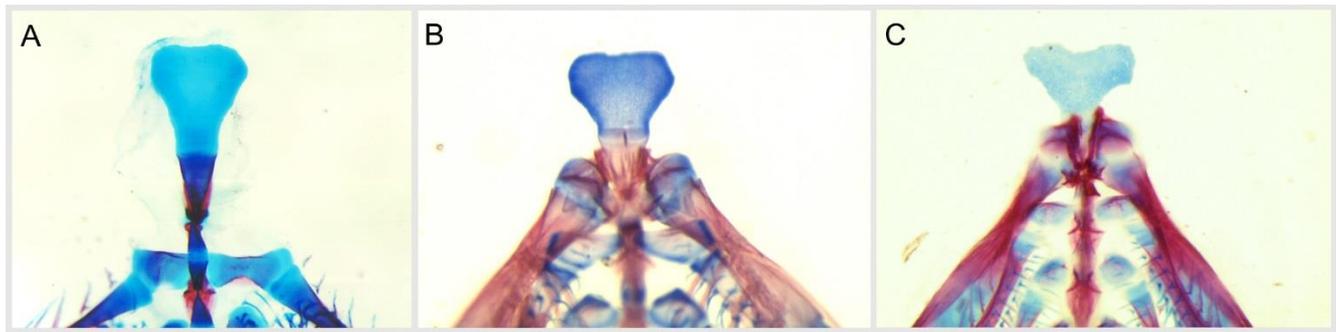


Figura 30. Forma del cartílago basihial: A = “simple”; B = “ancho”; C = “Y-shaped”.

Tabla 9. Forma del cartílago basihial para cada uno de los grupos. Los porcentajes indican qué proporción de los ejemplares presentaron cada una de las variantes consideradas.

	<i>A. bellottii</i> (N=4)	<i>A. apaii</i> (N=37)	<i>A. sp.1</i> (N=5)	<i>A. sp.2</i> (N=20)	<i>A. melanoorus</i> (N=10)	<i>A. univentripinnis</i> (N=16)	<i>A. sp.3</i> (N=22)
Simple	50%	22%	0%	5%	0%	6%	18%
Ancho	50%	76%	100%	0%	80%	94%	36%
Y-shaped / con comisuras	0%	3%	0%	95%	20%	0%	45%

Proporción aproximada de cartílago en el basihial

Para todos los ejemplares analizados el largo del cartílago ocupó entre un 50% y un 60% del largo total del basihial, no observándose tendencias de ninguna clase en ninguno de los grupos.

2) Vértebras

Número de vértebras abdominales

Tanto para ejemplares machos como hembras, el número de vértebras abdominales varió en general entre 10 y 14 vértebras, con tendencia en *Austrolebias bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1* a que los valores más frecuentes se hallaran entre 12 y 14, y en los restantes grupos entre 12 y 10. Debido al solapamiento de los rangos de datos estas diferencias no resultan en principio de valor diagnóstico en ninguno de los casos.

Número de vértebras caudales

Tanto para ejemplares machos como hembras, el número de vértebras caudales varió en general entre 15 y 18 vértebras, sin observarse tendencias demasiado claras entre los grupos. El único caso llamativo se observó en machos de *Austrolebias sp.1* que presentaron 14 vértebras, lo que los distingue del resto de los grupos, pero dado a que solo se trata de 2 ejemplares dicha diferencia en principio será tomada con precaución hasta no analizarse más especímenes.

Número total de vértebras

Destaca nuevamente en ejemplares machos el bajo número de vértebras en *Austrolebias sp.1* (26 versus 27 a 32 en los restantes grupos). También se observa un bajo solapamiento entre los rangos de los datos de *Austrolebias univentripinnis* (27 a 28 vértebras en los 10 ejemplares observados) y *A. bellottii* (con 29 a 30 vértebras en 9 de los 11 ejemplares observados) (Figura 31).

En el caso de ejemplares hembra en número varió entre 26 y 31 vértebras, y si bien se observaron tendencias, las mismas resultaron a priori de escaso valor diagnóstico.

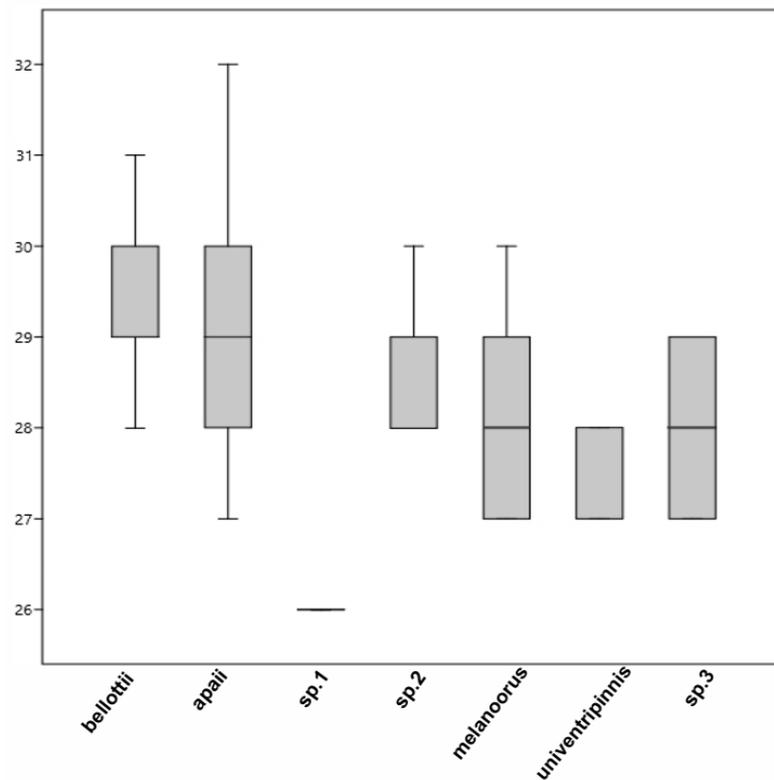


Figura 31. Box plots para la variable número vértebras totales en machos. Eje X = grupos, eje Y = número total de vértebras. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo.

3) Posición de aletas

Origen de aleta dorsal respecto a espinas neurales

En ejemplares macho la posición del origen de la aleta dorsal varió entre la espina neural de la séptima y la onceava vértebra, existiendo un gran solapamiento entre los rangos de los datos. Los únicos grupos que no se solaparon fueron *Austrolebias bellottii* y *A. univentripinnis*, que variaron entre las posiciones 9,5 a 10,5 y 7 a 8 respectivamente (Figura 32a).

En el caso de las hembras la posición del origen de la aleta dorsal varió entre la posición 8,5 y 13, y se observó solapamiento entre todos los rangos de datos. Sin embargo aparece como carácter potencialmente útil para distinguir entre ejemplares de *Austrolebias melanoorus* y *A. univentripinnis*, ya que el origen de la aleta dorsal varió entre las posiciones 11,5 a 12,5 para 7 de los 8 ejemplares analizados de la primera, y entre las posiciones 10,5 a 11 para 9 de los 10 ejemplares analizados de la segunda (Figura 32b).

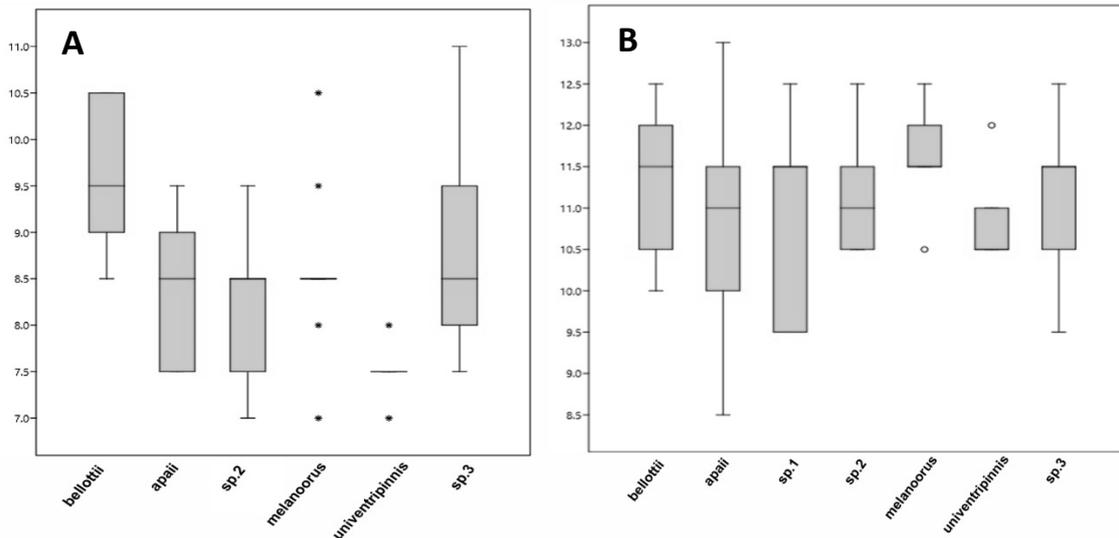


Figura 32. Box plots para la variable origen de la aleta dorsal respecto a las espinas neurales. **A** = machos; **B** = hembras. Eje X = grupos, eje Y = posición. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*.

Origen de aleta dorsal respecto a la columna vertebral

El origen de la aleta dorsal de los ejemplares varió entre las posiciones 8 a 12 en machos y 10 a 15 en hembras, respecto a las vértebras. Al igual que el caso anterior se observó un no solapamiento en los rangos de variación de los machos de *Austrolebias bellottii* y *A. univentripinnis* (Figura 33), sin embargo en ejemplares hembras no se detectaron diferencias de interés.

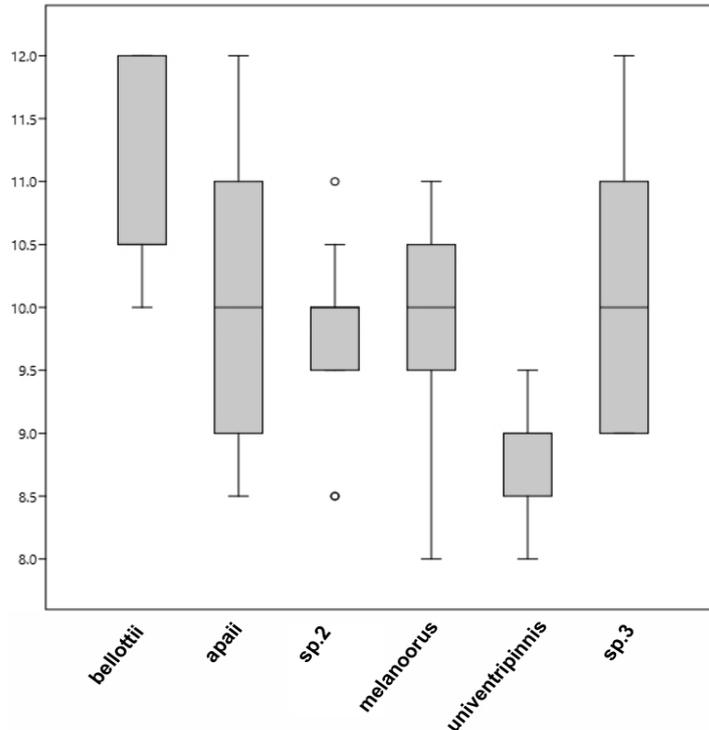


Figura 33. Box plots para la variable origen de aleta dorsal respecto a la columna vertebral en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = posición. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*.

Origen de aleta anal respecto a espinas pleurales

El origen de la aleta anal respecto a las espinas pleurales varió entre las posiciones 6,5 a 10 en machos y 7,5 a 12 en hembras. Para ejemplares machos se observó una separación parcial entre los rangos de *Austrolebias bellottii* vs. *A. sp.2* y *A. univentripinnis* (Figura 34a), presentando la primera como posición más frecuente el espacio entre las espinas 7 y 8 (posición 7,5) en 6 de los 8 ejemplares analizados, y mientras que para las restantes dos especies la posición varió entre las espinas 8 a 9 y la espina 8 a interespacio 8-9 respectivamente. Por su parte en ejemplares hembra se observó un no solapamiento entre los rangos de variación de *Austrolebias bellottii* (posición 9 a 9,5, N=9) y *A. apaii*

(posición 7,5 a 10, N=25) versus *A. sp.1* (posición 10,5 a 11,5, N=4), y un solapamiento parcial de *A. bellottii* con *A. melanoorus* (posición 10,5 a 12 en 7 de 8 ejemplares, más uno con origen de la aleta en posición 9,5) (Figura 34b).

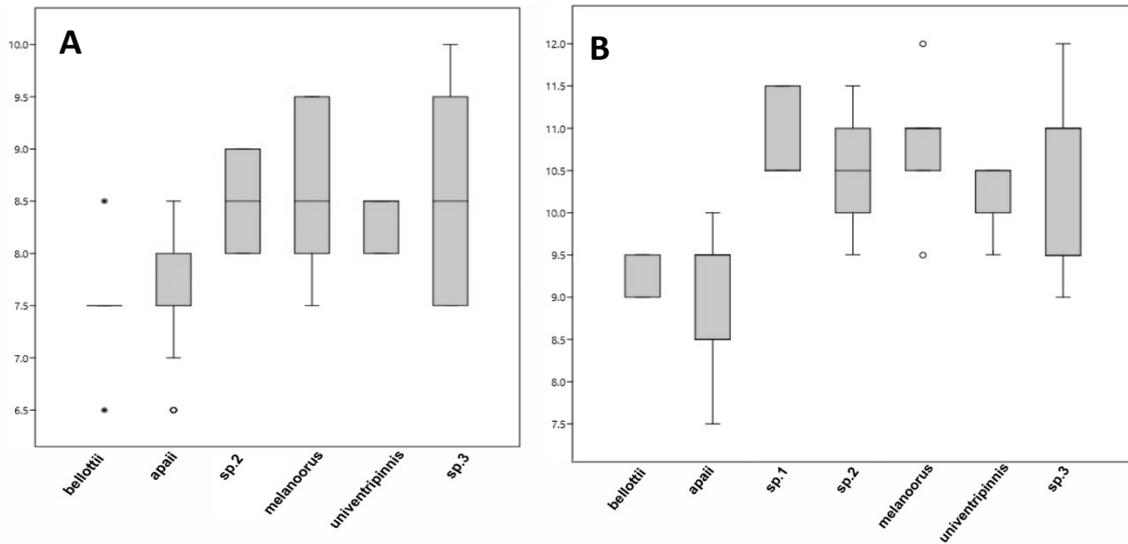


Figura 34. Box plots para la variable origen de aleta anal respecto a las espinas pleurales. A = machos; B = hembras. Eje X = grupos, eje Y = posición. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*.

Origen de aleta anal respecto a la columna vertebral

El origen de la aleta anal de los ejemplares varió entre las posiciones 8 a 12 en machos y 9 a 15 en hembras, respecto a las vértebras. En ejemplares macho se observó un bajo solapamiento entre *A. bellottii* (posición 8 a 9,5 para 7 de 8 ejemplares, más un ejemplar con el origen de la aleta en posición 10), y *A. sp.2*, *A. melanoorus* y *A. univentripinnis* (posición 10 a 12) (Figura 35). En ejemplares hembras no se detectaron diferencias de interés.

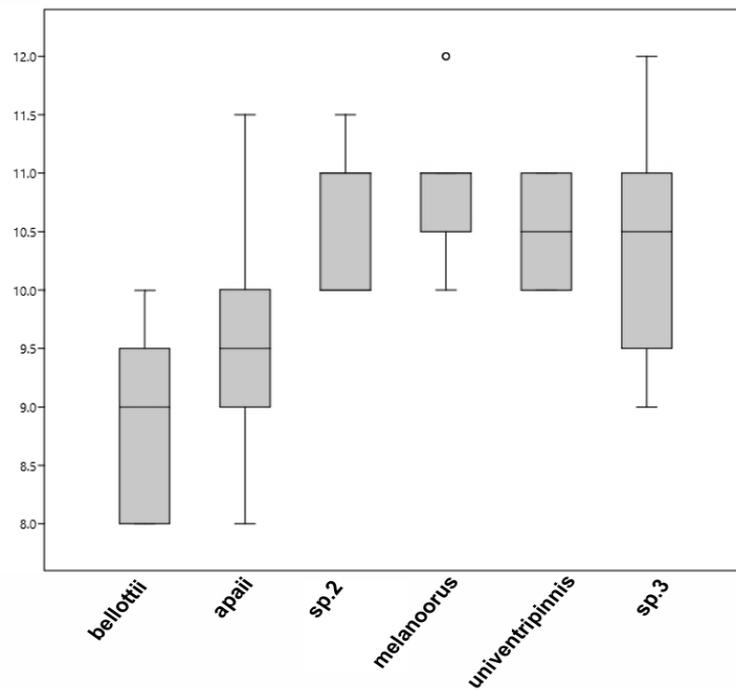


Figura 35. Box plots para la variable origen de la aleta anal respecto a la columna vertebral en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = posición. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*.

Origen de aleta anal respecto al origen de la aleta dorsal

Para ejemplares macho se observó que la totalidad de individuos de *Austrolebias bellottii* presentaron el inicio de la aleta anal posicionada anteriormente respecto a la aleta dorsal. En *Austrolebias* sp.2, *A. melanoorus*, y *A. univentripinnis* los ejemplares presentaron el origen de la aleta anal posicionado posteriormente respecto al origen de la dorsal entre el 90 y 100 % de los casos. Por su parte en *A. apaii* y *A. sp.3* la posición fue variable. (Tabla 10)

Tabla 10. Posición relativa del origen de la aleta anal en machos, respecto al origen de la aleta dorsal para cada uno de los grupos. Los porcentajes indican qué proporción de los ejemplares presentaron cada una de las variantes consideradas.

	<i>A. bellottii</i> (N=8)	<i>A. apaii</i> (N=29)	<i>A. sp.2</i> (N=10)	<i>A. melanoorus</i> (N=10)	<i>A. univentripinnis</i> (N=9)	<i>A. sp.3</i> (N=16)
Anterior	100%	72%	10%	10%	0	38%
Iguales	0%	7%	0%	0%	0	6%
Posterior	0%	21%	90%	90%	100	56%

En ejemplares hembras la posición del origen de la aleta anal fue más variable, aun así se observa una tendencia a posicionarse posteriormente en el 80% o más de los casos para *Austrolebias* sp.1, *A. sp.2*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3* (Tabla 11)

Tabla 11. Posición relativa del origen de la aleta anal en hembras, respecto al origen de la aleta dorsal para cada uno de los grupos. Los porcentajes indican qué proporción de los ejemplares presentaron cada una de las variantes consideradas.

	<i>A. bellottii</i> (N=10)	<i>A. apaii</i> (N=26)	<i>A. sp.1</i> (N=6)	<i>A. sp.2</i> (N=10)	<i>A. melanoorus</i> (N=7)	<i>A. univentripinnis</i> (N=10)	<i>A. sp.3</i> (N=15)
Anterior	40%	62%	0%	20%	14%	10%	13%
Iguales	20%	0%	17%	0%	0%	10%	0%
Posterior	40%	38%	83%	80%	86%	80%	87%

Número de radiales proximales en la cintura pectoral.

Tanto para machos como para hembras de todos los grupos el número de radiales proximales varió entre 3 y 4, con la excepción de un ejemplar de *A. apaii* y otro de *A. sp.2* que presentaron 5. No se observaron tendencias en los datos.

Patrones de coloración

A) Bandeado de los machos

El número de ejemplares por grupo para los que se pudo obtener datos del número de bandas en el cuerpo se muestra en la Tabla 12. El conjunto de los datos presentó diferencias significativas entre sus medianas (KW-H=111, $p = 6,137 \times 10^{-22}$). Se encontraron diferencias significativas entre muchos de los grupos, sin embargo debido al gran solapamiento que se observa entre los rangos de variación de los datos (Figura 36), este carácter resulta de escaso valor diagnóstico.

Tabla 12. Número de ejemplares machos en los que se realizó conteo de bandas para cada uno de los grupos.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
28	33	9	43	78	16	72

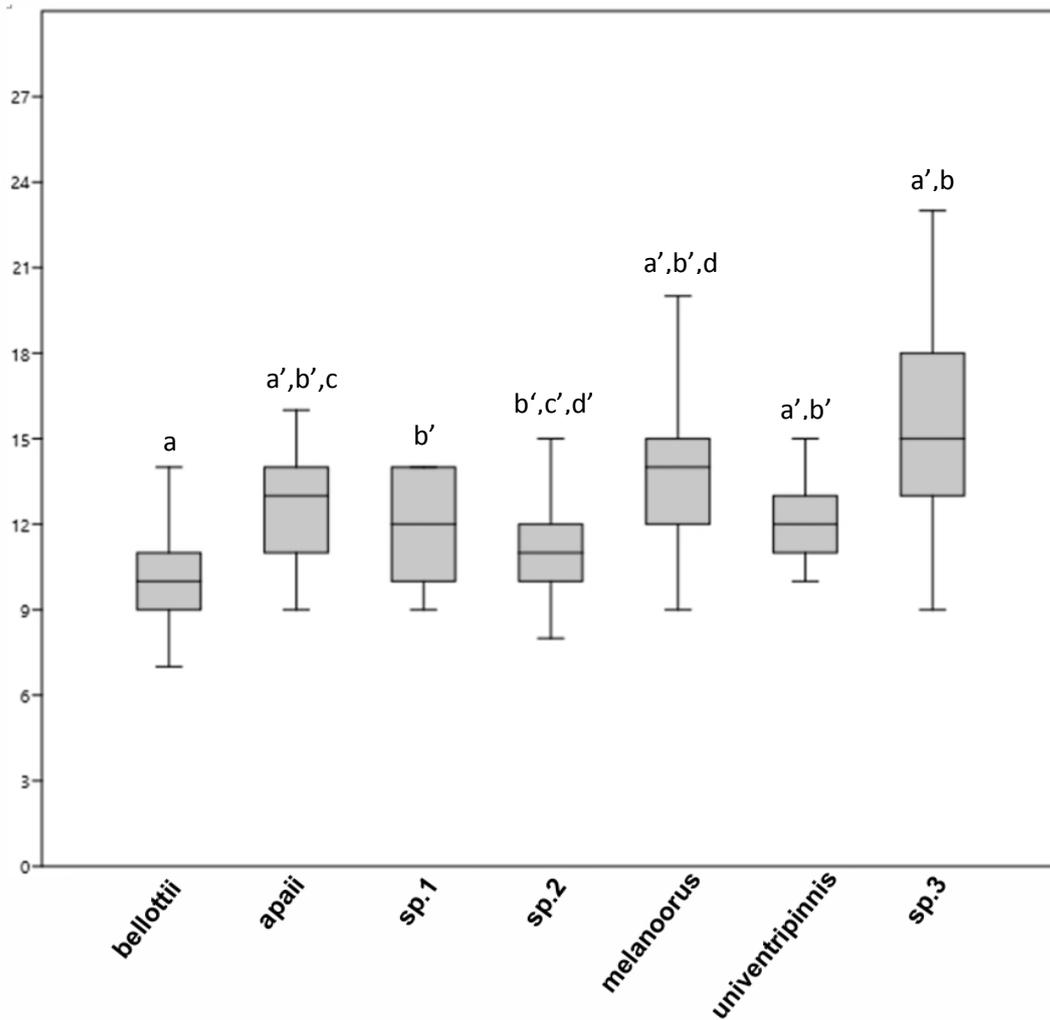


Figura 36. Box plots para la variable número de bandas claras en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = número total de bandas. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, y barras laterales marcando mínimo y máximo. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

B) Manchas en los flancos de las hembras

Cuando se analiza la presencia/ausencia de manchas negras a los lados de la región abdominal de ejemplares hembras, se observan dos grandes tendencias: para *Austrolebias bellottii* y *A. sp.1* relativamente pocos ejemplares presentaron las mismas (27% y 38% respectivamente), mientras en los restantes grupos la presencia de manchas varió entre un 77% y un 98% de los ejemplares analizados (Tabla 13).

En lo que respecta a la cantidad de manchas (cuando estas se hallaron presentes), a pesar de existir diferencias significativas entre varios de los grupos los rangos de variación se solaparon en la totalidad de los casos (Figura 37). Aún así resulta evidente la existencia de dos grandes tendencias, con *Austrolebias bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1* variando principalmente entre 1 y 3 manchas negras en los flancos, y los restantes cuatro grupos variando entre 1 a más de una decena de estas.

Por otra parte, mientras se realizaba el conteo de manchas se observó en buena parte de los ejemplares de *A. sp.2* (Figura 38a), que las manchas cuando se hallaban presentes generalmente estaban alineadas horizontalmente (aproximadamente el 74% de los ejemplares que presentaron manchas), lo que fue observado en muy raros caso dentro de los otros grupos. Estos últimos generalmente presentaron las manchas de forma dispersa en la región central de los flancos (Figura 38b).

Tabla 13. Número de ejemplares hembras por grupo en las que se analizó la presencia de manchas negras en los flancos. Los porcentajes indican la proporción de estas que efectivamente presentaron manchas negras.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
105	38	8	58	130	13	43
27%	82%	38%	81%	95%	77%	98%

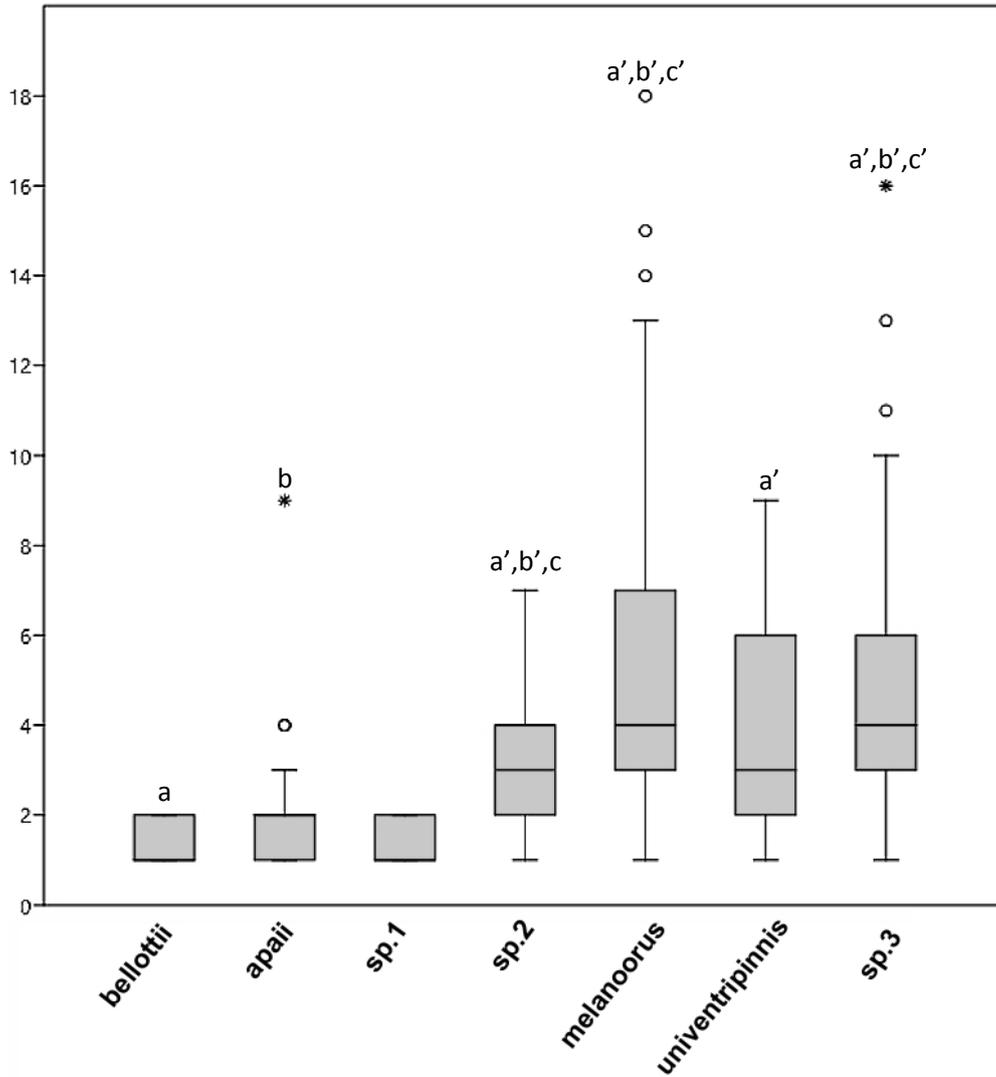


Figura 37. Box plots para la variable número manchas negras de los flancos en ejemplares machos. Eje X = grupos, eje Y = número de manchas. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

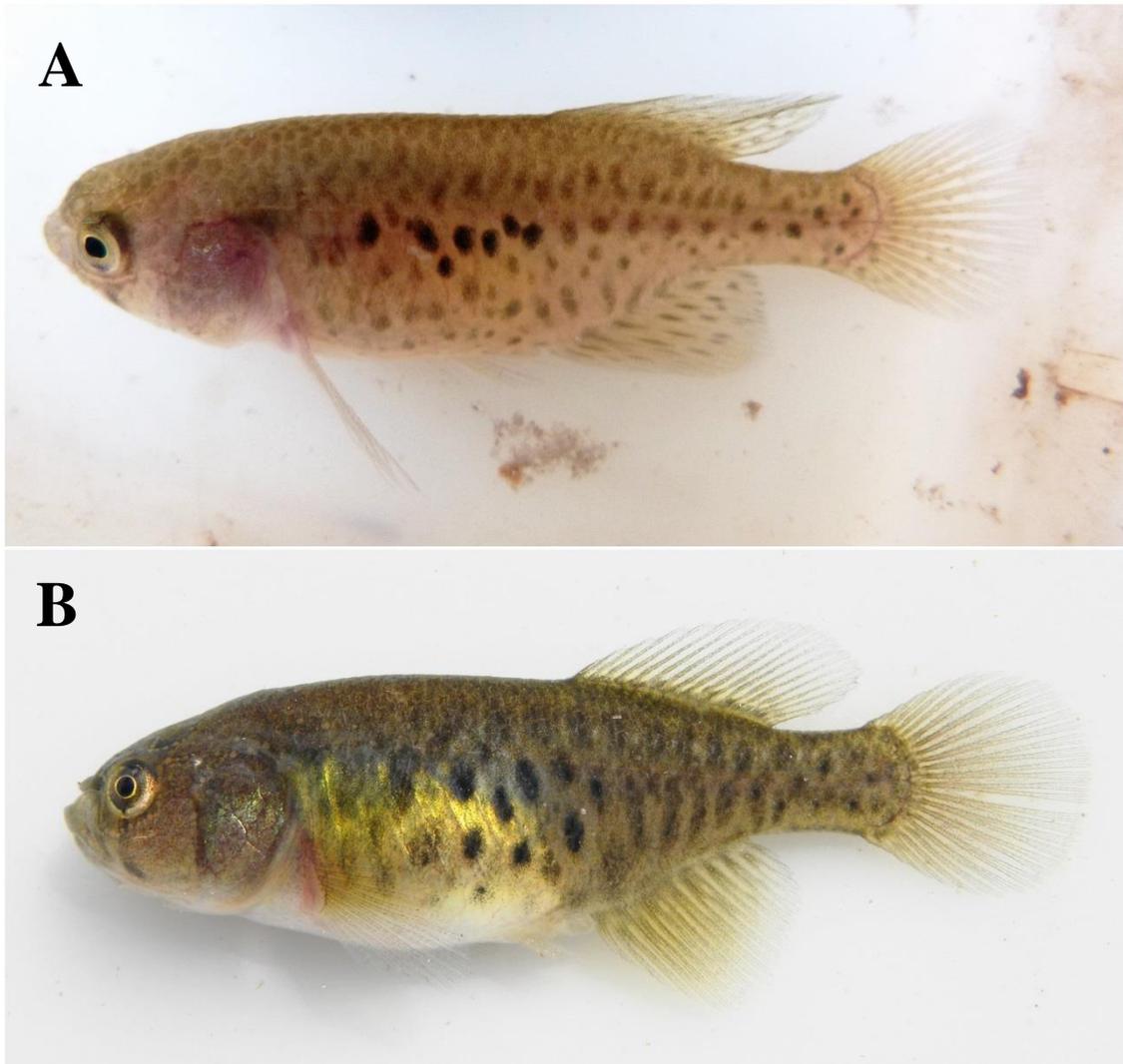


Figura 38. Ejemplares hembra de *Austrolebias* sp.2 (A) y *A. melanoorus* (B). Se puede observar la presencia de manchas negras horizontalmente alineadas en *A. sp.2*, mientras *A. melanoorus* presenta estas manchas dispersas en el flanco.

C) Caracteres no cuantitativos

Los patrones de coloración observados se resumen en la Tabla 14. No se encontraron diferencias entre los patrones de coloración de *Austrolebias bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1*, así como entre los de *A. melanoorus* y *A. sp.3*. En líneas generales se observa que los machos de *A. melanoorus* y *A. sp.3* (Figura 39a) presentan coloración apagada y poco llamativa cuando se los compara con la de ejemplares de los demás grupos. *Austrolebias*

univentripinnis (Figura 39d) presentó un patrón de coloración muy similar a *A. bellotti*, *A. apaii* (Figura 39b) y *A. sp.1*, difiriendo generalmente en la densidad y posición del punteado sobre las aletas anal y caudal. Por su parte *Austrolebias sp.2* presentó un patrón de coloración muy distintivo (Figura 39c) lo que la hace fácilmente reconocible de cualquiera de los integrantes de los demás grupos.

Tabla 14. Patrones de coloración observado en ejemplares machos para cada uno de los grupos. En la primer columna se detallan los caracteres analizados. En las restantes columnas se detalla lo observado para cada uno de los grupos de estudio. Casilleros del mismo color dentro de cada fila señalan características que resultaron iguales para 2 o más grupos.

MACHOS	<i>A. bellottii</i> (N=12)	<i>A. apaii</i> (N=17)	<i>A. sp.1</i> (N=5)	<i>A. sp.2</i> (N=62)	<i>A. melanoorus</i> (N=40)	<i>A. sp.3</i> (N=29)	<i>A. univentripinnis</i> (N=9)
Reborde negro en pectorales	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Iridiscencias sobre el reborde negro de las pectorales	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI
Flancos con bandas o puntos alineados verticalmente	puntos	puntos	puntos	bandas	bandas	bandas	puntos
Puntos iridiscentes o hialinos en la aleta dorsal	iridiscentes	iridiscentes	iridiscentes	iridiscentes	hialinos o no iridiscentes	hialinos o no iridiscentes	iridiscentes
Puntos en la aleta caudal	generalmente presentes	generalmente presentes	generalmente presentes	generalmente ausentes o unos pocos en la base	generalmente en base, poco conspicuos o ausentes	generalmente en base, poco conspicuos o ausentes	generalmente ausentes o unos pocos en la base
Reborde negro en anal	poco notorio o ausente	poco notorio o ausente	poco notorio o ausente	poco notorio o ausente	presente	presente	poco notorio o ausente
Coloración pélvicas	iridiscente intensa	iridiscente intensa	iridiscente intensa	iridiscente intensa	poco conspicua	poco conspicua	iridiscente intensa
Opérculo y preopérculo	iridiscente intenso	iridiscente intenso	iridiscente intenso	iridiscente intenso	poco conspicua	poco conspicua	iridiscente intenso
Puntos en la aleta anal	variables en disposición	variables en disposición	variables en disposición	en gral. 1 hilera basal densa	en gral. 1 o 2 hileras basales irregulares	en gral. 1 o 2 hileras basales irregulares	en gral. 1 hilera basal
Iridiscencia en caudal	generalmente intensa	generalmente intensa	generalmente intensa	generalmente intensa	poco conspicua	poco conspicua	generalmente intensa
Intensidad del color de fondo en aleta anal	más intenso hacia el borde	más intenso hacia el borde	más intenso hacia el borde	más intenso hacia el borde	más intenso hacia la base	más intenso hacia la base	más intenso hacia el borde

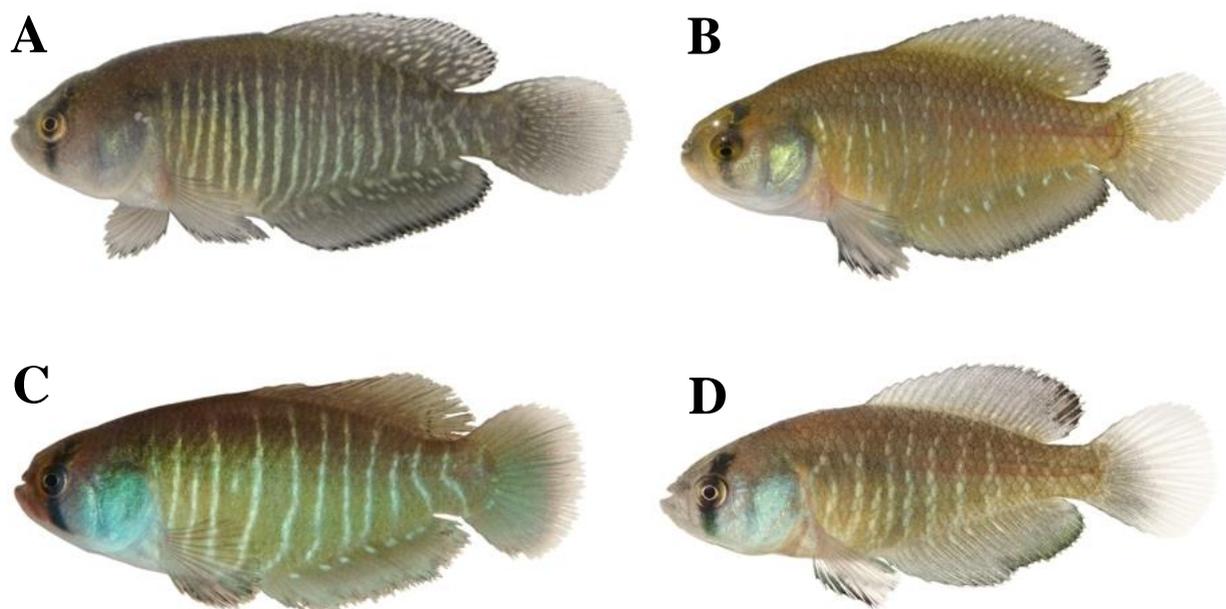


Figura 39. Ejemplares machos adultos de *Austrolebias* sp.3 (A), *A. apaii* (B), *A. sp.2.* (C) y *A. univentripinnis* (D).

Otros

1) Papila urogenital de los machos

En la totalidad de los ejemplares revisados la papila urogenital de los ejemplares machos se hallaba fusionada al primer radio de la aleta anal. El número de ejemplares revisados por grupo se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Número de ejemplares machos en los que se analizaron las características de la papila urogenital, para cada uno de los grupos.

<i>A. bellottii</i>	<i>A. apaii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentripinnis</i>	<i>A. sp.3</i>
16	16	14	15	16	16	16

2) Grado de fusión de las aletas pélvicas

Dicho caracter resultó ser parcialmente útil para distinguir entre los grupos. En ejemplares machos (Figura 40a) se puede observar dos grandes grupos, uno compuesto por *Austrolebias bellottii*, *A. sp.1*, *A. sp.2* y *A. univentripinnis* en el que los ejemplares presentaron las aletas pélvicas unidas por una membrana en un 50 a 80% de su longitud, y otro compuesto por *A. melanoorus* y *A. sp.3*, en el que los ejemplares presentan las aletas pélvicas fusionadas en un 50 % o menos, con presencia de individuos en los que éstas si bien están juntas en la base, no se hallan unidas. *A. apaii* se halla en una posición intermedia a los grupos anteriores, con el grado de fusión variando entre un 40 y un 70%.

En el caso de las hembras (Figura 40b) se observa algo similar que en machos, *Austrolebias bellottii* y *A. sp.1* presentaron aletas fusionadas en un 60 a 80 % de su longitud, mientras *A. melanoorus* y *A. sp.3* variaron entre un 60 a 0%. Similar al caso anterior *A. apaii*, *A. sp.2* y *A. univentripinnis* se hallaron en un punto intermedio, variando entre 50 y un 75 %.

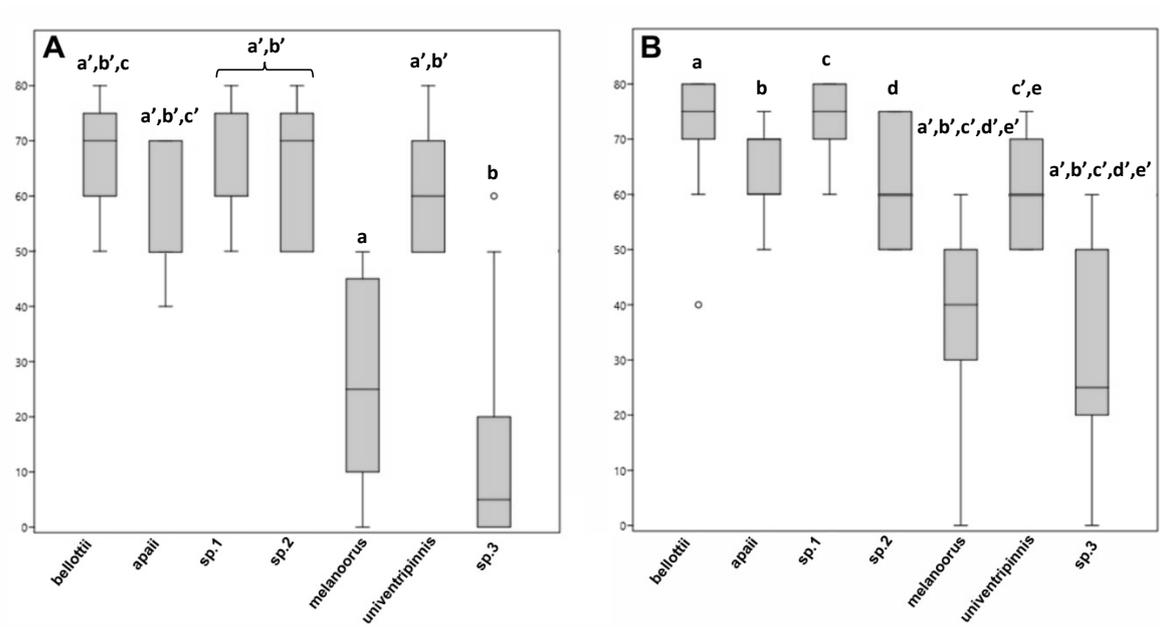


Figura 40. Box plots para la variable grado de fusión de las aletas pélvicas. **A** = machos; **B** = hembras. Eje X = grupos, eje Y = porcentaje de la longitud total que se halla fusionado. Mediana representada por la barra dentro de los rectángulos, rectángulos englobando los datos del percentil 25 al percentil 75, barras laterales marcando mínimo y máximo, y puntos representando *outliers*. Letras minúsculas señalan entre qué pares de grupos existen diferencias estadísticamente significativas.

Discusión

Análisis genético

Delimitación del grupo de especies *Austrolebias bellottii*

Como fuera mencionado en la introducción, el género *Austrolebias* fue revisado morfológicamente por Costa en el año 2006. En dicho trabajo se establece por primera vez una hipótesis filogenética para el género en su conjunto, y se proponen una serie de agrupaciones de especies, una de las cuales (Clado A4) es denominada como “grupo *A. bellottii*”. La monofilia de dicho grupo fue basada en una serie de características morfológicas que, sin embargo, presentan un alto grado de variabilidad y/o son homoplásicas respecto a las encontradas en otros clados.

En contraste, trabajos de sistemática molecular (García *et al.*, 2002, 2012, 2014, Loureiro & García, 2008) nos muestran un panorama diferente, donde el grupo tal y como fuera propuesto en el año 2006 resulta ser polifilético. El trabajo más reciente (García *et al.*, 2014) plantea que parte del grupo *A. bellottii sensu* Costa, conformaría un clado monofilético junto con representantes del grupo *A. robustus*, al que denomina “complejo de especies *A. bellottii-robustus*”. Las especies que no quedaran incorporadas en dicho grupo quedan englobadas en otro clado no directamente relacionado, al que denomina “complejo de especies *A. adloffii-viarius*”.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas en la presente tesis apoyan la hipótesis de que el grupo *A. bellottii* como fue concebido originalmente, se trata de una agrupación

artificial. En líneas generales los resultados obtenidos se asemejan a los de García *et al.* (2014), obteniéndose un clado bien soportado que se asemeja al “complejo de especies *A. bellottii-robustus*”, difiriendo sin embargo de forma bastante marcada en cuanto a su configuración interna. El clado obtenido estuvo compuesto por tres linajes principales:

- 1) uno que reúne las especies tradicionalmente asignadas a “grupo *A. robustus*”.
- 2) otro conformado únicamente por *Austrolebias vandenbergi*.
- 3) y un tercer grupo que engloba a las especies *Austrolebias bellottii*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. “apaii”* y las poblaciones incógnita incorporadas en esta tesis.

Por lo cual propongo considerar a este último clado como “grupo *A. bellottii*” en un sentido estricto (*sensu stricto*). Esta propuesta está apoyada por características morfológicas que los distinguen claramente de los dos primeros, como ser la ausencia de órganos de contacto en la aleta anal en ejemplares macho (*vs.* presencia), y papila urogenital fusionada al primer radio de la misma aleta también en machos (*vs.* papila urogenital libre).

Análisis filogenético grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s.

Los distintos análisis filogenéticos realizados (Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana), confirman la monofilia del grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s., con valores de soporte robustos en los tres casos (100%, 77% y probabilidad posterior de 1.00, respectivamente), y lo divide en 7 linajes monofiléticos principales, todos ellos bien soportados por cualquiera de los métodos. Estos linajes, que se correspondieron a las unidades establecidas preliminarmente en base a morfología y distribución geográfica, se agruparon en dos clados principales. Como se observa en la Figura 41, uno de estos clados reúne a los grupos *Austrolebias melanoorus*, *A. sp.3* y *A. univentripinnis* (Clado *A. melanoorus*), y el otro que reúne a *Austrolebias apaii*, *A. sp.1*, *A. bellottii* y *A. sp.2* (Clado *A. bellottii*).

El período de tiempo en el cual el grupo *A. bellottii* s.s. habría comenzado el proceso de diversificación, corresponde a principios y mediados de Pleistoceno, a partir de hace unos 2.4 millones de años. Durante el inicio de este período (aprox. 2.9 millones de años) los niveles oceánicos habrían caído por debajo de los niveles actuales (Hansen *et al.*, 2013), pudiendo haber propiciado eventos dispersivos de los ancestros del grupo. Ya hacia mediados de Pleistoceno los niveles oceánicos comienzan a fluctuar de forma cada vez más marcada (Hansen *et al.*, 2013), comenzando ciclos cada vez más pronunciados de transgresiones y regresiones marianas, que habrían aislado de forma periódica o permanente las distintas poblaciones, favoreciendo procesos vicariantes.

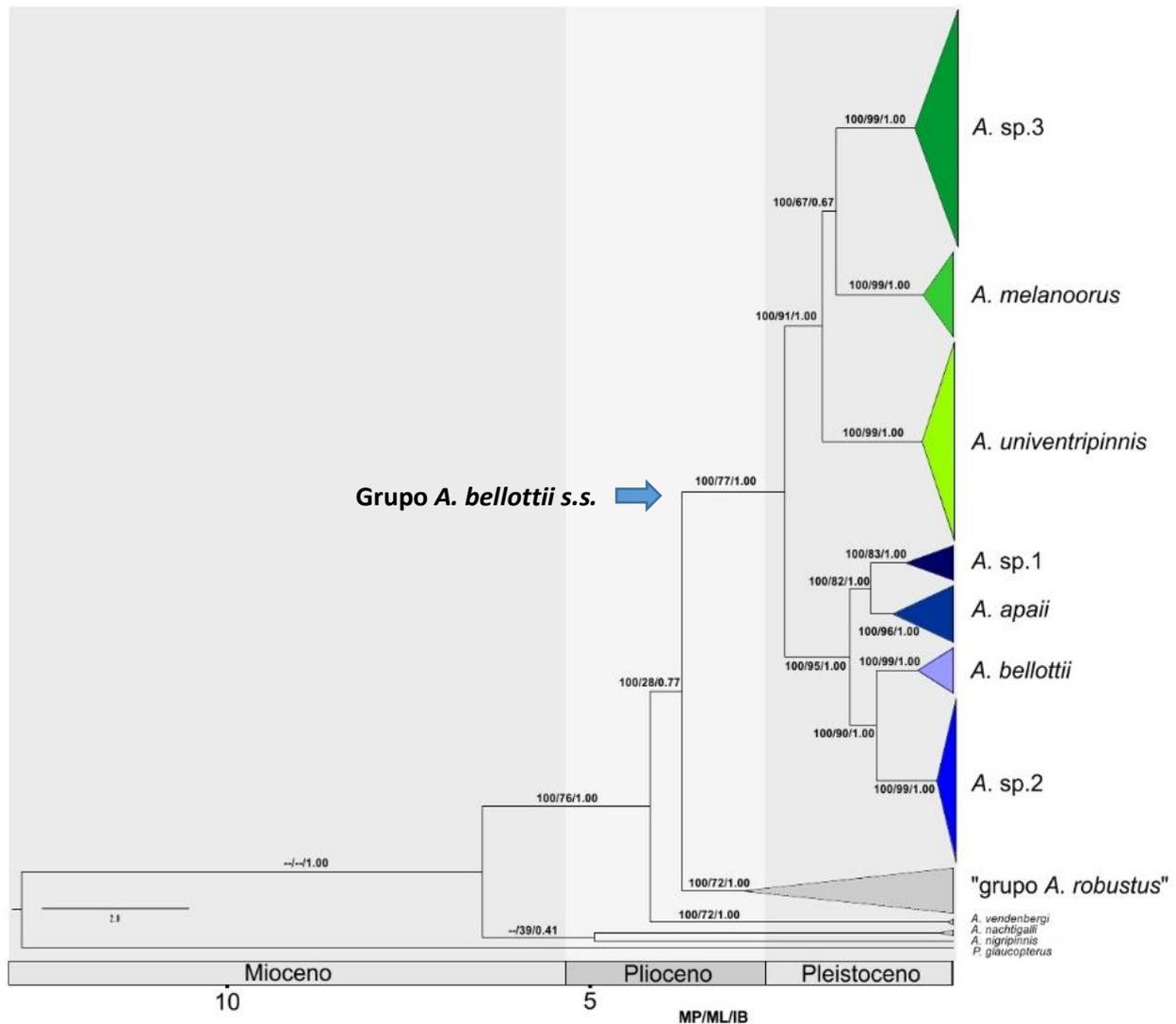


Figura 41. Árbol datado de Inferencia Bayesiana obtenido en BEAST para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s.. Los números sobre los nodos representa los valores de soporte obtenidos en los análisis de Máxima Parsimonia (MP), de Máxima Verosimilitud (ML), y los valores de probabilidad a posteriori (IB) para la reconstrucción mostrada. Linajes coloreados de verde conforman el **Clado A. melanoorus**, mientras los coloreados de azul el **Clado A. bellottii**. La barra inferior resume la escala de tiempo en millones de años.

La topología obtenida para el grupo difiere en múltiples aspectos de todas las previamente publicadas. Frente a los trabajos de sistemática molecular donde el grupo fue objetivo o al menos parte del set de datos (García *et al.*, 2002, 2012, 2014, Loureiro & García, 2008), grupo *A. bellottii* s.s. aparece como un linaje independiente del grupo *A. robustus* y de *A. vandenbergi*. Por otro lado el “Clado *A. bellottii*”, resultó ser similar al obtenido por García y colaboradores (2012). En dicho trabajo la unidad *Austrolebias bellottii/apaii* resulta estar compuesta por tres

grandes clados: un Clado I englobando las poblaciones provenientes del Río Uruguay medio y bajo (*Austrolebias apaii* en esta tesis); el Clado II que reúne las poblaciones provenientes de la cuenca media del Río Paraná (*Austrolebias* sp.1 en esta tesis), y un Clado III que reúne las poblaciones de Provincia de Buenos Aires (*Austrolebias bellottii* en esta tesis) y la localidad de Gualeguaychú en el margen oeste del río Uruguay. Mis resultados difieren sin embargo en los siguientes aspectos:

- 1- Los *Austrolebias* sp.1 (=Clado II) estaría más relacionada a *Austrolebias apaii* (=Clado I) que con *Austrolebias bellottii* (=Clado III).
- 2- Las secuencias obtenidas de ejemplares procedentes de Gualeguaychú quedan anidadas en el clado *Austrolebias apaii* (=Clado I) y no en *Austrolebias bellottii* (=Clado III), consolidando a todas las poblaciones del Río Uruguay y margen uruguayo del Río de la Plata como una unidad.
- 3- Se incorpora un cuarto linaje al esquema (*Austrolebias* sp.2) relacionado a *Austrolebias bellottii* (=Clado III).

En cuanto a las reconstrucciones filogenéticas en base a caracteres morfológicos (Costa 2006, 2010), los resultados de esta tesis difieren principalmente en los siguientes dos puntos:

- 1- Se propone una hipótesis filogenética robusta (*versus* sin soporte estadístico para la mayor parte de los nodos en ambas publicaciones).

2- Grupo *bellottii* s.s. no se encuentra directamente relacionado al grupo *adloffii*.

Análisis estadísticos y poblacionales

Los siete grupos analizados presentaron una diversidad haplotípica alta ($H \geq 0.667$) en contraste a una diversidad nucleotídica baja ($\pi \leq 0.01370$). Los valores resultaron ser similares a los encontrados en otras especies de la familia Rivulidae para el mismo marcador (García, 2006; García *et al.*, 2009, 2012; Ponce de León *et al.*, 2014), y son propios de especies con rápidos crecimientos de la población a partir de una población ancestral pequeña o que ha experimentado un proceso de cuello de botella (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). Uno de los casos más notorios fue el de *Austrolebias* sp.2, que presentó uno de los valores de diversidad nucleotídica más bajos de todos ($\pi = 0.0017$) en contraste a una diversidad haplotípica de 0.784. *Austrolebias* sp.2 presenta una de las distribuciones más restringidas de todo el grupo, siendo endémica de una serie de humedales en el tramo medio del Río Queguay (Paysandú, Uruguay).

En lo que refiere a las distancias genéticas pareadas entre los grupos, variaron entre 3,3% (*A. bellottii* vs. *A. sp.2*) y 9,9% (*A. melanoorus* vs. *A. bellottii*). Las distancias reportadas en la literatura entre diferentes especies de un mismo género para Cyt-b en la familia Rivulidae (García *et al.*, 2000, 2015; Loureiro & García, 2008; Ponce de León *et al.*, 2014), se encuentra entre un 4.5% (*Austrolebias cheradophilus* vs. *A. prognathus*) y un 18.6% (*Austrolebias adloffii* vs. *A. arachan*). En este sentido podemos considerar que varias de las diferencias observadas entre los siete linajes del grupo *A. bellottii* s.s., corresponderían a las esperables en caso de hallarnos frente a especies diferentes. Aún así varias de las distancias, principalmente las calculadas entre integrantes del Clado *A. bellottii*, estuvieron por debajo de este rango de valores, aunque por encima de los

registrados entre poblaciones dentro de las especies *Rivulus cylindraceus* (0.1%-2.69%) y *Rivulus berovidesi* (1.01%) (Ponce de León *et al.*, 2014; Silva, 2015).

Tomando en cuenta la red de haplotipos generada (Figura 17) y la distribución espacial de estos mismos haplotipos (Figuras 14 a 16), podemos notar la clara separación de dos grandes grupos, uno de ellos distribuido en las cuencas del Río Negro y Río Yaguarón (Clado *A. melanoorus*), y otro en las cuencas de los ríos Paraná, Plata y Uruguay (Clado *A. bellottii*). Esta separación a grandes rasgos es coincidente con las áreas de endemismo de Río Negro y Río de la Plata, propuestas por Costa (2010) para la subfamilia Cynolebiacinae. A un nivel más fino podemos notar que los siete linajes siguen siendo claramente reconocibles, no presentando haplotipos compartidos entre ellos, sino formando unidades relativamente compactas. Para la mayoría de estas unidades sí existen haplotipos compartidos entre localidades, pero también se observan variantes geográficamente restringidas, siendo en algunos casos la única en dicha localidad (ejemplo: Hap_7 en Candiota o Hap_12 en Herval). Destacan las poblaciones de *Austrolebias* sp.2 en los humedales del Río Queguay, que presentaron en esos análisis una única variante haplotípica (Hap_8), lo que puede ser importante tener en cuenta al momento de planificar medidas de manejo y conservación, ya que esa escasa variabilidad la señala como una unidad particularmente vulnerable.

Por su parte los bajos valores de F_{st} , menores en todos los casos a 0.19381, apuntan a que existe una baja estructuración genética entre las poblaciones estudiadas. Por otro lado prueba de hipótesis de agrupamiento mediante AMOVA apunta a que las unidades

geográficas Río Paraná, Río Uruguay y Buenos Aires deberían ser consideradas la misma, correspondiendo a tres de los cuatro linajes del clado *A. bellottii* (Figura 18).

Delimitación de especies

De los dos abordajes utilizados para la delimitación de especies (Figura 13), Automatic Barcode Gap Discover (ABGD) resultó ser el más conservador, y el que mejor se ajustó a las unidades definidos *a priori*, reconociendo como especies potenciales claramente a 5 de los 7 grupos propuestos. Por otra parte reconoció un par de unidades diferentes a las propuestas, considerando a *Austrolebias* sp.1 conespecífica con *Austrolebias apaii*, e individualizando la única secuencia de *apaii* proveniente de Artigas como una especie diferente. Dado que tanto las reconstrucciones filogenéticas como la red de haplotipos ubican dicha secuencia como asociada a *A. apaii*, preliminarmente y hasta no tener oportunidad de analizar más secuencias de dicha localidad, la consideraré parte de la especie “*Austrolebias apaii*/sp.1”. Los creadores de este procedimiento ya notaron desde un inicio que la performance del mismo se ve afectada por la presencia de singletons, e idealmente requiere de 3 a 5 secuencias por “especie” (Puillandre *et al.*, 2012; Kekkonen *et al.*, 2015).

Análisis morfológico

En líneas generales se observó que muchas de las características morfológicas o cromáticas consideradas tradicionalmente útiles para reconocer las distintas especies del grupo, resultan ser de escaso o nulo valor diagnóstico. Esto probablemente sea debido al uso de un N de individuos demasiado bajo ($N \leq 8$) en las distintas publicaciones. El

conjunto de las comparaciones realizadas entre los 7 grupos se esquematiza en la Tabla 16, donde se señala entre qué pares de grupos se detectaron o no diferencias inambiguas para uno o ambos sexos.

Tabla 16. Diferencias entre grupos. Casilleros de color verde señalan entre qué pares de grupos se detectaron diferencias inambiguas para uno o ambos sexos; casilleros de color naranja señala entre qué pares de grupos no se encontraron diferencias.

	<i>A. apaii</i>	<i>A. bellottii</i>	<i>A. melanoorus</i>	<i>A. univentrinnis</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>	<i>A. sp.3</i>
<i>A. apaii</i>							
<i>A. bellottii</i>							
<i>A. melanoorus</i>							
<i>A. univentrinnis</i>							
<i>A. sp.1</i>							
<i>A. sp.2</i>							
<i>A. sp.3</i>							

Morfometría y otras proporciones corporales

Tanto los análisis morfométricos lineales como los morfogeométricos (Figuras 19 a 22) coinciden en que, las variables potencialmente más útiles para reconocer (en combinación con otros caracteres) a los integrantes de los distintos grupos analizados, serían aquellas que describen la región ventral de los ejemplares de ambos sexos, pero principalmente en hembras. En general, tanto en machos como en hembras *Austrolebias melanoorus*, *A. univentrinnis*, *A. sp.2* y *A. sp.3* presentaron rangos de variación similares entre ellos, y diferentes a los observados en *Austrolebias apaii* y *A. sp.1*. Por su parte *A. bellottii* presentó rangos de variación intermedia, que solaparon en menor o mayor medida con los rangos de los demás grupos. Costa (2006) propone que algunas medidas como ser el diámetro del ojo en o la altura del cuerpo en ejemplares machos, son proporciones que resultan de utilidad diagnóstica en algunos casos (*A. bellottii* versus *A. apaii* y *A.*

univentripinnis respectivamente), pero tras analizar un gran número de ejemplares dichas características solapan marcadamente sus rangos de variación. Por su parte proporciones relativas como ser la extensión de aletas pélvicas y pectorales resultó útil en algunos casos, como por ejemplo para distinguir entre hembras de *Austrolebias* sp.2 y *A. apaii*.

Variables merísticas y caracteres óseos

Nuevamente la mayor parte de las variables analizadas resultaron de escaso valor para discriminar entre los grupos de forma inambigua, salvo casos puntuales como ser los conteos de radios anales para distinguir entre *Austrolebias* sp.1 de *A. melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. sp.2* y *A. sp.3*. Por otra parte se observó presencia de órganos de contacto en escamas de algunos ejemplares macho de *Austrolebias melanoorus*, lo que no había sido previamente reportado para la especie.

En lo que refiere a los caracteres óseos, fueron principalmente útiles para caracterizar la posición relativa de las aletas dorsal y anal en el cuerpo de los individuos, lo que en algunos casos sirvió para discriminar entre grupos. En algunos casos la frecuencia relativa de presencia/ausencia de osificaciones dermosfenóticas, así como la forma general del cartílago basihial, resultaron ser también características potencialmente diagnósticas.

Patrones de coloración

Las diferencias más marcadas entre algunos de los grupos resultaron ser de tipo no cuantitativo, y principalmente en machos. Costa (2006) utiliza como parte de sus caracteres diagnósticos caracteres de tipo cuantitativo, como ser número de bandas/hileras de puntos verticales en machos, o el número de manchas negras en los flancos de las hembras, pero en ambos casos (Figuras 36 y 37) se halló que a pesar de las tendencias los rangos de variación de estos datos solapan en todos los casos. En cuanto a los caracteres no cuantitativos la presencia de bandas verticales o hileras de puntos, así como la intensidad de pigmentación en machos (Figura 39), resultan ser características bastante marcadas y útiles para distinguir entre algunos de los grupos.

Integración de resultados

En el transcurso de esta tesis se utilizaron análisis filogenéticos y poblacionales (basados en el marcador Cyt-b) así como características fenotípicas para investigar la sistemática, distribución y diversidad de un grupo de especies poco comprendido y con historia taxonómica compleja dentro del género *Austrolebias* (ver por ejemplo Steindachner, 1881, Berg, 1897; Ahl, 1938; Vaz-Ferreira & Sierra, 1971; Amato, 1986; Costa, 2006; Calviño *et al.*, 2016). Desde una perspectiva genética el grupo de especies *A. bellottii* pudo ser circunscripto a un conjunto de linajes, varios de los cuales potencialmente pueden representar especies biológicas. Desde una perspectiva morfológica se exploró de forma exhaustiva la diversidad fenotípica presente en grupo, prestando particular atención a características que clásicamente son utilizadas para definir especies. A partir de este punto se puede plantear la siguiente pregunta:

¿Cuántas y cuales especies componen el grupo *Austrolebias bellottii* s.s.?

Las **reconstrucciones filogenéticas** inicialmente nos muestran un panorama donde son reconocibles siete linajes monofiléticos, denominados preliminarmente como *Austrolebias bellottii*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. apaii*, *A. sp1*, *A. sp.2* y *A. sp.3*. Como innumerables autores han hecho notar, “las especies son individuos ontológicos – entidades restringidas temporal y espacialmente, con un inicio (especiación) y un final (extinción); son linajes en el Árbol de la Vida”, pero no todo linaje evolutivo necesariamente representa una especie biológica (Zachos, 2015; Garnett & Christidis, 2017), e idealmente información de múltiples fuentes debe ser tomada en cuenta para valorar el estatus de estos linajes (e.g.: Puillandre *et al.*, 2012).

Los métodos de delimitación automático de especies en base a un único gen (GMYC y ABGD), señalan que el conjunto de la información manejada contiene potencialmente varias unidades que pueden ser consideradas especies, sin embargo no son concordantes entre ellos. GMYC propone en casos, escenarios que a priori resultan poco probables, con una gran cantidad de especies potenciales, algunas de ellas polifiléticas o crípticas coexistiendo en un mismo charco como en el caso del clado *Austrolebias apaii*. Por su parte **ABGD** nos brinda un panorama que se ajusta mucho mejor a las filogenias obtenidas, proponiendo 6 especies hipotéticas principales, *Austrolebias bellottii*, *A. melanoorus*, *A. univentripinnis*, *A. apaii*+*A.sp1*, *A. sp.2* y *A. sp.3*, más una basada en una única secuencia. Esta última en las reconstrucciones filogenéticas siempre queda englobada dentro de una de las especies hipotéticas principales, probablemente se trate de un problema metodológico como ya fuera mencionado. Por su parte la **red de haplotipos** no presenta contradicciones evidentes frente a esta hipótesis de 6 especies, existiendo 12 o más pasos mutacionales entre cada una de ellas (Figura 17).

Los bajos valores de **Est** por otra parte apuntan a que existe una baja estructuración genética entre las poblaciones estudiadas, y la prueba de hipótesis de agrupamiento mediante **AMOVA** indican que las unidades geográficas Río Paraná, Río Uruguay y Buenos Aires son muy homogéneas y podrían ser consideradas la misma. Basados en esta información tenemos que considerar la posibilidad que las especies putativas *Austrolebias bellottii* (Buenos Aires) y *Austrolebias apaii*/sp.1 (ríos Uruguay y Paraná) conformen una única entidad, lo que de ser apoyado por otras líneas de evidencia nos dejaría parados frente a una “especie” parafilética respecto a *Austrolebias sp.2*. Si bien desde una

perspectiva Cladista (Hennigiana) esta última hipótesis suele ser descartada inmediatamente, desde una óptica Evolutiva (Darwiniana) queda enteramente contemplada (Hörandl, 2006). De acuerdo con Hörandl (2006), este tipo de situaciones comúnmente se observa cuando el proceso evolutivo resulta en descendientes sin la extinción del grupo parental, lo que genera parafilia en este último. En pocas palabras, este proceso puede darse cuando un pequeño subconjunto de la población general queda aislado y sujeto a presiones selectivas diferentes, sometido a situaciones de “cuello de botella” y deriva, etc. Bajo esta situación (*budding*), la población podría experimentar rápidos cambios, con consecuencias dramáticas en su morfología, fisiología y ecología, mientras la población parental permanece relativamente incambiada (Mayr & Bock, 2002; Hörandl, 2006; Hörandl & Stuessy, 2010).

En lo que refiere a las **distancias genéticas** observadas entre los 7 clados, encontramos muchos casos en los que estas se encuentran dentro del rango de las ya observadas anteriormente entre especies diferentes del género *Austrolebias* (entre 4.5 y 18.6%), pudiendo ser tomadas a priori como evidencia para soportar varias de nuestras hipótesis de especies. De esta forma, *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3* presentaron valores de divergencia por encima del 5.2% en todos los casos. Por otro lado los linajes *A. apaii*, *A. bellottii*, *A. sp.1* y *A. sp.2* frecuentemente presentaron valores por debajo de los rangos conocidos para el género, posicionándonos en un área gris del conocimiento del grupo. En este aspecto, la ausencia de puntos de referencia acerca de a partir de qué punto, un determinado porcentaje de divergencia puede ser considerado indicador de una diferencia inter o intraespecífica (en este grupo de animales en particular), hace que este conjunto de datos sean de utilidad preliminarmente descriptiva.

Nuevamente resulta llamativo el caso de *Austrolebias* sp.2 que presentó los valores más bajos de divergencia observados cuando se lo compara respecto a *A. bellottii*.

Llegado este punto nos encontramos con dos hipótesis que evaluaré contrastándolas con la **información morfológica**:

Hipótesis 1: nuestro grupo estaría conformado por **5 especies**: 1) *Austrolebias melanoorus*, 2) *A. univentripinnis*, 3) *A. sp.3*, 4) *A. sp.2* y 5) *Austrolebias bellottii/apaii/sp.1*.

De forma resumida esta hipótesis se basa en lo siguiente:

- Las filogenias muestran siete linajes principales dentro de grupo *A. bellottii*
- ABGD reconoce siete unidades, pero una de estas no la consideramos por ser un singleton anidado dentro de una unidad mayor, lo que nos deja con seis unidades
- La red de haplotipos no contradice estas seis agrupaciones
- Los F_{st} s y AMOVA apuntan a que dos de estas unidades poseen baja estructuración poblacional y alta homogeneidad, por lo que podrían llegar a tomarse como la misma, dejándonos con cinco unidades una de ellas parafilética.

Hipótesis 2: nuestro grupo estaría conformado por **6 especies**: 1) *Austrolebias melanoorus*, 2) *A. univentripinnis*, 3) *A. sp.3*, 4) *A. sp.2*, 5) *Austrolebias bellottii*/ y 6) *A. apaii/sp.1*.

En este caso se tendrían en cuenta los mismos puntos que en la Hipótesis 1 pero daríamos peso a no generar agrupaciones parafiléticas, dejándonos con seis unidades.

En favor de la Hipótesis 1 y asumiendo un caso de *budding* esperaríamos encontrar que los representantes de los linajes *A. bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1* fuesen morfológicamente similares o indistinguibles entre ellos, y estos a su vez claramente identificables de *A. sp.2*. Por otra parte, en favor de la Hipótesis 2 esperaríamos encontrar que morfológicamente los representantes de los linajes *A. apaii* y *A. sp.1* fuesen morfológicamente similares o indistinguibles entre ellos pero en ambos casos claramente diferenciables respecto a *A. bellottii*.

Como se muestra de forma esquemática en la Tabla 17 *Austrolebias* sp.2 puede distinguirse morfológicamente de forma inambigua de representantes de los clados *A. bellottii*, *A. apaii* y *A. sp.1* en base al patrón de coloración de los machos, y caracteres morfométricos y merísticos de las hembras. Sin embargo las diferencias entre estos tres clados son o inexistentes o cuestionables, no existiendo evidencia morfológica fuerte que los sustente como entidades biológicas distintas. En vista de lo antes mencionado considero válida la Hipótesis 1 donde se propone la existencia de 5 especies, considerando a la unidad *Austrolebias bellottii/apaii/sp.1* una especie parafilética respecto a la especie *Austrolebias* sp.2.

Tabla 17. Diferencias entre grupos del Clado *A. bellottii*. Casilleros de color verde señalan entre qué pares de grupos se detectaron diferencias inambiguas para uno o ambos sexos; casilleros de color naranja señala entre qué pares de grupos no se encontraron diferencias. **C** = coloración, **M** = morfometría, **E** = merística, **O** = osteología, **m** = machos, **h** = hembras, * = muy pocos individuos.

	<i>A. apaii</i>	<i>A. bellottii</i>	<i>A. sp.1</i>	<i>A. sp.2</i>
<i>A. apaii</i>				
<i>A. bellottii</i>	-			
<i>A. sp.1</i>	Oh*	Oh*		
<i>A. sp.2</i>	Cm, Mh	Cm	Cm, Emh, Mh	

Por su parte *Austrolebias melanoorus*, *A. univentripinnis* y *A. sp.3*, pueden ser consideradas especies plenas dado que poseen un fuerte sustento morfológico y/o genético.

Finalmente, bajo este nuevo esquema obtenemos que el conjunto de los datos se ordena de la siguiente manera (Figura 42):

1) *Austrolebias bellottii* (Steindachner):

- Nombre válido por antigüedad; se confirma *Austrolebias apaii* Costa, Laurino, Recuero & Salvia como sinónimo *junior* de *A. bellottii*.
- Compuesta por tres grandes linajes coincidentes con sus tres grandes áreas de distribución sobre los ríos Paraná, Uruguay y afluentes del Río de la Plata en Buenos Aires (Uruguay y Argentina).
- Parafilética respecto a *Austrolebias sp.2*.
- Morfológicamente distinguible de todas las especies de grupo *bellottii* s.s., pero críptica respecto a *Austrolebias univentripinnis*.

2) *Austrolebias melanoorus* (Amato):

- Especie válida
- Endémica de la cuenca del Río Tacuarembó (Uruguay)
- Especie hermana de *A. sp.3*
- Morfológicamente distinguible de la mayoría de las especies de grupo *A. bellottii* s.s., pero críptica respecto a *Austrolebias sp.3*.

3) *Austrolebias univentripinnis* (Costa & Cheffe):

- Especie válida
- Endémica de la cuenca media y baja del Río Yaguarón (Brasil)
- Especie hermana del clado *A. sp.3* + *A. melanoorus*
- Morfológicamente distinguible de la mayoría de las especies de grupo *A. bellottii* s.s., críptica respecto a *Austrolebias bellottii* en su conjunto, sin embargo distinguible morfológicamente de cada uno de los tres linajes por separado, y distanciada genéticamente de estos entre un 7.6 y 8.7%.

4) *Austrolebias sp.2* (nueva especie):

- Reconocible de todas las demás especies del grupo bajo la totalidad de los abordajes, tanto morfológicos como genéticos.
- Endémica de los humedales del Río Queguay (Uruguay).

5) *Austrolebias sp.3* (nueva especie):

- Endémica de la zona alta de los ríos Negro y Yaguarón (Uruguay y Brasil).
- Críptica únicamente respecto a *Austrolebias melanoorus*, frente a la que puede considerarse válida por presentar distribución geográfica lejana, una distancia genética de 5.2%, es reconocida por ABGD como especie potencial y presenta monofilia recíproca frente a esta de acuerdo a los distintos abordajes, con valores de soporte robustos.

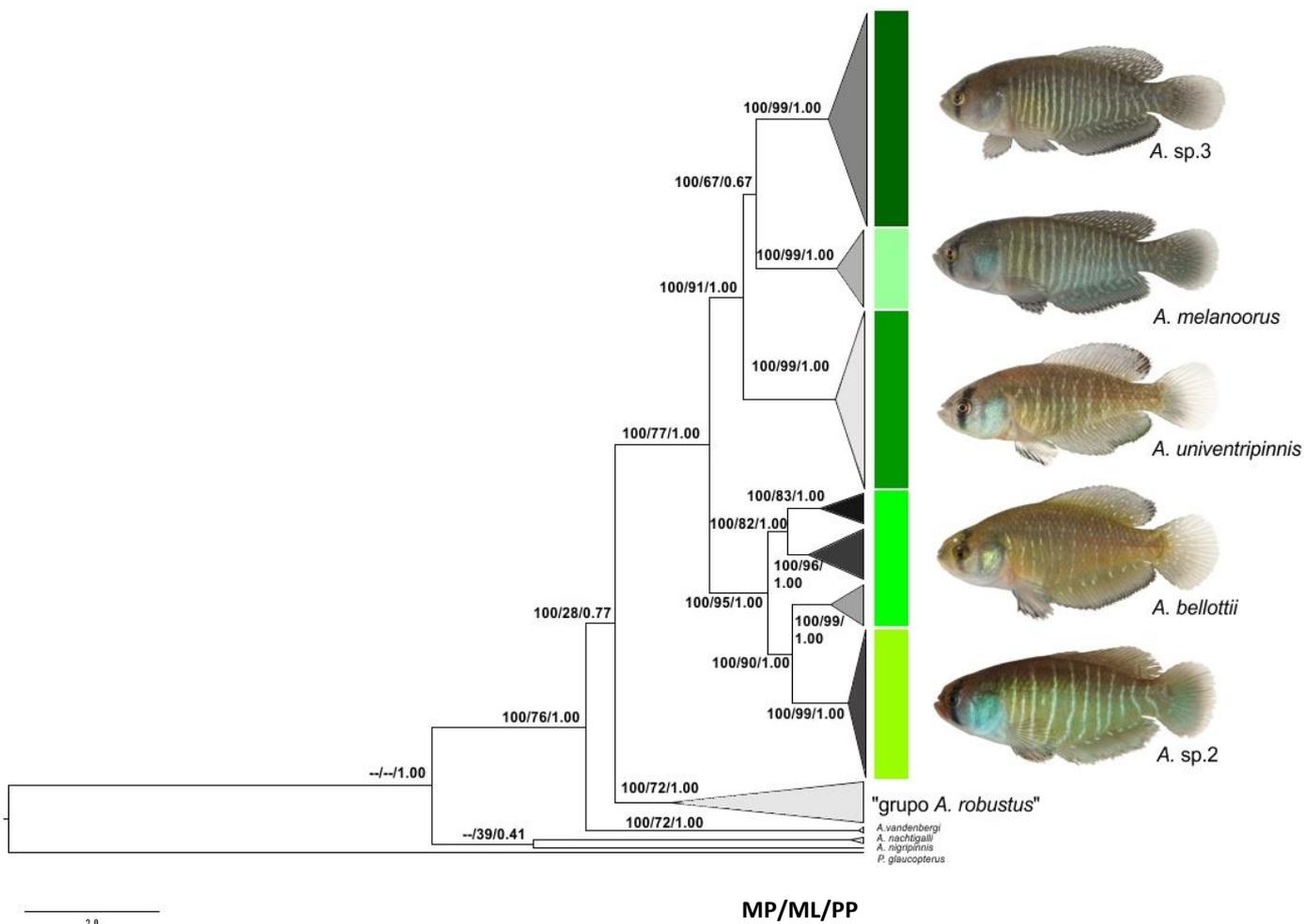


Figura 42. Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido en BEAST para el grupo de especies *Austrolebias bellottii* s.s.. Los números sobre los nodos representa los valores de soporte obtenidos en los análisis de Máxima Parsimonia (MP), de Máxima Verosimilitud (ML), y los valores de probabilidad a posteriori (IB) para la reconstrucción mostrada. Las barras de colores señalan las especies consideradas válidas al finalizado de esta tesis. Junto a estas se muestran fotografías de ejemplares machos de cada una.

Conclusiones y Perspectivas

En general se probó que el grupo de especies *Austrolebias bellottii* tal y como fuera propuesto por Costa (2006) no es válido, rechazándose la hipótesis general de trabajo. En su lugar se propone una nueva hipótesis en la que el grupo *A. bellottii* (grupo *A. bellottii* s.s.) estaría compuesto por 5 especies, dos de las cuales resultan ser nuevas para la ciencia.

Se pudo cumplir con los sucesivos objetivos específicos:

- 1- Se elaboró una hipótesis filogenética robusta que incluyó las poblaciones de *Austrolebias* formalmente descritas y las potencialmente relacionadas al grupo (“grupo *A. robustus*” y spp. de las cuencas de los ríos Queguay, Negro y Yaguarón). Se elaboró también una hipótesis inicial de unidades específicas que fue utilizado como punto de referencia para interpretar los sucesivos análisis.
- 2- Se pudo realizar un análisis morfológico exhaustivo del grupo, lo que fue de gran utilidad para comparar con los resultados obtenidos en los análisis genéticos.
- 3- Se pudo discutir el conjunto de los datos para lograr una interpretación holística de la composición específica del grupo y relacionamiento entre sus especies, donde todas las fuentes de información posibles fueron tenidas en cuenta.

En resumen destacan de esta tesis los siguientes puntos:

- Se analizaron por primera vez el total de las especies conocidas del grupo, tanto morfológica como genéticamente.
- Se establecieron nuevos límites para el grupo y se propuso una nueva hipótesis filogenética para el mismo. Esta hipótesis filogenética fue robusta.
- Se probó la utilidad de métodos como Automatic Barcode Gap Discover (ABGD), como punto de partida para la delimitación de especies en peces anuales.
- Se detectaron dos nuevas especies para la ciencia.
- Se confirmó a *Austrolebias apaii* como sinónimo *junior* de *Austrolebias bellottii*.

Perspectivas:

- Formalizar y difundir los resultados obtenidos mediante la publicación de los mismos en revistas arbitradas y posteriormente en medios de comunicación masivos.
- Explorar la región baja del Río Paraná hasta su desembocadura, para así completar los vacíos de información existentes para esa región.
- Revisar de forma más detallada las poblaciones de *Austrolebias bellottii* procedentes del Departamento de Artigas (Uruguay) y Provincia de Corrientes (Argentina), para dilucidar si se trata de un cuarto linaje dentro de esta especie, que haya sido subestimado por el presente análisis.

- Explorar el uso de otros marcadores moleculares (ejemplo nucleares) y procedimientos de reconstrucción filogenéticos basados en evidencia total.
- Realizar evaluación del estado conservación de estas especies bajo los criterios de la UICN, para ser incorporadas en la Lista Roja bajo las categorías correspondientes.

Bibliografía

- Agapow, M. 2005.** Species: demarcation and diversity. In: Phylogeny and Conservation (eds A. Purvis, J. L. Gittleman & T. Brooks), pp. 57–75. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ahl, E. 1938.** Beschreibung neuer Zahnkarpfen aus dem Zoologischen Museum Berlin. Zoologischer Anzeiger, 124(3-4): 53-58.
- Alonso, F., P.A. Calviño, G.E. Terán & I. García. 2016.** Geographical distribution of *Austrolebias monstrosus* (Huber, 1995), *A. elongatus* (Steindachner, 1881) and *A. vandenbergi* (Huber, 1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes), with comments on the biogeography and ecology of Rivulidae in Pampasic and Chaco floodplains. Check List, 12(4): 1945: 1-7.
- Amato, L.H. 1986.** Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876, de Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo, 11(162): 1–27.
- Awise, J.C. 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York: 511 pp.
- Awise, J.C. 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts: 464 pp.
- Bandelt, H.J., P. Forster & A. Röhl. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16: 37-48.
- Berois, N., M.J. Arezo, N.G. Papa & G.A. Clivio. 2012.** Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. WIREs Developmental Biology, 1: 595–602.

- Berois, N., M.J. Arezo & R.O. De Sá. 2014.** The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology*, 3(2): 1-9.
- Berg, C. 1897.** Contribuciones al conocimiento de los peces Sudamericanos, especialmente de los de la República Argentina. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires*, 5: 263-302.
- Bookstein, F.L. 1991.** *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. New York: Cambridge University Press: 435 pp.
- Brown, W.M., M. George Jr. & A.C. Wilson. 1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 1967-1971.
- Calviño, P., D.O. Nadalin, M.J. Serio & H.L. López. 2016.** Colección Ictiológica del Museo de La Plata: La familia Rivulidae. *ProBiota, Serie Técnica y Didáctica*, 36: 1-21.
- Costa, W.J.E.M. 1995.** Pearl killifishes - the Cynolebiatinae: systematics and biogeography of the neotropical annual fish subfamily. TFH, Neptune City: 128 pp.
- Costa, W.E.J.M. 1998.** Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in Rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *Journal of Comparative Biology*, 3(1): 33-94.
- Costa, W.E.J.M. 2006.** The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213: 1–162.
- Costa, W.J.E.M. 2008.** *Catalog of aplocheiloid killifishes of the world*. Reproarte, Rio de Janeiro: 127 pp.

- Costa, W.E.J.M. 2010.** Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal–vicariance analysis. *Journal of Biogeography*, 37: 1995–2004.
- Costa, W.E.J.M. 2014.** *Austrolebias araucarianus*, a new seasonal killifish from the Iguaçú river drainage, southern Basilian Araucarian Plateau Forest (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 25(2): 97-101.
- Costa, W.E.J.M., P.F. Amorim & J.L.O. Mattos. 2012.** Species delimitation in annual killifishes from the Basilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex (Cyprinodontiformes: Rivulidae): implications for taxonomy and conservation. *Systematics and Biodiversity*, 10(1): 71–91.
- Dingerkus, G. & L.D. Uhler. 1977.** Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing flesh. *Stain Technologies*, 52: 229-232.
- Drummond, A.J. & A. Rambaut. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Ezard, T., T. Fujisawa & T.G. Barraclough. 2009.** Splits: SPecies' LLimits by threshold statistics R package version 10-14/r31. <https://r-forge.r-project.org/projects/splits/>.
Accesado en Febrero de 2017

- Fujisawa, T. & T.G. Barraclough. 2013.** Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evolution on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62: 707–724
- García, G., F. Alvarez-Valin & N. Gomez. 2002.** Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 76: 49-59.
- García, G., V. Gutiérrez, N. Ríos, B. Turner, F. Santiñaque, B. López-Carro & G. Folle. 2014.** Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1): 87-98.
- García, G., V. Gutiérrez, J. Vergara, P. Calviño, A. Duarte & M. Loureiro. 2012.** Patterns of population differentiation in annual killifishes from the Paraná-Uruguay-La plata basin: the role of vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography*, 39(9): 1707–1719.
- García, G., M. Loureiro, N. Berois, M.J. Arezo, G. Casanova, G. Clivio & A. Olivera. 2009.** Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 620–635.
- García, G., N. Ríos & V. Gutiérrez. 2015.** Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 143(3): 353-360.

- García, G., G. Wlasiuk & E.P. Lessa. 2000.** High levels of mitochondrial cytochrome b divergence and phylogenetic relationships in the annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 129: 93–110.
- Garnett, S.T. & L. Christidis. 2017.** Taxonomy anarchy hampers conservation. *Nature*, 546: 25-27.
- Gascuel, O. 1997.** BioNJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 14: 685-695.
- Grant, W.S. & B.W. Bowen. 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.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper & P.D. Ryan. 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.
- Hansen, J., M. Sato, G. Russell & P. Kharecha. 2013.** Climate sensitivity, sea level and atmospheric carbon dioxide. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 371: 20120294.
- Hasegawa, M., H. Kishino & T. Yano. 1985.** Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Hörandl, E. 2006.** Paraphyletic versus monophyletic taxa—evolutionary versus cladistic classifications. *Taxon*, 55(3): 564–570.

- Hörandl, E. & T.F. Stuessy. 2010.** Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon*, 59(6): 1641–1653.
- Hudson, R.R. 1990.** Gene genealogies and coalescent process. En: Futuyma, D.J. & J. Antonivics, editores. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford: Oxford University Press: 1-44.
- Kekkonen, M., M. Mutanen, L. Kaila, M. Nieminen & P.D.N. Hebert. 2015.** Delineating Species with DNA Barcodes: A Case of Taxon Dependent Method Performance in Moths. *PLoS ONE*, 10(4): 1-32.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Klingenberg, C.P. 2011.** MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Leaché, A.D. & M.K. Fujita. 2012.** Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 277: 3071–3077.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Logan, M. 2010.** *Biostatistical Design and Analysis Using R – A Practical Guide*. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc., United Kingdom: 546 pp.
- Loureiro, M. 2004.** *Sistemática y Biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae)*. Tesis Doctoral no publicada: 128 pp.

- Loureiro, M., A. D'Anatro, F. Teixeira de Mello & V. Cardozo. 2007.** *Austrolebias cinereus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T63099A12602677. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T63099A12602677.en>. Descargado el 18 de Setiembre de 2016.
- Loureiro, M., A. Duarte & M. Zarucki. 2011.** A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology*, 9(2): 335-342.
- Loureiro, M. & G. García. 2008.** *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 1940: 1-15.
- Loureiro, M., M. Zarucki, I. González, N. Vidal & G. Fabiano. 2013.** Peces continentales. Pp. 91-112, en: Soutullo A, C Clavijo & JA Martínez-Lanfranco (eds.). *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DiCyT/MEC, Montevideo: 222 pp.
- Manly, B.F.J. 2005.** *Multivariate statistical methods: a primer* Chapman & Hall/CRC Press, 2005 - 214 pp. New York. USA.
- Mayr, E. & W.J. Bock. 2002.** Classifications and other ordering systems. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 40: 169–194.
- Medrano, J.F., E. Aasen & L. Sharrow. 1990.** DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8: 43.
- Miller, S., D. Dikes & H. Polesky. 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 1215.

- Monteiro, L.R. & S.F. Reis. 2000.** Principios de Morfometria geometrica. Ribeirão Preto, Holos Editora Ltda.: X+188 pp.
- Nee, S., R.M. May & P.H. Harvey. 1994.** The reconstructed evolutionary process. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 344: 305–311.
- Nei, M. 1987.** Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, USA: 512 pp.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000.** Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Inc. USA: 348 pp.
- Nielsen, D.T.B. & D. Pillet. 2015.** *Austrolebias accorsii*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae) from the upper rio Grande basin, Amazon basin, Bolivia. *Aqua*, 21(4): 172-179.
- Novo, M., R. Fernández, D. Fernández Marchán, M. Gutiérrez & D.J. Díaz Cosín. 2012.** Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *ZooKeys* 242: 1-16.
- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice & G. Grabowski. 1991.** The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory: 47 pp.
- Paradis, E., J. Claude & K. Strimmer. 2004.** APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289–290.
- Peteán, J. 2009.** 1. Aspectos biológicos. En Cappato, J. y A. Yanosky (Editores). Uso sostenible de peces en la Cuenca del Plata. Evaluación subregional del estado de amenaza, Argentina y Paraguay. UICN, Gland, Suiza: 76 pp.

- Ponce de León, J.L., G. León, R. Rodríguez, C.J. Metcalfe, D. Hernández, D. Casane & E. García-Machado. 2014.** Phylogeography of Cuban Rivulus: Evidence for allopatric speciation and secondary dispersal across a marine barrier. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79: 404–414
- Pons, J., T.G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D.P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W.D. Sumlin & A.P. Vogler. 2006.** Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55(4): 595–609.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet & G. Achaz. 2012a.** ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864–1877.
- Puillandre, N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovich, M.C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford & S. Samadi. 2012b.** Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*, 21: 2671–2691.
- Rambaut, A. & A.J. Drummond. 2009.** Tracer 1.5. <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>.
- Rambaut, A. & A.J. Drummond. 2011.** TreeAnnotator version 1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Rissler, L.J., R.J. Hijmans, C.H. Graham, C. Moritz & D.B. Wake. 2006.** Phylogeographic Lineages and Species Comparisons in Conservation Analyses: A Case Study of California Herpetofauna. *The American Naturalist*, 167(5): 655-666.
- Schwarz, G. 1978.** Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6(2): 461-464.
- Serra, S., J. Bessonart, F. Teixeira de Mello, A. Duarte, L. Malabarba & M. Loureiro. 2014.** Peces del Río Negro. Montevideo, MGAP-DINARA, 208 pp.

- Silva, R.R. 2015.** *Rivulus berovidesi*, a new killifish (Teleostei: Rivulidae) from western Cuba. *Zootaxa*, 3949(2): 289-296.
- Steindachner, F. 1881.** Beiträge zur Kenntniss der Flussfische Südamerika's (III) und Ichthyologische Beiträge (XI). *Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe*, 18(11): 97-100
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739
- Tamura, K, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson. 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.
- Vaz-Ferreira, R. & B. Sierra. 1971.** Especies del género *Cynolebias* Steindachner, 1876, en el Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 1: 24-44.
- Volcan, M.V., L.E.K. Lanés & Â.C. Gonçalves. 2009.** Threatened fishes of the world: *Austrolebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Environmental Biology of Fishes*, 86(3): 443-444.

- Volcan, M.V., L.E.K. Lanés & Â.C. Gonçalves. 2010.** Threatened fishes of the world: *Austrolebias univentripinnis* Costa and Cheffe 2005 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Environmental Biology of Fishes*, 87(4): 319-320.
- Volcan, M.V., L.E.K. Lanés & Â.C. Gonçalves. 2014.** *Austrolebias bagual*, a new species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from southern Basil. *Aqua*, 20(4): 161-172.
- Volcan, M.V., L.E.K. Lanés, Â.C. Gonçalves & M.M. Cheffe. 2011.** First record of annual killifish *Austrolebias melanoorus* (Amato, 1986) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Basil, with data on habitat and conservation. *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 1120–1122
- Volcan, M.V., Â.C. Gonçalves, L.E.K. Lanés & D.L. Guadagnin. 2015.** Chapter 11. Annual Fishes (Rivulidae) from Southern Basil - A Broad Scale Assessment of Their Diversity and Conservation. In: N. Berois, G. García & R. O de Sá (Eds.). 2015. *Annual Fishes – Life History Strategy, Diversity, and Evolution*: 327 pp.
- Wright, S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- Zachos, F.E. 2015.** Taxonomic inflation, the Phylogenetic Species Concept and lineages in the Tree of Life – a cautionary comment on species splitting. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(2): 180-184.
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets & W.L. Fink. 2004.** *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic Press, New York , USA: 443 pp.

ANEXOS

Anexo 1: Ejemplares utilizados para los análisis genéticos.

Tabla 1. Ejemplares secuenciados. Lista de los ejemplares que fueron secuenciados y utilizados en los análisis del presente trabajo. Se detalla especie, procedencia de los ejemplares y códigos identificadores de cada uno de los individuos.

Espece	Localidad	Individuo/s	Lote de referencia
Grupo "bellottii"			
<i>A. "apaii"</i>	Gualeguaychú, Entre Ríos, ARGENTINA	R176-R178	GP
<i>A. melanoorus</i>	Tranqueras (31°10'45,87"S 55°45'17,96"W), Rivera, URUGUAY	GP3316	ZVC-P 11623
	Paso Manuel Díaz (31°32'42,95"S 55°40'17,47"W), Rivera, URUGUAY	GP3798- GP3808	ZVC-P s/n
	Paso de la Laguna (32°13'27,50"S 55°22'32,60"W), Tacuarembó, URUGUAY	GP3953- GP3954, GP3956- GP3958	ZVC-P 13579
<i>A. sp.3</i>	Cañada de las Pajas (32°07'10,86"S 54°06'41,04"W), Cerro Largo, Uruguay	1250456	ZVC-P s/n
		GP3321- GP3322	ZVC-P 9721
		GP3333- GP3339	ZVC-P s/n
	Paso San Diego (31°57'57,25"S 53°54'52,01"W), Cerro Largo, URUGUAY	GP3340- GP3351	ZVC-P 11622
	Seival (31°25'57,00"S 53°43'05,00"W), Candiota, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3765- GP3774, GP3776	UFRGS 18042
	Camino Bagé-Dom Pedrito (31°12'32,80"S 54°17'24,20"W), Begé, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3777- GP3786	UFRGS 18050
<i>A. sp.2</i>	Río Queguay (32°08'21,97"S 57°26'19,94"W), Paysandú, URUGUAY	GP3353- GP3366	ZVC-P 11620
	Río Queguay (32°07'26,48"S 57°30'45,44"W), Paysandú, URUGUAY	GP3367- GP3373, GP3375- GP3376	ZVC-P 11621
	Estancia La Beba (32°11'08,70"S 57°26'08,60"W), Paysandú, URUGUAY	GP3377- GP3383	ZVC-P 12460
<i>A. univentripinnis</i>	Herval (31°56'29,30"S 53°29'00,10"W), Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3732- GP3741	UFRGS 18045
	Planice del Río Jaguarón junto a la Ciudad de Jaguarão (32°34'11,8" S 53°23'17,6" W), Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3709- GP3711, GP3713- GP3715, GP3719	UFRGS 18037
	Camino Jaguarão - Nossa Senhora da Glória (32°22'45,00"S 53°26'35,60"W), Jaguarão, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3720- GP3728	UFRGS 18046
	Camino Jaguarão - Pedras Brancas (32°27'49,00"S 53°26'43,00"W), Jaguarão, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3787- GP3796	UFRGS 18041
<i>A. vandenbergi</i>	Salta, ARGENTINA	R183, R186	GP

<i>A. nactigalli</i>	Planice del Río Yaguarón junto a la Ciudad de Jaguarão (32°34'11,8" S 53°23'17,6" W), Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3716-R3717	UFRGS 18037
Grupo "robustus"			
<i>A. vazferreirai</i>	Camino Bagé-Dom Pedrito (31°12'32,80"S 54°17'24,20"W), Begé, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP3880	UFRGS 18060
	Paso San Diego (31°57'57,25"S 53°54'52,01"W), Cerro Largo, URUGUAY	GP3898	ZVC-P s/n
	Fraile Muerto (32°31'12,09"S 54°31'51,21"W), Cerro Largo, URUGUAY	GP3903	ZVC-P s/n
	Arroyo Lechiguana (31°48'17,21"S 54°20'29,13"W), Cerro Largo, URUGUAY	GP3907	ZVC-P s/n
	Cordobés (32°36'59,00"S 55°19'24,00"W), Durazno, URUGUAY	GP3920	ZVC-P s/n
	Aceguá (31°50'43,50"S 54°21'36,42"W), Cerro Largo, URUGUAY	GP3928	ZVC-P s/n

Tabla 2. Secuencias descargadas de GenBank. Lista de las secuencias que fueron descargadas de la base de datos GenBank y que fueron utilizados en los análisis del presente trabajo. Se detalla la especie, código del individuo y "accession number" para cada una. La lista de localidades se extrajo de las publicaciones de origen de cada secuencia.

Especie	Localidad	Individuo/s	GenBank accession number
Grupo "adloffii"			
<i>A. adloffii</i>	Ponte do Gravataí, Rio Grande do Sul, BRASIL	GP308	AF245009.1
<i>A. charrua</i>	Ruta 19 Km7, Rocha, URUGUAY	GP350	AF245008.1
<i>A. minuano</i>	Quinta (32°03'01''S 52°13'25''W), Rio Grande do Sul, BRASIL	UFRJ 8976.4	KJ475091.1
<i>A. nachtigalli</i>	Arroio Grande (32°14'32''S 53°04'07''W), Rio Grande do Sul, BRASIL	UFRJ 8979.3	KJ475098.1
<i>A. nigrofasciatus</i>	Laranjal (31°46'32''S 52°12'36''W), Rio Grande do Sul, BRASIL	UFRJ 8975.2	KJ475085.1
<i>A. reicherti</i>	Ruta18 Km 369,5, Treinta y Tres, URUGUAY	GP1100	AY724392.1
<i>A. viarius</i>	Ruta 10 Km 250, Rocha, URUGUAY	GP856	AY724408.1
Grupo "alexandri"			
<i>A. affinis</i>	Ruta 5 Km 399,5, Tacuarembó, URUGUAY (Localidad Tipo)	GP470	AF245464.1
<i>A. alexandri</i>	Salto, Salto, URUGUAY	GP475	AF245011.1
<i>A. duraznensis</i>	Mercedes, Soriano, URUGUAY	GP2396	KF192624.1
<i>A. duraznensis</i>		GP2397	KF192625.1
<i>A. nigripinnis</i>	Bañado Verocay, Salto, URUGUAY	GP397	AF245013.1
<i>A. periodicus</i>	BR 293 4Km al oeste de Don Pedrito, Rio Grande do Sul, BRASIL (Localidad Tipo)	R261	FJ826898.1
Grupo "bellottii" (sin "adloffii")			
<i>A. "apaii"</i>	Bañado Verocay, Salto, URUGUAY	GP400	AF245007.1
	Bella Unión, Artigas, URUGUAY	GP1427	HQ149636
	Ciudad de Salto, Salto, URUGUAY	GP1441	HQ149643
		GP1442	HQ149644
	Puerto Viejo, San Javier, Río Negro, URUGUAY	GP1456	HQ149647
	Villa Soriano, Soriano, URUGUAY	GP1572	HQ149648
	Carmelo, Colonia, URUGUAY (Localidad Tipo)	GP363	AF245006.1
Guleguaychú, Entre Ríos, ARGENTINA	R179	HQ149660	
<i>A. bellottii</i>	La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA (Localidad Tipo)	R225	HQ149661
		R226	HQ149662
	Dolores, Buenos Aires, ARGENTINA	R294	HQ149666
	Viborata, Buenos Aires, ARGENTINA	R298	HQ149667
		R299	HQ149668

		R301	HQ149670
	Cabo San Antonio, Buenos Aires, ARGENTINA	R310	HQ149674
		R312	HQ149676
	Ruta 2 Km 145,2, Buenos Aires, ARGENTINA	R325	HQ149678
A. sp.1	Ruta 11, 21 km al sur de Río Oro, Chaco, ARGENTINA	R153	HQ149650
		R154	HQ149651
		R155	HQ149652
		R156	FJ 826891
		R157	HQ149653
		R158	HQ149654
	Puerto Tirol, Chaco, ARGENTINA	R173	HQ149655
Grupo "elongatus"			
<i>A. cheradophilus</i>	Los Sauces, Valizas, Rocha, URUGUAY	GP416	AF245467.1
<i>A. elongatus</i>	Azul, Buenos Aires, ARGENTINA	R160	FJ826893
<i>A. monstruosus</i>	Salta, ARGENTINA	R197	FJ826895
<i>A. prognathus</i>	Ruta 8 cerca de José Pedro Varela, Lavalleja, URUGUAY	R2378	KF027486
<i>A. wolterstorffi</i>	Rota 15 km 137,6, Lascano, Rocha, URUGUAY	GP530	AF245014.1
Complejo "luteoflammulatus"			
<i>A. gymnoventris</i>	Grutas de Salamanca, Maldonado, URUGUAY	GP2394	KF027481
<i>A. luteoflammulatus</i>	PROBIDES, Ruta 9, Rocha, URUGUAY	GP2549	KF027485
<i>A. quirogai</i>	Cerro de las Cuentas, Cerro Largo, URUGUAY	GP2538	KF027490
Grupo "robustus"			
<i>A. cinereus</i>	Ruta 21 y Arroyo las Víboras, Colonia, URUGUAY (Localidad Tipo)	GP735	AF245005.1
<i>A. "nonoiuliensis"</i>	Ciudad de 9 de Julio, Buenos Aires, Argentina (Localidad Tipo)	R082	FJ826896.1
<i>A. robustus</i>	Viborató, Buenos Aires, Argentina	R049	FJ826900.1
Grupo incierto en Austrolebias			
<i>A. patriciae</i>	Ruta a Clorinda, 500m al sur de Río Negro (25.25°S, 57.67°W), Presidente Hayes, PARAGUAY (Localidad Tipo)	R113	FJ826897
Grupos externos			
<i>Hypsolebias flavicaudatus</i>	Ruta entre Lagoa Grande y Santa Maria da Boa Vista, 52 km E de Lagoa Grande (8°52'36''S 39°55'25''W), Pernambuco, BRASIL	UFRJ 6822.1	JQ612776
<i>Hypsolebias janaubensis</i>	15°47'57''S 43°19'18''W, Minas Gerais, BRASIL	UFRJ 6787.1	JQ612772
<i>Hypsolebias nitens</i>	Itaguaçu (10°43'20''S 42°20'30''W), Bahia, BRASIL	UFRJ6828.2	JQ612779.1
<i>Hypsolebias nitens</i>		UFRJ6828.4	JQ612781.1
<i>Notholebias minimus</i>	Campo Grande (22°57'00"S 43°36'45"W), Rio de Janeiro, BRASIL	UFRJ8270.2	KF311333.1
<i>Plesiolebias glaucopterus</i>	Cuiabá, Mato Grosso, BRASIL	R006	AF245468.1

Anexo 2: Haplotipos obtenidos para el grupo *A. bellottii* s.s.

Tabla 1. Lista de los haplotipos obtenidos con sus respectivas localidades y grupos.

Haplotipos	Nº	Localidades	Grupos
Hap_1	11	Paso San Diego, Cañada de las Pajas	<i>A. sp.3</i>
Hap_2	14	Paso San Diego, Candiota	
Hap_3	1	Paso San Diego	
Hap_4	1		
Hap_5	1		
Hap_6	11		
Hap_7	4	Bagé	
Hap_8	30	Queguay	<i>A. sp.2</i>
Hap_9	7	Jaguarão	<i>A. univentripinnis</i>
Hap_10	13		
Hap_11	4		
Hap_12	10	Herval	<i>A. melanoorus</i>
Hap_13	1	Paso Manuel Díaz	
Hap_14	6	Paso Manuel Díaz, Paso de la Laguna	
Hap_15	1	Paso Manuel Díaz	
Hap_16	1		
Hap_17	1		
Hap_18	1		
Hap_19	3	Paso de la Laguna	
Hap_20	1		
Hap_21	1		
Hap_22	6	Río Negro, Salto, Gualaguaychú	<i>A. apaii</i>
Hap_23	1	Artigas	
Hap_24	1	Salto	
Hap_25	1	Soriano	
Hap_26	1	Colonia	
Hap_27	3	Puerto Tirol	
Hap_28	1		
Hap_29	2		
Hap_30	1	Sur del Río Oro	<i>A. bellottii</i>
Hap_31	1	La Plata	
Hap_32	5	La Plata, Viborata, San Antonio	
Hap_33	1	Dolores	
Hap_34	1	Viborata	
Hap_35	1	Ruta 2, Km 145,2	

Anexo 3: Estructuración poblacional.

Tabla 1. Hipótesis de estructuración poblacional. En la primer columna se listan todas las combinaciones puestas a prueba en los Análisis Moleculares de Varianza implementados en el programa Arlequin. En la segunda, tercer y cuarta columna se listan los valores de F_{ct} , F_{sc} y F_{st} respectivamente, para las combinaciones de la primer columna, los resultados se disponen de mayor a menor en orden descendente. **P** = Río Paraná; **U** = Río Uruguay; **BA** = Río de la Plata en Provincia de Buenos Aires; **Q** = Río Queguay; **T** = Río Tacuarembó, **N** = Río Negro Alto; **Ya** = Río Yaguarón Alto; **Yb** = Río Yaguarón Bajo.

Agrupamientos	Fct	Fsc	Fst
(BA+P+U)+Q+T+N+Ya+Yb	0,10551	0,01599	0,11981
BA+(P+U)+Q+T+N+Ya+Yb	0,10336	0,01664	0,11828
(BA+P)+U+Q+T+N+Ya+Yb	0,10260	0,01739	0,11820
(BA+P+U)+Q+(T+N+Ya)+Yb	0,05032	0,07768	0,12410
(BA+P+U)+Q+T+(N+Ya)+Yb	0,04378	0,08014	0,12041
BA+(P+U)+Q+(T+N+Ya)+Yb	0,03641	0,08859	0,12177
(BA+P)+U+Q+(T+N+Ya)+Yb	0,03563	0,08921	0,12166
(BA+P+U)+Q+(T+N)+(Ya+Yb)	0,02790	0,09585	0,12108
(BA+P+U)+Q+(T+N+Ya+Yb)	0,02585	0,10263	0,12582
BA+(P+U)+Q+T+(Ya+N)+Yb	0,02301	0,09799	0,11874
(BA+P)+U+Q+T+(N+Ya)+Yb	0,02174	0,09908	0,11867
BA+P+U+Q+(T+N+Ya)+Yb	0,01914	0,10249	0,11967
(BA+P+U+Q)+(T+N+Ya+Yb)	0,01403	0,11061	0,12309
BA+(P+U)+Q+(T+N)+(Ya+Yb)	0,01226	0,10801	0,11895
(BA+U+Q)+P+(N+T+Ya+Yb)	0,00592	0,11448	0,11972
BA+P+(U+Q)+(T+N)+(Ya+Yb)	-0,00139	0,11864	0,11741
BA+P+U+Q+T+(N+Ya)+Yb	-0,00991	0,12583	0,11717
(BA+U)+P+Q+T+(N+Ya+Yb)	-0,01065	0,12490	0,11558
BA+(P+U)+Q+T+(N+Ya+Yb)	-0,01404	0,12722	0,11496

Anexo 4: Lotes y descripción morfológica de cada uno de los grupos analizados.

***Austrolebias bellottii* (Steindachner)**

Figura 1

Materiales examinados: **MHNM 2411**, 30, 17 machos 36,2-55,0 mm SL, 13 hembras 34,5-41,9 mm SL, Ruta 3 km 76, Buenos Aires, Argentina, 35°16'S 58°46W, 20/XI/1982, R. Taberner. **MHNM 2412**, 97, 44 machos 30,3-59,4 mm SL, 53 hembras 26,9-51,2 mm SL, Canning, Buenos Aires, Argentina, 34°53'S 58°31W, 7/VIII/1975, R. Taberner. **MHNM 2414**, 87, 36 machos 17,7-47,0 mm SL, 51 hembras 18,9-47,0 mm SL, Castelar, Buenos Aires, Argentina, 34°40'S 58°39'W, 2/XI/1974, R. Taberner. **MHNM 2418**, 84, 31 machos 19,0-44,6 mm SL, 53 hembras 20,5-49,0 mm SL, Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°49'S 57°57'W, 28/X/1972, R. Taberner. **MHNM 2422**, 9, 4 machos 53,7-66,5 mm SL, 5 hembras 56,1-67,8 mm SL, Cañuelas, Buenos Aires, Argentina, 35°01'S 58°44W, 18/XII/1982, R. Taberner. **MHNM 2423**, 41, 17 machos 36,3-54,2 mm SL, 24 hembras 30,1-49,5 mm SL, Villa Elisa, Buenos Aires, Argentina, 34°50'S 58°04'W, 30/IX/1973, R. Taberner. **MHNM 2425**, 65, 13 machos 18,60-41,61 mm SL, 52 hembras 17,49-40,13 mm SL, Santa Teresita, Buenos Aires, Argentina, 36°32'S 56°43'W, 31/X/1975, R. Taberner. **MHNM 2428**, 2, 1 macho 48,6 mm SL, 1 hembra 40,4 mm SL, Las Heras, Buenos Aires, Argentina, 34°54'S 58°56'W, Aón. **MHNM 2432**, 12, 5 machos 35,3-54,3 mm SL, 7 hembras 27,6-48,6 mm SL, Punta del Indio, Buenos Aires, Argentina, 35°16'S 57°15'W, 19/XI/1972, R. Taberner. **MHNM 2571**, 26, 8 machos 39,0-53,5 mm SL, 18 hembras 32,5-48,1 mm SL, Villa Elisa, Buenos Aires, Argentina, 34°50'S 58°04'W, 11/XI/1973, R. Taberner. **MHNM 2574**, 12, 5 machos 48,1-53,9 mm SL, 7 hembras 32,5-47,1 mm SL, San Vicente, Buenos Aires, Argentina 35°00'S

58°25'W, 16/XI/1974, R. Taberner. **MHNM 2576**, 25, 16 machos 29,4-49,4 mm SL, 9 hembras 38,9-44,0 mm SL, Castelar, Buenos Aires, Argentina, 34°40'S 58°39'W, 1/XI/1974, J.L. Bellosini. **MHNM 2581**, 32, 12 machos 23,2-54,8 mm SL, 20 hembras 27,4-44,5 mm SL, Canning, Buenos Aires, Argentina, 34°53'S 58°31'W, 16/XI/1979, R. Taberner. **MHNM 2583**, 8 machos 20,9-31,3 mm SL, 12 hembras 20,1-28,7 mm SL, Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°49'S 57°57'W, 30/III/1983, R. Taberner. **MHNM 2587**, 21, 8 machos 26,5-35,8 mm SL, 13 hembras 24,3-34,9 mm SL, Gorchs, Buenos Aires, Argentina, 35°42'S 58°57'W, 13/VIII/1972, R. Taberner. **MHNM 2801**, 23, 5 machos 27,8-35,8 mm SL, 18 hembras 30,1-39,8 mm SL, camino entre La Plata y Magdalena, Buenos Aires, Argentina, 35°03'S 57°37'W, XI/1986, J.R. Casciotta. **MHNM 2802**, 21, 18 machos 35,1-46,4 mm SL, 3 hembras 38,4-46,9 mm SL, Las Heras, Buenos Aires, Argentina, 34°54'S 58°56'W, Aón. **MHNM 2892**, 73 hembras 26,0-48,5 mm SL, Castelar, Buenos Aires, Argentina, 34°40'S 58°39'W, 15/VIII/1966, R. Taberner. **MHNM 3116**, 78, 14 machos 22,1-39,2 mm SL, 64 hembras 23,2-31,7 mm SL, Chivilcoy, Buenos Aires, Argentina, 34°56'S 60°01'W, 5/VIII/1978, R. Taberner. **ZVC-P 516**, 82, 11 machos 35,2-49,1 mm SL, 71 hembras 29,6-47,11 mm SL, camino entre Villa Elisa y Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°50'S 58°01'W, 2/XI/1962, R. Vaz-Ferreira, B. y J. Soriano. **ZVC-P 517**, 2, 1 macho 38,3 mm SL, 1 hembra 37,0 mm SL, camino entre Villa Elisa y Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°50'S 58°01'W, 2/XI/1962, R. Vaz-Ferreira, B. y J. Soriano. **ZVC-P 707**, 11, 9 machos 30,7-48,6 mm SL, 2 hembras 38,9-39,4 mm SL, Camino de la Costa, 13km al sur de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 34°55'S 57°45'W, 3/XI/1962, R. López, R. Vaz-Ferreira, B. Sierra de Soriano & J. Soriano. **ZVC-P 708**, 11, 3 machos 41,8-47,4 mm SL, 8 hembras 31,9-44,1 mm SL, Camino de la Costa, 13km al sur de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 34°55'S 57°45'W, 3/XI/1962, R. López, R. Vaz-Ferreira, B. Sierra de Soriano & J. Soriano. **ZVC-**

P 709, 45, 12 machos 27,7-43,0 mm SL, 33 hembras 28,9-40,7 mm SL, Camino de la Costa, 13km al sur de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 34°55'S 57°45'W, 3/XI/1962, R. López, R. Vaz-Ferreira, B. Sierra de Soriano & J. Soriano. **ZVC-P 711**, 93, 42 machos 30,02-48,40 mm SL, 51 hembras 25,76-49,27 mm SL, Camino de la Costa, 13km al sur de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 34°55'S 57°45'W, 3/XI/1962, R. López, R. Vaz-Ferreira, B. Sierra de Soriano & J. Soriano. **ZVC-P 714**, 1 hembra 33,1 mm SL, Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°49'S 57°57'W, 3/XI/1962, R. Vaz-Ferreira, B. Sierra de Soriano & J. Soriano. **ZVC-P 954**, 10, 7 machos 55,2-63,7 mm SL, 3 hembras 44,6-50,8 mm SL, camino entre Villa Elisa y Punta Lara, Buenos Aires, Argentina, 34°50'S 58°01'W, 21/X/1963, López-Grancelli.



Figura 1. *Austrolebias bellottii*: MHNM 2411, (A) macho 55,0 mm SL, (B) hembra 36,3 mm SL, Ruta 3 km 76 (35°16'S 58°46'W), Buenos Aires, Argentina, col. R. Taberner, 20/XI/1982.

Descripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 1. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 66,5 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 67,8 mm. Forma general del cuerpo orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta dorsal. Perfil dorsal del cuerpo convexo hasta la inserción posterior de la aleta dorsal, apenas cóncavo por detrás de la cabeza. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta en machos y recta a cóncava en hembras. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados. Forma de la aleta anal de las hembras variable, pudiendo ser redondeada a triangular. Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales se ubica entre el espacio posterior al origen de las pélvicas y anterior al 7° radio de la aleta anal en machos, y anterior al origen de las pélvicas hasta el espacio entre el 3° y 4° radio anal en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 50-80% (1 hembra con 40%), con su extremo posterior que llega entre la papila urogenital y el quinto radio anal, tanto en machos como hembras. Papila urogenital en machos parcial a completamente unida a la aleta anal. Origen de la aleta dorsal en machos por detrás del origen de la aleta anal, entre las vértebras 10 y 12 y las espinas neurales de las vértebras 8 y 11; posición del origen de la aleta dorsal en hembras variable tanto por delante como por detrás del origen de la aleta anal, entre las vértebras 11 y 14 y las espinas neurales 10 y 13. Origen de la aleta anal en machos entre los “pleural ribs” de las vértebras 6 y 9 (usualmente entre la 7° y la 8°), y las vértebras 8 y 10, en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 9 y 10, y las

vértebras 12 y 14. Número de radios dorsales 20-24 en machos y 16-21 en hembras; número de radios anales 26-31 en machos y 22-28 en hembras. Radios totales en aleta caudal 19-27; radios en aletas pectorales 11-13; radios en aletas pélvicas 3-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 29-35; serie de escamas transversales 13-18; escamas circumpedunculares 13-18. Base de la aleta anal en machos generalmente con presencia de una a más escamas en el espacio entre los radios, dispuestas en una única hilera irregular; base de la aleta anal en hembras generalmente sin escamas. Órganos de contacto en escamas presentes en la totalidad de los ejemplares machos analizados, 1 a 9 órganos de contacto por escama: órganos de contacto presentes hasta los 6 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 12-24, parietal 0-4, anterior rostral 1-2 (usualmente 1), posterior rostral 1, infraorbital 1-3 + 18-29, preorbital 2-4, ótico 1-5, post-otico 1-5, supratemporal 1-2 (usualmente 1), medio opercular 0-1 (usualmente 1), ventral opercular 0-3, preopercular 18-29, mandibular 10-16, lateral mandibular 4-7.

Cartílago basihial ensanchándose hacia su extremo anterior a veces de forma abrupta, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial. Segundo faringobranquial con 4 a 13 dientes y tercer faringobranquial con 20 a 48. Primer arco branquial con 2 a 4 espinas epibranquiales y 8 a 12 hipobranquiales (generalmente 10 a 12). Osificaciones dermosfenóticas generalmente presentes (ausentes solo en 1 de 21 ejemplares

analizados); radiales proximales 3-4; proceso ventral del posttemporal de longitud variable, generalmente largo. Vértabras totales 28-31.

Coloración en vivo:

Machos: Cuerpo de coloración pardo a verdoso oscureciéndose hacia la región dorsal, con 6 a 14 hileras verticales de puntos brillantes celestes, ocasionalmente sobre bandas difusas un poco más claras que el color de fondo. Región pectoral y ventral blanquecina. Región opercular y preopercular celeste intenso. Ojo con iris amarillo claro; banda vertical gris oscura atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro, y reflejos azules por encima del reborde; pélvicas azul verdoso. Aletas dorsal y anal azul verdosas a verdes, con puntos celestes claros distribuidos de forma variable; borde de la anal más oscuro. Aleta caudal de color azul verdoso a verde con borde hialino, generalmente con manchas celestes distribuidas de forma variable.

Hembras: Cuerpo color marrón claro, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Generalmente con manchas marrones más oscuras dispersas por todo el cuerpo, formando bandas verticales en algunos ejemplares. Región central de los flancos usualmente sin manchas negras (1 a 2 manchas presentes en menos del 30% de los ejemplares analizados); cuando se hallan presentes suelen tener reflejos verde azulado. Ojo con iris amarillo claro; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Región opercular con reflejos celestes. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar manchas o líneas marrones en el espacio entre los radios.

Distribución y Conservación: De acuerdo al presente trabajo *Austrolebias bellottii* se distribuye en humedales de las cuencas asociadas directamente al Río de la Plata y Océano Atlántico, de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura 2). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN; de acuerdo con Peteán (2009) se categorizaría como Data Deficient (DD).

Table 1. Datos morfométricos de *Austrolebias bellottii*, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Caracter	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	49	26,3	63,7	40,2	-	50	25,8	50,8	35,2	-
2. Altura del cuerpo	49	30,2	46,2	39,1	3,12	50	31,7	43,1	37,6	2,80
3. Largo de la Cabeza	49	21,5	28,4	25,2	1,61	50	23,5	28,3	25,6	1,32
4. Alto del pedúnculo	49	9,9	15,5	12,8	1,14	50	10,3	14,7	12,6	1,11
5. Largo del pedúnculo	49	5,5	14,0	9,6	1,81	50	10,8	21,4	15,3	2,26
6. Longitud predorsal	49	47,8	57,3	52,5	2,29	50	55,6	63,4	58,6	1,75
7. Base de aleta dorsal	49	32,6	43,5	37,7	2,45	50	21,1	33,5	26,8	2,82
8. Longitud pre-anal	49	42,5	53,2	47,8	2,30	50	51,3	65,3	57,2	3,01
9. Base de aleta anal	49	39,3	53,6	47,2	3,36	50	25,7	38,0	30,1	2,71
10. Longitud pre pélvica	49	36,1	45,2	41,2	1,88	50	43,1	54,1	47,6	2,58
11. Largo aleta pectoral	49	16,5	28,3	23,1	2,48	50	19,3	29,3	24,2	2,25
12. Largo aletas pélvicas	49	8,2	14,4	11,2	1,29	50	12,0	17,2	14,2	1,22
13. Largo aleta caudal	49	18,0	30,0	25,1	3,42	50	22,1	35,1	28,5	2,60
14. Ancho de la cabeza	49	52,0	78,7	62,5	6,20	50	54,9	82,2	66,9	5,61
15. Alto de la cabeza	49	99,0	145,8	118,7	10,29	50	97,7	129,8	113,1	7,54
16. Distancia interorbital	49	39,1	56,2	46,9	3,56	50	38,4	52,4	46,1	2,77
17. Diámetro del ojo	49	26,4	38,0	31,2	2,58	50	28,5	42,8	33,6	2,91
18. Largo del hocico	49	20,1	32,8	24,3	2,33	50	18,9	32,5	22,4	2,19
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	50	17,0	24,2	21,1	1,75

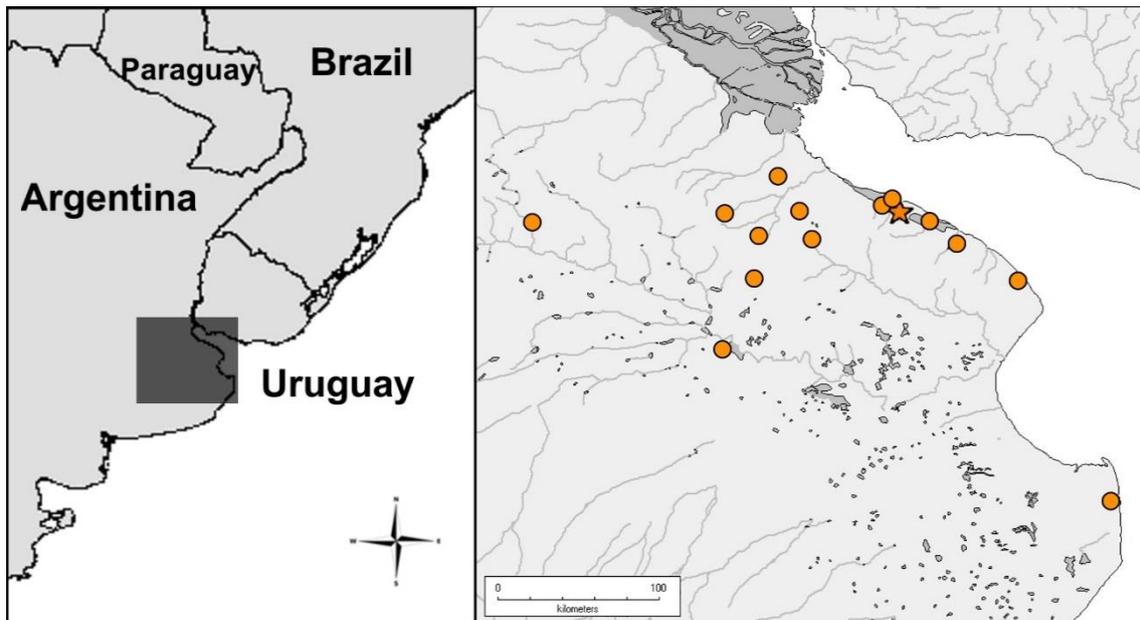


Fig. 2. Distribución geográfica de *Austrolebias bellottii* en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. La estrella indica la localidad tipo.

Austrolebias apaii Costa, Laurino, Recuero & Salvia

Figura 3

Materiales examinados: MHNM 3113, 23, 10 machos 27,3-40,1 mm SL, 13 hembras 26,4-31,9 mm SL, Esteros del Cambay, Corrientes, Argentina, 28°36'S 56°06'W, 17/VIII/1947, S.A. Bachmann. **ZVC-P 682**, 4, 1 macho 35,4 mm SL, 2 hembras 28,9-29,5 mm SL, Radio de Carmelo, Colonia, Uruguay, 34°00'03,82"S 58°17'43,27"W, 5/III/1962, R. Vaz-Ferreira. **ZVC-P 812**, 2, 1 macho 26,3 mm SL, 1 hembra 21,7 mm SL, Radio de Carmelo, Colonia, Uruguay, 34°00'03,82"S 58°17'43,27"W, 5/III/1962, R. Vaz-Ferreira. **ZVC-P 876**, 28, 17 machos 24,6-47,2 mm SL, 11 hembras 21,6-44,7 mm SL, Radio de Carmelo, Colonia, Uruguay, 34°00'03,82"S 58°17'43,27"W, 5/XI/1964, R. Vaz-Ferreira. **ZVC-P 2086**, 17, 6 machos 38,2-48,2 mm SL, 11 hembras 32,5-43,2 mm SL, Radio de Carmelo, Colonia, Uruguay, 34°00'03,82"S 58°17'43,27"W, 23/IX/1973, R. Vaz-Ferreira & G. Gannella. **ZVC-P 5343**, 15, 9 machos 29,7-39,8 mm SL (4 c&s 29,7-34,0 mm SL), 6 hembras 26,2-34,4 mm SL (4 c&s 26,2-34,4 mm SL), Ciudad de Sato, Salto, Uruguay, 31°19'40,46"S 57°58'28,27"W, V/2002, M. Loureiro, F. Teixeira de Mello & E Charbonier. **ZVC-P 5344**, 35, 12 machos 27,5-45,3 mm SL, 23 hembras 23,4-31,8 mm SL, boca del Arroyo Román Grande, Río Negro, Uruguay, 32°50'35,53"S 58°04'57,99"W, V/2002, M. Loureiro & A. D'Anatro. **ZVC-P 5345**, 3, 1 machos 46,3 mm SL, 2 hembras 31,2-37,0 mm SL, Puerto Viejo, Río Negro, Uruguay, 32°38'25,23"S 58°08'51,29"W, V/2002, M. Loureiro, F. Teixeira de Mello & E Charbonier. **ZVC-P 5346**, 23, 12 machos 24,5-48,2 mm SL (5 c&s 26,5-30,8 mm SL), 11 hembras 23,1-41,1 mm SL (5 c&s 23,1-27,7 mm SL), Franquia, Bella Unión, Artigas, Uruguay, 30°13'09,38"S 57°37'20,32"W, VII/2002, M. Loureiro. **ZVC-P 5348**, 3, 1 macho 34,8 mm SL, 2 hembras 24,9-30,9 mm SL, Nueva Palmira, Colonia, Uruguay, 33°52'50,92"S

58°24'36,96"W, 29/X/1948, R. Vaz-Ferreira. **ZVC-P 5349**, 2 hembras 38,9-41,0 mm SL, Ruta 96 km 3.5, Soriano, Uruguay, 33°25'09,28"S 58°17'58,45"W, 2003, M. Loureiro. **ZVC-P 5350**, 1 hembra 49,1 mm SL, Villa Soriano, Soriano, Uruguay, 33°24'39,61"S 58°19'15,12"W, 2003, M. Loureiro. **ZVC-P 5351**, 7, 1 macho 39,6 mm SL, 6 hembras 31,3-37,3 mm SL, Route 96 km 6, Soriano, Uruguay, 33°25'29,13"S 58°17'25,36"W, 2003, M. Loureiro. **ZVC-P 7712**, 8, 1 macho 37,1 mm SL, 7 hembras 27,6-37,7 mm SL, oeste de Villa Soriano, Soriano, Uruguay, 33°23'33,55"S 58°20'41,52"W, 31/VII/2007, M. Loureiro & S. Clavijo. **ZVC-P 7815**, 11, 4 machos 27,3-37,3 mm SL (3 c&s 27,3-33,9 mm SL), 7 hembras 20,0-33,6 mm SL (4 c&s 29,1-33,6 mm SL), Puerto Viejo, San Javier, Río Negro, Uruguay, 32°38'15,35"S 58°08'54,42"W, IV/2002, M. Loureiro, D. García, F. Teixeira de Mello & A. D'Anatro. **ZVC-P 7826**, 11, 4 machos 44,6-49,6 mm SL, 7 hembras 37,2-46,4 mm SL, Estancia Curupí, Soriano, Uruguay, 33°28'27,84"S 58°20'03,63"W, 13/VII/2007, M. Loureiro & S. Clavijo. **ZVC-P 10451**, 17, 15 machos 14,3-32,7 mm SL, 2 hembras 19,5-21,5 mm SL, Club de Pesca, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina, 33°03'38,60"S 58°25'32,40"W, 21/IX/2008. **ZVC-P 11560**, 9, 4 machos 29,0-39,4 mm SL, 5 hembras 27,9-37,9 mm SL, Agraciada, Soriano, Uruguay, 33°42'42,44"S 58°25'11,85"W, 8/IX/2010. **ZVC-P 11635**, 1 macho 37,1 mm SL, Vizcaíno, Río Negro, Uruguay, 33°21'42,92"S 58°20'34,71"W, 11/IX/2012, D. García, D. Díaz, W.S. Serra & M. Loureiro. **ZVC-P 12475**, 4, 3 machos 42,5-62,6 mm SL, 1 hembra 52,2 mm SL, camino de la Escuela N°1, Villa Soriano, Soriano, Uruguay, 29/VIII/2011. **ZVC-P 12480**, 13, 7 machos 34,5-62,2 mm SL, 6 hembras 31,1-50,6, Ruta 96 km 8, Soriano, Uruguay, 29/VIII/2011, M. Loureiro, A. Duarte & I. Berro. **ZVC-P 13955**, 4, 1 macho 46,2 mm SL, 3 hembras 38,5-42,7 mm SL, camino a Curupí, Soriano, Uruguay, 33°28'27,84"S 58°20'03,63"W.

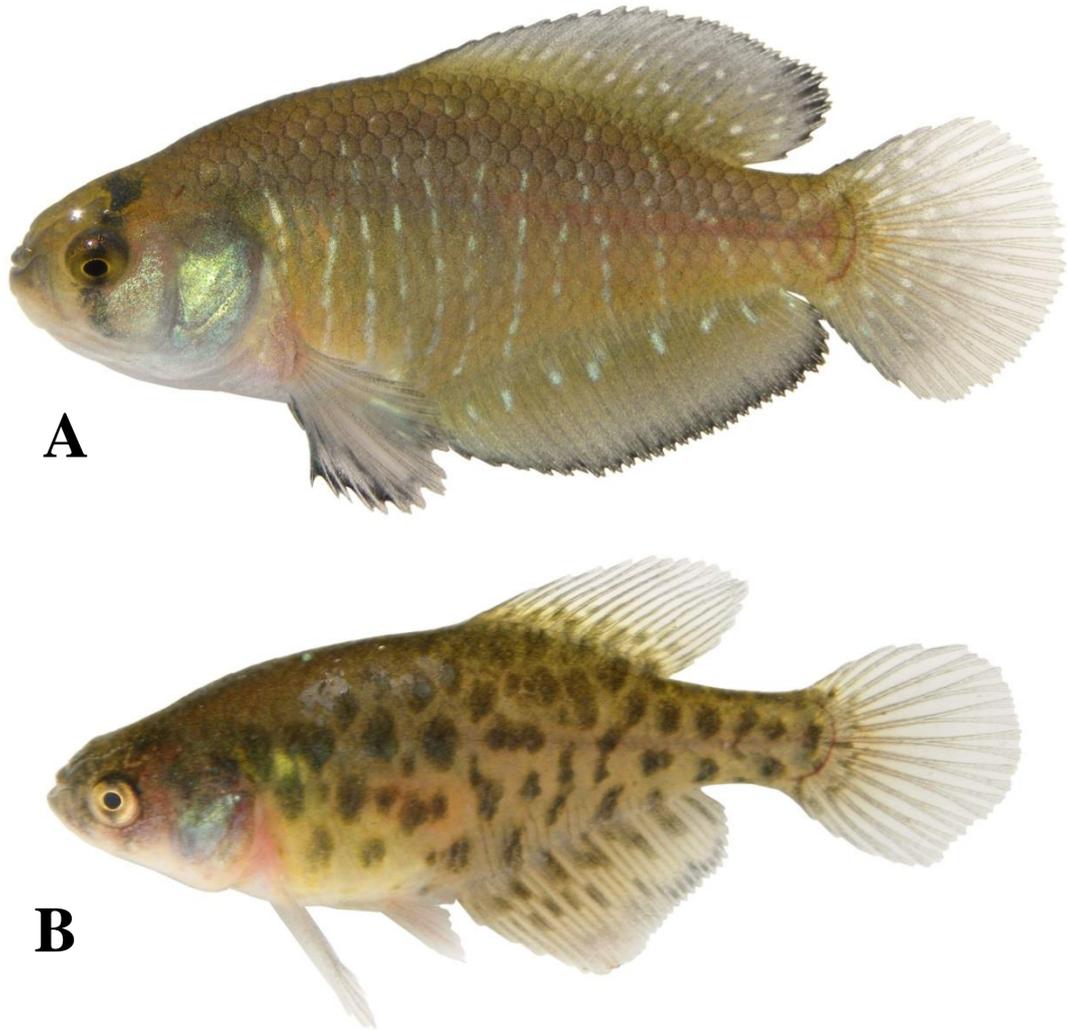


Fig. 3. *Austrolebias apaii*: **A**, macho Vizcaíno, Río Negro, Uruguay, 33°21'42,92"S 58°20'34,71"W, ejemplar no conservado; **B**, hembra (ZVCP 11560) 33,9 mm SL, Agraciada, Soriano, Uruguay, 33°42'42,44"S 58°25'11,85"W. Fotografías tomadas inmediatamente después de la captura (W.S. Serra).

Descripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 2. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 62,6 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 52,2 mm. Forma general del cuerpo romboidal a orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta anal. Perfil dorsal del cuerpo

convexo hasta la inserción posterior de la aleta dorsal, apenas cóncavo por detrás de la cabeza. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta a cóncava tanto en machos como en hembras. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados. Forma de la aleta anal de las hembras triangular. Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales se ubica del espacio entre las radios anales 6°-7° y anterior al 11° radio en machos, y de la papila urogenital hasta el espacio entre el 7° y 8° radio anal en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 50-75% (1 macho con 40%), con su extremo posterior que llega entre los radios anales 2° y 5° en machos, y la papila urogenital y el 6° radio anal en hembras. Papila urogenital en machos parcial a completamente unida a la aleta anal. Posición del origen de la aleta dorsal en machos variable, frecuentemente por detrás del origen de la aleta anal, entre las vértebras 8 y 12 y las espinas neurales de las vértebras 7 y 10; posición del origen de la aleta dorsal en hembras variable tanto por delante como por detrás del origen de la aleta anal, entre las vértebras 10 y 15 y las espinas neurales 8 y 13. Origen de la aleta anal en machos entre los “pleural ribs” de las vértebras 6 y 9, y las vértebras 8 y 12, en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 6 y 10, y las vértebras 9 y 14. Número de radios dorsales 21-26 en machos y 16-22 en hembras; número de radios anales 27-32 en machos y 23-30 en hembras. Radios totales en aleta caudal 17-24; radios en aletas pectorales 10-13; radios en aletas pélvicas 4-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 29-33; serie de escamas transversales 11-21 (generalmente 11-16); escamas circumpedunculares 11-18. Base de la aleta anal en machos generalmente con presencia de una a más escamas en el espacio entre los radios, dispuestas en una única hilera irregular; base de la aleta anal en hembras generalmente sin escamas. Órganos de contacto en escamas presentes en alrededor del 70% de los ejemplares machos analizados, 1 a 8 órganos de contacto por escama (generalmente 2 o 3); órganos de contacto presentes hasta los 3 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 16-24, parietal 2-6, anterior rostral 1-2 (usualmente 1), posterior rostral 1, infraorbital 2-3 + 20-31 (1 ejemplar hembra con 3+39), preorbital 2-4, ótico 1-5, post-ótico 1-4, supratemporal 0-2 (usualmente 1), medio opercular 0-1 (usualmente 1), ventral opercular 0-4, preopercular 21-33, mandibular 12-18, lateral mandibular 4-9.

Cartílago basihial generalmente ensanchado en su extremo anterior, raras veces con pequeñas comisuras (3% de los ejemplares analizados), ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial. Segundo faringobranquial con 2 a 9 dientes y tercer faringobranquial con 21 a 42. Primer arco branquial con 2 a 5 (generalmente 3 a 4) espinas epibranquiales y 9 a 12 hipobranquiales (generalmente 10 u 11). Osificaciones dermosfenóticas generalmente presentes (77% de los ejemplares analizados); radiales proximales 3-4 (5 en uno de 58 ejemplares analizados); proceso ventral del posttemporal de longitud variable, generalmente largo. Vértebrales totales 27-32.

Coloración en vivo:

Machos: Cuerpo de coloración pardo a verdoso oscureciéndose hacia la región dorsal, con 9 a 16 hileras verticales de puntos brillantes celestes, ocasionalmente sobre bandas difusas un poco más claras que el color de fondo. Región central de los flancos ocasionalmente con una o dos manchas negras. Región pectoral y ventral blanquecina. Región opercular y preopercular celeste intenso. Ojo con iris amarillo claro; banda vertical gris oscura atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro, y reflejos azules por encima del reborde; pélvicas azul verdoso. Aletas dorsal y anal azul verdosas a verdes, con puntos celestes claros distribuidos de forma variable; borde de la anal más oscuro. Aleta caudal de color azul verdoso a verde con borde hialino, generalmente con manchas celestes distribuidas de forma variable.

Hembras: Cuerpo color marrón claro, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Generalmente con manchas marrones más oscuras dispersas por todo el cuerpo, formando bandas verticales en algunos ejemplares. Región central de los flancos con manchas negras en más del 80% de los ejemplares analizados (1 a 8 manchas presentes, generalmente 1 a 3); cuando se hallan presentes suelen tener reflejos verde azulado. Ojo con iris amarillo claro; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Región opercular con reflejos celestes a verdosos. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar manchas o líneas marrones en el espacio entre los radios.

Tabla 2. Datos morfométricos de *Austrolebias apaii*, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Caracter	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máy	Promedio	DS	N	Mín	Máy	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	50	24,5	62,2	38,5	-	50	26,6	50,6	36,8	-
2. Altura del cuerpo	50	32,8	44,8	38,3	2,77	50	34,0	47,9	39,3	2,61
3. Largo de la Cabeza	50	21,6	30,3	26,0	1,82	50	23,6	32,6	26,9	1,53
4. Alto del pedúnculo	50	10,3	14,5	12,6	0,97	50	9,9	16,6	13,0	1,06
5. Largo del pedúnculo	50	6,3	13,2	9,7	1,69	50	10,6	20,0	13,9	1,80
6. Longitud predorsal	50	46,8	59,4	51,5	2,37	50	51,7	61,9	57,1	2,39
7. Base de aleta dorsal	50	30,9	43,6	38,8	2,35	50	23,8	34,9	29,9	2,39
8. Longitud pre-anal	50	41,3	50,2	46,0	1,97	50	48,6	57,6	53,1	2,36
9. Base de aleta anal	50	43,1	54,9	48,4	2,63	50	31,5	39,5	35,3	2,02
10. Longitud pre pélvica	50	36,2	42,8	39,7	1,78	50	40,2	48,8	44,2	2,33
11. Largo aletas pectorales	48	18,9	31,2	25,2	2,56	50	20,5	30,3	25,7	2,17
12. Largo aletas pélvicas	46	9,4	14,5	11,6	1,28	50	9,9	18,7	14,7	1,69
13. Largo aleta caudal	50	19,9	34,0	26,6	2,67	50	23,7	33,9	29,3	2,63
14. Ancho de la cabeza	50	50,9	70,8	61,4	4,21	50	54,3	79,8	65,9	4,85
15. Alto de la cabeza	50	93,1	140,2	113,3	10,33	50	100,1	125,4	110,6	6,17
16. Distancia interorbital	50	42,2	56,4	48,9	3,62	50	42,4	54,9	49,3	3,02
17. Diámetro del ojo	50	27,5	38,1	33,2	2,45	50	28,4	39,8	33,6	2,73
18. Largo del hocico	50	19,2	30,2	25,1	2,32	50	20,3	29,1	23,5	1,43
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	50	16,1	26,2	21,8	2,19

Distribución y Conservación: De acuerdo al presente trabajo *Austrolebias apaii* se distribuye en humedales asociados a los márgenes del Río Uruguay medio y bajo, en Uruguay y Argentina, y sobre la vertiente del Río de la Plata en Uruguay (Figura 4). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN, sin embargo en Uruguay (bajo el

nombre de *A. bellottii*) es considerada como una especie prioritaria para la conservación (Loureiro *et al.*, 2013).

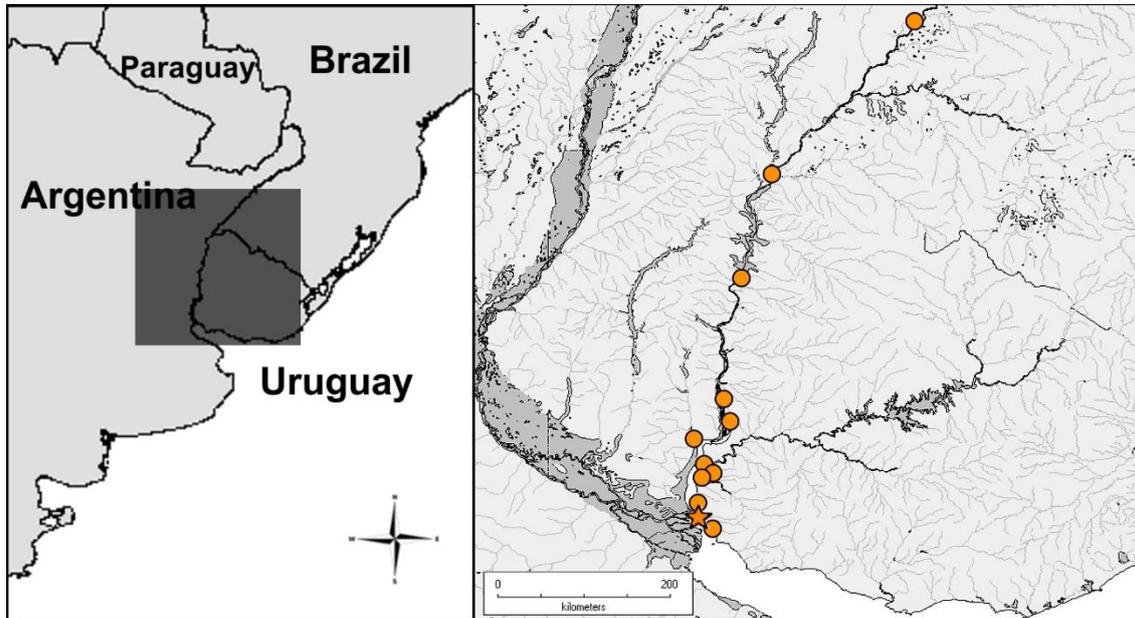


Figura 4. Distribución geográfica de *Austrolebias apaii* en los márgenes del Río Uruguay y Río de la Plata. La estrella indica la localidad tipo.

Austrolebias sp. 1

Figura 5

Materiales examinados: **MHNM 2566**, 44, 4 machos 23,1-36,0 mm SL, 40 hembras 27,1-39,9 mm SL, Puerto Vilelas, Chaco, Argentina, 27°30'S 58°57'W, 7/IV/1974, R. Taberner. **MHNM 3091**, 1 macho 27,8 mm SL (c&s), charcos en la Laguna Galarza, Esteros del Iberá, Corrientes, Argentina, 28°04'S 56°40'W, 21/VIII/1974, F. Santos. **MHNM 3092**, 2 hembras (c&s, parciamente desarticuladas), charcos en la Laguna Galarza, Esteros del Iberá, Corrientes, Argentina, 28°04'S 56°40'W, 21/VIII/1974, F. Santos. **MHNM 3093**, 1 macho (c&s), Puerto Vilelas, Chaco, Argentina, 27°30'S 58°57'W, 7/IV/1974, R. Taberner. **MHNM 3094**, 4 hembras 36,2-41,1 mm SL (c&s), Puerto Vilelas, Chaco, Argentina, 27°30'S 58°57'W, 7/IV/1974, R. Taberner. **ZVC-P 6409**, 7, 6 machos 33,2-41,2 mm SL, 1 hembra 31,2 mm SL, Río Salado, 18 km al N de San Cristobal, Santa Fé, Argentina, 30°11'S 61°11'W, 17/XII/1966, Lic. J.M. Gallardo. **ZVC-P 10448**, 2 machos 34,7-34,8 mm SL, charco 20 km al sur de Río Oro, Chaco, Argentina, 27°00'S 28°53'W, 30/VI/2005, P. Calviño. **ZVC-P 10449**, 9, 2 machos 34,7-34,8 mm SL, 7 hembras 24,2-29,8 mm SL, Tacural, Santa Fé, Argentina, 30°50'S 61°35'W, 22/VIII/2008, P. Calviño.



Figura 5. *Austrolebias* sp.1: **ZVC-P 10449**, Tacural, Santa Fé, Argentina, 30°50'S 61°35'W, **A**, macho 34,7 mm SL; **B**, hembra 24,7 mm SL.

Descripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 3. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 41,2 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 41,1 mm. Forma general del cuerpo romboidal a orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta dorsal. Perfil dorsal del cuerpo convexo hasta la inserción posterior de la aleta dorsal, apenas cóncavo por detrás de la cabeza. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal variable, pudiendo ser cóncava a

convexa tanto en machos como en hembras. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados. Forma de la aleta anal de las hembras triangular. Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales se ubica posterior al radio anal 4° y anterior al 9° radio en machos, y posterior al radio anal 2° y anterior al 7° en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 50-80%, con su extremo posterior que llega entre los radios anales 2° y 5° en machos, y entre los radios anales 4° y 7° en hembras. Papila urogenital en machos parcial a completamente unida a la aleta anal. Posición del origen de la aleta dorsal en hembras variable, generalmente anterior al origen de la aleta anal, entre las vértebras 11 y 14 y las espinas neurales 9 y 13 (no se dispone aún información referente a ejemplares machos). Origen de la aleta anal en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 10 y 12, y las vértebras 12 y 14 (no se dispone aún información referente a ejemplares machos). Número de radios dorsales 23-26 en machos y 18-22 en hembras; número de radios anales 29-32 en machos y 26-32 en hembras. Radios totales en aleta caudal 21-25; radios en aletas pectorales 11-13; radios en aletas pélvicas 5-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 28-34; serie de escamas transversales 11-18; escamas circumpedunculares 14-20. Presencia ocasional de una a más escamas en el espacio entre los radios de la base de la aleta anal, dispuestas en una única hilera irregular, tanto en machos como hembras. Órganos de contacto en escamas presentes en el 90% de los ejemplares machos analizados, 1 a 4 órganos de contacto por escama (generalmente 1): órganos de contacto presentes hasta los 3 primeros radios

superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 14-25 (usualmente 15-20), parietal 0-4 (usualmente 2-3), anterior rostral 1-2, posterior rostral 0-2 (usualmente 1), infraorbital 1-3 + 20-30, preorbital 2-3, ótico 2-5, post-otico 1-5, supratemporal 1-2 (usualmente 1), medio opercular 0-1 (usualmente 1), ventral opercular 1-3 (usualmente 2), preopercular 20-30, mandibular 12-18, lateral mandibular 2-8.

Cartílago basihial ensanchado en su extremo anterior, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial. Segundo faringobranquial con 5 a 7 dientes y tercer faringobranquial con 24 a 39. Primer arco branquial con 3 a 5 espinas epibranquiales y 10 a 12 hipobranquiales. Osificaciones dermosfenóticas presentes; radiales proximales 3-4; proceso ventral del posttemporal de longitud variable, generalmente largo. Vértebras totales 26-30.

Coloración en vivo:

Machos: Cuerpo de coloración pardo a verdoso oscureciéndose hacia la región dorsal, con 10 a 15 hileras verticales de puntos brillantes celestes, ocasionalmente sobre bandas difusas un poco más claras que el color de fondo. Región pectoral y ventral blanquecina a amarillenta. Región opercular y preopercular celeste verdoso intenso. Ojo con iris amarillo claro a blanco; banda vertical gris oscura con reflejos azulados atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro, y reflejos azules a verdes por encima del reborde; pélvicas azul verdoso. Aletas dorsal y anal azul verdosas a verdes, con puntos

celestes claros distribuidos de forma variable; borde de la anal más oscuro. Aleta caudal de color azul verdoso a verde con borde hialino, generalmente con manchas celestes distribuidas de forma variable.

Hembras: Cuerpo color marrón claro, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Generalmente con manchas marrones más oscuras dispersas por todo el cuerpo, formando bandas verticales en algunos ejemplares. Ocasionalmente pueden presentar 1 o 2 manchas negras en la región central de los flancos. Ojo con iris blanco; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Región opercular con reflejos celestes a verdosos. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar manchas o líneas marrones en el espacio entre los radios.

Distribución y Conservación: *Austrolebias* sp.1 se distribuye en humedales asociados a los márgenes del Río Paraná medio y bajo en Argentina (Figura 6). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN.

Tabla 3. Datos morfométricos de *Austrolebias* sp.1, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Caracter	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	14	23,1	41,4	33,2	-	19	24,2	39,9	30,2	-
2. Altura del cuerpo	14	29,5	41,9	35,9	3,53	19	31,1	40,5	35,8	2,88
3. Largo de la Cabeza	14	24,9	28,6	26,4	1,14	19	25,1	30,9	27,7	1,69
4. Alto del pedúnculo	14	9,9	17,0	12,8	1,71	19	10,9	14,6	12,3	1,02
5. Largo del pedúnculo	14	3,6	10,5	7,7	1,77	19	9,1	18,0	13,6	2,44
6. Longitud predorsal	14	48,7	55,1	52,5	1,80	19	54,6	62,2	59,0	2,19
7. Base de aleta dorsal	14	36,0	43,0	39,4	2,01	19	25,4	32,1	29,0	1,86
8. Longitud pre-anal	14	42,6	50,6	46,6	1,95	19	50,9	56,3	53,7	1,59
9. Base de aleta anal	14	41,7	56,5	49,3	4,06	19	31,2	37,1	34,9	1,60
10. Longitud pre pélvica	14	37,3	45,9	40,3	2,21	19	42,4	47,5	44,6	1,49
11. Largo aletas pectorales	14	20,8	29,6	23,9	2,54	16	19,6	28,7	23,9	2,80
12. Largo aletas pélvicas	14	9,5	15,7	11,6	1,93	19	12,6	18,4	15,1	1,30
13. Largo aleta caudal	14	20,1	30,3	25,6	3,29	19	26,7	33,2	29,6	1,90
14. Ancho de la cabeza	14	30,4	68,0	55,7	8,91	19	54,8	69,0	61,0	3,28
15. Alto de la cabeza	14	88,0	126,4	109,0	9,88	19	88,6	112,9	100,1	6,77
16. Distancia interorbital	14	33,5	54,0	46,4	4,86	19	44,3	52,1	47,5	2,63
17. Diámetro del ojo	14	28,8	41,5	34,1	3,47	19	33,1	41,0	37,3	2,30
18. Largo del hocico	14	20,7	25,2	23,0	1,29	19	19,1	28,7	23,9	2,80
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	17	17,7	26,7	22,9	2,25

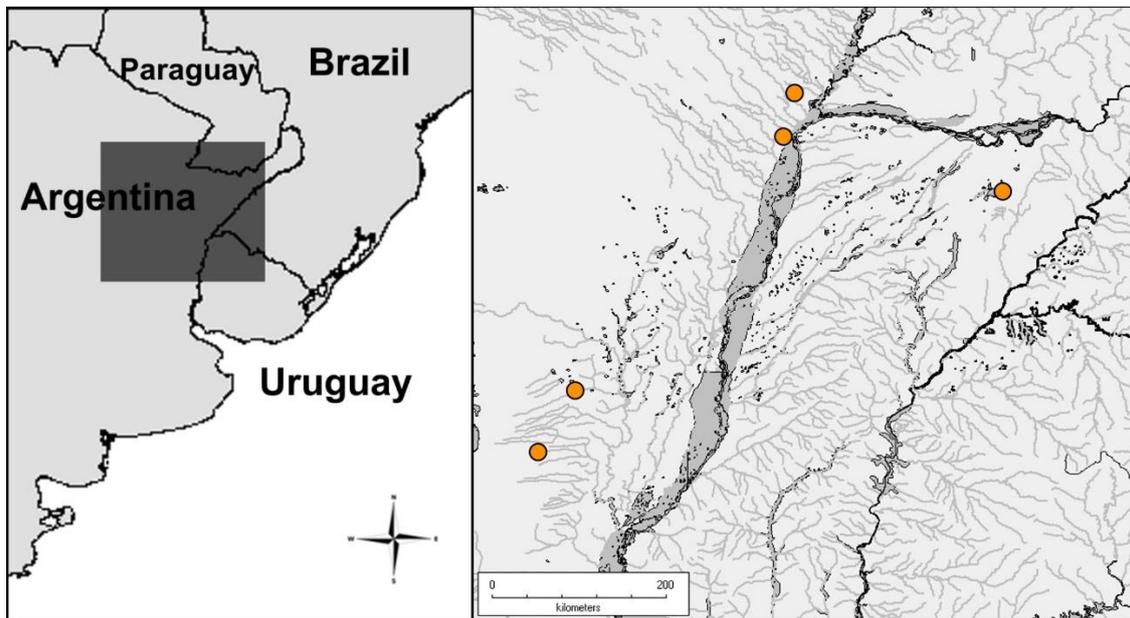


Figura 6. Distribución geográfica de *Austrolebias* sp.1 en la cuenca media del Río Paraná.

Austrolebias sp. 2

Figuras 7 y 8



Figura 7. *Austrolebias* sp.2, ZVC-P 13576, 39.4 mm SL, macho, Estancia La Beba (32°11'08,70"S 57°26'08,60"W), humedales del Río Queguay Grande, Dpto. de Paysandú, Uruguay. Ejemplar fijado en formol.

Materiales examinados: **MHNM 3728**, 4, 2 machos 29,9-33,6 mm SL, 2 hembras 27,4-33,3 mm SL, Río Queguay, Paysandú, Uruguay, 32°08'21,97"S 57°26'19,94"W, IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández. **MHNM 3729**, 2, 1 macho 34,0 mm SL, 1 hembra 31,0 mm SL, bañados del Río Queguay Grande, Estancia La Beba, Paysandú, Uruguay, 32°11'08,70"S 57°26'08,60"W, IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández. **ZVC-P 8657**, 22, 10 machos 16.1-27,2 mm SL, 12 hembras 16,9-30,1 mm SL, Río Queguay, Rincón de Pérez, Paysandú, Uruguay, 32°08'23,66"S 57°25'49,55"W, M. Loureiro & S. Clavijo. **ZVC-P 11620**, 97, 37 machos 22,8-39,4 mm SL (8 c&s 26,6- 38,1 mm SL; 10 fijados en alcohol 95° 21,9-28,4 mm SL, CAP 1193, GP 3353 a 3359 y 3364 a 3366), 60 hembras 24,2- 40,1

mm SL (8 c&s 22,7- 37,4 mm SL; 4 fijados en alcohol 95° 22,7-28,7 mm SL, CAP 1193, GP 3360 a 3363), Río Queguay, Paysandú, Uruguay, 32°08'21,97"S 57°26'19,94"W, IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández. **ZVC-P 11621**, 61, 28 machos 22,1- 34,9 mm SL (5 fijados en alcohol 95°, 22,1-27,7 mm SL, CAP 1181, GP 3367 a 3371), 33 hembras 21,2- 29,9 mm SL (5 fijados en alcohol 95°, 23,4-27,8 mm SL, CAP 1181, GP 3372 a 3376), Río Queguay, Paysandú, Uruguay, 32°07'26,48"S 57°30'45.44"W, 8/IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández. **ZVC-P 12460**, 58, 33 machos 25,7-39,1 mm SL (2 c&s 32,4-39,1 mm SL; 4 fijados en alcohol 95°, 27,1-29,0 mm SL, CAP 1194, GP 3377 a 3380), 25 hembras 24,9-37,4 mm SL (2 c&s 27,2- 33,1 mm SL; 3 fijados en alcohol 95°, 24,9-26,5 mm SL, CAP 1194, GP 3381 a 3383), bañados del Río Queguay Grande, Estancia La Beba, Paysandú, Uruguay, 32°11'08,70"S 57°26'08,60"W, IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández. **ZVC-P 13576**, 1 ejemplar macho 39,4 mm SL, bañados del Río Queguay Grande, Estancia La Beba, Paysandú, Uruguay, 32°11'08,70"S 57°26'08,60"W, IX/2011, M. Loureiro, A. Duarte, M. Zarucki, J. Bessonart & D. Hernández.

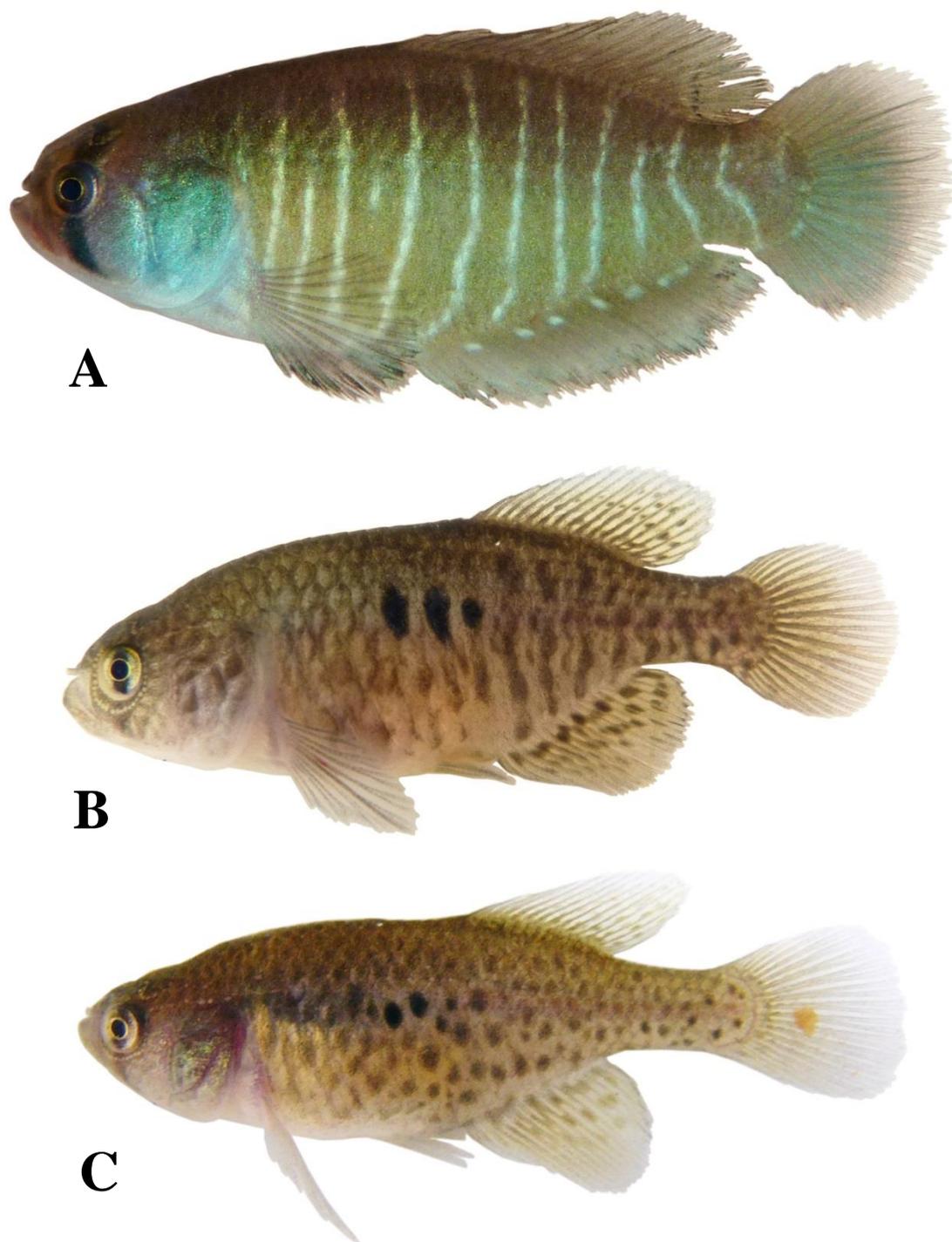


Figura 8. *Austrolebias* sp.2: **A**, macho 35,8 mm SL, 32°07'26,48"S 57°30'45.44"W, ejemplar no conservado (lado derecho del ejemplar, foto espejada); **B**, hembra (ZVCP 11620) con aleta anal redondeada, 32,4 mm SL; **C**, hembra (ZVCP 8657) con aleta anal triangular, 30,1 mm SL. Fotografías tomadas inmediatamente después de la captura (M. Loureiro).

Descripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 4. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 39,4 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 40,1 mm. Forma general del cuerpo orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta anal. Perfil dorsal de la cabeza generalmente recto o apenas cóncavo, perfil dorsal del cuerpo convexo por detrás de la cabeza y hasta la inserción posterior de la aleta dorsal. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta en machos y recta a cóncava en hembras. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados; presencia de filamentos cortos en el margen distal de la aleta anal en machos. Forma de la aleta anal de las hembras variable, pudiendo ser redondeada a triangular. Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales llegan entre el segundo y quinto radio anal en machos, y entre el origen de las pélvicas y la papila urogenital en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 50-80%, con su extremo posterior que llega entre la papila urogenital y el cuarto radio anal, tanto en machos como hembras. Papila urogenital en machos parcialmente unida a la aleta anal. Origen de la aleta dorsal en machos generalmente por delante del origen de la aleta anal, entre las vértebras 8 y 11 y las espinas neurales de las vértebras 7 y 10; en hembras generalmente a la misma altura o por delante del origen de la aleta anal, entre las vértebras 12 y 14 y las espinas neurales 10 y 13. Origen de la aleta anal en machos entre los “pleural ribs” de las vértebras 8 y 9, y las vértebras 10 y 12, en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 9 y 12, y las vértebras 12 y 15. Número de radios dorsales 22-25 en machos y

17-20 en hembras; número de radios anales 24-27 en machos y 21-24 en hembras. Radios totales en aleta caudal 20-25; radios en aletas pectorales 11-13; radios en aletas pélvicas 5.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 28-33; serie de escamas transversales 11-16 (N=29, más un ejemplar con 21); escamas circumpedunculares 13-20. Base de la aleta anal sin escamas. Órganos de contacto en escamas presentes en la totalidad de los ejemplares machos analizados, 1 a 8 órganos de contacto por escama (usualmente 1 o 2): órganos de contacto presentes hasta los 6 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 13-23, parietal 0-4, anterior rostral 1-2 (usualmente 1), posterior rostral 0-2 (usualmente 1), infraorbital 1-3 + 18-27, preorbital 2-4, ótico 2-5, post-otico 1-5, supratemporal 1-3 (usualmente 1), medio opercular 1-2 (usualmente 1), ventral opercular 1-3, preopercular 19-29, mandibular 11-15, lateral mandibular 3-7.

Cartílago basihial ensanchado en su extremo anterior, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial; presenta usualmente una hendidura o pequeñas comisuras centrales en su margen anterior. Segundo faringobranquial con 3 a 8 dientes y tercer faringobranquial con 17 a 37. Primer arco branquial con 3 o 4 espinas epibranquiales y 10 a 12 hipobranquiales. Osificaciones dermosfenóticas generalmente ausentes (presentes

solo en 1 de 20 ejemplares analizados); radiales proximales 3-5 (usualmente 4); proceso ventral del posttemporal usualmente largo. Vértabras totales 27-30.

Coloración en vivo:

Machos: Cuerpo de color verdoso oscureciéndose hacia la región dorsal, con 8 a 15 bandas verticales celestes brillantes. Algunos ejemplares con unas pocas manchas verde oscuras en el centro de los flancos. Abdomen amarillento, con región pectoral y ventral blanquecina. Región opercular y preopercular celeste intenso. Ojo con iris amarillo; banda vertical gris oscura atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro, y reflejos azules por encima del reborde; pélvicas azul verdoso. Aletas dorsal y anal azul verdosas, con puntos celestes claros generalmente sobre la base; borde de la anal más oscuro. Aleta caudal de color azul verdoso con borde hialino, con o sin manchas celestes.

Hembras: Cuerpo color marrón claro, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Generalmente con manchas marrones más oscuras dispersas por todo el cuerpo, formando bandas verticales en algunos ejemplares. Región central de los flancos con o sin manchas negras, que cuando presentes suelen estar alineadas horizontalmente. Ojo con iris amarillo; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Región opercular con reflejos celestes. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar pequeñas manchas o líneas marrón difusas en el espacio entre los radios.

Tabla 4. Datos morfométricos de *Austrolebias* sp.2, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Character	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	54	22,8	39,4	31,0	-	88	21,2	40,1	29,2	-
2. Altura del cuerpo	54	32,8	39,5	36,5	1,75	88	30,0	40,0	34,7	2,09
3. Largo de la Cabeza	54	23,9	29,6	27,1	1,28	88	22,6	30,2	27,7	1,36
4. Alto del pedúnculo	54	11,6	15,6	13,7	0,77	88	11,3	15,8	13,1	0,83
5. Largo del pedúnculo	54	6,5	17,3	11,5	2,16	88	12,1	26,4	16,0	2,25
6. Longitud predorsal	54	43,1	54,3	50,3	2,37	88	43,1	64,8	59,9	2,81
7. Base de aleta dorsal	54	34,8	47,7	40,6	2,79	88	22,4	32,6	27,3	2,42
8. Longitud pre-anal	54	46,7	60,2	51,9	2,39	88	52,6	67,1	60,4	2,65
9. Base de aleta anal	54	35,5	46,1	42,4	2,19	88	21,8	30,9	26,3	2,07
10. Longitud pre pélvica	54	41,3	48,8	45,3	1,51	88	46,3	61,1	51,9	2,38
11. Pectoral fin length	54	18,8	27,7	23,5	2,10	88	20,2	30,4	24,4	1,74
12. Largo aletas pélvicas	54	6,7	11,9	9,2	1,01	88	9,2	14,9	12,3	1,11
13. Largo aleta caudal	54	15,3	28,5	24,5	2,39	88	22,6	30,8	26,7	1,88
14. Ancho de la cabeza	54	59,9	77,2	67,7	3,95	88	60,8	90,3	75,3	6,28
15. Alto de la cabeza	54	92,1	125,7	110,3	6,70	88	88,5	133,7	104,7	7,33
16. Distancia interorbital	54	39,8	58,0	47,6	4,50	88	39,5	54,1	45,9	3,17
17. Diámetro del ojo	54	25,0	37,7	30,3	2,83	88	25,7	35,7	30,9	2,12
18. Largo del hocico	54	16,7	29,5	21,9	2,10	88	16,4	25,5	20,2	1,98
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	88	18,3	26,1	21,9	1,69

Distribución y Conservación: *Austrolebias* sp.2 es endémica de los humedales del tramo central de la cuenca del Río Queguay, Dpto. de Paysandú, Uruguay (Figura 9). No ha sido evaluada para la Lista de Especies Prioritarias del Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Uruguay, ni para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN, sin embargo la distribución de la especie se halla englobada en el área propuesta como Área

Protegida con Recurso Manejados “Montes del Queguay” (Ley 16462, Decreto 343/014), por lo que se considera que el nivel de amenaza preliminarmente es bajo.

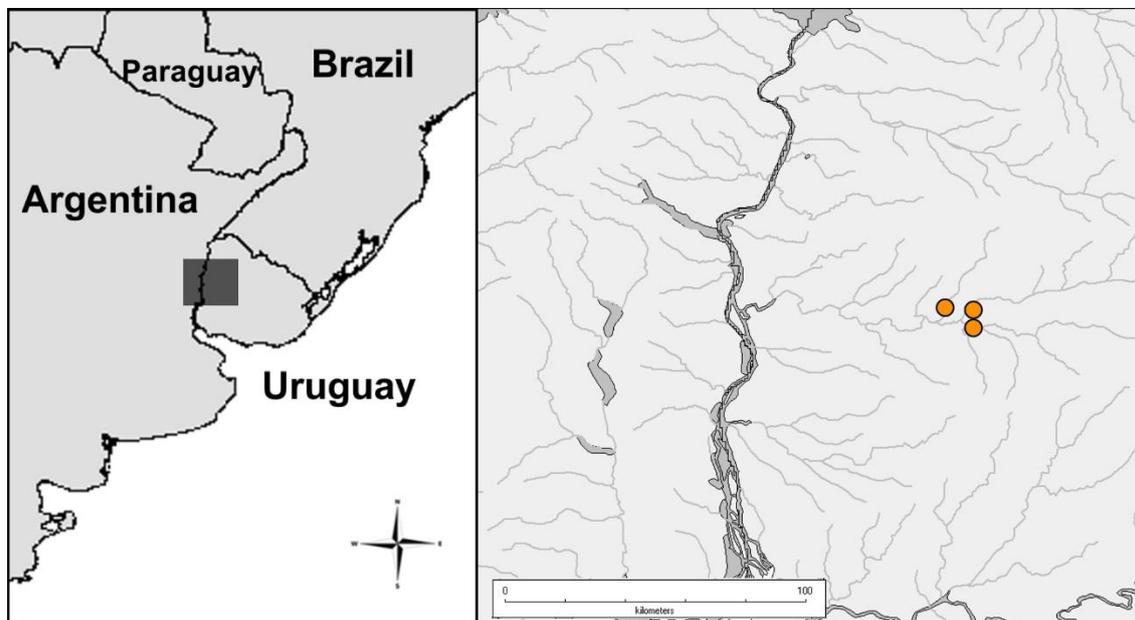


Figura 9. Distribución geográfica de *Austrolebias* sp.2 en Uruguay.

Austrolebias melanoorus (Amato)

Figura 10

Holotipo: MHNM 2545, macho 35,7 mm SL, charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 5, km 399.5, Tacuarembó, Uruguay, 31°39'01,55"S 55°54'01,05"W, 3/XI/1985, L.H. Amato.

Alotipo: MHNM 2547, 1 hembra 31,1 mm SL, colectada con el Holotipo.

Paratipos: MHNM 2546, 21 machos 27,9-36,2 mm SL (2 c&s desarticulados), colectados con el Holotipo. MHNM 2548, 28 hembras 24,8-39,5 mm SL (2 c&s 32,2-33,7 mm SL), colectadas con el Holotipo.

Otros lotes analizados: MHNM 3669, 1 hembra 28,7 mm SL, Ruta 26 y Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó, Uruguay, 31°52'28,48"S 55°28'19,10"W, 25/VIII/2004, P. Laurino, T. Litz, E. Perujo, H. Salvia & J. Salvia. MHNM 3672 (ex. CLT 1192), 108, 38 machos 17,1-34,3 mm SL, 70 hembras 16,0-31,4 mm SL, FYMSA, Rivera, Uruguay, 31°06'27,00"S 55°44'47,40"W, 24/VIII/2004, P. Laurino, T. Litz, E. Perujo, H. Salvia & J. Salvia. MHNM 3673 (ex. CTL 1040), 150, 101 machos 14,7-27,0 mm SL, 49 hembras 14,3-28,5 mm SL, Río Tacuarembó y Ruta 30, Tranqueras, Rivera, Uruguay, 31°10'36,00"S 55°45'52,80"W, 23/VIII/2004, P. Laurino, T. Litz, E. Perujo, H. Salvia & J. Salvia. MHNM 3675 (ex. CTL 1213b), 12, 8 machos 20,3-29,1 mm SL, 4 hembras 23,7-25,3 mm SL, Ruta 26 y Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó, Uruguay, 31°52'28,48"S 55°28'19,10"W, 25/VIII/2004, P. Laurino, T. Litz, E. Perujo, H. Salvia & J. Salvia. MHNM 3676 (ex. CLT 1196), 31, 13 machos 16,7-33,9 mm SL, 18 hembras 18,4-30,0 mm SL, Paso Ataques, Rivera, Uruguay, 31°05'42,60"S 55°41'12,60"W, 25/VIII/2004, P. Laurino, T. Litz, E. Perujo, H. Salvia & J. Salvia. ZVC-

P 4320, 8, 3 machos 27,8-30,2 mm SL, 5 hembras 20,7-28,7 mm SL, charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 5, km 399.5, Tacuarembó, Uruguay, 31°39'01,55"S 55°54'01,05"W, 26/IX/2000, M. Loureiro, F. Teixeira de Mello, A. D'Anatro & L. Bocardi. **ZVC-P 4322**, 13, 3 machos 33,0-37,8 mm SL (1 c&s 37,8 mm SL), 10 hembras 23,7-36,1 mm SL, charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 5, km 399.5, Tacuarembó, Uruguay, 31°39'01,55"S 55°54'01,05"W, X/1999, M. Loureiro, G. Yemini & C. Hernández. **ZVC-P 4323**, 8, 4 machos 30,5-43,1 mm SL, 4 hembras 29,4-35,5 mm SL, Ruta 26 y Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó, Uruguay, 31°52'28,48"S 55°28'19,10"W, 26/IX/2000, M. Loureiro, F. Teixeira de Mello, A. D'Anatro & L. Bocardi. **ZVC-P 4325**, 6, 4 machos 37,2-49,0 mm SL (2 c&s 37,2-49,0 mm SL), 2 hembras 37,6-39,8 mm SL, Ruta 26 y Río Tacuarembó, Pueblo Ansina, Tacuarembó, Uruguay, 31°52'28,48"S 55°28'19,10"W, X/1999, M. Loureiro, G. Yemini & C. Hernández. **ZVC-P 7810**, 47, 23 machos 21,5-31,7 mm SL, 24 hembras 20,8-26,8 mm SL, Ruta 5 y Río Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay, 31°31'58,96"S 55°41'14,45"W, VIII/2004. **ZVC-P 8729**, 19, 5 machos 36,0-41,5 mm SL (1 fijado en alcohol 95° 36,0 mm SL, CAP 358, GP 3282), 14 hembras 26,1-34,2 mm SL (2 fijadas en alcohol 95° 30,1-31,9 mm SL, CAP 358, GP 3283 y 3284), charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 5, km 399.5, Tacuarembó, Uruguay, 31°39'01,55"S 55°54'01,05"W, 10/X/2009, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P 8738**, 77, 32 machos 21,5-41,7 mm SL (4 fijados en alcohol 95°, 21,5-28,2 mm SL, CAP 267, GP 3288-3291), 45 hembras 22,9-46,4 mm SL (2 fijadas en alcohol 95°, 26,3-28,8 mm SL, CAP 267, GP 3292-3293), Ruta 5 y Río Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay, 31°31'58,96"S 55°41'14,45"W, 10/X/2009, M. Loureiro, A. Duarte W.S. Serra. **ZVC-P 8743**, 28, 12 machos 17,0-40,7 mm SL, 16 hembras 21,1- 35,2 mm SL, Río Tacuarembó, Paso Manuel Díaz, Rivera, Uruguay, 31°32'42,95"S 55°40'17,47"W, X/2009, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P**

8753, 48, 19 machos 18,2-45,6 mm SL (3 c&s 23,5-36,5 mm SL; 2 fijados en alcohol 95° 21,6-29,1 mm SL, CAP 342, GP 3285 y 3286), 29 hembras 22,4-41,3 mm SL (3 c&s 21,3-31,8 mm SL; 1 fijada en alcohol 95° 27,0 mm SL, CAP 342, GP 3287), Paso Rogerio, Río Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay, 31°43'32,23"S 55°38'46,59"W, 11/X/2009, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P 8762**, 1 hembra 32,5 mm SL, charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 26, Tacuarembó, Uruguay, 31°43'43,83"S 55°46'22,40"W, X/2009, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P 11623**, 3 hembras 35,3-42,3 mm SL (3 muestras de tejido en alcohol 95%, GP 3315-3317), Tranqueras, Rivera, Uruguay, 31°10'45,87"S 55°45'17,96"W, 21/IX/2012, W.S. Serra, A. Duarte, S. Stareczek & M. Loureiro. **ZVC-P 13480**, 14, 3 machos 26,5-29,9 mm SL, 11 hembras 24,3-27,6 mm SL, Tranqueras, Rivera, Uruguay, 31°10'45,87"S 55°45'17,96"W, 3/VI/2014, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P 13579**, 28, 20 machos 19,4-39,9 mm SL (17 fijados en alcohol 95°, 19,4-28,9 mm SL, CAP 1274, GP 3953 a 3956), 8 hembras 18,6-28,0 mm SL (5 fijados en alcohol 95°, 18,6-24,4 mm SL, CAP 1274, GP 3957 y 3958), Paso de la Laguna, Tacuarembó, Uruguay, 32°13'27,50"S 55°22'32,60"W, 3/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro. **ZVC-P 13580**, 1 hembra 26,4 mm SL, Ruta 26, 3 km al oeste del Arroyo Tres Cruces, Tacuarembó, Uruguay, 31°43'37,28"S 55°48'00,67"W, X/2009, M. Loureiro, A. Duarte & W.S. Serra. **ZVC-P 13581**, 22, 9 machos 15,0-23,1 mm SL, 13 hembras 13,7-23,1 mm SL, Paraje la Aurora, Paso Ataques, Rivera, Uruguay, 31°05'S 55°41'W, 23/VIII/2008, A. Saralegui. **ZVC-P 13651**, 22, 14 machos 31,5-43,0 mm SL (3 fijados en alcohol 95°, 31,9-35,9 mm SL, CAP 1273), 8 hembras 27,6-34,7 mm SL (5 fijados en alcohol 95°, 27,6-28,9 mm SL, CAP 1273), charco junto al Arroyo Tres Cruces, Ruta 5, km 399.5, Tacuarembó, Uruguay, 31°39'01,55"S 55°54'01,05"W, 4/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro.



Fig. 10. *Austrolebias melanoorus* (ZVC-P 13651) topotipos: **A**, macho 39,5 mm SL; **B**, hembra 31,5 mm SL. Fotografías tomadas inmediatamente después de la captura (W.S. Serra).

Redescripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 5. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 44,5 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 40,0 mm. Forma general del cuerpo orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta anal. Perfil dorsal de la cabeza generalmente recto o apenas cóncavo, perfil dorsal del cuerpo convexo por detrás de la cabeza y hasta la inserción posterior de la aleta dorsal. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta en machos y recta a cóncava en hembras. Márgenes superior e

inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos a suavemente cóncavos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados; presencia de filamentos cortos en el margen distal de estas aletas en machos. Radios medio-anteriores de la aleta anal de las hembras alargados (“aleta triangular”). Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales llegan entre la papila urogenital y el 5 radio anal en machos, y entre el origen de las pélvicas y el primer radio anal en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 0-60%, con su extremo posterior que llega entre la papila urogenital y el tercer radio anal, tanto en machos como hembras. Papila urogenital en machos unida parcial o completamente a la aleta anal. Origen de la aleta dorsal en machos generalmente por delante del origen de la aleta anal, entre las vértebras 8 y 11 y las espinas neurales de las vértebras 7 y 11; en hembras generalmente por delante del origen de la aleta anal, entre las vértebras 12 y 14 y las espinas neurales 10 y 13. Origen de la aleta anal en machos entre los “pleural ribs” de las vértebras 7 y 10, y las vértebras 10 y 12; en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 9 y 12, y las vértebras 12 y 15. Número de radios dorsales 21-28 en machos y 16-22 en hembras; número de radios anales 24-29 en machos y 19-25 en hembras. Radios totales en aleta caudal 21-29; radios en aletas pectorales 10-13; radios en aletas pélvicas 4-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 27-37; serie de escamas transversales 10-23; escamas circumpedunculares 13-26 (generalmente 15 a 22). Base de la aleta anal generalmente sin escamas, solo 3 de 32 ejemplares analizados presentan una

o unas pocas escamas dispersas. Órganos de contacto en escamas presentes en aproximadamente el 40% de los ejemplares machos analizados, generalmente con 1 o 2 órganos de contacto por escama: órganos de contacto presentes en los 2 a 3 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 16-24, parietal 1-4 (generalmente 2 o 3), anterior rostral 2-3 (usualmente 2), posterior rostral 1-2, infraorbital 1-4 + 19-30, preorbital 2-3, ótico 1-5, post-otico 2-5, supratemporal 0-2, medio opercular 1, ventral opercular 1-4, preopercular 20-31, mandibular 12-17, lateral mandibular 4-8.

Cartílago basihial generalmente ensanchado en su extremo anterior, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial; presenta ocasionalmente una hendidura o pequeñas comisuras centrales en su margen anterior. Segundo faringobranquial con 2 a 6 dientes y tercer faringobranquial con 17 a 37. Primer arco branquial con 3 a 5 espinas epibranquiales (generalmente 3) y 10 a 13 hipobranquiales. Osificaciones dermosfenóticas generalmente ausentes (14 de 18 ejemplares analizados); radiales proximales 3-4; proceso ventral del posttemporal usualmente largo. Vértebras totales 27-30.

Coloración en vivo:

Machos: Color de fondo del cuerpo amarillento en la región anterior, pasando a celeste grisáceo en la región posterior, con 9 a 19 bandas verticales gris oscuras. Región pectoral y ventral blanquecina; dorso pardo grisáceo. Región opercular y preopercular celeste

grisáceo. Ojo con iris amarillo oscuro; banda vertical gris oscura atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro; pélvicas celeste grisáceo; aleta dorsal gris oscuro con puntos claros o hialinos dispersos, más abundantes en la base; aleta caudal gris oscuro con puntos claros o hialinos dispersos, más abundantes en la base, y margen gris claro a hialino sin puntos; aleta anal celeste grisáceo oscuro, generalmente con una o dos hileras basales de puntos celeste claro, y margen negro.

Hembras: Cuerpo color marrón amarillento, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Región central de los flancos con manchas negras contrastantes generalmente no alineadas presentes en el 95% de los ejemplares analizados, cuando presentes 1 a 18; resto del cuerpo puede presentar manchas o bandas verticales marrones difusas poco contrastantes. Ojo con iris amarillo oscuro; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar cerca de la base pequeñas manchas marrón difusas en el espacio entre los radios.

Distribución y Conservación: *Austrolebias melanoorus* es endémica de los humedales de la cuenca del Río Tacuarembó, Dptos. de Tacuarembó y Rivera, Uruguay (Figura 11). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN, sin embargo en Uruguay es considerada como una especie amenazada y prioritaria para la conservación (Loureiro *et al.*, 2013).

Tabla 5. Datos morfométricos de *Austrolebias melanoorus*, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Character	Holotipo	Machos					Hembras				
		Rango					Rango				
		N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	35,7	49	18,8	43,1	31,6	-	53	19,1	38,4	28,6	-
2. Altura del cuerpo	38,2	49	25,0	40,5	35,6	2,53	53	30,2	38,4	34,6	2,09
3. Largo de la Cabeza	30,2	49	21,4	33,3	29,2	1,91	53	26,2	33,6	30,1	1,68
4. Alto del pedúnculo	15,1	49	9,1	15,5	13,4	1,32	53	10,7	15,8	12,9	0,90
5. Largo del pedúnculo	11,7	49	7,1	15,9	11,2	1,90	53	9,8	23,0	16,5	2,41
6. Longitud predorsal	55,9	49	40,3	57,7	52,1	2,87	53	56,4	69,5	62,4	2,34
7. Base de aleta dorsal	39,1	49	30,4	45,3	39,9	2,91	53	22,6	34,2	26,7	2,23
8. Longitud pre-anal	51,9	49	40,2	57,0	51,8	2,71	53	52,1	65,3	60,9	2,59
9. Base de aleta anal	40,0	49	28,3	45,4	39,1	3,04	53	19,9	29,7	24,6	2,19
10. Longitud pre pélvica	45,5	49	35,1	52,4	46,1	2,62	53	43,4	58,5	52,2	2,59
11. Longitud aletas pectorales	23,7	49	8,5	28,6	22,5	3,01	53	20,0	27,0	23,7	1,66
12. Largo aletas pélvicas	7,7	49	4,5	10,3	8,0	1,22	53	4,9	13,0	9,8	1,57
13. Largo aleta caudal	22,6	49	19,2	31,7	25,4	3,09	53	23,6	32,3	27,5	2,03
14. Ancho de la cabeza	63,0	49	55,6	79,3	63,7	4,51	53	58,1	83,3	66,3	5,01
15. Alto de la cabeza	100,5	49	93,7	123,2	105,4	6,47	53	88,8	116,4	101,7	5,86
16. Distancia interorbital	48,3	49	40,9	55,2	46,5	3,08	53	37,9	51,9	45,6	3,28
17. Diámetro del ojo	27,2	49	23,5	34,8	28,3	2,27	53	23,5	34,1	28,9	2,32
18. Largo del hocico	26,3	49	19,9	30,2	24,2	2,36	53	16,6	28,5	22,4	2,27
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	-	53	17,8	25,1	21,3	1,69

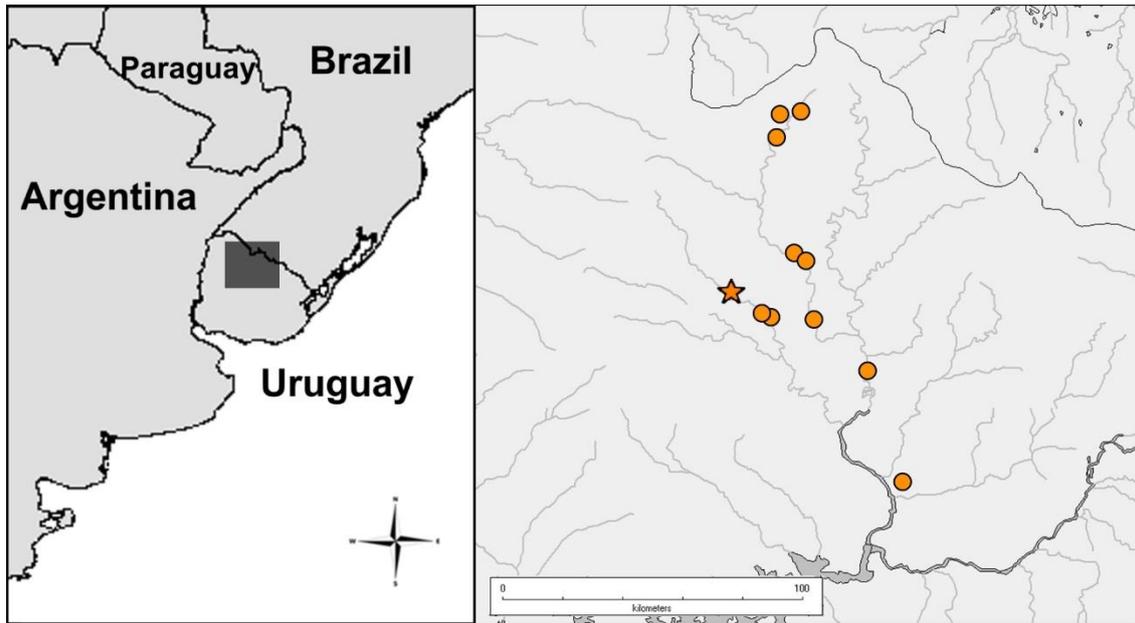


Figura 11. Distribución geográfica de *Austrolebias melanoorus* en Uruguay. La estrella indica la localidad tipo.

Austrolebias univentripinnis Costa & Cheffe

Figura 12

Material examinado: **UFRGS 18037**, 9, 2 machos 35,6-39,3 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3680, GP 3718-3719), 7 hembras 24,5-36,7 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3680, GP 3709-3715), planicie del Río Yaguarón junto a la Ciudad de Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil, 32°34'11,8"S 53°23'17,6"W, 7/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18041**, 14, 12 machos 16,0-24,9 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3684, GP 3789-3796), 2 hembras 18,7-25,1 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3684, GP 3787-3788), charco junto a la carretera Jaguarão - Pedras Brancas, Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil, 32°27'49,00"S 53°26'43,00"W, 7/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18045**, 35, 20 machos 12,8-23,6 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3688, GP 3732-3736), 15 hembras 14,0-19,4 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3688, GP 3737-3741), charco junto al camino Herval - Pedras Altas, Herval, Rio Grande do Sul, Brasil, 31°56'29,30"S 53°29'00,10"W, 8/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18046**, 10, 7 machos 18,2-23,9 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3689, GP 3720-3726), 3 hembras 20,0-20,9 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3689, GP 3727-3729), charco junto a la carretera Jaguarão - Nossa Senhora da Glória, Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil, 32°22'45,00"S 53°26'35,60"W, 7/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18062**, 56, 25 machos 20,7-29,0 mm SL (5 c&s 20,7-26,9 mm SL), 31 hembras 18,6-23,3 mm SL (5 c&s 19,2-22,3 mm SL), charco junto a la carretera Jaguarão - Nossa Senhora da Glória, Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil, 32°22'45,00"S 53°26'35,60"W, 7/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18064**, 9, 7 machos 21,9-29,0 mm SL, 2 hembras 19,4-21,1 mm SL, charco junto al camino Herval - Pedras Altas, Herval, Rio Grande do Sul, Brasil, 31°56'29,30"S 53°29'00,10"W, 8/IX/2013, L. Malabarba & J.

Ferrer. **UFRGS 18066**, 77, 30 machos 15,6-31,6 mm SL (5 c&s 19,4-30,6 mm SL), 47 hembras 14,2-30,6 mm SL (5 c&s 18,5-29,8 mm SL), charco junto a la carretera Jaguarão - Pedras Brancas, Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil, 32°27'49,00"S 53°26'43,00"W, 7/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer.

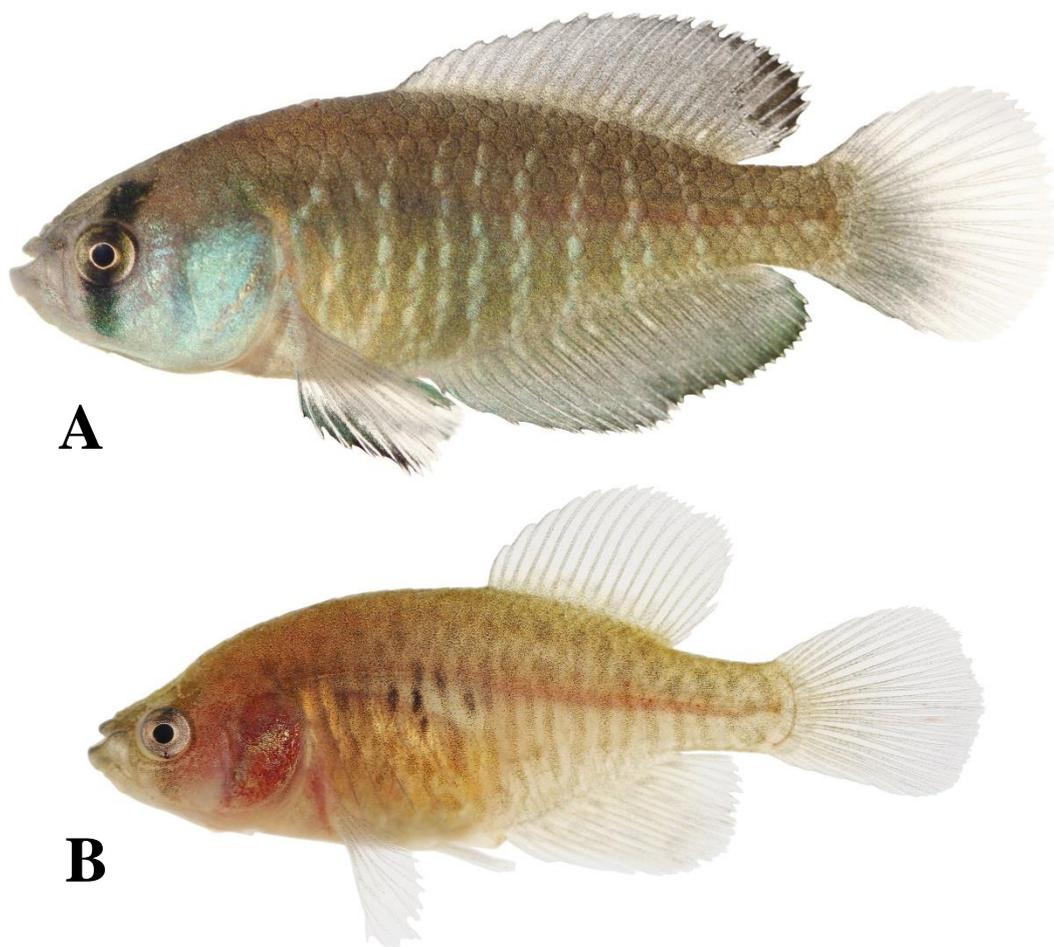


Fig. 12. *Austrolebias univentripinnis* (UFRGS 18066): **A**, macho 27,5 mm SL (lado derecho del ejemplar, foto espejada); **B**, hembra 30,6 mm SL. Fotografías tomadas inmediatamente después de la captura.

Redescripción: Las proporciones corporales se presentan en la Tabla X. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 31,6 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 30,6 mm. Forma general del cuerpo orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta dorsal. Perfil dorsal del cuerpo convexo hasta la inserción posterior de la aleta dorsal, apenas cóncavo por detrás de la cabeza en hembras. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados. Radios medio-anteriores de la aleta anal de las hembras alargados (“aleta triangular”). Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales se ubica entre el espacio posterior a la papila urogenital hasta el 7° radio de la aleta anal en machos, y posterior al origen de las pélvicas hasta el espacio entre el 4° y 5° radio anal en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 50-80%, con su extremo posterior que llega entre la papila urogenital y el 4° radio anal, tanto en machos como hembras. Papila urogenital en machos parcial a completamente unida a la aleta anal. Origen de la aleta dorsal en machos anterior al origen de la aleta anal, entre las vértebras 8° y 10° las espinas neurales de las vértebras 7° y 8°; posición del origen de la aleta dorsal en hembras variable, generalmente anterior al origen de la aleta anal, entre las vértebras 11° y 13° y las espinas neurales 10° y 12°. Origen de la aleta anal en machos entre las espinas pleurales de las vértebras 8° y 9°, y las vértebras 10° y 11°, en hembras entre las espinas pleurales de las vértebras 9° y 11°, y las vértebras 12 y 14. Número de radios dorsales 23-28 en machos y

16-20 en hembras; número de radios anales 24-28 en machos y 21-25 en hembras. Radios totales en aleta caudal 20-25; radios en aletas pectorales 11-13; radios en aletas pélvicas 4-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 26-31; serie de escamas transversales 10-16; escamas circumpedunculares 12-17. Base de la aleta anal en machos puede presentar en algunos individuos escamas en el espacio entre los radios, dispuestas en una única hilera irregular; base de la aleta anal en hembras generalmente sin escamas. Órganos de contacto en escamas generalmente presentes en ejemplares machos, 1 a 3 órganos de contacto por escama (usualmente 1 o 2): órganos de contacto presentes hasta los 2 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 15-22, parietal 1-5, anterior rostral 1-2, posterior rostral 1, infraorbital 2-3 + 17-29, preorbital 2-4 (generalmente 3), ótico 1-4, post-otico 1-4, supratemporal 1-2 (usualmente 1), medio opercular 0-1 (usualmente 1), ventral opercular 1-3, preopercular 19-28, mandibular 12-15, lateral mandibular 4-8.

Cartílago basihial generalmente ensanchándose hacia su extremo anterior de forma abrupta, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial. Segundo faringobranquial con 1 a 5 dientes y tercer faringobranquial con 16 a 33. Primer arco branquial con 2 a 4 espinas epibranchiales y 10 a 12 hipobranquiales (generalmente 11). Osificaciones dermosfenóticas generalmente ausentes (presentes solo en 3 de 20

ejemplares analizados); radiales proximales 3-4 (generalmente 4); proceso ventral del posttemporal de longitud variable, generalmente largo. Vértabras totales 27-29.

Coloración en vivo:

Machos: Cuerpo de coloración pardo a verdoso oscureciéndose hacia la región dorsal, con 10 a 15 hileras verticales de puntos brillantes celestes, ocasionalmente sobre bandas difusas un poco más claras que el color de fondo. Región pectoral y ventral amarillenta a blanquecina. Región opercular y preopercular celeste intenso. Ojo con iris blanquecino; banda vertical gris oscura atravesando el ojo, a veces con reflejos verde metálico. Aletas pectorales hialinas con reborde negro, y reflejos azulados por encima del reborde; pélvicas azul verdoso. Aletas dorsal y anal azuladas a azul verdosas, con puntos celestes claros sobre el tercio basal de las mismas; borde de la anal más oscuro principalmente en los dos tercios posteriores. Aleta caudal de color azul verdoso con borde hialino, generalmente con pocas manchas celestes distribuidas sobre la base de la aleta.

Hembras: Cuerpo color marrón claro, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Generalmente con manchas marrones más oscuras dispersas por todo el cuerpo, formando bandas verticales en algunos ejemplares. Región central de los flancos usualmente con manchas negras no alineadas (1 a 9, presentes en el 77% de los ejemplares analizados). Ojo con iris blanquecino; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Región opercular con reflejos celestes. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar manchas o líneas marrones tenues en el espacio entre los radios.

Distribución y Conservación: De acuerdo al presente trabajo *Austrolebias univentripinnis* se distribuye en humedales asociados a la cuenca del Río Yaguarón medio y bajo, en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 13). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN, sin embargo es considerada como una especie en Peligro Crítico para el estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Volcan *et al.*, 2015).

Tabla 6. Datos morfométricos de *Austrolebias univentripinnis*, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Character	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	44	19,4	31,6	24,9	-	50	18,5	30,6	22,6	-
2. Altura del cuerpo	44	28,3	38,7	34,3	2,21	50	30,2	39,8	34,3	2,20
3. Largo de la Cabeza	44	26,6	33,7	29,6	1,63	50	27,4	32,4	29,9	1,01
4. Alto del pedúnculo	44	9,9	13,3	11,8	0,83	50	10,3	14,3	11,9	1,05
5. Largo del pedúnculo	44	6,6	14,8	10,7	1,88	50	14,3	22,1	16,8	1,54
6. Longitud predorsal	44	46,7	57,7	51,5	2,61	50	56,5	63,3	60,2	1,66
7. Base de aleta dorsal	44	27,9	46,1	39,8	3,21	50	22,1	31,0	26,2	2,10
8. Longitud pre-anal	44	46,3	56,5	51,3	2,37	50	54,5	62,2	57,9	2,00
9. Base de aleta anal	44	31,9	47,8	39,4	3,15	50	23,3	29,8	26,0	2,21
10. Longitud pre pélvica	44	40,2	51,9	45,7	2,36	50	45,7	53,2	50,0	1,85
11. Longitud aletas pectorales	44	18,5	28,5	23,5	2,13	50	19,8	29,0	24,4	1,78
12. Largo aletas pélvicas	44	5,4	10,7	8,3	1,08	50	6,9	14,1	11,2	1,44
13. Largo aleta caudal	42	21,9	32,9	26,5	2,25	44	22,5	32,6	27,3	2,11
14. Ancho de la cabeza	44	51,4	78,8	60,5	4,92	50	52,4	67,5	61,8	2,70
15. Alto de la cabeza	44	89,2	118,3	101,7	5,58	50	85,1	112,7	97,6	5,41
16. Distancia interorbital	44	39,1	53,4	44,8	3,03	50	40,0	53,6	47,1	3,32
17. Diámetro del ojo	44	28,2	36,6	32,0	1,92	50	28,3	38,9	34,0	2,11
18. Largo del hocico	44	18,1	25,4	21,5	1,59	50	18,0	25,8	21,0	1,92
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	50	19,1	26,2	22,9	1,41

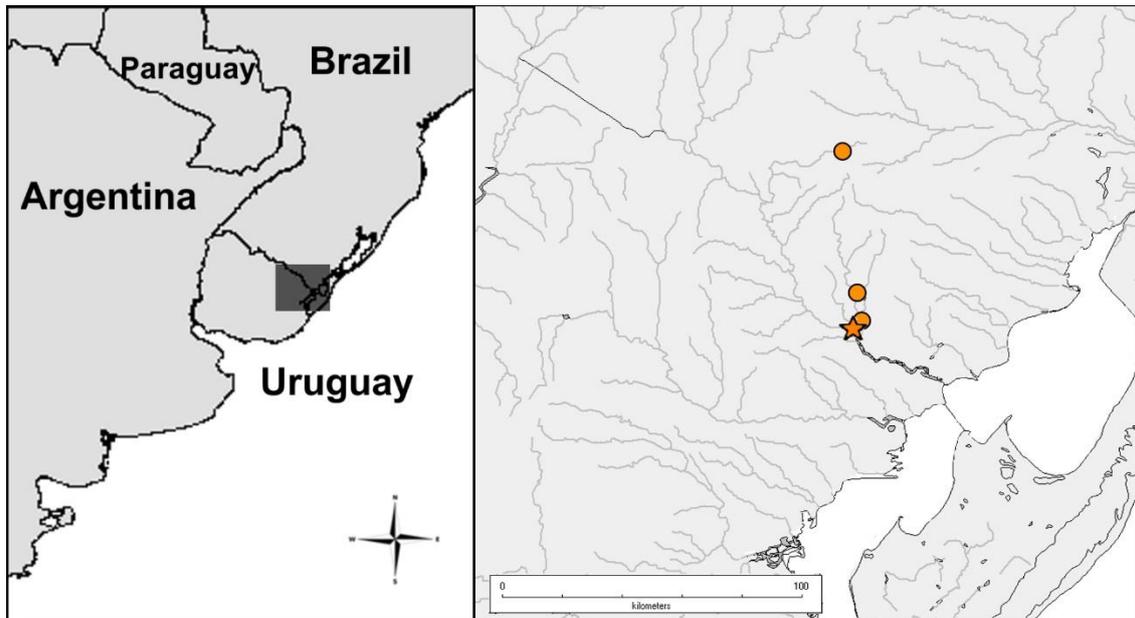


Fig. 13. Distribución geográfica de *Austrolebias univentripinnis* en Rio Grande do Sul, Brasil. La estrella indica la localidad tipo.

Austrolebias sp. 3

Figuras 14-16



Figura 14. *Austrolebias* sp.3, ZVC-P 13578, 37,0 mm SL, macho, Cañada de las Pajas (32°07'10,86"S 54°06'41,04"W), camino empalme entre la Ruta 7 y Ruta 8, Dpto. de Cerro Largo, Uruguay.

Materiales examinados: **MHNM 3730**, 2, 1 macho 34,1 mm SL, 1 hembra 28,2 mm SL, camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 2/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro. **MHNM 3731**, 4, 2 machos 28,0-28,1 mm SL, 2 hembras 23,4-25,2 mm SL, Paso San Diego, Cerro Largo, Uruguay, 31°57'57,25"S 53°54'52,01"W, IX/2009, M. Loureiro, M. Zarucki & A. Duarte. **ZVC-P 7757**, 3, 2 machos 41,3-44,5 mm SL, 1 hembra 40,0 mm SL, Paso San Diego, Cerro Largo, Uruguay, 31°57'57,25"S 53°54'52,01"W, 1/IX/2007, M. Loureiro, M. Zarucki, S. Clavijo & F. Teixeira. **ZVC-P 7780**, 1 hembra 36,4 mm SL, Paso San Diego, Cerro Largo, Uruguay, 31°57'57,25"S 53°54'52,01"W, IX/2007, M. Loureiro, M. Zarucki, S. Clavijo & F. Teixeira. **ZVC-P 8732**, 57, 28 machos 23,6-33,5 mm SL (3 c&s 26,5-33,5 mm SL; 1 fijado en alcohol 95° 26,1 mm SL, CAP 339, GP

3318), 29 hembras 21,6-28,4 mm SL (3 c&s 22,8-26,1 mm SL), Paso San Diego, Cerro Largo, Uruguay, 31°57'57,25"S 53°54'52,01"W, IX/2009, M. Loureiro, M. Zarucki & A. Duarte. **ZVC-P 9721**, 13, 7 machos 20,1-32,4 mm SL (5 fijados en alcohol 95° 20,1-32,4 mm SL, CAP 282, GP 3318 a 3323), 5 hembras 20,4-28,0 mm SL (5 fijadas en alcohol 95°, CAP 282, GP 3324 a 3329), camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 30/IX/2010, M. Loureiro, W.S. Serra, A. Duarte & J. Bessonart. **ZVC-P 11622**, 32, 19 machos 21,4-42,4 mm SL (2 c&s 21,4-24,0 mm SL; 1 fijado en alcohol 95%, 42,4 mm SL, CAP 1188, GP 3340; 10 fijados en alcohol 95%, 21,7-30,0 mm SL, CAP 1192, GP 3341-3350), 13 hembras 20,9-40,0 mm SL (2 c&s 20,9- 22,8 mm SL; 2 fijadas en alcohol 95%, 21,7-24,5 mm SL, CAP 1192, GP 3351-3352), Paso San Diego, Cerro Largo, Uruguay, 31°57'57,25"S 53°54'52,01"W, 19/IX/2012, W.S. Serra, A. Duarte & M. Loureiro. **ZVC-P 11668**, 10, 7 machos 29,2-40,0 mm SL (2 c&s 29,2-37,5 mm SL), 3 hembras 28,0-29,8 mm SL (2 c&s 28,1-29,8 mm SL), camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 30/VII/2013, W.S. Serra, A. Duarte & M. Loureiro. **ZVC-P 13577**, 16, 10 machos 25,6-34,5 mm SL, 6 hembras 22,9-32,2 mm SL, camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 2/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro. **ZVC-P 13578**, 1 macho 37,0 mm SL, camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 2/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro. **ZVC-P 13663**, 2 machos 23,3-23,7 mm SL, camino entre Ruta 7 y Ruta 8, Cañada de las Pajas, Cerro Largo, Uruguay, 32°07'10,86"S 54°06'41,04"W, 2/IX/2015, W.S. Serra, J. Bessonart & M. Loureiro. **UFRGS 18043**, 12, 6 machos 20,4-26,2 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3685, GP 3765-3769 y GP3776), 6 hembras 20,1-24,0 mm SL (fijados en alcohol 95°, TEC 3685, GP 3770-3775), Seival, Candiota, Rio Grande do

Sul, Brasil, 31°25'57,00"S 53°43'05,00"W, 8/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18050**, 43, 16 machos 22,0-36,8 mm SL (3 c&s 30,9-33,9 mm SL; 3 fijados en alcohol 95°, 26,4-31,5 mm SL, TEC 3693, GP 3777-3779), 27 hembras 22,4-30,7 mm SL (3 c&s 25,89- 28,05 mm SL; 7 fijados en alcohol 95°, 22,4-26,5 mm SL, TEC 3693, GP 3780-3786), charco junto al camino entre Bagé y Dom Pedrito, Begé, Rio Grande do Sul, Brasil, 31°12'32,80"S 54°17'24,20"W, 8/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer. **UFRGS 18067**, 28, 20 machos 19,3-44,2 mm SL (3 c&s 28,1-40,2 mm SL), 18 hembras 24,1-37,9 mm SL (3 c&s 24,1-36,2 mm SL), Seival, Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil, 31°25'57,00"S 53°43'05,00"W, 8/IX/2013, L. Malabarba & J. Ferrer.

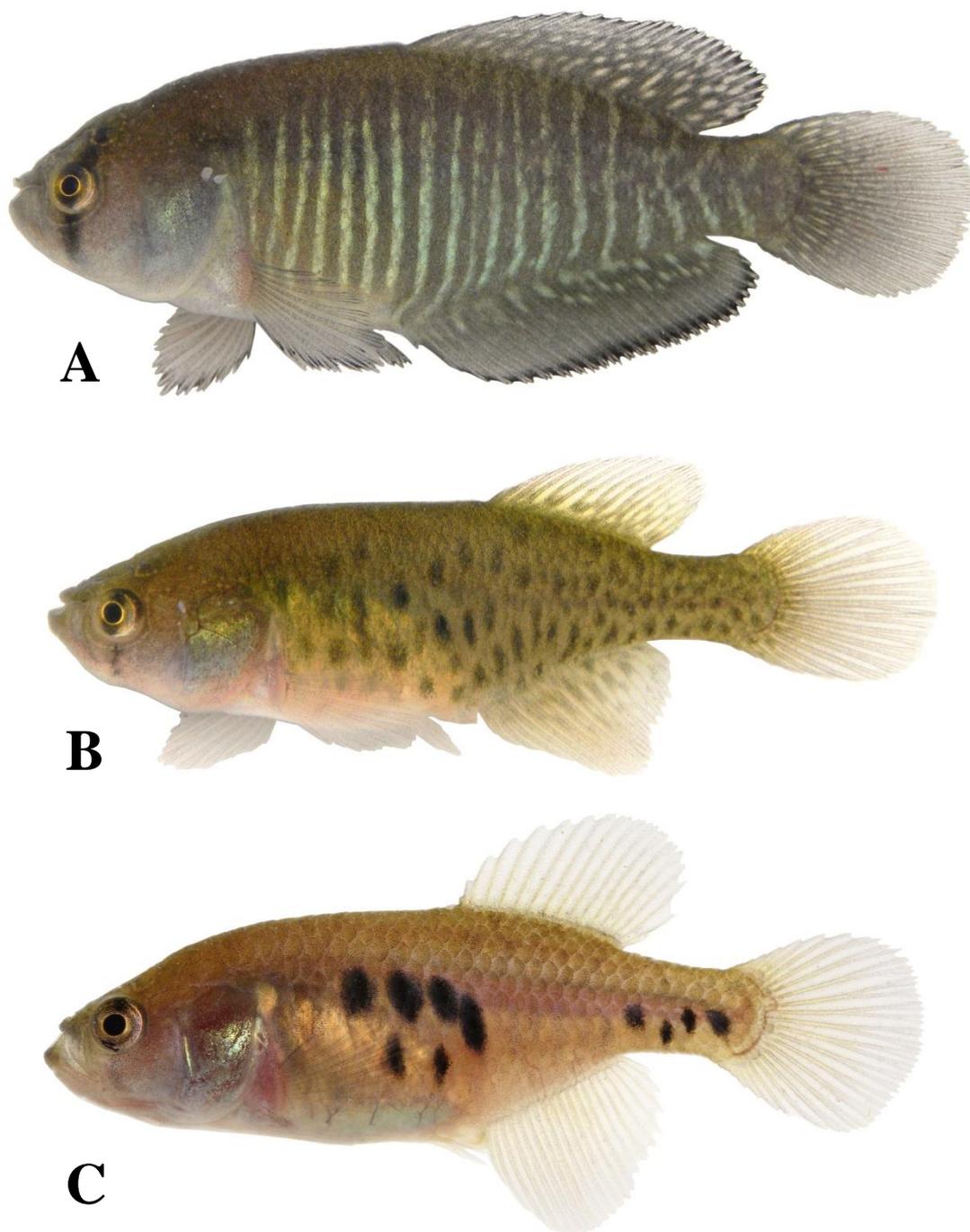


Figura 15. *Austrolebias* sp.3: **A**, macho, MHNM 3730, 34,1 mm SL; **B**, hembra, MHNM 3730, 28,2 mm SL; **C**, hembra de “Bagé”, UFRGS 18050, 28,6 mm SL (lado derecho del ejemplar, foto espejada). Fotografías tomadas inmediatamente después de la captura.



Figura 16. Ejemplar macho de *Austrolebias* sp.3 procedente de la localidad de Paso San Diego. Mantenido en acuario, no conservado.

Descripción:

Las proporciones corporales se presentan en la Tabla 7. Machos generalmente de mayor tamaño que las hembras; mayor macho examinado con 44,5 mm de longitud estándar, y mayor hembra de 40,0 mm. Forma general del cuerpo orbicular moderadamente comprimido, con su alto máximo aproximadamente a la altura entre el origen de las aletas pélvicas y el comienzo de la aleta anal. Perfil dorsal de la cabeza generalmente recto o apenas cóncavo, perfil dorsal del cuerpo convexo por detrás de la cabeza y hasta la inserción posterior de la aleta dorsal. Margen ventral del cuerpo convexo entre margen anterior de la mandíbula inferior y el inicio de la aleta anal, base de la aleta anal generalmente recta en machos y recta a cóncava en hembras. Márgenes superior e inferior del pedúnculo caudal generalmente rectos a suavemente cóncavos. Hocico redondeado y corto.

Extremos posteriores de las aletas anal y dorsal redondeados; presencia de filamentos cortos en el margen distal de estas aletas en machos. Radios medio-anteriores de la aleta anal de las hembras alargados (“aleta triangular”). Aleta caudal redondeada. Aletas pectorales elípticas. Extremo posterior de las aletas pectorales llegan entre la papila urogenital y el 5 radio anal en machos, y entre el origen de las pélvicas y el primer radio anal en hembras. Aletas pélvicas fusionadas generalmente entre un 0-50%, con su extremo posterior que llega entre la papila urogenital y el tercer radio anal, tanto en machos como hembras. Papila urogenital en machos unida parcial o completamente a la aleta anal. Origen de la aleta dorsal en machos generalmente a la misma altura o por delante del origen de la aleta anal, entre las vértebras 9 y 12 y las espinas neurales de las vértebras 7 y 11; en hembras generalmente a la misma altura o por detrás del origen de la aleta anal, entre las vértebras 10 y 14 y las espinas neurales 9 y 13. Origen de la aleta anal en machos entre los “pleural ribs” de las vértebras 7 y 10, y las vértebras 9 y 12; en hembras entre los “pleural ribs” de las vértebras 9 y 12, y las vértebras 12 y 15. Número de radios dorsales 21-28 en machos y 15-21 en hembras; número de radios anales 22-28 en machos y 19-25 en hembras. Radios totales en aleta caudal 21-28; radios en aletas pectorales 11-14; radios en aletas pélvicas 2-6.

Escamas cicloides, cubriendo todo el cuerpo y la cabeza a excepción de la región ventral de esta última. Número de escamas en la serie longitudinal 27-36 (N=30), dos ejemplares con 40 y 43 escamas; serie de escamas transversales 13-22; escamas circumpedunculares 14-25. Base de la aleta anal generalmente sin escamas, solo un 20% de los ejemplares presentan unas pocas escamas dispersas. Órganos de contacto en escamas presentes en aproximadamente el 30% de los ejemplares machos analizados, generalmente con 3 a 6

órganos de contacto por escama: órganos de contacto presentes en los 3 a 5 primeros radios superiores de las aletas pectorales; órganos de contacto ausentes en los radios de aletas impares y pélvicas.

Neuromastos cefálicos: serie supraorbital 13-21, parietal 1-4, anterior rostral 1-3 (usualmente 1 o 2), posterior rostral 1 (raras veces 2), infraorbital 1-3 + 21-28, preorbital 2-3, ótico 1-4, post-otico 1-4, supratemporal 1 (raras veces 2), medio opercular 1 (raras veces ausente), ventral opercular 1-3 (raras veces ausente), preopercular 18-29, mandibular 13-17, lateral mandibular 4-8.

Cartílago basihial ensanchado en su extremo anterior, ocupando entre un 50 a 60% del largo total del basihial; presenta usualmente con una hendidura o pequeña comisura central en su margen anterior. Segundo faringobranquial con 2 a 7 dientes y tercer faringobranquial con 18 a 42. Primer arco branquial con 2 a 4 espinas epibranquiales y 9 a 12 hipobranquiales. Osificaciones dermosfenóticas generalmente ausentes; radiales proximales 3-4; proceso ventral del posttemporal usualmente largo. Vértebras totales 26-29.

Coloración en vivo:

Machos: Color de fondo del cuerpo amarillento en la región anterior, pasando a celeste grisáceo en la región posterior, con 9 a 23 bandas verticales gris oscuras. Región pectoral y ventral blanquecina; dorso pardo grisáceo. Región opercular y preopercular celeste grisáceo. Ojo con iris amarillo oscuro; banda vertical gris oscura atravesando el ojo. Aletas pectorales hialinas con reborde negro; pélvicas celeste grisáceo; aleta dorsal gris

oscuro con puntos claros o hialinos dispersos, más abundantes en la base; aleta caudal gris oscuro con puntos claros o hialinos dispersos, más abundantes en la base, y margen gris claro a hialino sin puntos; aleta anal celeste grisáceo oscuro, generalmente con una o dos hileras basales de puntos celeste claro, y margen negro.

Hembras (forma típica): Cuerpo color marrón amarillento, más oscuro en el dorso; lados de la región abdominal amarillentos; región pectoral y ventral blanquecinas. Región central de los flancos con manchas negras contrastantes generalmente no alineadas, 0 a 16 modalmente 3 (N=48), en la mayoría de los casos con tamaño menor al diámetro del ojo pero mayor al de la pupila; resto del cuerpo puede presentar manchas o bandas verticales marrones difusas poco contrastantes. Ojo con iris amarillo oscuro; banda vertical gris oscura difusa atravesando el ojo. Aletas pares hialinas; aletas impares amarillentas hacia la base y hialinas hacia el extremo, pudiendo presentar cerca de la base pequeñas manchas marrón difusas en el espacio entre los radios.

Variaciones locales: los ejemplares hembras analizados de la localidad de Bagé suelen presentar aletas completamente hialinas, y las manchas negras del costado del cuerpo poco numerosas (0 a 6) y de gran tamaño (iguales o mayores al diámetro del ojo), contrastando con un fondo marrón uniforme (Figura 15c). Por otro lado las hembras analizadas de la localidad de Candiota presentan las manchas marrones del resto del cuerpo oscuras, contrastantes con el fondo.

Distribución y Conservación: *Austrolebias* sp. 3 es conocida para humedales de las regiones altas de los ríos Negro y Yaguarón, en el sur de Brasil y noreste de Uruguay (Figura 17). No se encuentra incorporada en la Lista Roja de la UICN, sin embargo para

el estado de Rio Grande do Sul (bajo el nombre de *A. melanoorus*), es considerada como una especie En Peligro (Volcan *et al.*, 2015).

Tabla 7. Datos morfométricos de *Austrolebias* sp.3, Longitud Estándar se expresa en mm; medidas numeradas 2-13 y 19 se expresan como porcentajes de la longitud estándar; subunidades de la cabeza (14-18) se expresan como porcentajes del Largo de la Cabeza.

Character	Machos					Hembras				
	Rango					Rango				
	N	Mín	Máx	Promedio	DS	N	Mín	Máx	Promedio	DS
1. Longitud Estandar (mm)	67	19,3	44,5	31,8	-	61	20,9	40,0	29,5	-
2. Altura del cuerpo	67	28,6	40,9	35,8	2,62	61	31,2	38,5	35,0	1,75
3. Largo de la Cabeza	67	25,0	34,6	28,3	1,76	60	26,3	32,8	29,5	1,70
4. Alto del pedúnculo	67	10,0	18,2	13,3	1,53	61	11,3	22,3	13,6	1,44
5. Largo del pedúnculo	67	6,5	16,2	12,0	1,99	61	12,2	21,2	17,4	1,91
6. Longitud predorsal	67	48,2	58,0	52,8	2,11	61	57,2	66,1	60,6	2,02
7. Base de aleta dorsal	67	31,9	46,3	38,5	2,78	61	19,0	34,1	25,5	2,64
8. Longitud pre-anal	67	42,3	59,4	50,7	2,55	61	52,4	64,7	59,3	2,30
9. Base de aleta anal	67	31,3	49,9	39,9	3,12	61	20,2	30,1	24,4	2,21
10. Longitud pre pélvica	67	41,1	51,0	45,6	2,23	61	44,8	56,8	51,4	2,61
11. Largo aletas pectorales	67	15,4	30,0	22,4	2,29	61	16,5	27,3	23,0	1,79
12. Largo aletas pélvicas	66	4,0	9,4	6,8	1,08	61	6,0	12,1	8,8	1,17
13. Largo aleta caudal	66	18,5	32,9	24,4	2,56	61	16,4	33,4	26,0	2,30
14. Ancho de la cabeza	67	56,4	77,5	66,0	4,51	60	55,5	80,2	66,5	4,71
15. Alto de la cabeza	67	94,1	121,9	110,0	6,34	60	90,2	113,5	101,4	5,65
16. Distancia interorbital	67	38,9	54,3	45,5	3,29	60	37,1	50,8	43,6	3,04
17. Diámetro del ojo	67	22,5	34,9	28,7	2,53	60	25,1	33,5	29,0	1,90
18. Largo del hocico	67	17,3	29,7	23,2	2,69	60	15,4	23,9	20,4	2,06
19. Altura aleta anal	-	-	-	-	-	60	16,3	25,7	21,4	1,67

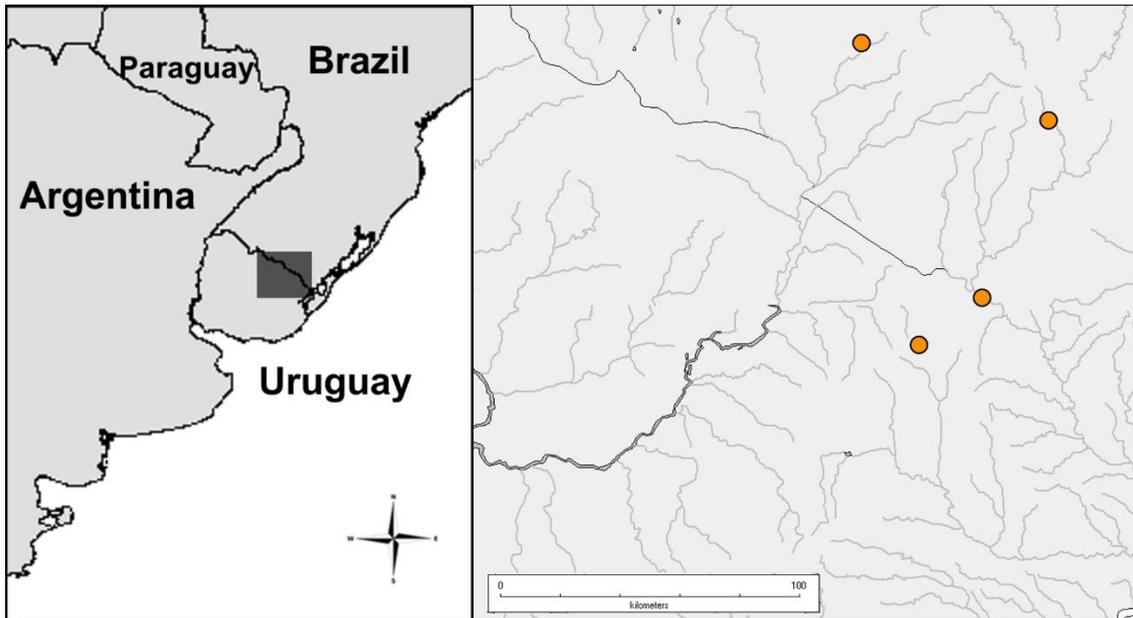


Fig. 17. Distribución geográfica de *Austrolebias* sp.3 en Cerro Largo (Uruguay) y Rio Grande do Sul (Brasil).