



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA

Subárea Genética

Filogeografía de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) en las cuencas del Uruguay

Lic. Néstor Ríos

Orientador: Dra. Graciela García

Co-orientador: Dra. Carmen Bouza

Tribunal: Dra. Susana González

Dr. Marcelo Loureiro

Dr. Héctor Romero

Agradecimientos

A Carmen y Graciela por estar siempre presentes y atentas a colaborar con mi formación. Igualmente importante, ambas han sido un fuerte apoyo desde el punto de vista personal, siempre atentas a las necesidades y urgencias de uno.

A la Dra. Susana Gonzalez, el Dr. Marcelo Loureiro y el Dr. Héctor Romero por aceptar forma parte del tribunal y por mostrar un importante interés en facilitar la defensa de este trabajo.

A Franco Teixeira y a la colección de Zoología de Vertebrados por la donación de ejemplares y muestras de bagre negro y su interés en este trabajo.

A los compañeros de laboratorio, a Verónica Gutiérrez que participó en la amplificación de marcadores en el marco del Proyecto MV 2793, al resto de los compañeros por colaborar en la realización de tareas que permitieron el desarrollo de esta tesis y a todos, incluyendo a Ana, por ayudar a desahogarse en los momentos de calentura.

A mis viejos por apoyarme y permitirme desarrollar mi carrera en lo que es sin dudas mi vocación.

A Cecilia por la paciencia, apoyo en todo momento (fines de semana, vacaciones, madrugadas) y sobre todo por ayudar a sobreponerme a las frustraciones.

A mis sobrinos que alegran mis momentos libres y no tan libres.

A amigos y CO₂ que permiten que me desenchufe del día a día y las preocupaciones estudio-laborales.

Al grupo de trabajo de ACUIGEN de la Universidad de Santiago de Compostela que me han recibido de la mejor forma haciéndome sentir parte de esa familia y enseñándome que existe otra forma de trabajo.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Silúridos Neotropicales	3
1.1.1. Antecedentes del género <i>Rhamdia</i>	5
1.1.2. Importancia de <i>R. quelen</i> en el marco de las pesquerías y la acuicultura	10
1.2. Filogeografía	11
1.3. Unidades prioritarias para la conservación	12
1.4. <i>Citocromo b</i> , evidenciando linajes genéticos ancestrales.	13
1.5. Microsatélites, una poderosa herramienta para el análisis de estructura poblacional.	14
1.6. Hipótesis	15
1.7. Objetivo General	15
1.7.1. Objetivos específicos	15
2. Materiales y métodos	16
2.1. Muestreo macrogeográfico de <i>R. cf. quelen</i> en las cuencas de Uruguay.....	16
2.2. Extracción de ADN	16
2.3. Amplificación parcial del gen <i>citocromo b</i>	18
2.4. Secuenciación	19
2.5. Análisis de secuencias del gen <i>citocromo b</i>	19
2.5.1. Alineamiento de secuencias <i>citocromo b</i>	20
2.5.2. Análisis de diversidad del marcador <i>citocromo b</i>	20
2.5.3. Test de neutralidad en base a secuencias mitocondriales	21
2.6. Análisis filogenético de <i>R. quelen</i> en la región Neotropical	22
2.6.1. Máxima parsimonia.....	22
2.6.2. Modelo evolutivo de ajuste al conjunto de datos mitocondriales	23
2.6.3. Máxima Verosimilitud	24
2.6.4. Coalescente	24
2.6.5. Distancia genética entre grupos	26
2.7. Análisis poblacional en base a datos de ADN mitocondrial en las cuencas de Uruguay	26
2.7.1. Análisis de demografía histórica: “Mismatch distribution”	26
2.7.2. Red de haplotipos.....	27
2.7.3. Análisis de estructuración poblacional	28
2.7.4. Análisis molecular de la varianza	28
2.7.5. Aislamiento por distancia	28
2.8. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras del Uruguay mediante <i>loci</i> microsatélite y secuencias del gen <i>citocromo b</i>	29
2.8.1. Amplificación por PCR de los <i>loci</i> microsatélite	29
2.8.2 Genotipado de <i>loci</i> microsatélite	30
2.8.3. Análisis de datos de marcadores microsatélite	31
2.8.3.1. Evaluación de genotipado (de errores de genotipado y alelos nulos)	31
2.8.3.2. Test de Hardy-Weinberg	31
2.8.3.3. Test de desequilibrio de ligamiento	32
2.8.3.4. Análisis de la diversidad genética en marcadores microsatélites	32
2.8.3.5. Análisis de estructuración poblacional en los marcadores nucleares	33
2.8.3.6. Análisis Bayesiano de la estructura poblacional	34
2.8.3.7. Distancias genéticas en base a marcadores microsatélite	34
2.8.4. Análisis microgeográfico del marcador mitocondrial.....	35
2.8.4.1. Estudio de la diversidad de secuencias de <i>citocromo b</i>	35
2.8.4.2. Análisis de estructuración poblacional mediante secuencias de <i>citocromo b</i>	35
3. Resultados	36
3.1. Análisis de <i>R. cf. quelen</i> basados en el marcador mitocondrial en cuencas de la región Neotropical	36
3.2. Análisis filogenético	37

3.2.1. Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.....	37
3.2.2. Coalescente	40
3.2.3. Reloj molecular.....	43
3.3. Análisis poblacional y demografía histórica	44
3.3.1. Análisis de demografía histórica: “Mismatch distribution”	44
3.3.2. Red de haplotipos.....	44
3.3.3. Análisis de estructura poblacional	45
3.3.4. Análisis molecular de la varianza	47
3.3.5. Aislamiento por distancia	48
3.4. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras de Uruguay mediante <i>loci</i> de microsatélites y secuencias del gen <i>citocromo b</i>	50
3.4.1. Análisis de datos de marcadores microsatélites	50
3.4.2. Análisis de secuencias del gen <i>citocromo b</i>	54
4. Discusión.....	56
4.1. Polimorfismo del gen <i>citocromo b</i> en <i>R. cf. quelen</i>	56
4.2. Filogeografía de <i>R. quelen</i> en la región Neotropical	57
4.3. Grupo <i>Rhamdia cis-andino</i>	58
4.4. Divergencia genética de <i>R. cf. quelen cis-andino</i>	59
4.5. Análisis poblacional de <i>R. quelen</i> en las cuencas de Uruguay	60
4.6. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras de Uruguay mediante <i>loci</i> de microsatélites y secuencias del gen <i>citocromo b</i>	62
4.7. Unidades prioritarias para la conservación	66
4.8. Conclusión	66
4.9. Perspectivas.....	68
Bibliografía	69
Anexo I.....	78
Anexo II.....	82
Anexo III.....	82
Anexo IV.	83

Resumen

Rhamdia quelen (bagre negro) pertenece al Orden Siluriformes y como varios representantes del Orden, estos peces constituyen recursos valiosos en pesquerías y para el desarrollo de la acuicultura. La sistemática de esta especie ha sido muy controvertida, así lo marcan las contradicciones en los distintos estudios de tipo sistemático basados en caracteres morfológicos y, la contraposición de éstos con los análisis basados en caracteres moleculares y los estudios previos en citogenética. Es por esto que surge la necesidad de desarrollar un estudio con el objetivo de realizar el análisis filogeográfico de esta especie en la región Neotropical y en particular dentro de las cuencas de Uruguay a los efectos de identificar la existencia de diferentes linajes genéticos y la estructura poblacional asociada a las cuencas del país. En este sentido, este trabajo se dividió en tres niveles jerárquicos: 1) el análisis filogenético de la especie en la región Neotropical basados en gen mitocondrial *citocromo b*; 2) análisis poblacional macrogeográfico en las cuencas de Uruguay basados en el marcador mitocondrial *citocromo b*; y 3) análisis microgeográfico en la Laguna del Sauce, Laguna de Rocha y Laguna Castillos, tres lagunas costeras de importancia pesquera en Uruguay mediante el análisis de secuencias de *citocromo b* y marcadores de tipo microsatélite. Los resultados obtenidos permitieron detectar siete linajes mitocondriales altamente divergentes a nivel de especie, que conforman el complejo de especies *R. cf. quelen*, éstos habrían divergido en alopatria por el fenómeno de vicarianza en el Plioceno - Mioceno. Los siete linajes se agrupan en cuatro grandes clados: A) conformado por linajes del Paraná (Rq1), Rq2 y Rq3; B) Rq 4 (Paraná y Cuareim) y Amazonas (Rq5); C) Cuenca del Essequibio (Rq6); D) presente en el Orinoco (Rq7). En Uruguay se detectaron tres de estos linajes y, dos de los cuatro grandes clados encontrados en esta especie a nivel global en la región Neotropical: Rq2-CladoA, presente en la cuenca del río Cuareim, Queguay y Lunarejo; Rq3-CladoA, en las cinco grandes cuencas del Uruguay; y Rq4-CladoB, que habita la cuenca del río Cuareim y la cuenca del Paraná. Debido a la alta divergencia de estos linajes, éstos podrían significar tres unidades evolutivamente significativas (ESU) para la conservación de recursos genéticos de esta especie en el país. En cuanto al análisis poblacional macrogeográfico en Uruguay, éste nos permite afirmar que el patrón de distribución de las poblaciones del bagre negro en Uruguay se divide en cuatro grupos: la cuenca del Cuareim; la población mezcla de

origen cultivado de Villa Constitución; las cuencas del Lunarejo, Queguay y la población de Rincón del Bonete; y por último, el grupo más extenso que agrupa el resto de las poblaciones presentes en la cuenca del Río Negro y al sur del mismo río. Mediante la red de haplotipos, encontramos los tres clados observados en los análisis filogenéticos, mostrando evidencias de que existe un linaje muy común en el país que presenta características evolutivas asociadas con una rápida y reciente evolución. Por último, el análisis a microescala geográfica basado en marcadores nucleares de tipo microsatélite y de ADN mitocondrial ha permitido diferenciar tres poblaciones que se corresponden con las tres lagunas costeras analizadas a esta escala: Laguna del Sauce, Laguna Castillos y Laguna de Rocha. Estas distintas poblaciones podrían representar distintas unidades de manejo (MU), unidades prioritarias para la conservación que deberían ser estudiadas desde el punto de vista morfológico, fisiológico y genómico, con el fin de distinguir diferentes características que podrían ser explotadas en la acuicultura. Podemos concluir entonces que *R. cf. quelen* es un complejo de especies, altamente estructurado en la región *cis*-andina y particularmente Uruguay presentaría tres ESUs en sus cuencas hidrográficas y por lo menos tres MUs, detectadas en la región de lagunas costeras analizadas. A su vez, este estudio como los que lo anteceden, evidencian la necesidad de realizar una revisión sistemática exhaustiva de este complejo de poblaciones a nivel morfológico y de variabilidad genética adaptativa con aproximaciones de tipo genómico (marcadores procedentes de secuenciación de nueva generación, neutros y génicos).

1. Introducción

1.1. Silúridos Neotropicales

El Orden Siluriformes se destaca entre los Ostariophysi por ser uno de los más diversos de este grupo, con aproximadamente 35 familias y 2900 especies, aunque se estima que existen 1750 que aún no han sido descritas (de Pinna 1998; Sullivan *et al.* 2006). El Orden se distribuye en todos los continentes, con presencia de fósiles en la Antártida (de Pinna 1998, Hardman 2005). Este grupo habita principalmente en masas de agua dulceacuícolas, sin embargo, existen algunos silúridos de agua salada y estuarinos. Los Siluriformes presentan una gran diversidad de adaptaciones, como por ejemplo: especies xilófagas, silúridos eléctricos y peces adaptados al parasitismo (Hardman 2005; Betancur-R 2009). Por su amplia distribución y diversidad, son un modelo de importancia en estudios de biogeografía a distintas escalas, de regional a global (Sullivan *et al.* 2006). El Orden Siluriformes está integrado por tres grupos: Loricarioidei; Diplomystidae; Siluroidei (Sullivan *et al.* 2006). El primero es el más ancestral conformando un grupo recíprocamente monofilético a Diplomystidae+Siluroidei. El hecho de que Loricarioidei como grupo más ancestral de los Siluriformes sea endémico de Sudamérica sugiere la idea de que el Orden Siluriformes habría surgido en esta región (Sullivan *et al.* 2006). En el presente se considera que el grupo de silúridos Neotropicales tiene un origen polifilético, concentrándose más de la mitad de las especies del Orden (1650), distribuidas en 15 familias (de Pinna 1998).

El género *Rhamdia*, objeto de estudio en este trabajo, incluido inicialmente en la familia Pimelodidae (Swainson 1838), ha sido reubicado por Lundberg & McDade (1986) dentro de la familia Heptapteridae, en base a caracteres morfológicos. Estos autores confirmaron la monofilia de esta familia, delimitando su distribución en masas dulceacuícolas desde México hasta el sur de Argentina. Esta familia de silúridos Neotropicales, incluyendo las subfamilias Rhamdiinae (Bleeker 1862) y Heptapterinae (Lundberg & McDade 1986), presenta una de las más grandes radiaciones dentro de los Siluriformes (de Pinna 1998), compuesta por aproximadamente 150-200 especies válidas, las cuales se encuentran distribuidas en 24 géneros (Ferraris Jr. 2007).

Esta familia tiene representantes en todas las áreas de endemismo del Neotrópico, lo que la convierte en un grupo potencial para análisis de tipo biogeográficos (de Pinna 1998), ya que estas áreas son útiles a la hora de definir las áreas de estudio (unidades básicas de estudios biogeográficos) y sus relaciones. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido tomada en cuenta en este tipo de análisis debido al escaso conocimiento que se tiene de la relación intergénero en varios de los *taxa* que la integran (Bockmann & Guazzelli 2003). Aunque existen antecedentes de estudios de esta relación, ésta aún no es del todo clara, ya que distintos autores han propuesto diferentes relaciones intergenéricas dentro de Heptapteridae (de Pinna 1998). Por ejemplo, Lundberg & McDade (1986) encontraron una fuerte relación de *Rhamdia* con *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Goeldiella*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Typhlobagrus*.

La relación de la familia Heptapteridae con el resto de silúridos Neotropicales fue estudiada también por Sullivan *et al.* (2006) en base a marcadores moleculares nucleares (*rag1* y *rag2*). Este estudio encontró que las familias Heptapteridae+Conorhynchos y Pimelodidae+Pseudopimelodidae forman la superfamilia Pimelodoidea, la cual colapsa en una politomía basal dentro del grupo Siluroidei (Figura 1). Estos resultados fueron coincidentes con lo encontrado por Hardman (2005) basado en el gen *citocromo b*.

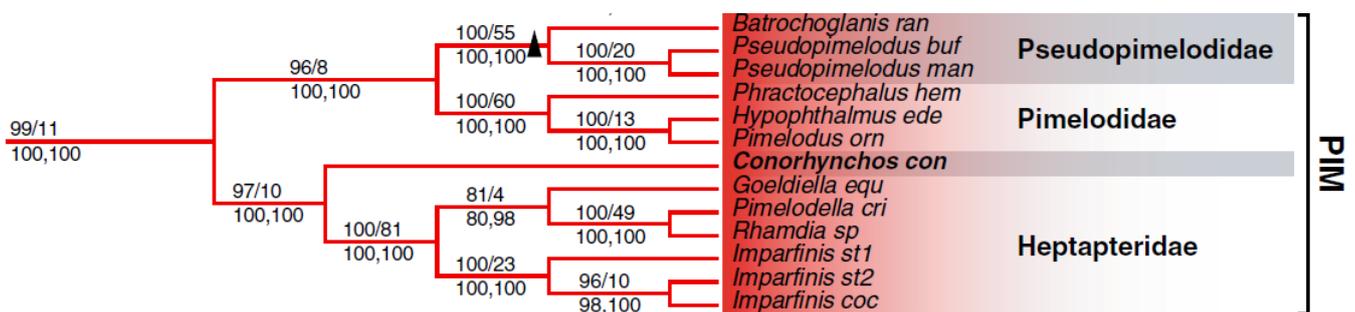


Figura 1. Relación del género *Rhamdia* y la familia Hepapteridae dentro del grupo Pimelodoidea (PIM), en el contexto del *taxa* Siluroidei (Sullivan *et al.* 2006).

La familia de Heptapteridae es identificada mediante las siguientes sinapomorfías, según Lundberg & McDade (1986):

1) extremo posterior del cuarto proceso transversal expandido lateralmente sobre la vejiga natatoria y mellado una a varias veces; 2) espinas neurales del centro del complejo de weber unidas por una lámina ósea de borde recto horizontal o a veces inclinada; 3) el proceso para la inserción del opérculo del músculo elevador en la esquina posdorsal del hiomandíbular está altamente expandido; 4) cuadrado con borde libre y forma dorsal bifida, extremos posteriores y anteriores articulan por separado con el hiomandíbular y metapterigoideo; 5) presencia de un proceso anterior recurvado (gancho mesetmoide) que sale desde la esquina ventrolateral del mesetmoide.

1.1.1. Antecedentes del género *Rhamdia*

El género *Rhamdia* se encuentra presente en todas las cuencas de la región Neotropical (Silfvergrip 1996). Silfvergrip (1996) realizó la revisión más exhaustiva del género en base a caracteres morfológicos, incluyendo ejemplares que podrían presentar caracteres relacionados con el género *Rhamdia*. El resultado de dicho estudio fue la reducción del género a tan sólo 11 especies con más de 100 especies sinonimizadas. Por ejemplo, 48 especies fueron sinonimizadas a *R. quelen* (Quoy * & Gaimard 1824), mientras que 18 fueron sinonimizadas con *R. laticauda* (Kner 1858). Las 11 especies de *Rhamdia* finalmente consideradas fueron: *R. foina* (Müller & Troschel 1849), *R. humilis* (Günther 1864), *R. itacaiunas* (Silfvergrip 1996), *R. jequitinhonha* (Silfvergrip 1996), *R. laticauda*, *R. laukidi* (Bleeker 1858), *R. muelleri* (Günther 1864), *R. nicaraguensis* (Günther 1864), *R. poeyi* (Eigenmann & Eigenmann 1888), *R. quelen* y *R. xetequepeque* (Silfvergrip 1996). En la Figura 2 se describe la distribución de las once especies del género *Rhamdia* según Silfvergrip (1996).

Las sinapomorfias que definen el género *Rhamdia*, según Silfvergrip (1996), son:

1) cuerpo revestido por piel o cuero, sin escamas; 2) tres pares de bigotes sensitivos de diferente tamaño entre sí; 3) una larga aleta adiposa con el extremo posterior libre; 4) fontanelas posteriores cerradas; 5) procesos humerales bien desarrollados y ausencia de dientes en el vómer.

Adicionalmente, su coloración puede variar desde un amarillo pálido hasta el gris, con el vientre siempre más claro, pudiendo presentar manchas. Los ejemplares adultos de las especies del género *Rhamdia* pueden alcanzar los 40 cm de largo total y 2 Kg de peso. No presentan dimorfismo sexual aparente, sin embargo, en épocas reproductivas el orificio urogenital presenta diferencias entre sexo (Gomes *et al.* 2000, García 2009).

Perdices *et al.* (2002) realizaron un análisis filogeográfico en especies de *Rhamdia* de Mesoamérica, mediante marcadores moleculares. En el mismo concluyeron la existencia de dos grupos monofiléticamente recíprocos, las especies de *Rhamdia trans-andinas* y *cis-andinas*, que habrían divergido a causa del levantamiento de los Andes. Como consecuencia de este resultado, se restringe el límite norte de la distribución de *R. quelen* a la cuenca del Orinoco, ya que esta especie ha sido originalmente descrita para la región *cis-andina*. Además, en este trabajo se propone la validez de *R. cinerascens* (Günther 1864) y *R. guatemalensis* (Günther 1864), ya que éstas forman clados diferentes, quedando externas a *R. quelen* y *R. laticauda*. Según Silfvergrip (1996), tanto *R. cinerascens*, como *R. guatemalensis*, son sinonimias de *R. quelen*.

Por otro lado, Weber & Wilkens (1998) y Wilkens (2001) propusieron la validez de las especies *R. reddelli* (Miller 1984) y *R. zongolicensis* (Wilkens 1994), basados en evidencias de aislamiento postcigótico en híbridos de primera generación, antes sinonimizadas a *R. laticauda* (Silfvergrip 1996). Adicionalmente, *Brachyrhamdia marthae* (Sands & Black 1985) fue incluida dentro del género *Rhamdia* por Zarske (2003). A su vez, Nelson *et al.* (2004) reconocieron a *R. parryi* (Eigenmann & Eigenmann 1888) como especie válida, antes sinonimizada a *R. laticauda* por Silfvergrip (1996).



Figura 2. Distribución geográfica del género *Rhamdia* según Silfvergrip (1996). A la izquierda se observan las referencias. Un punto puede marcar más de una localidad. Para *R. muelleri* y *R. quelen* se marcan los límites de su distribución.

Además, posteriormente a la revisión de Silfvergrip (1996), se han descrito cuatro nuevas especies del género *Rhamdia*: *R. macuspanensis* (Weber & Wilkens 1998); *R. laluchensis* (Weber *et al.* 2003); *R. guasarensis* (Do Nascimento *et al.* 2004) y *R. enfurnada* (Bichuette & Trajano 2005). *Rhamdia guasarensis*, *R. macuspanensis*, *R. enfurnada*, *R. reddelli* y *R. zongolicensis* son especies que, en mayor o en menor medida, se encuentran adaptadas a la vida cavernícola, con distintos grados de pigmentación y desarrollo ocular, llegando incluso a la pérdida de los ojos en *R. guasarensis* (Do Nascimento *et al.* 2004; Bichuete & Trajano 2005; Anza 2006).

Tomando en cuenta los datos previos disponibles, Anza (2006) concluye que el género *Rhamdia* está compuesto por 19 especies, estas son: *R. cinerascens*; *R. enfurnada*; *R. foina*; *R. guasarensis*; *R. guatemalensis*; *R. humilis*; *R. itacaiunas*; *R. jequitinhonha*; *R. laluchensis*; *R. laticauda*; *R. laukidi*; *R. macuspanensis*; *R. marthae*; *R. muelleri*; *R. nicaraguensis*; *R. poeyi*; *R. quelen*; *R. xetequepeque* y *R. zongolicensis*. Aumentando a 20 especies, considerando a *R. reddelli* (Weber & Wilkens 1998) y a 25 tomando en cuenta las 5 nuevas especies (*R. sp1*- *R. sp5*) descritas en un área de endemismos delimitada por la cuenca del río Ribeira do Iguape y el Río Tramandaí, Brasil (Anza 2006). La distribución de las 25 especies que se admiten actualmente dentro del género *Rhamdia* se señala en la Figura 3. La especie *R. sp4* está presente en toda el área de estudio, donde comparte cuenca con las otras cuatro especies (*R. sp1*; *R. sp2*; *R. sp3*; *R. sp5*), sin embargo, con la única que se ha encontrado en simpatría es con *R. sp3*. Esto podría indicar que la diferenciación de al menos la mayoría de estas especies haya tenido lugar en alopatría. Anza (2006) reconoce que estas cinco especies entran dentro de la descripción de *R. quelen*, según Silfvergrip (1996), incluso lotes de *R. sp2* y *R. sp4* fueron utilizados en el trabajo de este último. Por lo que critica la descripción de Silfvergrip (1996) por creerla muy amplia y general.



Figura 3. Distribución geográfica del género *Rhamdia* en la actualidad. A la izquierda se visualizan las referencias de especies, un punto puede representar más de una localidad. Para *R. quelen*, *R. muelleri*, *R. sp2* y *R. sp4* se marcan los límites de su distribución.

Sorprendentemente, García (2009), en base al análisis de cuatro marcadores moleculares (ATPasa 6 y 8, *citocromo b*, NADH2 y región control), contradice la monofilia de *Rhamdia* y *R. quelen*, ya que la especie *R. itacaiunas* y muestras de *R. quelen* resultaron más cercanas a otro géneros de la familia Heptapteridae. Sin embargo, reconoce que son necesarios un mayor número de datos genéticos, biológicos, así como un estudio morfológico más exhaustivo, tanto de *Rhamdia* como de los géneros de la familia Heptapteridae. A su vez, se propone que la amplia distribución en gran diversidad de ambientes, en escenarios de reducido tamaño poblacional propiciaría la especiación en alopatría. Por lo tanto, la riqueza específica podría ser subestimada debido a la ausencia de caracteres diagnósticos, a su vez explicable bajo selección estabilizadora sobre caracteres morfológicos (García 2009).

Por otro lado, el estudio a nivel citogenético de poblaciones de *R. quelen* de Brasil por Martínez *et al.* (2011), ha mostrado un número cromosómico constante (58 cromosomas), aunque con diferencias cariotípicas entre poblaciones del Paraná alto ((22 metacéntricos (m) + 18 submetacéntricos (sm) + 12 subtelocéntricos (st) + 6 acrocéntricos (a)) y las de Araguaia (18m + 18sm + 14st + 8a). Además, estos autores encontraron variaciones en la ubicación del ADN ribosomal 18S y 5S, evidenciando la existencia de reordenaciones cromosómicas generadas por inversiones pericéntricas. Estas variaciones cromosómicas fijadas en las poblaciones serían la causa de la divergencia de estas poblaciones de *Rhamdia*. Las contradicciones a nivel taxonómico junto a las evidencias de variación cariotípica, conducen a la hipótesis de que *R. quelen* es un complejo de especies (Martínez *et al.* 2011).

1.1.2. Importancia de *R. quelen* en el marco de las pesquerías y la acuicultura

El bagre negro (*R. quelen*) es explotado por medio de la pesca y la acuicultura para consumo a nivel regional (Vaz *et al.* 2010); presentando características que lo hacen un buen modelo de cultivo, con alto rendimiento de la carcasa, alta tasa de crecimiento, fácil manejo reproductivo y una alta relación proteína/grasa (Luchini 1988; Gomes *et al.* 2000; Vaz *et al.* 2010). Sin embargo, es prioritario un análisis filogeográfico que aporte información necesaria para una correcta gestión de los recursos

genéticos/fuentes de diversidad genética disponibles en el desarrollo de programas de cultivo y de la mejora genética (Vaz *et al.* 2010).

1.2. Filogeografía

La filogeografía es la disciplina que estudia los principios y procesos que inciden en el patrón de distribución de los distintos linajes genéticos, por tanto, es considerada como una disciplina puente entre los procesos micro y macroevolutivos (Avice *et al.* 1987; Avice 2004; Piorski *et al.* 2008). De ahí que fenómenos a nivel poblacional tales como mutación, selección natural o deriva génica pueden evidenciar patrones demográficos y relaciones filogenéticas a nivel de especie y niveles taxonómicos más altos (Bermingham & Moritz 1998). Aunque existen excepciones, el fenómeno de estructuración genética se da en la mayoría de las especies, en mayor o en menor medida (Balloux & Lugon-Moulin 2002; Avice 2009). La misma, puede darse tanto en animales de baja dispersión, en donde la divergencia entre individuos suele estar relacionada directamente con la distancia geográfica y en los animales de alta vagilidad, donde la estructura poblacional puede estar determinada por barreras geográficas o por filopatría (Avice 2009).

Dentro del escenario de especiación alopátrica existen dos hipótesis que explican la estructura encontrada en los diferentes *taxa*, dispersión y vicarianza. La primera ocurre cuando un conjunto de individuos supera una barrera preexistente pudiendo diferenciarse del taxón original, generando una nueva población ó subpoblación. Mientras que la vicarianza implica la subdivisión de un taxón por el surgimiento de una barrera que puede conducir a la diversificación en dos o más grupos (Crisci *et al.* 2003). En relación a esto, Lieberman (2000) introduce el término geodispersión para referirse a los eventos geológicos que generan la dispersión de un grupo de *taxa*, por ejemplo, la captura de cuencas.

Análisis filogeográficos basados en datos moleculares de estas poblaciones pueden dar cuenta de la estructura poblacional, pudiendo delimitar la distribución de las especies (Barluenga & Meyer 2005; Piorski *et al.* 2008), reconocer poblaciones híbridas e introgresión (Vera *et al.* 2012), así como también, dar respuesta a preguntas del tipo biogeográfico, tales como: evidenciar fenómenos de vicarianza crípticas en la historia

biológica de la biota, eventos pasados de fragmentación, expansión del rango de distribución y colonización (Avice 2000). De esta manera surge el término “Filogeografía comparada”, esto es el estudio de la evolución del patrón geográfico a través del análisis de la evolución de la estructura poblacional de varios *taxa* que coexisten en el área de estudio (Avice *et al.* 2000).

1.3. Unidades prioritarias para la conservación

La pérdida de hábitat para las especies y la fragmentación ha puesto en riesgo la diversidad biológica en general, a través de un incremento en el riesgo de deriva genética, reducción de la variabilidad genética a través de cuellos de botella, inhibiendo de este modo el flujo génico y perjudicando los procesos de adaptación de las especies (Templeton 2001).

Es así que surge la necesidad de implementar políticas de conservación, para esto es necesario conocer la estructura poblacional del taxón. El desconocimiento de esto o decisiones erróneas al definir las unidades prioritarias, pueden conducir a no tomar medidas para proteger un taxón desconocido en peligro de extinción, el derroche de esfuerzo en proteger especies abundantes o híbridos, o a la no conservación de poblaciones altamente divergentes que podrían ser utilizadas para contrarrestar efectos negativos de la endogamia (Frankham *et al.* 2004). Además, cuando se trata de una especie explotada en pesquerías y acuicultura la conservación de la diversidad es prioritaria para contrarrestar los efectos de la deriva génica y endogamia, y para mantener la integridad genética de los stocks naturales (Welcomme & Barg 1997). A su vez, se ha propuesto que niveles bajos de diversidad genética podrían representar un riesgo para la eficacia biológica de la especie o la viabilidad de las poblaciones (Vrijenhoek 1994).

En este sentido, los estudios de enfoque filogeográfico siguiendo a Moritz (1994) permiten identificar ESU (del inglés, “Evolutionarily Significant Units”), esto es, un grupo de organismos que han estado aislados de sus conspecíficos, evolucionando de forma independiente y presentando una diversificación genética importante al resto de las poblaciones de la especie. También, podemos detectar MU (“Management

Units”), definidas como aquellas poblaciones en las que su dinámica está marcada por las tasas de nacimientos y muertes, no tanto por las migraciones (Moritz 1994; Paetkau 1999). De esta manera podemos determinar subpoblaciones o stocks, ya que según Moritz (1994), genéticamente éstos tendrían las mismas características que las MUs. La identificación de estas unidades es prioritaria para la conservación, así como también es conocimiento básico para el desarrollo de emprendimientos de mejora genética, debido a que las distintas unidades podrían presentar distintas adaptaciones locales, poseer diferencias genéticas que promuevan distintas tasas de crecimiento, resistencia a enfermedades, fertilidad y a nivel de especie adaptabilidad o supervivencia (Hoarau *et al.* 2002).

1.4. Citocromo *b*, evidenciando linajes genéticos ancestrales.

El ADN mitocondrial en vertebrados varía entre 15-20 mil pares de bases, conteniendo, además de la región control, 37 secuencias donde 22 corresponden a ARN de transferencia, dos ARN ribosomales (12s y 16s) y 13 ARN mensajeros, por lo que aproximadamente todo el genoma se encuentra destinado a funciones codificantes, siendo muy raro encontrar intrones, secuencias repetidas o pseudogenes (Awise 2000). El ADN mitocondrial es elegido como marcador genético en la mayoría de los análisis filogeográficos (Farias *et al.* 2001) debido a su rápida evolución, entre 5 y 10 veces mayor que los genes nucleares). Éste es de herencia matrilineal y su rápida evolución se debe a una alta tasa de mutación a causa de un ineficaz sistema de reparación de errores en la replicación. La alta tasa de mutación se debe en parte a los altos niveles de concentración de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria que generan un ambiente inestable para la molécula de ADN. A su vez, la fijación de las mutaciones se debe a los bajos niveles de selección purificadora debido a que los péptidos para los que codifica el ADN mitocondrial no participan directamente de la replicación, transcripción y traducción (Awise 2009). Este tipo de marcador de rápida evolución es indicado para determinar relaciones entre organismos estrechamente relacionados, es decir, entre especies hermanas o poblaciones (Brown *et al.* 1979; Hey & Machado 2003). El gen *citocromo b*, como todas las secuencias codificantes, posee información tanto de lenta como de rápida evolución dependiendo de la posición analizada, ya que

la tercera base del codón posee una mayor tasa evolutiva que las primeras dos posiciones (Farias *et al.* 2001).

1.5. Microsatélites, una poderosa herramienta para el análisis de estructura poblacional.

Los microsatélites o SSR (del inglés, “Single Sequence Repeat”) son secuencias cortas de ADN de 1-6 nucleótidos repetidas en tandem de 20 a unos pocos cientos de pares de bases, dispersos de forma ubicua por el genoma. Estos marcadores se caracterizan por presentar herencia mendeliana codominante y alto polimorfismo, con una tasa evolutiva por *locus* por generación entre 10^{-2} - 10^{-6} (Chistiakov *et al.* 2006; Piorski *et al.* 2008). Los marcadores microsatélite han sido utilizados en análisis filogeográficos, en especies que han divergido recientemente o en análisis de variabilidad genética a nivel intraespecífico, ya que a niveles evolutivos mayores la homoplasia representa un riesgo debido a su alta tasa evolutiva. De esta forma, los SSR contribuyen a identificar tanto las ESU y MU, idealmente en combinación con otro tipo de marcadores moleculares (por ejemplo: genes mitocondriales) para mejorar la identificación de ESUs (Chistiakov *et al.* 2006).

Por otro lado, los SSR también tienen sus aplicaciones en los emprendimientos de mejoramiento genético, utilizados como herramienta en análisis de paternidad, análisis de trazabilidad en productos pesqueros, elaboración de mapas de ligamiento y estudios de asociación con caracteres de interés (Chistiakov *et al.* 2006). A su vez, los SSR permiten detectar híbridos e incluso una estimación de la introgresión (Vera *et al.* 2012), esto tiene su implicación en la conservación de la diversidad genética, por ejemplo, en eventos de translocación de una población a otra y la posibilidad de que estas hibriden.

1.6. Hipótesis

El complejo de especies *R. cf. quelen* en el Uruguay está compuesto por diferentes linajes genéticos estructurados y asociados a la evolución histórico-geológica de las cuencas.

1.7. Objetivo General

Realizar un análisis filogeográfico de *R. cf. quelen* en el Uruguay en el contexto de la región Neotropical, a los efectos de identificar la existencia de diferentes linajes genéticos y la estructura poblacional asociada a las cuencas del país.

1.7.1. Objetivos específicos

- Realizar un análisis filogenético de *R. cf. quelen* enfocados en las cuencas del Uruguay, respecto al contexto macrogeográfico de la especie en la región Neotropical mediante secuencias de *citocromo b* mitocondrial.
- Realizar un análisis poblacional macrogeográfico en las grandes cuencas del Uruguay, utilizando secuencias del gen *citocromo b* mitocondrial.
- Identificar posibles unidades evolutivamente significativas para la conservación de *R. cf. quelen* en el Uruguay mediante la utilización de secuencias de *citocromo b* mitocondrial
- Realizar un análisis poblacional a nivel microgeográfico en tres lagunas costeras de importancia pesquera en Uruguay, utilizando secuencias de *citocromo b* mitocondrial y microsatélites, para evaluar su aplicación a la discriminación de unidades de manejo y conservación (MUs) o “stocks” a nivel microescala.
- Proponer en base a estos análisis pautas para la conservación de la diversidad de poblaciones naturales de la especie en Uruguay.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestreo macrogeográfico de *R. cf. quelen* en las cuencas de Uruguay

Un total de 171 individuos de bagre negro *R. quelen*, fueron colectados de 18 localidades distribuidas dentro de las cinco grandes cuencas del Uruguay: Cuenca del Río Uruguay, del Río Negro, Río de la Plata, Laguna Merín, y ríos y arroyos de la cuenca del Océano Atlántico (Figura 4, Anexo I). Es de destacar que la localidad de Villa Constitución corresponde a las instalaciones de la DINARA (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos; <http://www.dinara.gub.uy>), estos individuos son de origen cultivado con una población fundadora de origen diverso. El tamaño muestral disponible por localidad osciló entre 1 y 65, con una media de 18 a nivel global y un promedio por cuenca hidrográfica de aproximadamente 34 individuos. En las localidades de Laguna del Sauce (65), Laguna de Rocha (39) y Laguna Castillos (40), dónde fue posible realizar un mayor esfuerzo de muestreo, se abordó un análisis poblacional a nivel microgeográfico. Las muestras de tejido (músculo, hígado o aleta adiposa) fueron fijadas en Etanol 95% y conservadas en el Laboratorio de Genética Evolutiva en Modelos Animales en la Sección Genética Evolutiva, Universidad de la República.

2.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de aproximadamente 20 miligramos de músculo o aleta adiposa. El protocolo utilizado se basa en una modificación del publicado por Medrano *et al.* (1990). Éste consiste en la precipitación con alta concentración salina y Etanol absoluto en frío. El mismo comienza con dos lavados de 1ml de buffer STE 1X (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM EDTA pH 8; 1% SDS y 100mM NaCl) pH 8 en frío (4 °C). A continuación, se le agrega 550µl de tampón de lisis pH 8 (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 1% SDS y 100mM NaCl) y 11µl de Proteinasa K (10mg/ml). Posteriormente, el tejido es homogeneizado mecánicamente y se deja incubando toda la noche en estufa a 55°C. Una hora antes de finalizar la incubación se le agrega 7µl de ARNasa (10mg/ml). Finalizada la incubación, se centrifuga por 10 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante es transferido a otro tubo y se le agrega 200µl de NaCl 5M para una concentración final de NaCl 2M y se centrifuga por 30 minutos a

12.000 rpm (a temperatura ambiente). El sobrenadante resultante, ya sin proteínas, es transferido nuevamente a otro tubo para luego agregarle el doble de volumen de Etanol absoluto en frío. Se homogeniza manualmente de forma lenta las dos fases, y se deja precipitando el ADN por 48 horas a 4°C. Posteriormente, la muestra se centrifuga durante 30 minutos a 12.000 rpm (a temperatura ambiente). A continuación, se elimina el sobrenadante y se realizan dos lavados del precipitado con Etanol 70%, luego de cada lavado se realiza una centrifugación de 5 minutos a 6.000 rpm y se elimina el sobrenadante. El precipitado se deja secando durante una hora en estufa a 55 °C, luego se resuspende en 100µl de buffer TE 1X (10mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA) y finalmente, luego de un baño a 65°C durante 20 minutos, se conservan a – 20 °C.

La calidad del ADN extraído se testeó mediante migración electroforética en gel de agarosa (Sigma) 1% en buffer TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1L): 242 g de Tris-base, 57,1ml de ácido acético glacial y 10ml de 0,5 M EDTA pH 8), conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 5µl/100ml. Se mezclaron 5µl del ADN genómico extraído con 2µl de tampón de carga (0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF y 30% Glycerol en agua). La electroforesis se realizó durante 40 minutos a 80 V. Todas las soluciones y los reactivos utilizados fueron preparados según Sambrook *et al.* (1989).

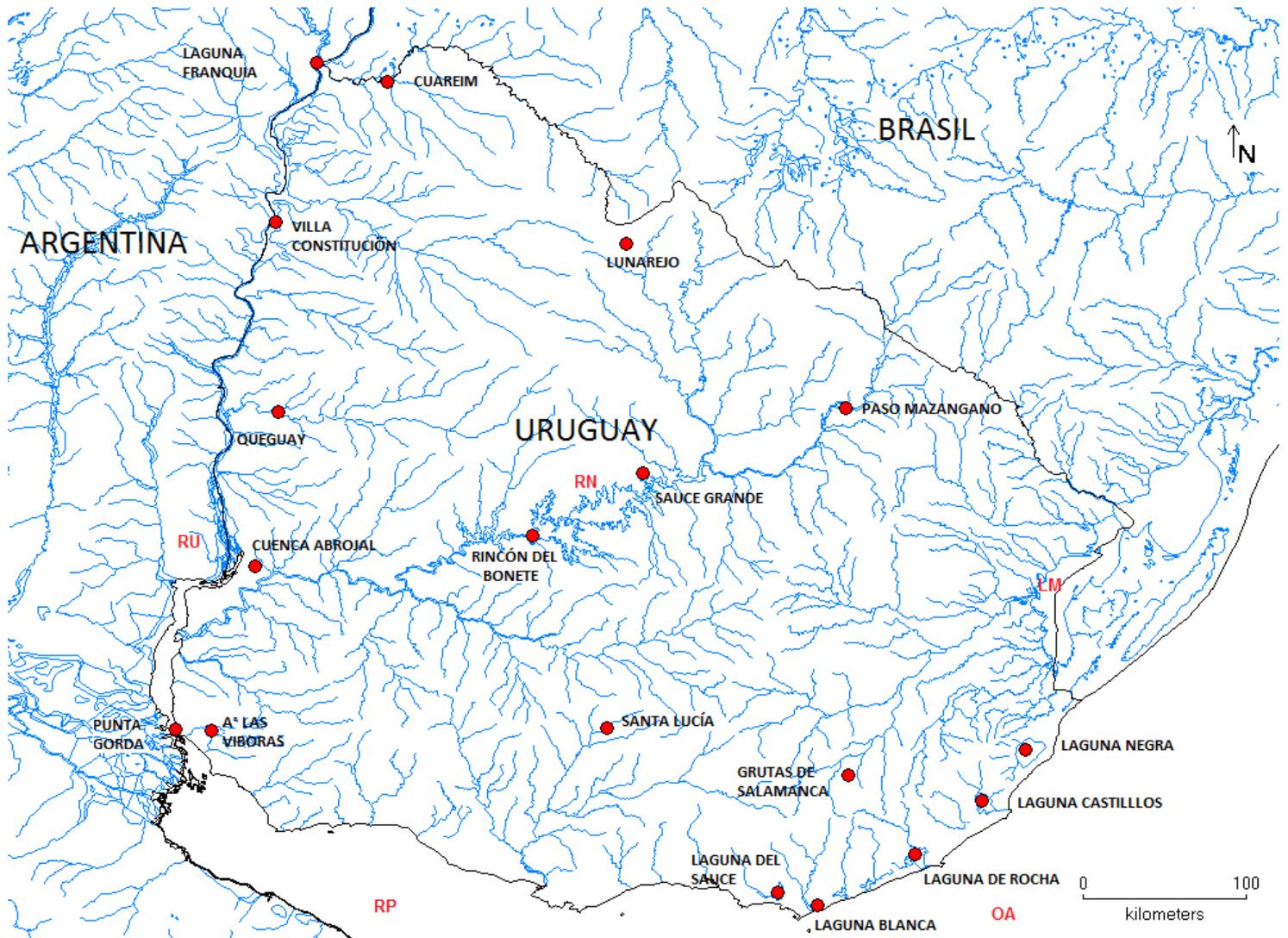


Figura 4. En el mapa se señalan las 18 localidades muestreadas en las cinco regiones hidrográficas del Uruguay (en rojo): Río Uruguay (RU), Río Negro (RN), Laguna Merín (LM), Río de la Plata (RP), Océano Atlántico (OA).

2.3. Amplificación parcial del gen *citocromo b*

La amplificación del fragmento de interés se realizó mediante la técnica de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Para esto, se utilizaron oligonucleótidos universales para amplificar el *citocromo b* de peces, *Gludg-L* y *Cb6-H* (Tabla I), publicados por Palumbi *et al.* (1991). El fragmento amplificado esperado empleando estos oligonucleótidos es de aproximadamente 1.200 pb.

Tabla I. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *citocromo b*.

Oligonucleotídica	Secuencia nucleotídica
<i>Gludg-L</i>	5' TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG 3'
<i>Cb6-H</i>	5' GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC 3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador automático (PTC-100, MJ Research, Inc.). Para un volumen de 20µl se utilizaron 30ng del ADN genómico extraído de las muestras analizadas de *R. quelen*. La mezcla de la reacción de un volumen final tiene la siguiente composición: buffer 1X, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,15mM, de *CB6-H* y *Gludg-L* 0,25µM y 1,0 unidades de polimerasa Taq (Invitrogen). El programa utilizado consiste en un primer paso de desnaturalización de 94 °C por 5 minutos. Luego 30 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, annealing/pegado de oligonucleótidos, a 45 °C durante 1 minuto y tercero la extensión a 72 °C por 1: 30 min. Por último, 10 minutos de extensión final a 72 °C.

2.4. Secuenciación

Los productos amplificados del marcador citocromo b para todos los individuos analizados, se enviaron a purificar y secuenciar a un Servicio de secuenciación automático (Macrogen Inc., Corea).

2.5. Análisis de secuencias del gen *citocromo b*

Para el análisis de secuencias se incluyeron, además de las secuencias del marcador mitocondrial citocromo b generadas en este trabajo, otras secuencias disponibles en GenBank para el género *Rhamdia* (Anexo II y III). Como grupo externo se utilizaron secuencias del género *Pimelodella* (Anexo III), el cual ha sido utilizado con este fin en análisis previos de *Rhamdia* (Perdices *et al.* 2002).

2.5.1. Alineamiento de secuencias del gen *citocromo b*

El alineamiento de 198 secuencias (166 secuencias originales de *R. quelen*, más 26 secuencias obtenidas del GenBank de esta especie, otras especies de *Rhamdia* y del género *Pimellodella*; Anexo II) se implementó en el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Para el análisis de secuencias múltiples este programa realiza una búsqueda heurística que comienza alineando aquellas secuencias con mejor “score” (puntuación) de alineamiento, así hasta añadir todas las secuencias. Por lo que el algoritmo de este programa se basa en una matriz de distancia entre los “scores” de alineamiento, que son calculados mediante los parámetros de alineamiento configurados. A su vez, confecciona un árbol de distancia, basado en el método de Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987), que es utilizado como guía para el alineamiento global.

2.5.2. Análisis de diversidad del marcador *citocromo b*

Se contabilizó el número de sitios polimórficos para los 176 individuos de *R. cf. quelen*. Además, se calculó la diversidad nucleotídica como el promedio de las diferencias pareadas a través de la fórmula:

$$\hat{\pi} = \sum_{ij} \chi_i \chi_j \pi_{ij}$$

donde χ es la frecuencia del individuo y π es la proporción de diferentes nucleótidos entre los individuos i y j (Nei 1987).

En el análisis de ADN mitocondrial se usa el término haplotipo para referirse a la secuencia haploide de este ADN. Dentro de una población puede encontrarse varios haplotipos que son definidos como una combinación de alelos que son heredados juntos. En este sentido, se relevaron los haplotipos representados dentro de las secuencias pertenecientes a dicho complejo y se estimó la diversidad haplotípica mediante la siguiente ecuación:

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

donde n es el número de copias en la muestra y X es la frecuencia haplotípica del haplotipo i -ésimo, esta fórmula es una modificación de la ecuación de Nei (1987) (Librado & Rozas 2009). Los sitios polimórficos, la diversidad nucleotídica, la identificación de haplotipos y la diversidad haplotípica fueron calculados mediante el programa DNAsp v5 (Librado & Rozas 2009).

Con el fin de analizar la saturación en el marcador mitocondrial, se realizó el análisis de distancias dentro del género *Rhamdia* según el modelo Kimura 2 parámetros (K2P, Kimura 1980). El modelo K2P asume diferentes tasas de transiciones y transversiones que son calculadas a partir de la matriz de datos. Se calcularon las diferencias pareadas discriminando entre transiciones y transversiones. Además, se compararon las transiciones y transversiones tanto como para las primeras dos posiciones del codón, como para la tercera. Por último, se calculó la relación entre el número de sustituciones sinónimas (K_S , son aquellas mutaciones que no cambian el aminoácido codificado) y las no sinónimas (K_A , aquellas que sí producen un cambio en el aminoácido codificado). Las distancias genéticas fueron calculadas en el programa Mega 5 (Tamura *et al.* 2011), mientras que los valores de ambas sustituciones (K_S y K_A) fueron calculados en el programa DNAsp v5 (Librado & Rozas 2009).

2.5.3. Test de neutralidad en base a secuencias mitocondriales

Se implementaron dos test de neutralidad, "Tajima" y "Fu", con el fin de definir si nuestros datos se ajustan al modelo de neutralidad. El test de Tajima (Tajima 1989) asume el modelo de sitios infinitos y sin recombinación. El estadístico D se calcula en base al parámetro poblacional θ ($\theta=2N\mu$ para marcadores haploides, donde N es el tamaño poblacional y μ es la tasa de mutación neutral), el mismo se calcula a través de la comparación entre el parámetro calculado a partir del número de sitios polimórficos y el que se calcula a partir de la diversidad nucleotídica en los datos.

El test de Fu (1997) también asume sitios infinitos y ausencia de recombinación. El mismo se basa en la probabilidad de encontrar un número de alelos igual o menor al observado, realizando un muestreo al azar bajo la teoría neutral.

La significación de ambos estadísticos se calcula mediante la generación de muestras al azar utilizando una simulación basada en el modelo coalescente. Estos cálculos se realizan bajo el modelo de neutralidad y considerando una población en equilibrio.

2.6. Análisis filogenético de *R. quelen* en la región Neotropical

Con el fin de analizar las relaciones filogenéticas se han implementados tres métodos de construcción de filogenias: el método de Máxima Parsimonia (Eck & Dayhoff 1966) el cual no se basa en un modelo de evolución molecular; métodos basados en modelos de evolución molecular, el método de Máxima Verosimilitud (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) y coalescente.

2.6.1. Máxima Parsimonia

Se implementó la construcción filogenética basada en el criterio de máxima parsimonia, en donde el menor número de cambios es el que mejor explica la relación entre los *taxa* (Eck & Dayhoff 1966). Este método comienza con un alineamiento de las secuencias de cada taxón, y se trabaja con los sitios parsimoniosamente informativos (aquellos sitios donde hay más de un carácter que esté representado al menos dos veces en la muestra). Debido a que en el conjunto de datos de este trabajo se representa un número importante de *taxa* (>20) se utilizó una búsqueda heurística, ya que una búsqueda exhaustiva demandaría demasiado tiempo. Para adherir los *taxa* en la construcción del árbol filogenético se utilizó el algoritmo “Stepwise Addition Algorithm” (Swofford *et al.* 1996). Este algoritmo integra cada taxón a las distintas ramas, evaluando los árboles en cada adición, de forma que se continúa adhiriendo *taxa* al árbol más parsimonioso en la adición anterior. Cuando se forma el árbol provisional con todos los *taxa* se aplica el algoritmo “Tree Bisection and Reconnection”, generando nuevas topologías, cortando el árbol provisional y reconectándolo en las distintas ramas (Nei & Kumar 2000). El análisis filogenético basado en el método de Máxima parsimonia se realizó en el programa informático PAUP* v4.0 b10 (Swofford 2002). La estabilidad del árbol fue testeada con 100 pseudoréplicas del test de bootstrap (Felsenstein 1985), un método estadístico de muestreo de reposición al azar.

2.6.2. Modelo evolutivo de ajuste al conjunto de datos mitocondriales

El programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998) fue utilizado con el fin de seleccionar el modelo que mejor se ajuste a nuestro *set* de datos. Basados en el criterio de información de Akaike (Akaike 1974), el que compara simultáneamente entre 56 modelos anidados y no anidados tomando en cuenta la verosimilitud del modelo y los parámetros del mismo, el modelo elegido fue el TIM+I+G (-lnL=6152,6). Sin embargo, el modelo utilizado fue el segundo elegido por este método (-lnL=6150,9) el GTR (“General Time Reversible”, Lanave *et al.* 1984), ya que los programas utilizados (PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel 2003) y BEAST v 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007)) no están en los parámetros por defecto la utilización del modelo TIM.

El modelo GTR es un proceso estacionario de Markov en el que las distintas probabilidades de sustituciones son expresadas mediante una matriz. Este modelo define la probabilidad de sustitución para un tiempo infinitesimal mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{P}(t+dt) = \mathbf{P}(t) (\mathbf{I} + \mathbf{R}dt)$$

donde I es la identidad y R es la matriz con las tasas de sustitución instantánea. A su vez, tanto Lanave *et al.* (1984) y Rodríguez (1990) han demostrado que mediante la siguiente ecuación se puede calcular la probabilidad de sustitución entre cualquier estado:

$$\mathbf{P}(t) = e^{\mathbf{R}t}$$

2.6.3. Máxima Verosimilitud

El método de máxima verosimilitud (ML, del inglés Maximum Likelihood) fue diseñado en principio por Cavalli-Sforza & Edwards (1967) para el análisis de frecuencias genéticas y retomado por Felsenstein (1981), desarrollando un algoritmo para el análisis de secuencias. Este método maximiza la verosimilitud dado el conjunto de secuencias y basado en un modelo de evolución, por lo que la topología elegida como correcta será aquella con mayor verosimilitud, usualmente escrita como $L = P(\text{data}|\text{tree})$ (Nei & Kumar 2000; Graur & Li 2000).

El análisis de máxima verosimilitud se realizó mediante el programa PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel 2003). Para dicho análisis se utilizó el algoritmo de “Nearest neighbor interchanges” (intercambio de vecinos cercanos) para refinar el árbol obtenido mediante BioNJ y obtener el árbol punto de partida. Este método realiza una serie de intercambios entre las ramas mientras el árbol se está construyendo y una vez finalizada la inserción de todos los *taxa* (Guindon & Gascuel 2003). Mientras que el test estadístico aLRT (Anisimova & Gascuel 2006) fue implementado para el soporte de las ramas, este test es similar al bootstrap y más rápido de implementar que el test de pseudoréplicas. Las distintas aproximaciones pueden variar sus resultados, sin embargo, estos suelen estar altamente correlacionados (Dereeper *et al.* 2008).

2.6.4. Coalescente

La teoría del coalescente fue descrita originariamente por Kingman (1982), nombrada como n-coalescente y se basa en una cadena de Markov de tiempo continuo de un conjunto de estados finito. El coalescente es un modelo retrospectivo de la genética de poblaciones que permite construir genealogías de genes incorporando los principios de la genética Mendeliana. Este modelo se basa en la idea de que todas las copias de genes presentes en la muestra descienden de una única copia del gen. A su vez, el coalescente asume que los linajes muestreados en el conjunto de datos son una muestra tomada al azar de la generación anterior. El árbol de coalescencia, a diferencia de las filogenias, se enraíza a través de la datación de los distintos nodos no enraizados a través del uso de un grupo externo (Hein *et al.* 2004).

En este trabajo se implementó una aproximación bayesiana para la inferencia filogenética del coalescente. El método bayesiano se asemeja al método de ML, sin embargo, la aproximación bayesiana tiene como supuesto que la hipótesis o topología más correcta es aquella que maximiza la probabilidad *a posteriori* (Holder & Lewis 2003). Dicha probabilidad es proporcional a la verosimilitud por la probabilidad *a priori*. Como en el caso del método de ML, el bayesiano también se basa en un modelo evolutivo que contribuye al cálculo de la probabilidad *a posteriori*. El modelo correcto, debe tener el número correcto de parámetros, ya que esto está directamente relacionado con la distribución de la probabilidad posterior (Buckley 2002). Las cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) son la principal herramienta en el análisis bayesiano, ya que a través de un esquema de muestreo de simulaciones estocásticas proporciona una aproximación a dicha probabilidad. Las MCMC permiten saltar entre valles permitiendo acceder no solo a todo lo largo de la distribución de la verosimilitud sino que también puede acceder a aquellos picos más altos (Avisé 2000).

La topología basada en el análisis bayesiano fue obtenida mediante el paquete informático BEAST v 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007), el que permite obtener una filogenia calibrada, esto es un árbol enraizado incorporando una escala temporal.

Se ejecutaron 2 diferentes análisis en este programa siguiendo los siguientes parámetros: asumiendo el modelo de árbol *a priori* "Yule process", ya que éste se ajusta a los árboles a nivel de especies, y a una tasa constante de especiación para todos los linajes. El modelo evolutivo utilizado fue el GTR, con distribución gamma con cuatro categorías y sitios invariables. La longitud de las cadenas para las 2 ejecuciones del programa fue de 120 millones de pasos, este número es el adecuado para el análisis de más de 100 secuencias. La convergencia de las MCMC en una distribución estacionaria para todos los parámetros fue testada mediante el programa TRACER v1.5 (Rambaut & Drummond 2011). El programa TREEANNOTATOR v1.6.2 (Rambaut & Drummond 2011) fue implementado para obtener el árbol consenso, para eso se utilizó un 10% como burn-in de los 20.000 árboles, utilizando el resto para la búsqueda de dicho árbol. Para la primera carrera del programa se utilizó el reloj molecular estricto, que asume una misma tasa evolutiva para todos los linajes; mientras que para la segunda se asumió un reloj molecular relajado de distribución Log-Normal, que

permite variaciones en la divergencia entre las ramas (Drummond *et al.* 2006). La tasa evolutiva utilizada para el cálculo del tiempo de divergencia del ancestro común más reciente (tMRCA) fue de 1,5 % por millón de años, ésta ha sido utilizada previamente en el género *Rhamdia* en el análisis de secuencias de *citocromo b* (Perdices *et al.* 2002).

2.6.5. Distancia genética entre grupos

Con el fin de conocer la distancia genética entre los distintos clados encontrados en *R. quelen*, y compararla con la presentada por las especies de *Rhamdia trans-andina* y con el género *Pimelodella*, se calcularon las distancias corregidas por el modelo Kimura 2 parámetros en el programa Mega5 (Tamura *et al.* 2011), ya que este programa no presenta modelos más complejos que se ajusten a nuestro conjunto de datos para este tipo de análisis.

2.7. Análisis poblacional en base a datos de ADN mitocondrial en las cuencas de Uruguay

El análisis poblacional se basó en el marcador mitocondrial *citocromo b*, analizando 166 secuencias, agrupadas en 16 poblaciones, acorde a las localidades de origen: Colonia (río Uruguay bajo), Rincón del Bonete, Paso Mazangano, Sauce Grande, Talita, Maldonado (Grutas de Salamanca), Laguna del Sauce, Laguna Castillos, Laguna Blanca, Laguna Negro, Laguna de Rocha, estación de Villa Constitución, cuencas del Cuareim, Queguay, Lunarejo y Abrojal.

2.7.1. Análisis de demografía histórica: “Mismatch distribution”

Bajo la teoría de la coalescencia, este análisis utiliza la diversidad molecular encontrada en el conjunto de datos para evidenciar fenómenos demográficos en la evolución del taxón estudiado. En este sentido, la expansión puede ser evidenciada por una filogenia con forma de estrella, una distribución unimodal cuando se analizan las diferencias pareadas, la reducción en el número de sitios segregantes o alto número

de mutaciones de baja frecuencia. Mientras que fenómenos de cuellos de botella o reducción poblacional suelen presentar las características opuestas a la expansión poblacional (Schneider & Excoffier 1999). Con el fin de testear si nuestro conjunto de datos se ajusta a un modelo de expansión demográfica se utilizó el programa Arlequin ver 3.0. (Excoffier *et al.* 2005). Este programa implementa el método de Schneider & Excoffier (1999) para calcular los parámetros de expansión poblacional mediante el método no lineal de mínimo cuadrado. Se han implementado 100 pseudoréplicas de “bootstrap” para calcular el intervalo de confianza para dichos parámetros bajo el modelo de coalescencia. Adicionalmente, se realiza un test basado en la suma del cuadrado de la desviación (SSD, del inglés, “Sum of Square Deviations”) de los parámetros observados con respecto a los obtenidos mediante la reestimación a partir de simulaciones realizadas partiendo de los parámetros calculados y asumiendo que se trata de una población de tamaño estable. Por último, se calculó el índice de irregularidad (r) de Harpending (1994). Este índice toma valores altos cuando existe una distribución multimodal, lo que está asociado con poblaciones estables, mientras que valores más bajos están asociados a expansión.

2.7.2. Red de haplotipos

El paquete informático NETWORK v.4.6.0.0 (Bandelt *et al.* 2004) fue utilizado para confeccionar la red de haplotipos. Este programa utiliza el método de Máxima Parsimonia, para dicho análisis se utilizó el algoritmo “median-joining” (MJ), ya que permite más de una sustitución en un mismo sitio.

2.7.3. Análisis de estructuración poblacional

Se calculó el estadístico análogo (Φ) al estadístico de F_{ST} (Wright 1951), el componente relativo de diferenciación genética interpoblacional para el conjunto de marcadores analizados, oscilando de 0-1 (ausencia-máxima diferenciación).

El estadístico se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$F_{st=i} = \frac{1}{n} \left[\frac{1}{P-1} \text{SSD}(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} \text{SSD}(WP_i) \right] \sigma_T^2$$

dónde n es el número de copias del haplotipo en la población- i , P es el número de poblaciones, N es el número de haplotipos, SSD es la suma de los cuadrados de las desviaciones entre poblaciones (AP) y SSD es la suma de los cuadrados de las desviaciones dentro de las poblaciones (WP) (Excoffier *et al.* 2005).

2.7.4. Análisis molecular de la varianza

Con el fin de estimar el patrón de estructura poblacional para nuestro conjunto de datos realizamos el análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa Arlequin ver 3.0. (Excoffier *et al.* 2005), evaluando la varianza haplotípica y el número de mutaciones entre haplotipos. El mismo analiza la varianza en el conjunto de datos de la frecuencia haplotípica y el número de mutaciones entre haplotipos. Los haplotipos fueron previamente definidos en base a los resultados del programa DNAsp v 5 (Librado & Rozas 2009). La significación de los componentes de la varianza se calcula mediante 1000 permutaciones no paramétricas.

2.7.5. Aislamiento por distancia

Con el fin de testear si el aislamiento genético medido a través del estadístico F_{ST} se relaciona con las distancias geográficas, se realizó un test de Mantel (Mantel 1967). Este análisis busca si hay correlación entre dos matrices de datos, y a través de permutaciones calcula la significación de dicha correlación. Este test se realizó mediante el programa Mantel Non-parametric Test Calculator 2.0 (Liedloff 1999).

2.8. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras del Uruguay mediante *loci* microsatélite y secuencias del gen *citocromo b*

El análisis a microescala se concentró en tres localidades que se corresponden con las Lagunas Castillos, Laguna del Sauce y Laguna Rocha siendo éstas las más representadas en el conjunto de datos. Para este análisis se analizaron 126 secuencias de *citocromo b* y 67 individuos genotipados para los cinco *loci* de tipo microsatélite.

2.8.1. Amplificación por PCR de los *loci* microsatélite

Mediante la técnica de PCR, siguiendo las condiciones para la mezcla de la reacción que se utilizaron para amplificar el gen mitocondrial (ver apartado 2.3), se amplificaron cinco *loci* de tipo microsatélite (Tabla II), en las localidades de Laguna del Sauce, Laguna de Rocha y Laguna Castillos (Anexo I), ya que éstas tienen mayor representación muestral en el conjunto de datos. A su vez, dichas lagunas son de importancia socio-económica al representar una fuente de sustento para las localidades de pescadores artesanales asociadas a estas lagunas. El panel de *loci* microsatélite incluyó dos marcadores aislados originalmente en la especie *Pimellodella chagresi* (PC17 y PC97; Moeser & Bermingham 2005). Otros dos *loci*, que fueron aislados en la especie *Pseudoplatystoma corruscans* (Pcor y Pcor2) y han mostrado polimorfismo en cuatro especies de la familia Pimelodidae (Revaldaves *et al.* 2005); y un quinto microsatélite aislado específicamente en *R. quelen* (*locus* Rh1; Ribolli & Zaniboni-Filho 2009). Estos marcadores han demostrado su utilidad para realizar análisis poblacionales en muestras de *R. quelen* procedentes de Brasil (Ribolli & Zaniboni-Filho 2009). Para poder observar los fragmentos amplificados se utilizaron oligonucleótidos marcados con un fluoróforo (FAM y HEX) en el cebador sentido. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de interés se detallan en la Tabla II. El programa para la amplificación constó de un primer paso de desnaturalización de 94 °C por 3 minutos. Luego 30 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, annealing/pegado de oligonucleótidos, a 50 °C durante 1 minuto y tercero la extensión a 72 °C por 1 minuto. Por último, 10 minutos de extensión final a 72 °C.

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores de PCR para loci microsatélite, motivo de repetición y fluoróforos de marcaje utilizados en el genotipado mediante secuenciador automático.

<i>Loci</i>	Secuencia de los oligonucleótidos	Motivo	Fluoróforo
Pcor1-F	AAACCCGAGGATAACCAGTC	(TC) ₉ GC(TC) ₉	FAM
Pcor1-R	CAGCGTGCTACTAACACAAAC		
Pcor2-F	GATATGCAAATAAGAAGGTC	AG ₁₉	HEX
Pcor2-R	TCTTCTGGCTTTTCC*TCCTCT		
Pc17-F	CACGACGTTGTAAAACGAC	(CA) ₂₁	FAM
Pc17-R	AGGTATGCGGAACACTGACC		
Pc97-F	CACGACGTTGTAAAACGAC	(CA) ₁₄	FAM
Pc97-R	GGAACAGTGAGAGCGGAGAC		
Rh1-F	TTACTCGGGATACGATGC	Desconocido	HEX
Rh1-R	TTGTCAGAGTGCCAAAGG		

2.8.2 Genotipado de *loci* microsatélite

Los fragmentos amplificados para cada uno de los 5 microsatélites en el total de individuos analizados fueron enviados a un Servicio Comercial de Genotipado (Macrogen Inc., Corea) para la obtención de los electroferogramas a través de la migración en electroforesis por capilares en un secuenciador automático ABI 3730XL (*Applied Biosystems*). Posteriormente, los electroferogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa informático PEAKSACANNER ver 1.0 (*Applied Biosystems*) para el genotipado de *loci* microsatélite según el tamaño del fragmento amplificado.

2.8.3. Análisis de datos de marcadores microsatélite

2.8.3.1. Evaluación de genotipado (de errores de genotipado y alelos nulos)

Debido a la mayor eficiencia de la PCR en amplificar fragmentos más cortos, se sabe que cuando un individuo es heterocigota el alelo más corto presenta un mayor número de copias que el alelo más grande, esto es conocido como dominancia del alelo más corto (este fenómeno suele denominarse en inglés como “dropout”) (Van Oosterhout *et al.* 2004). Cuando los individuos presentan altas diferencias de tamaño, el alelo de mayor tamaño puede no ser amplificado o llevar a dificultades en el genotipado. Adicionalmente, el genotipado puede revelar error de tartamudeo (“stuttering”), sobre todo en alelos con varias repeticiones, lo que acrecienta la probabilidad del deslizamiento de la polimerasa sobre el motivo de repetición. El error de tartamudeo suele resultar problemático al genotipar individuos heterocigotas, dónde el tartamudeo de un alelo se superpone con el otro. Otro problema que surge en el amplificado de microsatélites es la presencia de alelos nulos, estos son alelos que no se pueden amplificar debido a mutaciones en la secuencia de pegado del “primer”. Con el fin de testear la presencia tanto de alelos nulos como de errores de genotipado (“dropout” y “stuttering”) se utilizó el programa Micro-Checker v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Este programa además permite calcular la frecuencia de alelos nulos según la siguiente ecuación de Chakraborty *et al.* (1992):

$$r = ((H_e - H_o) / H_e) / (2 - ((H_e - H_o) / H_e)).$$

2.8.3.2. Test de Hardy-Weinberg

En el programa Genepop v4.1 (Rousset 2008) se realizó el test de ajuste a condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg, con hipótesis nula de tamaño población grande, apareamiento de gametos al azar (panmixia), ausencia de selección, mutación y migración. El algoritmo aplicado se basa en la cadenas de Markov para estimar el valor de probabilidad P y su error estándar (Rousset 2008). Como ya hemos mencionado, éste es un proceso de simulaciones estocásticas que explora la distribución de P. En este caso la cadena de Markov comienza con un periodo de desmemorización 10.000, el que permite que el proceso sea independiente del estado inicial. Luego este proceso

se dividió en 20 lotes (“batches”) de 5.000 iteraciones, en el que cada uno estima un valor de P derivado de la proporción del tiempo que la cadena pasa “visitando” la muestra, estos valores son utilizados para calcular el error estándar de P. A su vez, se realizó el test de Fisher en el mismo programa con el fin de testar el ajuste a las condiciones equilibrio de Hardy-Weinberg al conjunto de cinco *loci*. Este test utiliza una distribución de χ^2 para el cálculo del valor de P, donde valores de P menores a α (0,05) indican que se rechaza la hipótesis nula, por tanto los datos no se ajustan a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg.

2.8.3.3. Test de desequilibrio de ligamiento

En el programa Genepop v4.1 (Rousset 2008) también se implementó un test de desequilibrio de ligamiento entre pares de *loci* (hipótesis nula: “Los alelos de un *locus* son independientes del otro *locus*”). Con este fin, el programa elabora una tabla de contingencia entre los genotipos de cada *locus* y luego utiliza un algoritmo basado en cadenas de Markov para calcular el valor de P (Rousset 2008). El valor P es obtenido mediante cadenas de Markov de igual manera que el test de equilibrio de Hardy-Weinberg. Las cadenas de Markov se configuraron con una desmemorización de 10.000, 100 lotes de 5.000 iteraciones.

2.8.3.4. Análisis de la diversidad genética en marcadores microsatélites

A partir del conjunto de datos genotípicos de los cinco *loci* microsatélites ensayados (Tabla II) se obtuvieron las frecuencias alélicas y se calcularon varios estimadores de diversidad genética: Número medio de alelos por locus (N_A), Heterocigosis esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (H_e), Heterocigosis observada (H_o) y el contenido de información polimórfica (PIC) basado en la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

donde p_i y p_j es la frecuencia del alelo i y j respectivamente, mientras que n es el número de alelos.

La Heterocigosis esperada, Heterocigosis observada y el contenido de información polimórfica fue calculada en el programa Cervus (Kalinowski *et al.* 2007).

Adicionalmente, se calculó la riqueza alélica por población y en total mediante la siguiente fórmula (Mousadik and Petit 1996):

$$\hat{r}(g) = \sum_i \left[1 - \frac{\binom{N - N_i}{g}}{\binom{N}{g}} \right]$$

donde $r(g)$ es el número de alelos en la población de tamaño g , N_i es el número de alelos i muestreados dentro de N , el número de alelos muestreados. Este parámetro tiene como virtud que es independiente del tamaño muestral por lo que permite comparar muestras de distinto tamaño. El cálculo de la riqueza alélica se realizó en el paquete informático Fstat v1.2 (Goudet 1995)

2.8.3.5. Análisis de estructuración poblacional en los marcadores nucleares

En el programa Fstat v1.2 (Goudet 1995) también se calculó el estadístico F_{ST} (Wright 1951),

$$F_{ST} = \frac{a}{a+b+c},$$

en el que a es el componente de la varianza observado entre poblaciones, b entre individuos dentro de poblaciones y c entre gametos dentro de individuos (Weir & Cockerham 1984), a diferencia de otros autores, éstos integran a las ecuaciones parámetros como el tamaño de la muestra, frecuencia de heterocigotos y número de poblaciones. Por otro lado, mediante el análisis molecular de la varianza se estudió la estructura poblacional entre las tres poblaciones analizadas, basados en el conjunto de datos de los marcadores nucleares. Este análisis fue implementado en el programa Arlequin ver 3.0. (Excoffier *et al.* 2005).

2.8.3.6. Análisis Bayesiano de la estructura poblacional

Este análisis se aplicó para evaluar cuántas poblaciones existen independientemente de las localidades geográficas de muestreo; esto es importante cuando existen poblaciones crípticas o subpoblaciones. Para ello se utilizó el programa Structure (Pritchard *et al.* 2000). Este programa permite delimitar los individuos que integran cada población asignándole la probabilidad de pertenecer a cierta población. Esta aproximación se basa en un método bayesiano de “cluster” basado en el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones y asumiendo equilibrio de ligamiento, es decir, independencia de los *loci*. Las distintas ejecuciones en dicho programa se realizaron permitiendo al programa que puedan existir individuos con componentes genéticos de más de una población. Este programa utiliza una aproximación a través de cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) para conocer la distribución de $P(X|K)$. En este análisis, se aplicó un calentamiento (*burn-in*) de 50.000 iteraciones para que la estimación de la distribución de P sea independiente del estado inicial y 100.000 repeticiones después del “burn-in”.

2.8.3.7. Distancias genéticas en base a marcadores microsatélite

El análisis de las frecuencias alélicas es utilizado comúnmente para poder discriminar relaciones entre especies hermanas o poblaciones a nivel intraespecífico. Para dicho fin existen varios métodos para el cálculo de distancia genética entre individuos/poblaciones y para la construcción de árboles que reflejen las relaciones genéticas interindividuales y/o poblacionales (Nei *et al.* 1983). La construcción del árbol que captura la relación entre los individuos fue realizado mediante el método de distancia “Neighbor joining” (Saitou & Nei 1987). Este método utiliza el principio de Mínima Evolución en la unión de cada vecino, lo que lo hace un método rápido a la hora de construir una topología (Nei & Kumar 2000). La construcción del árbol bajo este método comienza con una topología en forma de estrella y a continuación se unen los dos *taxa* que tengan el menor valor en la matriz de distancias. Luego se crea una nueva matriz donde los dos vecinos elegidos anteriormente se toman como un solo taxón, la unión de vecinos continúa hasta llegar a una topología binaria.

El cálculo de distancia se realizó basado en la siguiente fórmula:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}} \quad (\text{Nei et al. 1983})$$

D_A está basada en una distancia geométrica representada en una multidimensional hiperesfera e independiente de modelos de mutación. La distancia D_A ha sido testada por medio de simulaciones, demostrándose que es uno de los estimadores de distancias genéticas más eficientes en reconstruir la topología correcta, aunque es menos precisa en calcular el largo de las ramas (Takezaki & Nei 1996).

La construcción del árbol fue realizada en el programa informático Population 1.2.28 (Langella 1999).

2.8.4. Análisis microgeográfico del marcador mitocondrial

El análisis microescalageográfica consistió en el análisis de 62 secuencias de *citocromo b* procedentes de la Laguna del Sauce, 39 de Laguna Castillos y 24 de Laguna de Rocha.

2.8.4.1. Estudio de la diversidad de secuencias de *citocromo b*

Para este conjunto de datos se estimó el número de sitios segregantes, sitios parsimoniosamente informativos, distancias genéticas dentro del “set” de datos y la diversidad nucleotídica.

2.8.4.2. Análisis de estructuración poblacional mediante secuencias de *citocromo b*

El estadístico (Φ) análogo al F_{ST} (Wright 1951) fue calculado mediante la fórmula ya descrita entre las tres poblaciones analizadas a microescala geográfica. La significancia del estadístico fue calculada mediante 1.000 permutaciones. Por último, se realizó el AMOVA para evidenciar la estructura poblacional recogida por el marcador mitocondrial, entre las tres lagunas analizadas. El cálculo del estadístico F_{ST} y el AMOVA fueron realizados en paquete informático Arlequin ver 3.0. (Excoffier *et al.* 2005).

3. Resultados

3.1. Análisis de *R. cf. quelen* basados en el marcador mitocondrial en cuencas de la región Neotropical

En el presente trabajo se obtuvieron 167 secuencias del gen mitocondrial *citocromo b* de *R. cf. quelen*, con un largo total de 1043 pb. Se encontró un total de 237 sitios variables y 175 sitios parsimoniosamente informativos (Tabla III). A su vez, se ha encontrado una alta diversidad haplotípica, una relativamente baja diversidad nucleotídica y los dos test de neutralidad realizados mostraron valores negativos aunque sólo el test de Tajima resultó significativo.

En la Figura 5a se observa la diferencia entre las distancias corregidas por el modelo K2P, analizando por separado las transiciones y transversiones representados contra las distancias pareadas para todas las posiciones. Igualmente se puede observar que las transiciones superan a las transversiones, sin evidencias de saturación. Cuando observamos la Figura 5b encontramos una alta dispersión tanto al observar las transiciones como las transversiones. Mientras que la tercera posición rompe la relación entre transiciones y transversiones (Figura 5c), ya que a distancias mayores a 0,2 las transversiones superan a las transiciones, evidenciando saturación en esta posición. En cuanto a la relación K_A/K_S , ésta fue de 0,102, lo cual revela la existencia de selección purificadora en el fragmento analizado.

Tabla III. Parámetros estadísticos de diversidad genética de *R. quelen* Neotropical.

Pares de Bases	Sitios Variables	Sitios parsimoniosamente informativos	Número de Haplotipos	H	π (Desvío estándar)	Distancia K2P (Desvío estándar)	D (P)	Fs (P)
1043	237	175	85	0,803	0,01418 (0,00001)	0,012 (0,001)	-2,47 (P < 0,01)	-3,26 (P > 0,10)

Diversidad Haplotípica (H) (adaptada de Nei 1987); Diversidad Nucleotídica (π) (Nei 1987); Distancias genéticas ρ sin corregir. Estadístico D del test de Neutralidad de Tajima (1989); Estadístico Fs del test de Neutralidad Fu (1997).

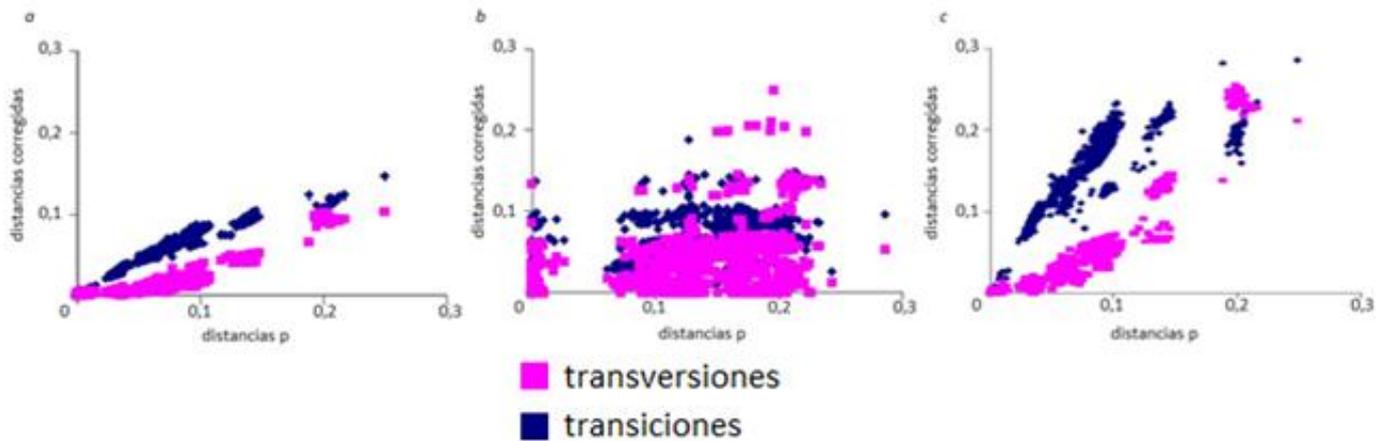


Figura 5. Análisis de saturación del gen *citocromo b*, a través del estudio de la relación entre las distancias corregidas, analizando por separado las transiciones y las transversiones, y las distancias pareadas sin corregir: (a) tomando en cuenta las tres posiciones del codón; (b) análisis de las primeras dos posiciones del codón; (c) de la tercera posición del codón.

3.2. Análisis filogenético

3.2.1. Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud

Las topologías obtenidas mediante MP (Figura 6) y ML (Figura 7) poseen estructuras similares. Ambas, permiten confirmar la monofilia del género *Rhamdia*, agrupando dos grandes clados con buen soporte que incluyen, por un lado, los *taxa* del género *Rhamdia cis-andino* y por el otro, los *Rhamdia trans-andinos*. Los bagres del clado *trans-andino* se agrupan en tres *taxas*: 1- *R. laticauda*, *R. rogersi*, *R. cabrerae*, *R. nicaraguensis*; 2- *R. guatemalensis* y *R. wagneri*; 3- *R. cinerascens*.

Dentro del grupo de los *cis-andinos*, nuestro grupo de interés, el análisis permitió diferenciar siete linajes de *R. quelen*. Estas topologías agrupan los siete linajes del grupo *cis-andino* en cuatro grandes clados (A- Rq1, Rq2 y Rq3; B- Rq4 y Rq5; C- Rq6; D- Rq7), donde A, B y C coalescen en una politomía basal conformando un clado hermano de D. Por lo que el grupo D conformado por individuos de la cuenca del Orinoco constituye el clado más basal de los *R. quelen cis-andino*.

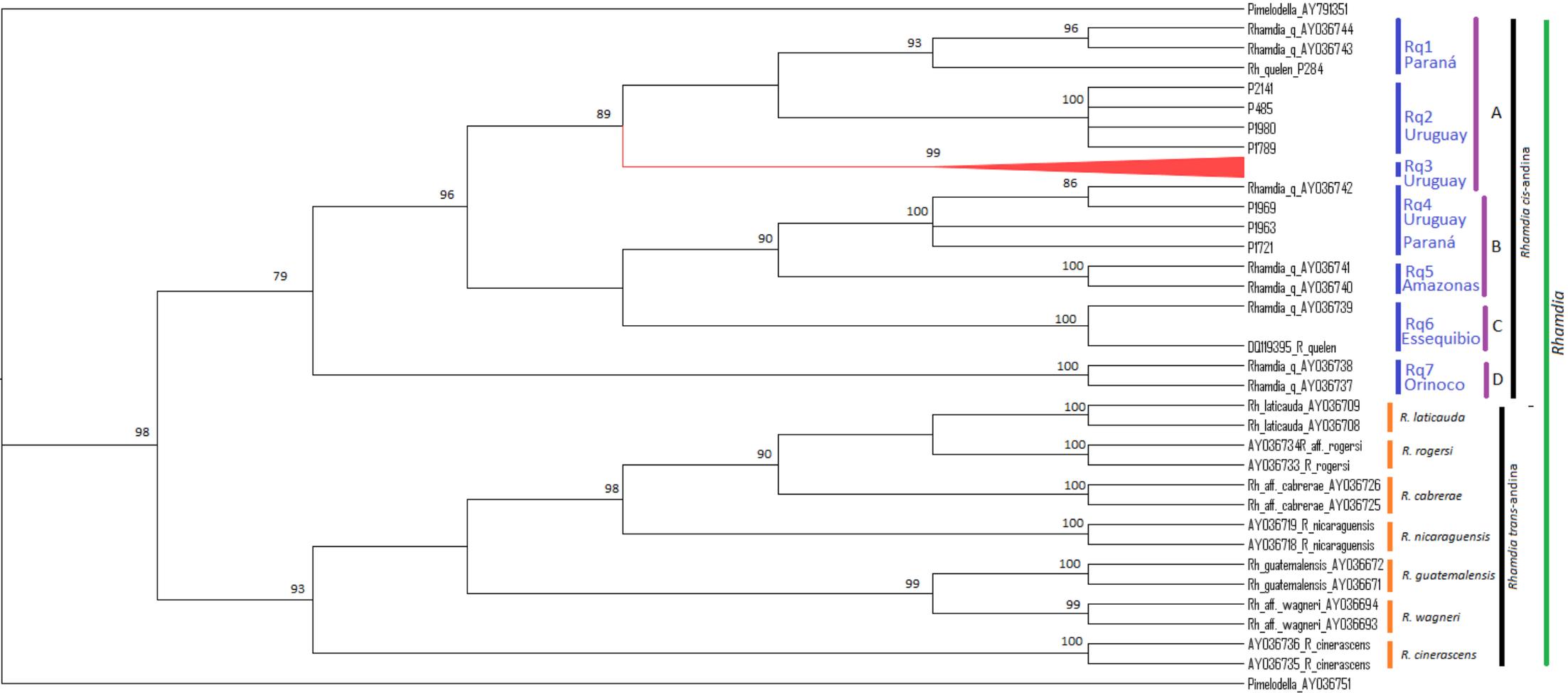


Figura 6. Topología obtenida a partir del método de Máxima parsimonia (MP), dicho árbol fue obtenido mediante el consenso estricto a partir de 397 árboles. El apoyo de los nodos corresponde al soporte estadístico obtenido mediante 100 pseudoréplicas de bootstrap. El grupo externo utilizado para enraizar dicho árbol fueron las secuencias del género *Pimelodella*. A la derecha se señalan linajes de *R. quelen* y su correspondiente cuenca de origen en azul, el resto de las especies de *Rhamdia* analizadas en naranja, en violeta los cuatro clados conformados por los linajes cis-andinos, en negro se agrupan las secuencias trans- y cis-andina. En verde se señala el taxa que agrupa los individuos de *Rhamdia*. El clado rojo agrupa muestras del Uruguay que se describen en el **Anexo I**.

Pimelodella_AY791351

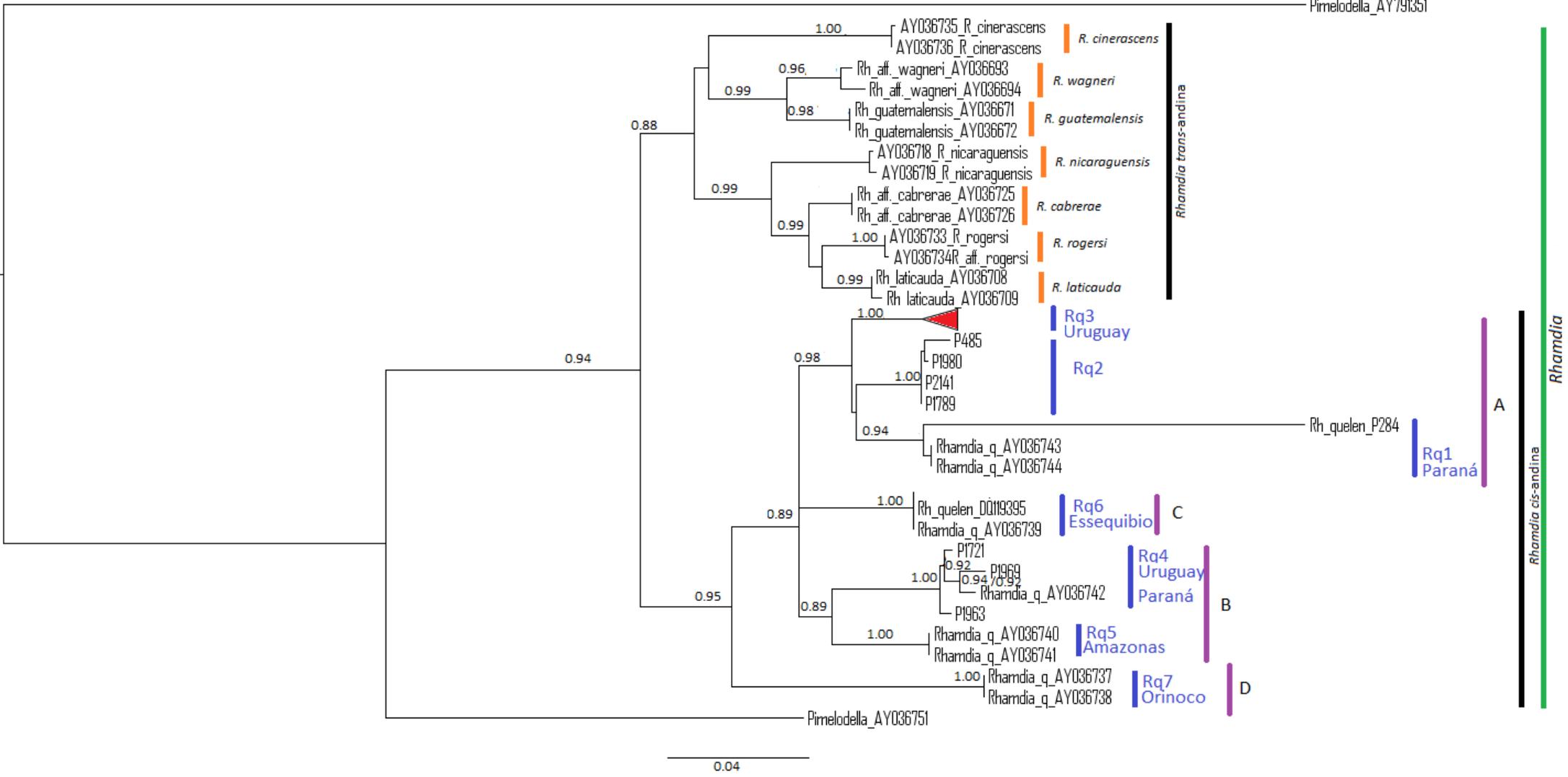


Figura 7. Topología resultante del análisis de máxima verosimilitud, el largo de las ramas es proporcional a la distancia. El soporte de los nodos corresponde a la probabilidad de aLRT. A la derecha se señalan aquellos linajes de *R. quelen* y sus cuencas de origen en azul, el resto de las especies de *Rhamdia* analizadas en naranja, en violeta los cuatro clados conformados por los linajes cis-andinos, en negro se agrupan las secuencias *trans*- y *cis*-andina. En verde se señala el *taxa* que agrupa los individuos de *Rhamdia*. El clado rojo agrupa muestras del Uruguay que se describen en el **Anexo I**.

Las distancias entre los distintos clados encontrados en este estudio muestra en promedio una divergencia de 7% entre los *taxa* de *R. quele*n *cis*-andino, mientras que los *taxa* presentes en Uruguay muestran valores que están en el rango de 4-7% (Tabla IV). El valor más alto de distancia genética dentro de los clados de *Rhamdia trans*-andino fue registrado entre los individuos del grupo Rq1 y Rq7. Dentro del grupo *trans*-andino, se encontraron valores similares entre las especies analizadas (3-8%), mientras que los valores más altos dentro del género se encontraron cuando comparamos especies del clado *trans*-andino con linajes *cis*-andinos. Este análisis también arrojó que los valores más altos, aproximadamente 20%, cuando comparamos los dos géneros *Pimelodella* y *Rhamdia*.

3.2.2. Coalescente

El árbol de coalescente construido mediante la aproximación bayesiana asumiendo un reloj estricto (Figura 8a), al igual que ML y MP permite confirmar la monofilia de *Rhamdia*, así como también la división del género en dos grupos, donde las especies de se agrupan en las *Rhamdia trans*- y *cis*-andino. Dentro del género se observa una estructura similar, donde se reconstruyen los mismos clados tanto en el grupo *trans*-andino (1,2,3) colapsando en una politomía basal, como los *cis*-andino (A, B, C, D). Sin embargo, el individuo P284 de Misiones queda como basal de un grupo monofilético conformado por el linaje Rq1 (sin P284), Rq2 y Rq3.

Al implementar la carrera basados en el reloj molecular relajado que permite la variación de divergencia entre los linajes, se ha reproducido la misma estructura encontrada en el análisis de ML y MP, es decir, que P284 conforma el linaje Rq1, junto a *R. quele*n AY036743 y AY036744.

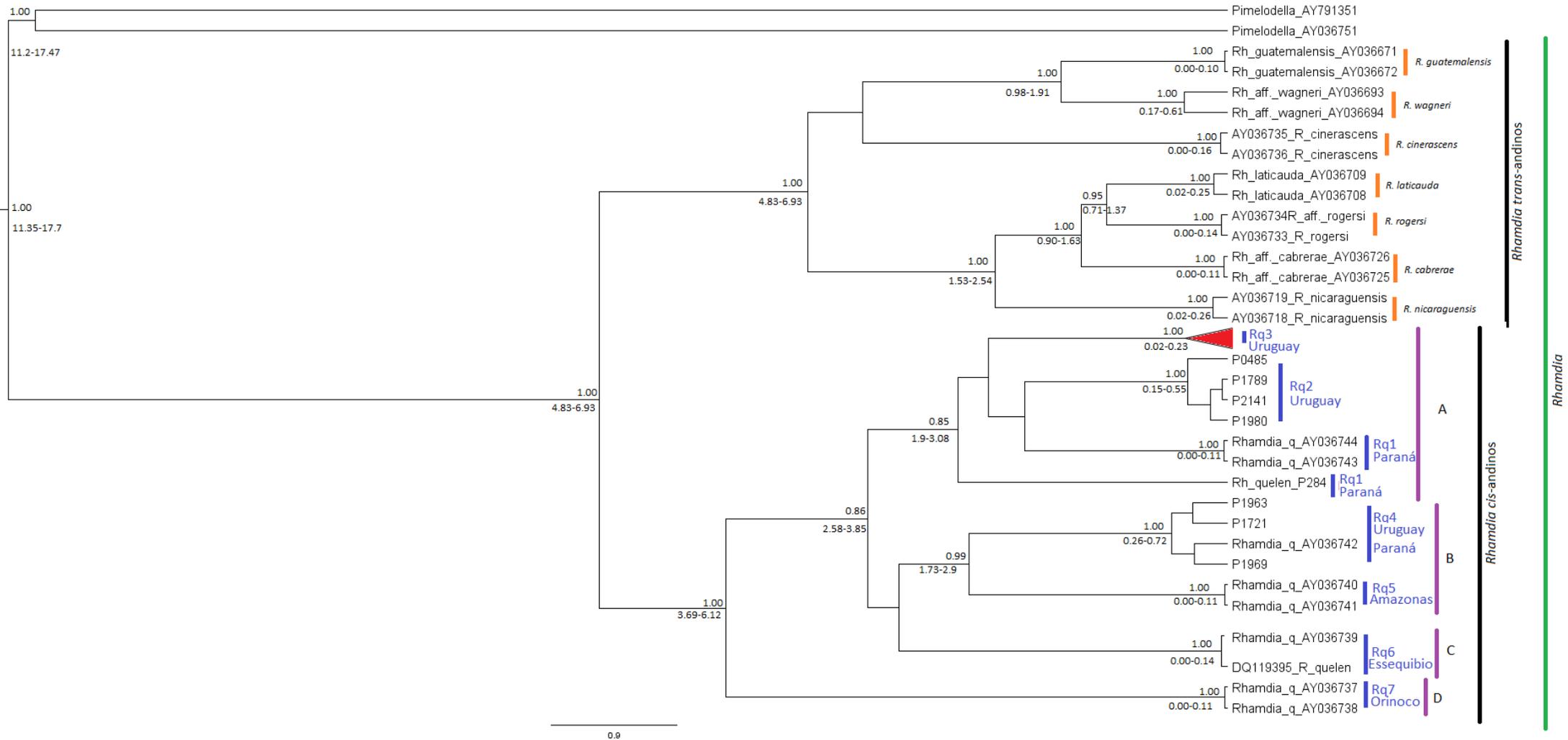


Figura 8a. Árbol filogenético del coalescente obtenido mediante la aproximación bayesiana basado en el modelo GTR+I+G y en un reloj molecular estricto. Sobre los nodos se encuentra la probabilidad *a posteriori* y por debajo los valores extremos del tiempo de divergencia (en Millones de años) que agrupan el 95 % de los valores en la función de densidad de la probabilidad posterior calculados mediante un reloj estricto. A la derecha se señalan aquellos linajes de *R. quelen* en azul y el resto de las especies de *Rhamdia* analizadas en naranja, en violeta los cuatro clados conformados por los linajes cis-andinos, en negro se agrupan las secuencias *trans*- y *cis*-andina. En verde se señala el *taxa* que agrupa los individuos de *Rhamdia*. El clado rojo agrupando muestras de Uruguay y los códigos por muestra y localidad se describen en el **Anexo I**.

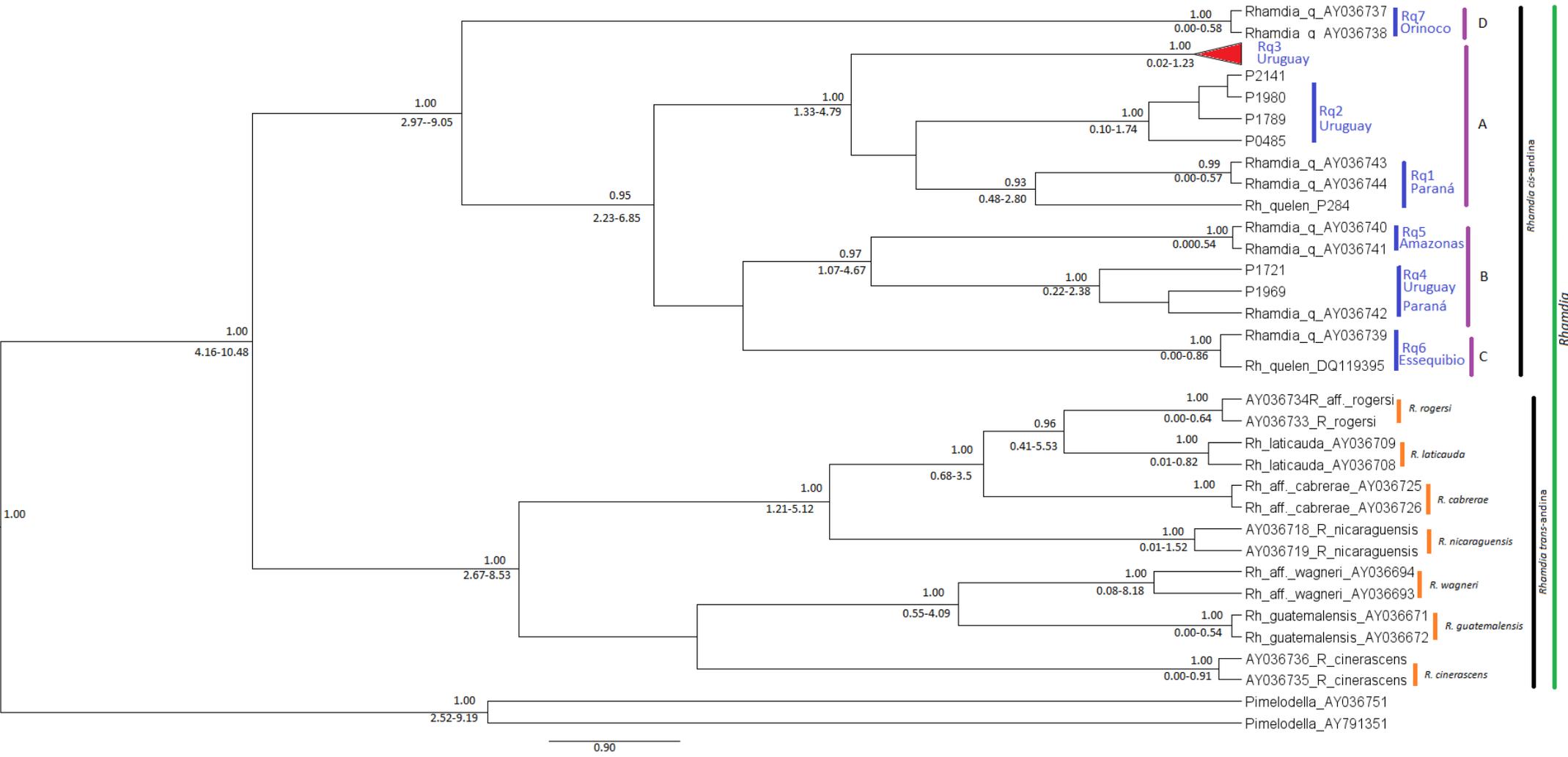


Figura 8b. Árbol filogenético del coalescente obtenido mediante la aproximación bayesiana basado en el modelo GTR+I+G y asumiendo un reloj relajado. Sobre los nodos se encuentra la probabilidad *a posteriori* mientras que debajo se señala el tiempo de divergencia (en Millones de años) obtenida mediante dicho método. A la derecha se señalan aquellos linajes de *R. quelen* y sus respectivas cuencas de origen en azul, el resto de las especies de *Rhamdia* analizadas en naranja, en violeta los cuatro clados conformados por los linajes cis-andinos, en negro se agrupan las secuencias *trans*- y *cis*-andina. En verde se señala el *taxa* que agrupa los individuos de *Rhamdia*. El clado rojo agrupando muestras de Uruguay y los códigos por muestra y localidad se describen en el **Anexo I**.

3.2.3. Reloj molecular

El análisis del reloj molecular implementando un reloj relajado no correlacionado con una distribución Log-Normal (Figura 8a) muestra un tMRCA mayor, en promedio, que las calculadas utilizando un reloj estricto. El análisis de coalescencia utilizando un reloj molecular relajado (Figura 8b) permitió datar la divergencia del género *Rhamdia* así como también la división de los clados *cis*- y *trans*-andino entre 4,16-10,48 millones de años (MA), desde Plioceno-Mioceno. En cuanto al MRCA de los *Rhamdia cis*-andinos, éste fue datado en 2,97-9,05 millones de años (MA), el cuál es mayor en promedio que el tMRCA encontrado para los *trans*-andinos 2,67-8,53. En cuanto a los linajes del Uruguay, encontramos que Rq2 y Rq3 divergieron hace 1,33-4,79 MA (desde Pleistoceno-Plioceno), mientras que el MRCA de estos dos con Rq4 se estima 2,23-6,85 MA.

Tabla IV. Distancias genéticas corregida por el modelo K2P entre pares de clados encontrados en los análisis filogenéticos del género *Rhamdia* y *Pimelodella*, en base al marcador mitocondrial *citocromo b*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-Rq1															
2-Rq2	0,06														
3-Rq3	0,06	0,04													
4-Rq4	0,08	0,06	0,07												
5-Rq5	0,09	0,06	0,06	0,06											
6-Rq6	0,09	0,06	0,06	0,07	0,06										
7-Rq7	0,12	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09									
8- <i>R. laticauda</i>	0,12	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11								
9- <i>R. guatemalensis</i>	0,11	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,11	0,08							
10- <i>R. wagneri</i>	0,11	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08	0,04						
11- <i>R. cabreræ</i>	0,12	0,10	0,09	0,10	0,11	0,11	0,10	0,03	0,08	0,08					
12- <i>R. cinerascens</i>	0,11	0,10	0,09	0,10	0,11	0,11	0,11	0,08	0,07	0,07	0,08				
13- <i>R. rogersi</i>	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,03	0,07	0,08	0,03	0,08			
14- <i>R. nicaraguensis</i>	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,05	0,07	0,07	0,04	0,08	0,05		
15- <i>Pimelodella</i>	0,22	0,19	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,18	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	

3.3. Análisis poblacional y demografía histórica

3.3.1. Análisis de demografía histórica: “Mismatch distribution”

El análisis de la distribución del desajuste sobre las secuencias de *R. cf. quelen* del Uruguay (Figura 9) muestra una distribución con tendencia multimodal lo que se relaciona con una población estable luego de posibles barridas selectivas. Para dicho análisis el SSD fue de 0,002 ($P > 0,05$) lo que indica que no existen evidencias estadísticamente significativas que permitan descartar el fenómeno de expansión en este conjunto de datos. En cuanto al índice de irregularidad, este también fue alto, de 0,11 ($P > 0,05$), que sugeriría poblaciones estables, aunque no resultó estadísticamente significativo.

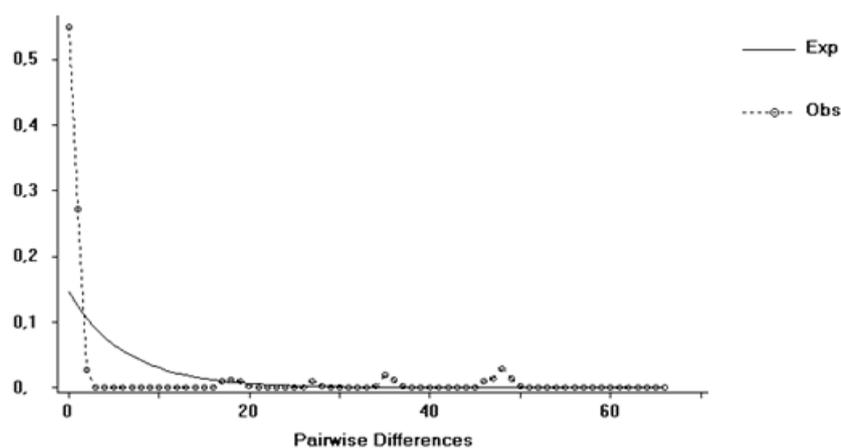


Figura 9. Gráfico del análisis “Mismatch distribution” para secuencias del marcador mitocondrial *citocromo b* de *R. cf. quelen* en las cuencas de Uruguay obtenido mediante el programa DNAsp v5 (Librado & Rozas 2009).

3.3.2. Red de haplotipos

La red de relaciones entre los haplotipos *citocromo b* (Figura 10) permite reconstruir seis de los linajes de *R. quelen*, no pudiendo recuperar el clado conformado por los haplotipos H1 y H6 del Paraná. Esto podría deberse a que este haplotipo presenta varias mutaciones únicas en el conjunto de datos. Los tres clados presentes en Uruguay se encuentran separados por más de 40 pasos mutacionales, coexistiendo los tres en la cuenca del Cuareim y dos de ellos en el Rincón del Bonete y Villa

Constitución. Dentro del clado Rq3 se observa una topología en forma de estrella con un grupo de haplotipos (H9, H11, H17, H18) más abundante en el centro y varios haplotipos derivados separados por 1 a 4 pasos mutacionales.

3.3.3. Análisis de estructura poblacional

Los valores del estadístico F_{ST} basado en el análisis de secuencias del *citocromo b* (Tabla V) entre las 16 poblaciones muestreadas muestran que tres de las poblaciones presentan importante diferenciación genética respecto a la mayoría de las restantes (Laguna Blanca, Lunarejo y Queguay). Laguna Blanca sólo muestra valores bajos-moderados de diferenciación con Villa Constitución (0,06), mientras que las poblaciones del Lunarejo y Queguay muestran valores muy reducidos únicamente con la población del Cuareim (Tabla V).

Las distancias genéticas dentro de las poblaciones (Tabla VI) se encuentran en el rango de 0 a 4%, siendo la población de Cuareim la que presenta la mayor diversidad dentro de las localidades analizadas. A la población del Cuareim le siguen Villa Constitución y Rincón del Bonete. Es importante destacar que en nuestro conjunto de datos existen limitaciones en el muestreo que podrían influir en estos resultados.

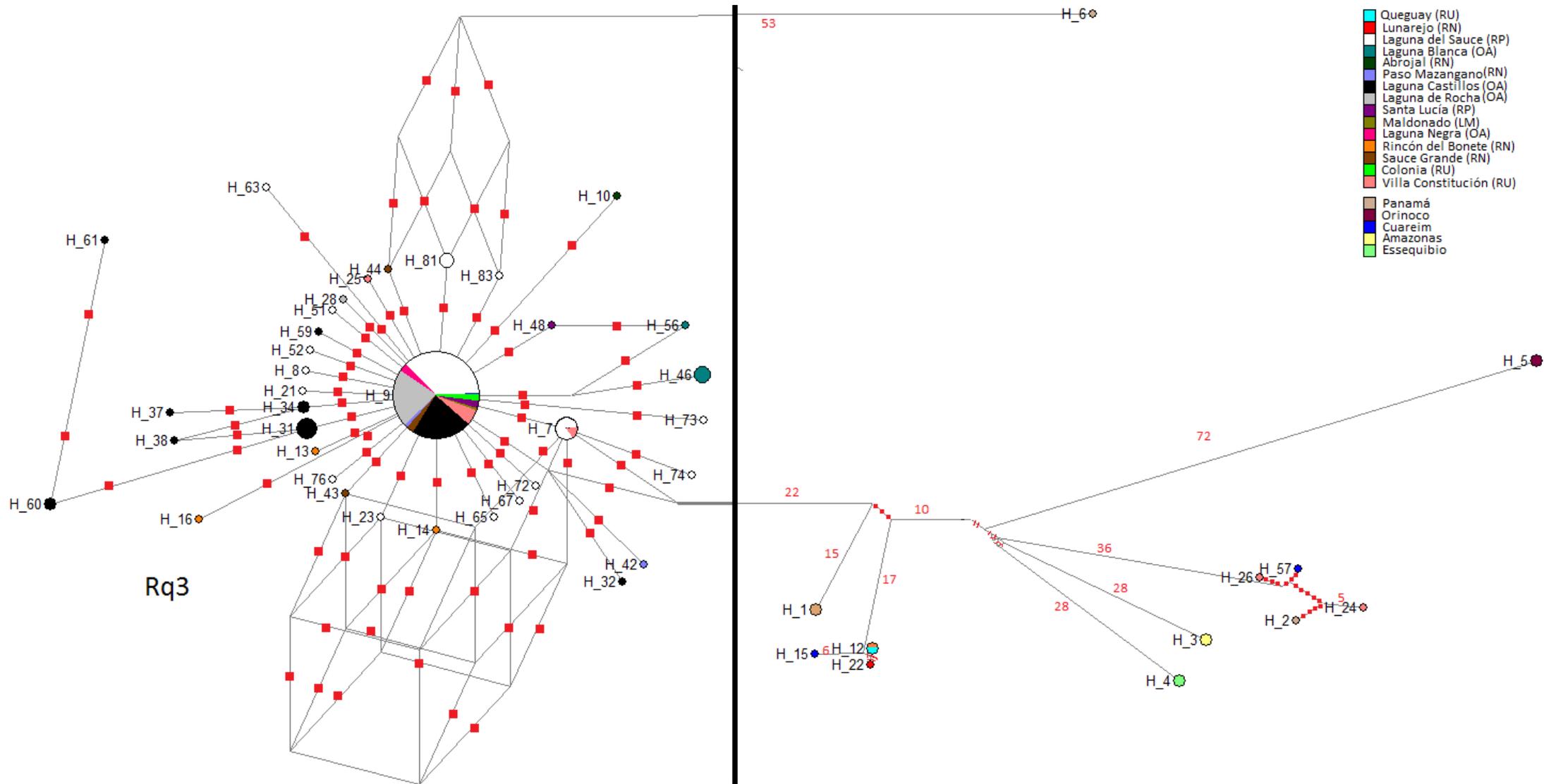


Figura 10. Red de haplotipos *citocromo b* de *R. cf. quelen* analizando secuencias de la región *cis*-andino, en donde el área de los círculos es proporcional a su frecuencia. Los puntos y los números rojos señalan la cantidad de mutaciones que separan dos haplotipos. Los colores refieren a las localidades o cuencas donde está presente cada haplotipo. En el gráfico se indican los siete grupos (Rq1-7) encontrados en el análisis filogenético. El haplotipo 9 (H9) integra los haplotipos H11, H17, H18, H19, H20, H29, H30, H33, H35, H39, H45, H49, H50, H53, H54, H55, H58, H64, H66, H68, H70, H71, H75, H78, H79, H80, H84; H81 integra los haplotipos H82 y H85; H34 integra el haplotipo H36; H31 incluye H40; H7 integra los haplotipos H27, H69 y H77; H46 integra el haplotipo H47; H60 integra el haplotipo H62; H12 integra el haplotipo H41.

Tabla V. Valores del estadístico F_{ST} pareado entre localidades, estimados mediante secuencias *citocromo b* entre las poblaciones muestreadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1- Laguna del Sauce	0,00															
2- Laguna de Rocha	0,02	0,00														
3- Laguna Castillos	0,14	0,17	0,00													
4- Laguna Blanca	0,68	1,00	0,64	0,00												
5- Colonia	-0,29	0,00	-0,13	1,00	0,00											
6- Maldonado	-0,90	0,00	-0,59	1,00	0,00	0,00										
7- Talita	-0,11	0,00	0,01	1,00	0,00	0,00	0,00									
8- Paso Mazangano	0,22	0,86	0,17	0,86	0,00	-1,00	0,38	0,00								
9- Sauce Grande	0,12	0,49	0,16	0,71	-0,26	-1,00	0,00	0,00	0,00							
10- Laguna Negra	-0,16	0,00	-0,03	1,00	0,00	0,00	0,00	0,25	-0,09	0,00						
11- Villa Constitución	0,21	0,14	0,16	0,06	-0,32	-0,99	-0,13	-0,29	-0,10	-0,18	0,00					
12- Queguay	0,98	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,96	1,00	0,58	0,00				
13- Rincón del bonete	0,40	0,49	0,34	0,29	-0,26	-1,00	-0,03	-0,23	0,00	-0,09	-0,19	0,71	0,00			
14- Cuenca del abrojal	0,09	0,86	0,04	0,86	0,00	-1,00	0,38	-0,33	0,00	0,25	-0,41	0,95	-0,19	0,00		
15- Lunarejo	0,98	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	0,96	1,00	0,56	1,00	0,70	0,95	0,00	
16- Cuareim	0,85	0,77	0,79	0,37	-0,02	-0,67	0,26	-0,04	0,26	0,16	0,16	-0,65	-0,01	-0,14	-0,67	0,00

Los valores en negrita corresponden a valores significativos ($P < 0,05$) a través de 1.000 pseudoreplicas.

3.3.4. Análisis molecular de la varianza

Mediante el AMOVA (Tabla VII) se encontró que la estructura poblacional, aquella que maximiza la varianza entre grupos (61,72%) y minimiza la varianza dentro de los grupos (31,26%), de *R. quelen* en el Uruguay identifica cuatro grupos: 1- Cuareim; 2-Villa Constitución; 3-Rincón del Bonete, Lunarejo, Queguay; 4- Abrojal, Paso Mazangano, Sauce Grande, Santa Lucía, Laguna Blanca, Laguna Negra, Maldonado, Colonia, Laguna de Rocha, Laguna Castillos y Laguna del Sauce.

Tabla VI. Distancias genética corregidas mediante el modelo k2P dentro de las poblaciones muestreadas y su correspondiente desviación estandar (S.E.).

	Distancia genética	S.E.
1- Laguna del Sauce	0,001	0,000
2- Laguna de Rocha	0,000	0,000
3- Laguna Castillos	0,001	0,001
4- Laguna Blanca	0,001	0,001
5- Colonia	0,000	0,000
6- Maldonado	0,000	0,000
7- Talita	0,001	0,001
8- Paso Mazangano	0,002	0,001
9- Sauce Grande	0,001	0,001
10- Laguna Negra	0,000	0,000
11- Villa Constitución	0,023	0,003
12- Queguay	0,000	0,000
13- Rincón del bonete	0,017	0,004
14- Cuenca del abrojal	0,003	0,002
15- Lunarejo	0,000	0,000
16- Cuareim	0,056	0,007

3.3.5. Aislamiento por distancia

En el gráfico en la Figura 11, donde se comparan las distancias obtenidas por el estadístico F_{ST} y las distancias geográficas, se evidencia una alta dispersión de los datos. La falta de correlación fue probada mediante el test de Mantel, donde el estadístico g tomo un valor de -0,21 siendo inferior a la región crítica ($g = 1,645$ para $p = 0,05$), por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula. Por tanto, no encontramos evidencias de asociación entre los elementos de las dos matrices de distancia, distancias geográficas y genéticas.

Tabla VII. Análisis Molecular de Varianza genética a nivel macrogeográfico en las cuencas de Uruguay. Se presentan los valores basados en el gen mitocondrial del AMOVA de acuerdo a una de las hipótesis testeadas para evaluar la estructura demográfica de las poblaciones de *R. quelen* analizadas en este trabajo.

AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	58,63	1,59*	61,72
Entre poblaciones dentro de grupos	12	29,61	0,18*	7,02
Dentro de poblaciones	150	120,60	0,80*	31,26
	165	208,84	2,57	

La estructura está marcada por cuatro grupos: 1- Cuareim; 2-Villa Constitución; 3-Rincón del Bonete, Lunarejo, Queguay; 4- Abrojal, Paso Mazangano, Sauce Grande, Santa Lucía, Laguna Blanca, Laguna Negra, Maldonado, Colonia, Laguna de Rocha, Laguna Castillos y Laguna del Sauce. Los componentes de la varianza estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se indica con un asterisco (*).

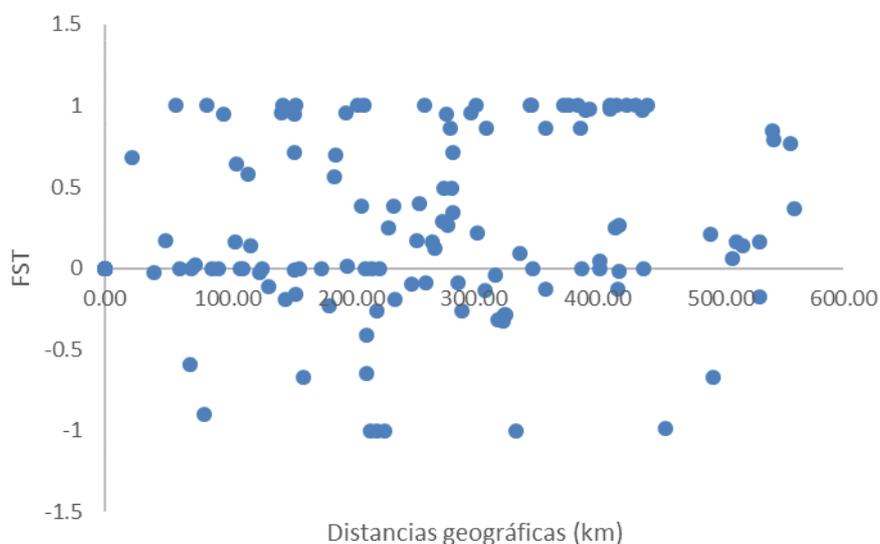


Figura 11. Gráfico de la relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas medidas mediante el estadístico F_{ST} en *R. quelen* de las cuencas de Uruguay.

3.4. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras de Uruguay mediante *loci* microsatélite y secuencias del gen *citocromo b*

3.4.1. Análisis de datos de marcadores microsatélite

El análisis de la matriz de datos de los cinco *loci* microsatélite mediante el programa Micro-Checker no mostró evidencias de errores de genotipado, sólo signos de alelos nulos en el *locus* Pc97 en la Laguna del Sauce con una frecuencia estimada de 0,1972. Todos los *loci* en las tres lagunas mostraron ajuste a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), con la excepción del Pc97 en la Laguna del Sauce. Se detectaron evidencias significativas de desequilibrio de ligamiento entre los pares de *loci*: Pc97-Pc17 en Laguna de Castillos y Rh1-Pcor2 en Laguna de Sauce, aunque en ningún caso resultaron significativas tras aplicar la corrección de Bonferroni.

Los parámetros de diversidad genética presentes en los cinco *loci* microsatélite ensayados en las tres lagunas analizadas fueron moderados a altos, con valores promedio global entre *loci* de 0,697 y 0,645 para la heterocigosis esperada y contenido de información polimórfica (Tabla VIII). El análisis de diversidad evidenció heterogeneidad entre *loci*, aunque Pcor2 y Rh1 se encuentran entre los más variables (N_A : 11-14 y 5-18; H_e : 0,790-0,891 y 0,656-0,897; PIC: 0,742-0,856 y 0,581-0,870; r_A : 8,818-10,406 y 4,909-11,123) (Tabla VIII y IX).

La población de Laguna del Sauce muestra los valores de diversidad genética promedio más altos (N_A : 11,2; H_e : 0,761; PIC: 0,719)(Tabla VIII y IX). Los valores en promedio resultaron muy similares ente Laguna Castillos y Laguna de Rocha (N_A : 7,4 y 5,6; H_e : 0,654 y 0,677; PIC: 0,605 y 0,613; r_A : 5,900 y 5,429) (Tabla VIII y IX).

Tabla VIII. Variabilidad genética para los cinco *loci* microsatélite ensayados en las tres lagunas analizadas.

<i>Laguna del Sauce</i>						
<i>Locus</i>	N	N [°] _A	Ho	He	PIC	P value
Pcor1	32	8	0,625	0,663	0,622	0,080
Rh1	27	18	0,815	0,897	0,870	0,200
Pcor2	30	14	0,900	0,833	0,803	0,610
Pc97	32	10	0,563	0,726	0,679	0,000
Pc17	23	6	0,696	0,688	0,621	0,590
Media/Total		11,2	0,720	0,761	0,719	0,000
<i>Laguna de Rocha</i>						
Pcor1	12	4	0,750	0,630	0,541	0,740
Rh1	12	5	0,667	0,656	0,581	0,530
Pcor2	12	11	0,833	0,790	0,742	0,740
Pc97	12	4	0,667	0,612	0,515	1,000
Pc17	11	4	0,636	0,697	0,684	0,450
Media/Total		5,6	0,711	0,677	0,613	0,789
<i>Laguna Castillos</i>						
Pcor1	20	3	0,300	0,272	0,247	1,000
Rh1	20	10	0,800	0,835	0,792	0,710
Pcor2	20	11	0,800	0,891	0,856	0,110
Pc97	20	9	0,900	0,771	0,719	0,690
Pc17	20	4	0,600	0,499	0,409	0,820
Media/Total		7,4	0,680	0,654	0,605	0,944

N: número de individuos analizados por población; N[°]_A: número de alelos por *locus* por población; Ho: Heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; PIC: Contenido de información del polimorfismo; P: valor de la probabilidad del test de Hardy-Weinberg.

Tabla IX. Riqueza alélica estandarizada para 11 individuos diploides (L. Rocha).

<i>locus</i>	Riqueza alélica			
	L. del Sauce	L. Rocha	L. Castillos	Total
Pcor1	6,053	3,917	2,770	5,177
Rh1	11,123	4,909	7,230	10,929
Pcor2	8,818	10,406	9,490	12,092
Pc97	6,431	3,913	6,908	8,320
Pc17	5,200	4,000	3,100	5,270
Media	7,525	5,429	5,900	8,358

En el análisis a escala microgeográfica del estadístico F_{ST} del conjunto de datos de *loci* microsatélite se observan altos valores de F_{ST} (Tabla X), que indican aislamiento genético entre las lagunas. En cuanto al análisis molecular de la varianza (Tabla XI), cuando contrastamos las distintas hipótesis de agrupamiento, la que maximizó la varianza entre grupos fue la siguiente estructura: Laguna Castillos y la Laguna de Rocha en un grupo y por otro lado la Laguna del Sauce.

Tabla X. Estadístico F_{ST} en base a marcadores microsatélites entre pares de poblaciones de las lagunas analizadas a nivel de microescala.

Localidad	1	2	3
1- Laguna Castillos	-		
2- Laguna del Sauce	0,24	-	
3- Laguna de Rocha	0,19	0,21	-

Los valores en negrita corresponden a valores significativos ($P < 0,05$) a través de 1.000 pseudoreplicas.

Tabla XI. Análisis Molecular de Varianza genética a nivel microgeográfico mediante marcadores microsatélite. Se presentan los valores del análisis maximizando los valores de F_{CT} para la estructura conformada por dos grupos: 1- Laguna Castillos y Laguna de Rocha; 2- Laguna del Sauce.

AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	16,859	0,070*	5,59
Entre poblaciones dentro de grupos	1	7,972	0,232*	17,49
Dentro de poblaciones	125	127,856	1,023*	77,22
	127	152,688	1,324	

Los componentes de la varianza estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se indica con un asterisco (*).

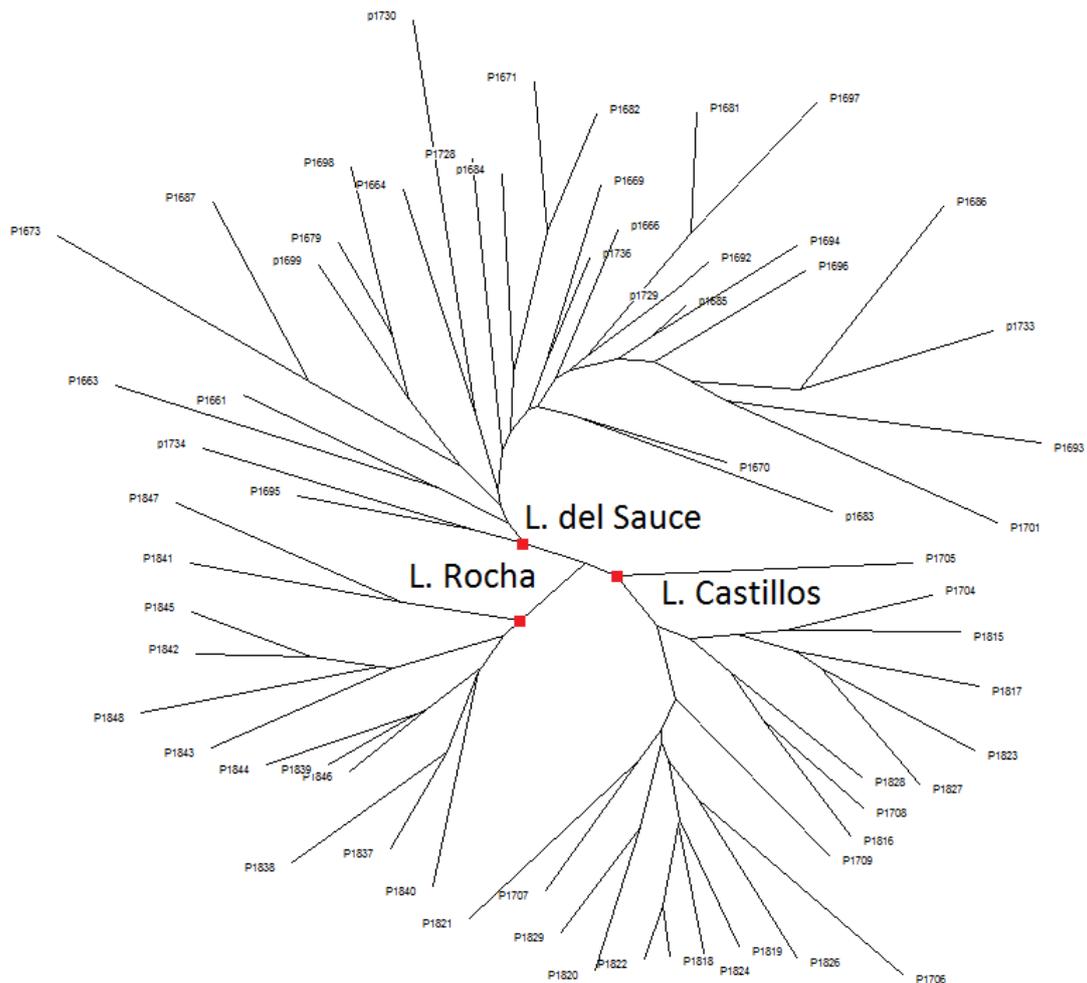


Figura 12. Topología construida en base al metodo de Neighbor-joining, utilizando las distancias genéticas D_A Nei (1983) entre todos los pares de individuos en base a los cinco *loci* microsatélites analizados. En rojo se señalan los nodos que soportan los tres cluster conformados por individuos de las tres lagunas

El árbol de distancia construido a partir del método de unión de vecinos (Figura 12) agrupó los individuos en tres clados diferentes que se corresponden con la laguna de origen de los mismos. A su vez, el análisis bayesiano de “cluster” (Figura 13) reveló que el número de poblaciones más probable es de tres ($PX|K$)=-1096,53, con buena correspondencia geográfica dado que todos los individuos fueron asignados de forma coherente a su correspondiente localidad (Figura 13).

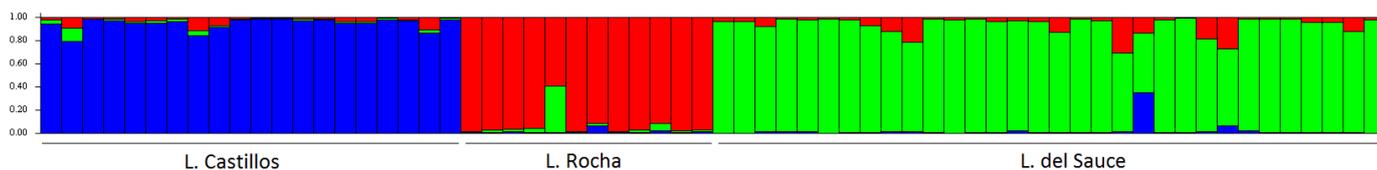


Figura 13. Análisis bayesiano de cluster mediante *loci* microsatélite implementado en el programa STRUCTURE. En el gráfico se observa la probabilidad de cada individuo de pertenecer a cada cluster. Debajo se indica la localidad a la que pertenecen los individuos muestreados.

3.4.2. Análisis microgeográfico de secuencias del gen *citocromo b*

Los parámetros de diversidad genética (sitios polimórficos, diversidad nucleotídica y distancias corregidas) dentro del conjunto de datos de *citocromo b* (Tabla XII) evidencian una baja diversidad encontradas en las tres lagunas.

Tabla XII. Estadísticos descriptivos del conjunto de datos mitocondriales para el análisis microgeográfico

Pares de Bases	Sitios Variables	Sitios parsimoniosamente informativos	π (Desvío estándar)	Distancia K2P (Desvío estándar)
1043	20	6	0,00836 (0,0001)	0,000 (0,000)

Diversidad Nucleotídica (π).

El estudio del estadístico F_{ST} basado en los datos del marcador mitocondrial (Tabla XIII) evidenciaron valores altos, aunque no de aislamiento entre la Laguna Castillos y las otras dos lagunas, mientras que muestra valores bajos de diferenciación entre la Laguna del Sauce y Laguna de Rocha. En cuanto al análisis molecular de la varianza, se encontró que el agrupamiento de poblaciones que maximizaba la varianza entre grupos y minimizaba la varianzaa dentro de los grupos, según las secuencias de *citocromo b* (Tabla XIV), fue la conformación de un grupo entre la Laguna del Sauce y Laguna Rocha y el otro conformado por Laguna Castillos.

Tabla XIII. Estadístico F_{ST} en base al análisis de secuencias *citocromo b* entre las tres lagunas analizadas.

Localidad	1	2	3
1- Laguna Castillos	-		
2- Laguna del Sauce	0,13	-	
3- Laguna de Rocha	0,15	0,02	-

Los valores en negrita corresponden a valores significativos ($P < 0,05$) a través de 1.000 pseudoreplicas.

Tabla XIV. Análisis Molecular de Varianza genética. Se presentan los valores del análisis según el gen mitocondrial para la estructura conformada por dos grupos: 1- Laguna de Rocha y Laguna del Sauce; 2- Laguna Castillos.

AMOVA	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	2,467	0,039*	13,46
Entre poblaciones dentro de grupos	1	0,376	0,004*	1,24
Dentro de poblaciones	122	30,221	0,248*	85,3
	124	33,064	0,29	

Los componentes de la varianza estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se indica con un asterisco (*).

4. Discusión

4.1. Polimorfismo del gen *citocromo b* en *R. cf. quelen*

El conjunto de secuencias de *R. quelen* estudiadas a nivel macrogeográfico presenta una baja diversidad nucleotídica, aproximadamente un 1%. Estos niveles son similares a los encontrados en poblaciones de *Pimelodus albicans* (Vergara *et al.* 2008), especie perteneciente a la familia Pimelodidae. Sin embargo, estos niveles son inferiores a los encontrados previamente a nivel intraespecífico dentro del género *Rhamdia* (Perdices *et al.* 2002; García 2009). Las diferencias encontradas con respecto a los resultados de Perdices *et al.* (2002), son de esperar debido a que nuestro análisis sólo tiene en cuenta parte de la diversidad encontrada en el género. La relativamente baja diversidad nucleotídica y la alta diversidad haplotípica está acompañada de una alta frecuencia (0,44) del “haplotipo 11” (Anexo I). Valores relativamente bajos de diversidad nucleotídica y altos de diversidad haplotípica podrían revelar, según Avise (2000), rápidos crecimientos de la población a partir de una población ancestral pequeña. En tanto los resultados de los test de neutralidad (Tajima y Fu’s tests), resultaron negativos, pudiendo interpretarse como un exceso de alelos raros. El resultado del test de Tajima, con valor negativo, y significativo, evidencia que nuestro conjunto de datos no se ajusta al modelo de mutación neutral. Como hipótesis alternativa, surge la presencia de selección purificadora eliminando alelos raros ó que la población de *R. quelen* haya estado sometida a cuellos de botella (Tajima 1989). Sin embargo, el test de Fu (1997) no rechaza significativamente la hipótesis nula, esto puede deberse a que este test es más poderoso cuando existe expansión poblacional o “hitchhiking” (selección por ligamiento) y menos poderoso cuando existe selección de fondo. En tanto, los resultados de demografía histórica indican que *R. quelen* conformaría una población estable con huellas de posibles barridas selectivas. En este sentido, mediante la relación K_A/K_S podemos concluir que las evidencias apuntan a que existe selección purificadora en el gen *citocromo b*, lo que es de esperar en un gen codificante para una proteína de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, podemos decir que hay ausencia de selección positiva en la evolución del ADN mitocondrial de este taxón, ésta es una de las asunciones necesarias para poder asegurar que los patrones genéticos reflejan la historia de los organismos (Zink 2005).

Otro fenómeno que puede afectar el análisis de tipo filogenético en base a marcadores moleculares es la saturación en el *set* de datos, sobre todo cuando se trata de genes codificantes debido a que presentan altas tasas de mutación, principalmente en la tercera base del codón (Farias *et al.* 2001). En nuestro caso, los análisis de saturación indican que sólo ésta puede ser importante en la tercera base para distancias cercanas al 20%. Esto no indicaría un riesgo para nuestros análisis, ya que las distancias genéticas entre los distintos *taxa* pertenecientes al género *Rhamdia* están por debajo del 20%.

4.2. Filogeografía de *R. quelen* en la región Neotropical

Los análisis filogenéticos permiten confirmar la monofilia de *R. quelen*, esto concuerda con lo obtenido por Perdices *et al.* (2002) basado en el gen *citocromo b*. Sin embargo, se contraponen a los resultados de García (2009), donde las filogenias construidas a partir de la concatenación de tres genes mitocondriales (región control, NADH2 y *citocromo b*), evidencian un origen polifilético de *Rhamdia* con secuencias del género *Pimelodella* dentro de nuestro género de interés. Los resultados filogenéticos de García (2009), son confirmados por la elevada distancia observada, en sus análisis, entre las secuencias de *Rhamdia*, donde estas secuencias se hallan más cercanas con secuencias de *Pimelodella* que con el resto de las secuencias de *Rhamdia*. Es por esto, que la autora propone una revisión morfológica de estos ejemplares, así como también la necesidad de mayores análisis genéticos estudiando el linaje problemático.

Debido a la naturaleza de los peces de agua dulce, su asociación con los ríos y los distintos cursos de agua, se sabe que éstos reflejan la evolución de las cuencas geográficas que integran, ya que su evolución está marcada por los fenómenos que afectan dichas cuencas. Esto puede evidenciarse en nuestros resultados, donde encontramos dos grupos recíprocamente monofiléticos, separados por la cordillera de los Andes, lo que concuerda con los resultados de Perdices *et al.* (2002). Por tanto, podemos determinar que el género *Rhamdia* se compone de dos clados que se han diversificado por el levantamiento de los Andes.

Nuestros resultados evidencian que la división del género *Rhamdia* por el levantamiento de los Andes, separando las cuencas del río Orinoco y la cuenca del río

Magdalena, según el reloj molecular relajado habría ocurrido entre 4,16-10,48 (en promedio 7,32) MA atrás, mientras que el análisis basado en el reloj molecular estricto ubicó este ancestro común más reciente 4,8-6,9 (5,85) MA atrás. El promedio de nuestra estimación utilizando un reloj relajado se asemeja a lo encontrado por Perdices *et al.* (2002) quienes basados en un “set” de datos combinados (*citocromo b* y *ATPasa 8/6*) sitúan este evento entre 7,7-8,8 MA atrás. Por otro lado, Sivasundar *et al.* (2001) en un estudio de *Prochilodus* estimaron la divergencia de las cuencas *trans-andinas* y *cis-andinas*. Basados en el gen *ATPasa* esta divergencia fue datada en los 5,37 MA atrás, mientras que en base a la región control del genoma mitocondrial la divergencia fue de 16,18 MA atrás. Por último, la evidencia geológica sitúa este evento 10 MA atrás, culminando hace 8 MA (Lundberg *et al.* 1998). Basados en esta evidencia, continuaremos discutiendo las estimaciones obtenidas asumiendo un reloj molecular relajado, ya que éste mostró valores coherentes con las evidencias geológicas y una topología coherente con el resto de las topologías obtenidas mediante otros métodos.

4.3. Grupo *Rhamdia cis-andino*

Los resultados del tiempo de divergencia respecto a los ancestros comunes más recientes muestran que el grupo de los *Rhamdia cis-andinos* tendrían un MRCA más antiguo que el grupo de *Rhamdia trans-andino*, por lo que podríamos señalar a la región *cis-andina* como distribución original del género *Rhamdia*. Dentro del *taxa cis-andino*, el linaje “Rq7” presente en las cuencas del Orinoco es el más basal, mientras que los otros componen un grupo recíprocamente monofilético a este último, esto indicaría que el origen de distribución de *Rhamdia* sería la cuenca del Orinoco. Por otro lado, nuestros resultados muestran que el linaje presente en la cuenca del Essequibo en la región de la Guyana estaría más emparentado con los de las cuencas del Amazona, Paraná, Uruguay y Río de la Plata que con los del Orinoco, lo que coincide con varios trabajos que han encontrado que la biota de peces de la región de la Guyana, donde se encuentra el Essequibo, tiene sus ancestros más cercanos en el Amazonas (Cardoso & Montoya-Burgos 2009).

En cuanto al grupo conformado por tres clados (A, B y C) que colapsan en una politomía basal, se puede ver que los linajes de A y B coexisten en la misma cuenca,

tanto en Paraná como en la cuenca del Río Uruguay (Figuras 6-7-8a-8b). Lo que sugiere como hipótesis más parsimoniosa el contacto secundario, es decir, la divergencia de estos clados previo a la coexistencia en estas cuencas y posterior dispersión a través de la captura de cuencas entre el Amazonas y el Paraná (clado B), Paraná y Uruguay (clado A y B). Esta relación entre el Paraná y Uruguay ha sido citada en varios estudios (Clavijo & Olazarri 2009); de la misma manera, el fenómeno de captura de cuencas entre el Paraná y el Amazonas ha sido documentado al menos cuatro veces para los últimos 70 mil años (Lundberg *et al.* 1998). A su vez, hemos datado el MRCA del clado A en 1,33-4,79 (3,06) MA en el Plioceno temprano, por lo que esta divergencia habría ocurrido antes de la separación entre los linajes Rq4 y Rq5 (1,07-4,67; 2,87 MA). Estas evidencias hacen aún más plausible la hipótesis de que el clado B tendría su origen en la cuenca del Amazonas con un posterior contacto entre cuencas entre el Paraná-Amazonas (1,07-4,67; 2,87 MA), mientras que el clado A habría diversificado en la cuenca del Paraná-Uruguay. La diversificación dentro del clado A podría haber sido facilitada mediante los períodos de reducción en el nivel del mar durante el Pleistoceno, lo que facilitaría la estructuración genética a causa de la limitación en la conectividad de los ríos (Chenoweth *et al.* 1998). Por otro lado, existen antecedentes en estudios a nivel citogenético en poblaciones del Paraná que han encontrado diferencias dentro de *R. quelen* en la fórmula cariotípica y que proponen la existencia de eventos de inversiones pericéntricas y reordenaciones cromosómicas (Martinez *et al.* 2011). Este fenómeno podría explicar la divergencia de estos linajes o podría actuar como un refuerzo de aislamiento en un contacto secundario entre linajes divergentes.

4.4. Divergencia genética de *R. cf. quelen* cis-andino

Debido a la alta estructuración encontrada en *R. quelen* cis-andino, tanto en el análisis árbol de coalescente construido mediante la aproximación bayesiana como mediante los otros métodos de reconstrucción filogenética, y los valores de distancia genética entre los linajes que componen este grupo, se hace necesaria la revisión taxonómica de *R. quelen*. Cuando comparamos con especies propuestas como válidas por Perdices *et al.* (2002), *R. cinerascens* y *R. guatemalensis*, la distancia genética encontrada es del 7%, similar a los valores observados al comparar los linajes que componen los *Rhamdia*

cis-andinos en este estudio. De la misma manera, cuando comparamos con un análisis similar en el género *Pseudoplatystoma* (Torrico *et al.* 2009) de la familia Pimelodidae, los valores de distancia en el gen *citocromo b* son similares a los encontrados entre los linajes de *R. quelen*, variando de 6% entre *P. punctifer*-*P. reticulatum* y 7,6% entre *P. magdaleniatum*-*P. corruscans*.

En este sentido, las distintas especies descritas y validadas luego de la revisión de Silfvergrip (1996), sumado a las evidencias presentadas en este trabajo, podrían indicar que estos linajes con divergencias genéticas profundas constituirían especies diferentes, haciendo necesario una nueva revisión taxonómica de estos clados. Sin embargo, como hipótesis alternativa, estos linajes podrían componer especies crípticas, no pudiéndose identificar bajo el análisis de caracteres morfológicos y apoyando la idea de que *R. quelen* sería un complejo de especies.

4.5. Análisis poblacional de *R. quelen* en las cuencas de Uruguay

La red de haplotipos (Figura 10) nos permite separar 7 clados altamente divergentes a nivel macrogeográfico, separados por más de 30 mutaciones en sitios parsimoniosamente informativos. En Uruguay encontramos tres de estos clados, el Rq2 está más representado en la mayoría de las poblaciones muestreadas (14), siendo el más abundante dentro de nuestro muestreo. Dentro de las muestras analizadas de Uruguay podemos decir, a través de las diferencias pareadas, que existen dos hipótesis de la historia demográfica de *R. quelen*: 1) este taxón habría estado sujeto a períodos de expansión; 2) bajo selección a favor de un haplotipo central del cual derivan haplotipos raros. Ambas hipótesis son coherentes con la topología en forma de estrella que presenta el clado Rq2; además la frecuencia de dichos haplotipos hacen pensar que éstos representarían los haplotipos ancestrales de este clado. A su vez, los pocos pasos entre los haplotipos, el alto número de haplotipos derivados podría estar asociado a eventos de una rápida radiación.

La estimación indirecta del flujo génico de las localidades muestreadas revela una restricción de flujo génico de las poblaciones de Lunarejo, Laguna Blanca y Queguay respecto a la mayoría de los restantes sitios de muestreo; lo cual explicaría la presencia de haplotipos endémicos en estas tres poblaciones. Es de destacar la limitación

muestral en nuestro conjunto de datos, dónde el Lunarejo y Queguay están representadas con tan sólo un ejemplar. Por otro lado, las localidades de Cuareim, Rincón del Bonete, Villa Constitución presentan valores bajos de F_{ST} evidenciando altos valores de flujo génico con el resto de las poblaciones, aunque presentan los mayores valores de distancia genética dentro de la población. Esta situación tiene su explicación en que las tres poblaciones están compuestas por más de uno de los *taxa* de *R. quelen* encontrados (Cuareim Rq2, Rq3, Rq4; Rincón del Bonete: Rq2, Rq3; Villa Constitución: Rq3, Rq4).

Los resultados del AMOVA muestran que la estructura más plausible que explica la relación entre las localidades muestreadas es el agrupamiento de las poblaciones en cuatro grupos. En donde uno de los grupos está integrado por la cuenca del Cuareim, conteniendo los tres linajes altamente divergentes encontrados en el estudio filogenético y en la red de haplotipos, siendo la única población natural que presenta este linaje. Por tanto podríamos decir que el origen de los individuos que presentan los haplotipos H24 y H26 de Villa Constitución podrían tener su origen en la cuenca del Cuareim. Un segundo grupo estaría integrado por la población de origen cultivado en la estación de DINARA (Villa Constitución), con representantes de los linajes Rq3 y Rq4. El tercer grupo integraría las localidades de Queguay, Lunarejo y Rincón del Bonete que presentan haplotipos pertenecientes a dos linajes Rq2 y Rq3; este grupo está caracterizado por la presencia del linaje Rq2 en las tres poblaciones. Por último, se encuentra un cuarto grupo con el mayor número de poblaciones analizadas, que sólo presentan haplotipos del linaje Rq3. En la red de haplotipos este subgrupo, conforma una topología en forma de estrella, con un haplotipo central más frecuente y haplotipos derivados separados por pocos pasos mutacionales, lo que indicaría una reciente divergencia de los mismos. Esta reticulación encontrada dentro del linaje Rq3 podría ser la causa de la politomía no resuelta encontrada entre los linajes de *R. quelen*, aunque ésta también podría tener su explicación en una rápida evolución donde las nuevas mutaciones no se fijarían, por lo que las reconstrucciones filogenéticas estarían marcadas por los polimorfismos ancestrales. Por su parte, el subgrupo conformado por los haplotipos H9, H11, H17, H18 representaría a los haplotipos más ancestrales dentro del linaje Rq3. Estos también se encuentran en las poblaciones de Laguna Castillos, Laguna del Sauce, Laguna de Rocha, Talita, Sauce

Grande, Maldonado, Paso Mazangano, Laguna Negra y Abrojal, dejando como hipótesis más parsimoniosa la dispersión de este linaje en periodos de alto nivel del mar y posterior estructuración. Esta hipótesis se sustenta en que no se han encontrado haplotipos derivados compartidos por dos poblaciones, con la excepción del grupo conformado por los haplotipos H7, H27, H69 y H77, en el que el haplotipo H77 se encuentra en la estación de Villa Constitución. Como ya vimos esta estación conforma una población artificial, pudiendo atribuir el origen de este haplotipo a la población de la Laguna del Sauce. Respecto a las poblaciones de Laguna Blanca y Rincón del Bonete que sólo tienen haplotipos derivados, se sugiere un origen posterior al resto de las poblaciones. A pesar de que existe cierta estructuración poblacional relacionada con la estructura geográfica de Norte a Sur, el test de Mantel descartó la hipótesis de aislamiento por distancia. Esto es de esperar cuando existen haplotipos altamente divergentes coexistiendo en una misma cuenca y cuando haplotipos estrechamente relacionados se encuentran ampliamente distribuidos y presentes en la mayoría de las localidades muestreadas.

4.6. Análisis microgeográfico en tres lagunas costeras de Uruguay mediante *loci* de microsatélites y secuencias del gen *citocromo b*

En este estudio se ha realizado un análisis poblacional a escala microgeográfica en las poblaciones mejor representadas en nuestro conjunto de datos. En este sentido, las poblaciones de Laguna del Sauce, Laguna Castillos y Laguna de Rocha fueron analizadas en base a marcadores moleculares de tipo microsatélite y mitocondriales.

En cuanto al test de equilibrio de Hardy-Weinberg, éste sólo resultó significativo en el *locus* Pc97 en la Laguna del Sauce, y en el test global sobre *loci* mediante el test de Fisher en la misma población. Este resultado podría tener su explicación en la presencia de alelos nulos en Pc97 en la Laguna del Sauce inferido mediante el programa Microchecker, ya que el resto de los marcadores no mostraron apartamientos de las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, ni indicios de errores de genotipado ni de presencia de alelos nulos. Por lo tanto, podemos decir que nuestro estudio sugiere que las tres lagunas se comportan como tres poblaciones que cumplen con los supuestos de Hardy-Weinberg, es decir, que existe panmixia y

ausencia de selección. A su vez, podemos descartar efecto Wahlund, es decir, la depresión de heterocigosis debido a la subestructuración dentro de la población. Además, no se encontraron indicios de desequilibrio de ligamiento entre pares de *loci* en las tres poblaciones, ya sea por ausencia de recombinación entre dos *loci* o debido al análisis de la mezcla de dos o más poblaciones, con distintas combinaciones y frecuencias alélicas.

Los estadísticos indicadores de diversidad genética de microsatélites en las tres lagunas analizadas han mostrado niveles por *locus* de medios a altos, tanto el contenido de información polimórfica (0,247-0,870) como de heterocigosis esperada (0,272-0,897). Se observaron niveles medios de riqueza alélica (2,770-11,123), destacando Pcor2 como y Pcor1 como los loci de mayor y menor diversidad alélica sobre poblaciones, respectivamente. Como ya mencionamos, este estadístico se distingue del resto por ser independiente del tamaño muestral. Estos resultados se contraponen a lo encontrado por Ribolli & Zaniboni-Filho (2009), en un análisis del comportamiento reproductivo de *R. quelen* en alto Uruguay, Brasil. En este estudio los autores encontraron valores altos de contenido de información de polimorfismo (PIC) en Pcor1, además de Pcor2 y Rh1, en común con este estudio, mientras Pc17 y Pc97 mostraron ser menos polimórficos. Por lo tanto, teniendo en cuenta los niveles de polimorfismo en las tres lagunas costeras, principalmente teniendo en cuenta la riqueza alélica, podemos recomendar el uso de Pcor 2, Rh1 y Pc97 para análisis de paternidad ya que han mostrado altos niveles de polimorfismo. Sin embargo, debido a las diferencias encontradas con otras poblaciones de *R. quelen* (Ribolli & Zaniboni-Filho 2009), se recomienda una evaluación tanto de niveles de diversidad como de presencia de alelos nulos para las poblaciones objetivo de análisis de paternidad.

Cuando comparamos los parámetros descriptivos de *loci* microsatélite entre las tres poblaciones encontramos que existe un mayor número de alelos muestreados por *loci*, en promedio, en la Laguna del Sauce y menor en la Laguna de Rocha, esta tendencia podría estar influida por el tamaño muestral. Sin embargo, cuando comparamos los valores de riqueza alélica, Heterocigosis esperada y el contenido de información polimórfica, estadísticos menos sensibles al tamaño muestral, la Laguna del Sauce continúa mostrando los niveles de diversidad más altos. Por otro lado, las tendencias

de cuál sería la laguna menos diversa no es clara, ya que la Laguna Castillos y Laguna de Rocha muestran valores similares de diversidad.

A diferencia de lo revelado por las secuencias del gen *citocromo b*, en donde se encontraron niveles bajos de estructuración, en cuanto a los valores de F_{ST} entre las tres lagunas en base a marcadores microsatélite, éstos evidenciaron altos niveles de estructuración, cercanos al aislamiento. Además, la red de haplotipos basada en el marcador mitocondrial evidenció secuencias endémicas en cada una de las tres lagunas, aunque las tres lagunas presentan los haplotipos que conforman el grupo ancestral (H9, H11, H17 y H18) del clado Rq2 más abundante (60%). Mientras que el análisis bayesiano de cluster, el método de unión de vecinos, test de Hardy-Weinberg y el estadístico F_{ST} basados en los *loci* nucleares sustentan que las muestras obtenidas de las tres lagunas estudiadas a microescala geográfica conforman tres poblaciones que se encuentran aisladas genéticamente. Como se ha mencionado el estadístico F_{ST} puede estar relacionado con el flujo génico, de la misma manera que la estructura poblacional es consecuencia del intercambio o no de migrantes entre las distintas localidades. Por lo que la diferenciación observada podría ser la consecuencia de la estructuración geográfica donde las Lagunas habrían representado sistemas aislados, no permitiendo el intercambio de individuos en la historia evolutiva de estas poblaciones. De igual forma, los resultados del AMOVA en relación a las lagunas mediante los dos tipos de marcadores se contraponen. El *citocromo b* podría estar recuperando una relación ancestral entre la Laguna del Sauce y Laguna de Rocha, más relacionadas entre sí que con Laguna Castillos. Los resultados de microsatélites reconstruyen una relación más cercana entre Laguna Castillos y Laguna de Rocha, lo que está en concordancia con la estructura de las cuencas actuales, donde Laguna Castillos y Laguna de Rocha pertenecen a la cuenca del Océano Atlántico y la Laguna del Sauce a la del Río de la Plata. Las diferencias entre los resultados obtenidos mediante el análisis de ambos tipos de marcadores podrían deberse a la alta tasa evolutiva de los microsatélites que le permite resolver relaciones por debajo del nivel específico y definir la estructura poblacional (Chistiakov *et al.* 2006; Piorski *et al.* 2008). Estos resultados indicarían que existe cierta estructuración a causa del aislamiento geográfico entre las tres lagunas, este aislamiento habría ocurrido en un pasado reciente ya que esta estructuración no pudo ser recuperada con el marcador

mitocondrial. Por otro lado, esta oposición entre los resultados obtenidos mediante los dos tipos de “set” de datos podría ser debido a que el marcador mitocondrial al estar bajo la fuerza de selección purificadora no revele de forma fiel la historia demográfica de poblaciones que han divergido recientemente, a diferencia de los marcadores microsátélites de tipo anónimo que son considerados neutrales a la selección. Una nueva hipótesis surge al tomar en cuenta la herencia del marcador mitocondrial, reconstruyendo la historia evolutiva de linajes matriarcales. Esto podría ser importante cuando existen diferencias comportamentales entre sexos tales como migración o filopatría, aunque esto no ha sido documentado para *R. cf. quelen*.

A diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, en un análisis del alto Uruguay de la especie *Pimelodus maculatus* de la familia Pimelodidae, Ribolli *et al.* (2012) basados en *loci* de tipo microsátélites, encontraron una alta diversidad genética en promedio ($H_e = 0,629-0,948$) y valores bajos del estadístico F_{ST} (inferior a 0,03). Sin embargo, estos autores analizaron localidades que se encuentran conectadas en una misma cuenca para una especie con una alta tasa migratoria, mientras que la estructura geográfica de las lagunas estudiadas en el presente trabajo supone una barrera para el flujo génico. De esta manera, las poblaciones aisladas de estas lagunas están más expuestas a los efectos de la deriva génica, disminuyendo los valores de la diversidad génica y aumentando los valores de F_{ST} debido a la falta de intercambio de migrantes y la evolución independiente de las lagunas. En otro estudio basado en *P. corruscans* encontraron un amplio rango de heterocigosidad esperada (0,31-0,94) y niveles intermedios de divergencia con valores de F_{ST} en el rango de 0,034-0,163 (Pereira *et al.* 2009). El análisis, que se llevó a cabo en el sistema Paraná-Paraguay, permitió identificar distintas poblaciones de esta especie migratoria pudiendo evidenciar que a diferencia de nuestro estudio la estructura poblacional de la especie estaba marcada por el fenómeno de “homing” o filopatría, este fenómeno ya había sido propuesto para esta especie en base a un estudio de captura y recaptura (Godinho *et al.* 2007).

4.7. Unidades prioritarias para la conservación

Los siete linajes mitocondriales encontrados en *R. quelen*, como vimos presentan valores de divergencia similares a los encontrados entre especies emparentadas, por lo que en este trabajo se proponen como unidades evolutivamente significativas (ESUs). En este sentido, se entiende necesario, dentro del Uruguay, conservar las poblaciones del Cuareim, Lunarejo o Queguay, mientras que el linaje Rq3 parecería menos vulnerable al encontrarse ampliamente expandido en las cuencas del Uruguay. Sin embargo, como ya mencionamos, es necesario un análisis de este tipo con marcadores nucleares para la confirmación de estas unidades evolutivamente significativas.

Las poblaciones presentes en las tres lagunas, Laguna del Sauce, Laguna Castillos y Laguna de Rocha, representarían diferentes “pools” genéticos que deberían considerarse como unidades de manejo (MU) independientes y por tanto deberían ser conservadas en pos de conservar la diversidad genética total de la especie en el área de estudio, ya que podrían incluso representar adaptaciones locales únicas (Moritz 1994, Waits *et al.* 1998, Piorski *et al.* 2008).

4.8. Conclusión

Este estudio constituye el primer análisis de tipo filogeográfico de *R. quelen* en Uruguay, encontrando una alta estructuración dentro del grupo taxonómico *R. quelen cis-andino*, presentando siete linajes mitocondriales altamente divergentes, a nivel de especie, y confirmando la hipótesis de que éste sería un complejo de especies. Además, se han identificado tres nuevos linajes mitocondriales dentro de las cuencas de Uruguay.

El fenómeno de divergencia de *R. quelen* estaría marcado por el fenómeno de vicarianza entre grandes cuencas *cis-andinas*. La historia de *R. quelen* revela dos contactos secundarios a través del fenómeno de captura de cuencas entre la cuenca del Amazonas y la de Paraná-Uruguay, el primero aproximadamente 3,25 atrás y el segundo 2,3 MA. Mientras que en el Paraná-Uruguay este fenómeno podría haber ocurrido debido a la estructuración, consecuencia de la reducción de nivel del mar y posterior contacto entre cuencas.

El bagre negro, una de las especies autóctonas prioridad en la acuicultura en el Uruguay y prioritaria para la conservación para SNAP por ser recurso pesquero, muestra una alta diversidad en el país, presentando tres linajes mitocondriales de los 7 encontrados en este trabajo. Además, dentro de estos linajes encontramos representados dos clados, uno emparentado con el linaje de la cuenca del Amazonas que está presente en la localidad de la Laguna Franquía y en Villa Constitución, y otro clado que está presente en las cuencas del Paraná, Uruguay, Río de la Plata, Laguna Merín y que encontramos en la mayoría de las localidades muestreadas.

Los resultados del análisis poblacional indican que la población del Cuareim representa gran parte de la diversidad genética de *R. quelen* en el Uruguay. A su vez, encontramos que las poblaciones de Lunarejo, Queguay y Rincón del Bonente conforman un grupo diferente respecto al resto de las poblaciones de la cuenca del Río Negro, Laguna Merín, Río de la Plata y Océano Atlántico, caracterizadas por presentar únicamente el linaje más abundante (Rq2).

Si bien los dos tipos de marcadores, microsatélite y *citocromo b*, evidencian distintos resultados, estos se complementan a la hora de reconstruir la historia de *R. quelen* en el Uruguay. En tal sentido, el análisis de ambos marcadores a nivel microgeográfico ha permitido identificar tres MUs que se corresponden con las poblaciones de Laguna del Sauce, Laguna Castillos y Laguna de Rocha.

4.9. Perspectivas

Debido a los problemas taxonómicos en *R. quelen* presentados en esta Tesis y la estructura encontrada en los análisis filogenéticos, surge la necesidad de realizar una revisión sistemática basada en caracteres morfológicos de *R. quelen*, principalmente de los linajes encontrados en este trabajo.

Se propone extender el muestreo en aquellas localidades menos representadas, como el Lunarejo, Queguay y cuenca de la Laguna Merín, con el fin de conocer si la diversidad encontrada es representativa de la diversidad presente en las cuencas del Uruguay y con ello aumentar la robustez de nuestros análisis. En cuanto a las unidades prioritarias para la conservación, es necesario el análisis de las ESUs encontradas en este estudio utilizando marcadores nucleares neutrales de tipo microsatélite para poder ratificarlas como tales. Mientras que para poder identificar las distintas MUs presentes en el Uruguay es prioritario el análisis del resto de las localidades con *loci* nucleares de herencia biparental, tipo microsatélites.

Como hemos visto, es necesario, una vez identificadas las unidades evolutivas y de manejo, realizar un análisis de tipo ecológico no sólo para confirmar su estatus como unidades prioritarias para la conservación, sino también para su caracterización como potenciales variedades para el cultivo en la acuicultura, ya que estas podría presentar características de importancia para esta actividad, como por ejemplo: mayores tasas de crecimiento, resistencia a enfermedad, mayores tallas. Y lo que es más importante, variabilidad genética subyacente para estos rasgo, como materia prima esencial en la fundación de programas de selección genética.

Bibliografia

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* 19: 716-723.
- Anisimova M, Gascuel G. 2006. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Syst. Biol.* 55 (4): 539-552.
- Anza JA. 2006. Revisão das espécies do gênero *Rhamdia* (Siluriformes: Heptateridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade subestimada do gênero. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice JC. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- Avice JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36: 3–15.
- Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165.
- Barluenga M, Meyer A (2004) Old fish in a young lake stone loach (Pisces: *Barbatula barbatula*) populations in Lake Constance are genetically isolated by distance. *Mol. Ecol.* 14: 1229-1239.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bermingham E, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol. Ecol.* 7: 367-369.
- Betancur-R R. 2009. Molecular phylogenetics and evolutionary history of ariid catfishes revisited: a comprehensive sampling. *BMC Evol. Biol.* 9:175 doi:10.1186/1471-2148-9-175.
- Bichuette ME, Trajano E. 2005. A new cave species of *Rhamdia* (Siluriformes: Heptateridae) from Serra do Ramalho, northeastern Brazil, with notes on ecology and behavior. *Neotrop. Ichthyol.* 3(4): 587-595.

- Bockmann FA, Guazzelli GM. 2003. Heptapteridae (Heptapterids). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. 406-431.
- Brown WM, George M Jr., Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1967-1971.
- Buckley TR. 2002. Model misspecification and probabilistic tests of topology: evidence from empirical data sets. Syst. Biol. 51(3): 509-523.
- Cardoso YP, Montoya-Burgos JI. 2009. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. Mol. Ecol. 4: 947-964
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am. J. Hum. Genet. 19: 233-257.
- Chakraborty R, de Andrade M, Daiger S, Budowle B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. Ann. Hum. Genetics 56: 45-57.
- Chenoweth SF, Hughes JM, Keenan CP, Lavery S. 1998. Concordance between dispersal and mitochondrial gene flow: isolation by distance in a tropical teleost, Lates calcarifer (Australian barramundi). Heredity 80:187-197.
- Chistiakov DA, Hellems B, Volckaert FAM. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture. 255: 1-29.
- Clavijo C, Olazarri J. 2009. Mollusca, Bivalvia, Mycetopodidae, Anodontites trigonus: Southern dispersion in the Uruguay river. Check List 5(3): 530-532.
- Crisci JV, Katinas L, Posadas P. 2003. *Historical biogeography: an introduction*. Ed. Harvard University Press.
- Dereeper DCA, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic. Acids. Res.
- Do Nascimento C, Provenzano F, Lundberg JG. 2004. *Rhamdia guasarensis* (Siluriformes: Heptapteridae), a new species of cave catfish from the Sierra de Parijá, northwestern Venezuela. Proceedings of the Biological Society of Washington 117(4): 564-574.

- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4(5).
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214.
- Eck RV, Dayhoff MO. 1966. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A. 2001. The *Cytochrome b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J. Mol. Evol.* 53: 89-103.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Ferraris Jr. CJ. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fu Y-X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- García C. 2009. Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptateridae): análise de relações evolutivas. São Paulo.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52(5):696–704.
- Godinho AL, Kynard B and Godinho HP. 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, pimelodidae) in the São Francisco River, Brazil. *Environ. Biol. Fish.* 80: 421-433.
- Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. 2000. Biology of *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). *Ciê. Rural, Santa Maria*, 30 (1): 179-185.

- Goudet J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J. Hered.* 86: 485–486.
- Graur D, Li W-H. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 2nd edition.
- Hardman M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Mol. Phylogenetic. Evol.* 37: 700-720.
- Harpending RC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Hein J, Schierup M, Wiuf C. 2004. *Gene genealogies, variation and evolution: a primer in coalescent theory*. Oxford University press.
- Hey J, Machado CA. 2003. The study of structured populations-New hope for a difficult and divided science. *Nature.* 4: 535-543.
- Hoarau G, Rijnsdorp AD, Van der Veer HW, Stam T, Olsen L. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Mol. Ecol.* 11: 1165-1176.
- Holder M, Lewis PO. 2003. PHYLOGENY ESTIMATION: TRADITIONAL AND BAYESIAN APPROACHES. *Nat. Rev. Genet.* 4(4): 275-284.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099–1106.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kingman JFC. 1982. The coalescent. *Stochastic Proc. Appl.* 13: 235—248.
- Lanave C, Preparata G, Saccone C, Serio G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20 (1): 86–93.
- Langella O. 1999. Populations v1.2.28 (12/5/2002): a population genetic software. CNRS UPR9034. Available at <http://www.pge.cnrs.gif.fr/bioinfo/populations-/index.php>.

- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lieberman BS. 2000. *Paleobiogeography: Using Fossils to Study Global Change, Plate Tectonics, and Evolution*. New York: Kluwer Academic Press.
- Liedloff A. 1999. Mantel nonparametric test calculator for windows. Version 2.00. Distributed by the author, School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane.
- Luchini LM. 1988. Produccion de "bagre negro" o "catfish sudamericano". *Rev. Arg. Prod. Anim* 8: 433-439.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba M, Wesselingh F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Edipucrs, Porto Alegre 13–48.
- Lundberg JG, McDade L. 1986. A description of the rare Venezuelan catfish *BrachyRhamdia imitator* Myers (Siluriformes, Pimelodidae) with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Notula Nature* 463: 1-24.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.
- Martinez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Silva LF, Venere PC, Souza IL, Moreira-Filho O. 2011. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*. 64(1): 121-128.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Moeser AA, Bermingham E. 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite *loci* for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). *Mol. Ecol. Notes* 5(2): 363-365.
- Moritz C. 1994. Defining "Evolutionarily Significant Units" for consevation. *Trends Ecol. Evol.* 9(10): 373-375.

- Nelson JS, Crossman EJ, Espinosa-Pérez H, Findley LT, Gilbert CR, Lea RN, Williams JD. 2004. Common and scientific names of fishes from United States, Canada, and Mexico. Sixth Edition. American Fisheries Society, Special Publ. 29. Bethesda, Maryland. 1-386.
- Nei M, Tajima F, Tatenno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from DNA analysis. Proc. 5th World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod. 21: 405-412.
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei M, Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Inc. USA.
- Paetkau D. 1999. Using Genetics to Identify Intraspecific Conservation Units: a Critique of Current Methods. Conserv. Biol. 13(6):1507-1509.
- Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. 1991. The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
- Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. Mol. Phylogenet. Evol. 25: 172-189.
- Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. Ecol. Freshw. Fish. 18: 215–225.
- de Pinna MCC. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (ed.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Edipucrs, Porto Alegre 279–330.
- Piorski NM, Sanches A, Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Carrillo-Avila M, Freitas PD, Galetti Jr. PM. 2008. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. Braz. J. Biol. 1039-1050.
- Posada D, Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.

- Rambaut A, Drummond AJ. 2009. Tracer v1. <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>.
- Rambaut A, Drummond AJ. 2011. TreeAnnotator version 1.6.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Revaldaves E, Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* 5: 463-465.
- Ribolli J, Zaniboni-Filho E. 2009. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotrop. Ichthyol.* 7(4):629-634.
- Ribolli J, Rodrigues de Melo CM, Zaniboni-Filho E. 2012. Genetic characterization of the Neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genet. Mol. Biol.* 5(4):761-9.
- Rodriguez F, Oliver JL, Marin A, Medina JR. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142:485–501.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8: 103-106.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Schneider S, Excoffier L. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.
- Silfvergrip AMC. 1996. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). Swedish Museum of Natural History, Stockholm.
- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10: 407-417.
- Sullivan JP, Lundberg JG, Hardman M. 2005. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 636-662.

- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM. 1996. Phylogenetic Inference. In Molecular systematics, 2nd edition. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts
- Swofford DL. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Takezaki N, Nei M. 1996. Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *G. S. A.* 144: 389-399
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J. 2001. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (10): 5426-5432.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Torrico JP, Hubert N, Desmarais E, Duponchelle F, Rodriguez JN, Montoya-Burgos J, Davila CG, Carvajal-Vallejos FM, Grajales AA, Bonhomme F, Renno JF (2009) Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Mol Phylogenet Evol* 51 (3): 588–594.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. col. Notes.* 4 (3): 535-538.
- Vaz BS, Cerqueira GM, Silva JC, Manzke VHB, Moreira CGA, Moreira HLM. 2010. Sequence analysis of the growth hormone gene of the South American catfish *Rhamdia quelen*. *Gene. Mol. Res.* 9(4): 2184-2190.

- Vera M, García-Marin JL, Martínez P, Araguas RM, Bouza C. 2012. Identification and conservation of remnant genetic resources of brown trout in relict populations from Western Mediterranean streams. *Hydr.* 707(1): 29-45.
- Vergara J, Azpelicueta MM, Garcia G. 2008. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotrop. Ichthyol.* 6(1): 75-85.
- Vrijenhoek RC. 1989. Genotypic diversity and coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. In OTTE, D. and ENDLER, J. (Eds.). *Speciation and its consequences*. Sunderland MA.
- Weber A, Allegrucci G, Sbordoni V. 2003. *Rhamdia laluchensis*, a new species of troglobitic catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from Chiapas, Mexico. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 14(3): 273-280.
- Weber A, Wilkens H. 1998. *Rhamdia macuspanensis*: a new species of troglobitic pimelodid catfish (Siluriformes; Pimelodidae) from a cave in Tabasco, Mexico. *Copeia* 4: 998-1004.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Welcomme RL, Barg U. 1997. *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries -5: Aquaculture Development*. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Wilkens A. 2001. Convergent adaptations to cave life in the *Rhamdia laticauda* catfish group (Pimelodidae, Teleostei). *Environ. Biol. Fish* 62: 251-261.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Zarske A. 2003. Wiederbeschreibung von *Rhamdia marthae* (Sand & Black, 1985) (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae). *Zool. Abh. Staat. Mus. Tierk. Dresden* 53: 47-55.
- Zink RM. 2005. Natural selection on mitochondrial DNA in *Parus* and its relevance for phylogeographic studies. *Proc. R. Soc. B.* 272: 71-78.

Anexo I. Lista de individuos *R. quelen* trabajados en este estudio. Se indican: el origen muestral; el haplotipo y linaje mitocondrial del marcador *citocromo b* (-: individuos no analizados para el marcador mitocondrial); y los individuos genotipados para marcadores microsatélite (x).

Individuos	Localidad	Cuenca	Haplotipo	Linaje	Genotipado
P1689	Laguna del Sauce	RP	h07	Rq3	
P1693	Laguna del Sauce	RP	h07	Rq3	X
P1983	Laguna del Sauce	RP	h07	Rq3	
P1994	Laguna del Sauce	RP	h07	Rq3	
P2076	Laguna del Sauce	RP	h08	Rq3	
P2077	Laguna del Sauce	RP	h09	Rq3	
P2135	Tajamar, cuenca abrojal	RN	h10	Rq3	
P1664	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1666	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1667	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1668	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1669	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1670	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1671	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1673	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1675	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1690	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1694	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1716	Laguna Negra	OA	h11	Rq3	
P1717	Arroyo de las Víboras, Colonia	RP	h11	Rq3	
P1718	Punta Gorda, Colonia	RP	h11	Rq3	
P1734	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1735	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1736	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	X
P1752	Aº Talita, Santa Lucía	RP	h11	Rq3	
P1753	Aº Talita, Santa Lucía	RP	h11	Rq3	
P1772	Sauce Grande	RP	h11	Rq3	
P1773	Sauce Grande	RP	h11	Rq3	
P1777	Paso Mazangano-Paso Aguiar	RN	h11	Rq3	
P1790	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1815	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1816	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1818	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1820	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1822	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1824	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1828	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1829	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	X
P1830	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1831	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	

P1833	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1836	Maldonado, Frente a gruta de Salamanca	OA	h11	Rq3	
P1837	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1838	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1839	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1840	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1841	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1842	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1843	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1844	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1845	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1846	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1848	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	X
P1878	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1880	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1881	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1883	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1885	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1886	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1887	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1888	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1890	Laguna Castillos	OA	h11	Rq3	
P1892	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1893	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1894	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1896	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1897	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1898	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1899	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1900	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1902	Laguna de Rocha	OA	h11	Rq3	
P1960	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1962	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1966	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1970	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1971	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1972	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h11	Rq3	
P1974	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1975	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1976	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1977	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1979	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1982	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1986	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	
P1990	Laguna del Sauce	RP	h11	Rq3	

P1992	Laguna Negra	OA	h11	Rq3	
P2136	Tajamar, cuenca abrojal	RN	h11	Rq3	
P2141	Rincón del Bonete	RN	h12	Rq2	
P2143	Rincón del Bonete	RN	h13	Rq3	
P2144	Rincón del Bonete	RN	h14	Rq3	
P0485	Río Cuareim	RU	h15	Rq2	
P2142	Rincón del Bonete	RN	h16	Rq3	
P1993	Laguna Negra	OA	h17	Rq3	
P1989	Laguna del Sauce	RP	h18	Rq3	
P1988	Laguna del Sauce	RP	h19	Rq3	
P1985	Laguna del Sauce	RP	h20	Rq3	
P1981	Laguna del Sauce	RP	h21	Rq3	
P1980	Río Queguay	RU	h22	Rq2	
P1973	Laguna del Sauce	RP	h23	Rq3	
P1969	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h24	Rq4	
P1964	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h25	Rq3	
P1963	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h26	Rq4	
P1961	Salto, Villa Constitución. Instalaciones DINARA	RU	h27	Rq3	
P1901	Laguna de Rocha	OA	h28	Rq3	
P1706	Laguna Castillos	OA	h29	Rq3	X
P1895	Laguna de Rocha	OA	h29	Rq3	
P1884	Laguna Castillos	OA	h30	Rq3	
P1707	Laguna Castillos	OA	h31	Rq3	X
P1817	Laguna Castillos	OA	h31	Rq3	X
P1832	Laguna Castillos	OA	h31	Rq3	
P1879	Laguna Castillos	OA	h31	Rq3	
P1882	Laguna Castillos	OA	h31	Rq3	
P1877	Laguna Castillos	OA	h32	Rq3	
P1847	Laguna de Rocha	OA	h33	Rq3	X
P1835	Laguna Castillos	OA	h34	Rq3	
P1834	Laguna Castillos	OA	h35	Rq3	
P1827	Laguna Castillos	OA	h36	Rq3	X
P1826	Laguna Castillos	OA	h37	Rq3	X
P1825	Laguna Castillos	OA	h38	Rq3	
P1823	Laguna Castillos	OA	h39	Rq3	X
P1819	Laguna Castillos	OA	h40	Rq3	X
P1789	Aº Lunarejo, Paso Real. Cuenca Tacuarembó	RU	h41	Rq2	
P1776	Paso Mazangano-Paso Aguiar	RN	h42	Rq3	
P1775	Sauce Grande	RP	h43	Rq3	
P1774	Sauce Grande	RP	h44	Rq3	
P1771	Sauce Grande	RP	h45	Rq3	
P1723	Laguna Blanca	OA	h46	Rq3	
P1768	Laguna Blanca	OA	h46	Rq3	
P1769	Laguna Blanca	OA	h46	Rq3	
P1764	Laguna Blanca	OA	h47	Rq3	

P1750	A° Talita, Santa Lucía	RP	h48	Rq3	
P1749	Laguna del Sauce	RP	h49	Rq3	
P1733	Laguna del Sauce	RP	h50	Rq3	X
P1731	Laguna del Sauce	RP	h51	Rq3	
P1730	Laguna del Sauce	RP	h52	Rq3	X
P1729	Laguna del Sauce	RP	h53	Rq3	X
P1728	Laguna del Sauce	RP	h54	Rq3	X
P1724	Santa Lucía	RP	h55	Rq3	
P1722	Laguna Blanca	OA	h56	Rq3	
P1721	Desague Laguna Franquía	RU	h57	Rq4	
P1720	Río Cuareim	RU	h58	Rq3	
P1709	Laguna Castillos	OA	h59	Rq3	X
P1708	Laguna Castillos	OA	h60	Rq3	X
P1705	Laguna Castillos	OA	h61	Rq3	X
P1704	Laguna Castillos	OA	h62	Rq3	X
P1703	Laguna del Sauce	RP	h63	Rq3	
P1701	Laguna del Sauce	RP	h64	Rq3	X
P1698	Laguna del Sauce	RP	h65	Rq3	X
P1696	Laguna del Sauce	RP	h66	Rq3	X
P1695	Laguna del Sauce	RP	h67	Rq3	X
P1692	Laguna del Sauce	RP	h68	Rq3	X
P1691	Laguna del Sauce	RP	h69	Rq3	
P1688	Laguna del Sauce	RP	h70	Rq3	
P1687	Laguna del Sauce	RP	h71	Rq3	X
P1686	Laguna del Sauce	RP	h72	Rq3	X
P1685	Laguna del Sauce	RP	h73	Rq3	X
P1684	Laguna del Sauce	RP	h74	Rq3	X
P1682	Laguna del Sauce	RP	h75	Rq3	X
P1681	Laguna del Sauce	RP	h76	Rq3	X
P1680	Laguna del Sauce	RP	h77	Rq3	
P1679	Laguna del Sauce	RP	h78	Rq3	X
P1674	Laguna del Sauce	RP	h79	Rq3	
P1672	Laguna del Sauce	RP	h80	Rq3	
P1665	Laguna del Sauce	RP	h81	Rq3	
P1663	Laguna del Sauce	RP	h82	Rq3	X
P1662	Laguna del Sauce	RP	h83	Rq3	
P1661	Laguna del Sauce	RP	h84	Rq3	X
P1660	Laguna del Sauce	RP	h85	Rq3	X
P1821	Laguna Castillos	OA	-	-	X
P1683	Laguna del Sauce	RP	-	-	X
P1697	Laguna del Sauce	RP	-	-	X
P1699	Laguna del Sauce	RP	-	-	X

RU: Río Uruguay; OA: Océano Atlántico; RN: Río Negro; RP: Río de la Plata.

Anexo II. Lista de secuencias de *R. quelen* obtenidos del GenBank

Accession number	Localidad	Haplotipos	Linaje
AY036743	Misiones, A°Ñandú	h1	Rq1
AY036744	Cuenca del Paraná, Iguazú, A° Yucuy	h1	Rq1
EF564743 (P284)	Misiones, Cuñapirú	h6	Rq1
AY036742	Cuenca del Paraná, Río Santa Lucía	h2	Rq4
AY036740	Cuenca del Amazonas, Río Manu	h3	Rq5
AY036741	Cuenca del Amazonas, Río Manu	h3	Rq5
DQ119395	Datos no disponible	h4	Rq6
AY036739	Guyana, Essequibo	h4	Rq6
AY036737	Venezuela, Orinoco	h5	Rq7
AY036738	Venezuela, Orinoco	h5	Rq7

Anexo III. Lista de secuencias de los género *Rhamdia* y *Pimelodella* obtenidas del GenBank

Accession number	Species
AY036709	<i>R. laticauda</i>
AY036708	<i>R. laticauda</i>
AY036672	<i>R. guatemalensis</i>
AY036671	<i>R. guatemalensis</i>
AY036693	<i>R. aff. wagneri</i>
AY036694	<i>R. aff. wagneri</i>
AY036725	<i>R. aff. cabrae</i>
AY036726	<i>R. aff. cabrae</i>
AY036735	<i>R. cinerascens</i>
AY036736	<i>R. cinerascens</i>
AY036734	<i>R. aff. rogersi</i>
AY036733	<i>R. rogersi</i>
AY036718	<i>R. nicaraguensis</i>
AY036719	<i>R. nicaraguensis</i>
AY791351	<i>Pimelodella</i>
AY036751	<i>Pimelodella</i>

Anexo IV. Frecuencias génicas de los cinco loci en las tres lagunas analizadas.

Localidad:	L. Castillos	L. Rocha	L. del Sauce
Pcor1			
N:	20	12	32
83	0,050	0,000	0,547
85	0,850	0,542	0,188
87	0,100	0,292	0,078
89	0,000	0,000	0,047
91	0,000	0,042	0,047
93	0,000	0,125	0,031
95	0,000	0,000	0,031
97	0,000	0,000	0,031
Rh1			
N:	20	12	27
206	0,050	0,000	0,000
209	0,025	0,000	0,000
210	0,100	0,000	0,019
211	0,025	0,000	0,000
212	0,025	0,083	0,241
213	0,000	0,000	0,019
216	0,325	0,000	0,000
218	0,125	0,542	0,167
220	0,000	0,000	0,037
221	0,000	0,000	0,019
222	0,200	0,000	0,019
224	0,000	0,250	0,037
226	0,000	0,000	0,056
228	0,000	0,000	0,056
230	0,025	0,000	0,000
232	0,000	0,000	0,019
234	0,000	0,000	0,019
236	0,000	0,042	0,093
238	0,000	0,083	0,019
240	0,100	0,000	0,111
242	0,000	0,000	0,037
244	0,000	0,000	0,019
250	0,000	0,000	0,019
Pcor2			
N:	20	12	30
188	0,000	0,000	0,017
190	0,000	0,042	0,033
194	0,050	0,042	0,350
195	0,000	0,000	0,017
196	0,000	0,000	0,117
200	0,000	0,000	0,033
204	0,250	0,000	0,000

208	0,125	0,000	0,000
218	0,125	0,000	0,000
222	0,000	0,000	0,083
224	0,025	0,042	0,017
226	0,100	0,042	0,150
228	0,000	0,458	0,000
230	0,075	0,042	0,017
232	0,100	0,000	0,000
234	0,000	0,083	0,017
240	0,000	0,042	0,100
242	0,025	0,083	0,017
244	0,075	0,042	0,033
248	0,050	0,083	0,000
Pc97			
N:	20	12	32
242	0,025	0,333	0,453
248	0,125	0,000	0,109
250	0,000	0,000	0,016
252	0,050	0,000	0,000
254	0,000	0,000	0,031
261	0,025	0,542	0,000
263	0,025	0,000	0,047
265	0,400	0,000	0,000
267	0,250	0,083	0,000
269	0,025	0,000	0,016
271	0,075	0,000	0,250
286	0,000	0,000	0,031
288	0,000	0,042	0,000
292	0,000	0,000	0,016
294	0,000	0,000	0,031
Pc17			
N:	20	11	23
219	0,000	0,000	0,043
233	0,025	0,045	0,065
235	0,650	0,455	0,457
239	0,000	0,227	0,326
241	0,300	0,000	0,000
243	0,000	0,000	0,043
245	0,025	0,273	0,065