



PEDECIBA

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Universidad de la República - Ministerio de Educación y Cultura - PNUD

ÁREA: BIOLOGÍA
SUB-ÁREA: ZOOLOGÍA

TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografía Comparada de Sciaénidos del Atlántico Sudoccidental

Carlos Alejandro Márquez Herney

Orientador: Dr. Enrique P. Lessa Gallinal

Co-orientador: Dr. Antonio M. Solé-Cava

Asesor: M.Sc. Alfredo N. Pereira Patti

2012

Tesis de Doctorado

Título: Filogeografía comparada de Sciaénidos del Atlántico Sudoccidental

Alejandro Márquez

Orientador: Enrique P. Lessa
Co-Orientador: Antonio M. Solé-Cava
Asesor: Alfredo N. Pereira

Tribunal

Presidente: Dr. Omar Defeo
Vocal: Dra. Graciela García
Vocal: Dr. Walter Norbis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi orientador, el Dr. Enrique Lessa por aceptar orientar esta tesis y por su invaluable guía durante el desarrollo del trabajo.

Gracias a mi co-orientador, el Dr. Antonio Solé-Cava, por aceptarme en su laboratorio y en los “churrascos”.

También agradezco a mi amigo Alfredo Pereira por acompañarme en esta aventura del conocimiento de los recursos pesqueros.

Agradezco al Prof. José Levy (pionero en los análisis genéticos en recursos pesqueros en la región), por interesarse en mi tesis, y apoyarme desde el principio.

Muchas gracias a los miembros del tribunal, cuyos aportes fueron fundamentales para el mejoramiento de esta tesis.

Gracias al Prof. Troccoli por facilitar todo lo que estuviera a su alcance para que pudiera desarrollar mi tesis.

Agradezco a mis compañeras del laboratorio de DINARA, María Noel, Daniela y Sofía por el apoyo y la ayuda recibida.

Gracias a Júlia, por su compañía y por sus cuidados.

Agradezco a Beatriz, por el cariño y la amistad siempre

Gracias a mi amiga Silvita.

Y a muchos otros que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta tesis ¡Gracias!

Tabla de contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1.1 Filogeografía	9
1.2 Cambios climáticos del Pleistoceno Tardío	10
1.3 Historia demográfica de las especies y estructuración de las poblaciones	11
1.4 Factores que pueden modelar la estructura de las poblaciones	12
Áreas de cría	12
Las corrientes marinas en el Atlántico Sudoccidental	13
1.5 Genética y estructura de las poblaciones en peces bajo explotación comercial	13
Definición de stocks	13
La identificación genética de stocks y la actividad pesquera	15
1.6 La Familia Sciaenidae: peces costeros de importancia comercial	16
La corvina <i>Micropogonias furnieri</i>	17
La pescadilla de red <i>Macrodon atricauda</i> (antes <i>Macrodon ancylodon</i>)	17
Las burriquetas <i>Menticirrhus americanus</i> y <i>M. littoralis</i>	18
La pescadilla de calada <i>Cynoscion guatucupa</i> (antes <i>Cynoscion striatus</i>)	20
1.7 Hipótesis de trabajo	22
1.8 Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 2. MÉTODOS GENERALES	24
Localidades	25
Extracción y PCR	26

Amplificación y secuenciación de la región control mitocondrial	26
Análisis de datos	27
CAPÍTULO 3. La corvina <i>Micropogonias furnieri</i>	30
Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker <i>Micropogonias furnieri</i> in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay	31
Anexo 3.1. <i>Micropogonias furnieri</i> (“Extended Bayesian Skyline plot”)	41
CAPÍTULO 4. Las burriquetas <i>Menticirrhus americanus</i> y <i>M. littoralis</i>	43
4.1. Presencia de dos grupos filogenéticamente divergentes en la burriqueta (<i>Menticirrhus americanus</i>) en el Atlántico Sudoccidental	44
Introducción	44
Materiales y Métodos	45
Resultados	49
Discusión	54
Material suplementario	61
4.2. Confirmación molecular y diversidad de la burriqueta <i>Menticirrhus littoralis</i> en aguas uruguayas	63
Introducción	63
Materiales y Métodos	64
Resultados	65
Discusión	69
CAPÍTULO 5. Estructura genética comparada de las pescadillas: <i>Cynoscion guatucupa</i> y <i>Macrodon atricauda</i>	72
Introducción	73
Materiales y Métodos	75
Resultados	78
Discusión	83
CAPÍTULO 6. Discusión General, Conclusiones y Perspectivas	87
6.1 Discusión General	88
Patrones de estructuración de las poblaciones	88

Estudios poblacionales en otras especies costeras en el Atlántico Sudoccidental	89
Historia demográfica y glaciaciones	92
Implicancias para el manejo de las pesquerías.....	93
6.2 Conclusiones.....	100
6.3 Perspectivas.....	101
Referencias.....	103

RESUMEN

Los peces costeros constituyen un modelo para evaluar la estructuración genética de las poblaciones, dado que los cambios en la morfología de la costa y su dinámica ambiental debida a los cambios climáticos del final del Cuaternario, pudieron influenciar la distribución geográfica de los individuos. La identificación de grupos genéticamente divergentes es importante para la protección de la biodiversidad, y es un insumo fundamental cuando existe una actividad extractiva de recursos naturales como las especies objetivo de la pesca.

En esta tesis se presenta la estructura genética y la historia demográfica de 4 especies de la Familia Sciaenidae (más la confirmación de la presencia de una especie para Uruguay) en el Atlántico Sudoccidental, entre Espírito Santo (Brasil) y Bahía Blanca (Argentina).

La corvina *Micropogonias furnieri* y la burriqueta *Menticirrhus americanus* mostraron grupos genéticamente diferenciados entre el Río de la Plata y la región oceánica de Uruguay, lo que indica la presencia de dos stocks de estas especies en aguas uruguayas. En el caso de la corvina, la diferenciación se debió a una diferencia significativa en la distribución de haplotipos entre las dos regiones. En la burriqueta, los individuos de estas dos regiones, representaron dos grupos recíprocamente monofiléticos, con una distribución alopátrica de los individuos de los dos grupos. Uno de estos grupo estuvo representado principalmente en el Río de la Plata, mientras que el otro se distribuyó desde el este de Uruguay (La Coronilla), hasta Espírito Santo (Brasil).

Las dos especies de pescadillas, *Cynoscion guatucupa* y *Macrodon atricauda*, no mostraron evidencia significativa de diferenciación genética en toda el área estudiada, pero las dos especies mostraron patrones de diversidad genética muy diferentes. La pescadilla de calada *C. guatucupa*, mostró altos niveles de

diversidad genética, mientras que lo contrario fue observado en la pescadilla de red *M. atricauda*.

Las poblaciones de las especies analizadas parecen haber respondido a los ciclos de glaciación del final del Cuaternario de tres maneras principales: con una estabilidad o incluso decremento poblacional, con expansiones poblacionales recientes, de los últimos 20.000 a 40.000 años, y con expansiones poblacionales como respuesta eventos de hace 100.000. La primera de las respuestas fue observada en las poblaciones la corvina del Río de la Plata y de Bahía Blanca. Evidencias de expansiones poblacionales recientes se observaron en la población oceánica de la corvina, en ambos grupos de la burriqueta *Menticirrhus americanus*, y en la pescadilla de red *Macrondon atricauda*. La pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa* y la burriqueta *Menticirrhus littoralis* son las especies que mostraron evidencias de expansiones más antiguas.

El conocimiento de la estructura genética de las principales especies costeras de interés pesquero en la Zona Común de Pesca Argentino Uruguayo (ZCPAU), la corvina y la pescadilla de calada, es una información fundamental para el manejo de estos recursos. Si bien no se identificó concordancia entre los patrones de estructuración genética de estas dos especies, la identificación de dos poblaciones de corvina permitiría un ordenamiento de la pesquería de la corvina en función de dos stocks. La explotación del stock más oceánico, menos explotado en la ZCPAU, aliviaría la presión de pesca del stock del Río de la Plata, y dado que la pescadilla de calada se distribuiría conformando un único stock en la ZCPAU esa medida no afectaría significativamente a sus poblaciones.

ABSTRACT

Coastal fishes are a model to assess the genetic structure of populations, since changes in the morphology of the coast and its environmental dynamics due to climate change at the end of the Quaternary could influence the geographic distribution of individuals. The identification of genetically divergent groups is important for the protection of biodiversity, and it is a fundamental input for a natural resource under extractive activities such as fished species.

This thesis presents the genetic structure and demographic history of four species of the Sciaenidae Family (plus the confirmation of the presence of one species for Uruguay) in the Southwest Atlantic, between Espírito Santo (Brazil) and Bahía Blanca (Argentina).

The whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* and the southern kingfish *Menticirrhus americanus* showed genetically distinct groups between the Río de la Plata and the oceanic region of Uruguay, indicating the presence of two stocks of these species in Uruguayan waters. For the whitemouth croaker, the differentiation was due to a significant difference in the distribution of haplotypes between the two regions. In the southern kingfish, individuals from these two regions accounted for two reciprocally monophyletic groups, with an allopatric distribution of individuals in the two groups. One group was primarily in the Río de la Plata, while the other was distributed from eastern Uruguay (The Crown) to Espírito Santo (Brazil).

The two species of weakfish, *Cynoscion guatucupa* and *Macrodon atricauda* showed no significant evidence of genetic differentiation across the study area, but the two species showed very different patterns of genetic diversity. The striped weakfish *C. guatucupa*, showed high levels of genetic diversity, while the opposite was observed in the King weakfish *M. atricauda*. The striped weakfish *Cynoscion guatucupa* and Gulf kingfish *Menticirrhus littoralis* are the species that showed evidence of older expansions.

The populations of the studied species appear to have responded to the cycles of the end of the Quaternary glaciations in three main ways: with a population stability or even decline, with recent population expansions, occurred 20,000 to 40,000 years ago, and with population expansions in response to events occurred 100,000 years ago. The first responses were observed in the whitemouth croaker populations of Rio de la Plata and Bahia Blanca. Evidence of recent population expansions were observed in the ocean populations of the whitemouth, in both groups of the southern kingfish *Menticirrhus americanus* and in the King weakfish *Macrodon atricauda*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Filogeografía

El término filogeografía fue acuñado por primera vez por Avise et al. (1987). La filogeografía es una disciplina que se ocupa de los arreglos espaciales de los linajes genéticos, especialmente en estudios intraespecíficos o entre especies cercanas (Avise 2009). Tiene como meta principal conocer los componentes espaciales y temporales de la estructuración poblacional e interpretar los procesos evolutivos y ecológicos que los generaron. En los estudios filogeográficos se obtiene información genética de los individuos de una determinada región, para evaluar hipótesis biogeográficas, describir la evolución del aislamiento reproductivo de unidades poblacionales, e inferir los procesos subyacentes en el origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad (Beheregaray 2008).

La distribución geográfica de las genealogías es fruto de la historia demográfica de las poblaciones, y esta a su vez es influenciada por los cambios en el ambiente que habitan (Bermingham & Martin 1998). Por lo tanto, se podrían plantear hipótesis sobre como los cambios climáticos del pasado que generaron cambios en la distribución y extensión de los ambientes pudieron haber influenciado los patrones de diversidad biológica actuales.

Los períodos de glaciación, cuyo último máximo ocurrió entre 18.000-23.000 años antes del presente han producido eventos de contracción-expansión de las poblaciones de algunas especies. Para aquellas especies cuyo hábitat se vio reducido durante un pico de glaciación, las poblaciones han sobrevivido a bajas latitudes, y solamente repoblando latitudes altas con una expansión del rango de distribución, luego del Último Máximo de Glaciación (LGM, “Last Glacial Maximum”) (Provan & Bennet 2008, Hewitt 2004). Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en organismos terrestres y dulceacuícolas aunque mucho menos estudiado en organismos marinos donde el registro fósil no es tan completo.

La filogeografía puede proveer un contexto evolutivo para conocer la influencia espacial e histórica sobre los patrones de riquezas de especies. Por otro lado, entender las respuestas históricas a los cambios ambientales y conocer áreas aisladas evolutivamente puede dar información sobre estrategias de conservación (Bermingham & Moritz 1998). Al comparar las estructuras filogeográficas de especies simpátricas con amplias distribuciones, se puede inferir si los ensamblajes de faunas actuales han sido históricamente estables, lo cual se puede detectar por la concordancia en los patrones de distribución de la variación genética. La filogeografía comparada trata de encontrar patrones concordantes en especies contemporáneas co-distribuidas (Zink 2002), dado que el grado de concordancia entre los patrones filogeográficos es un indicio de la estabilidad histórica del ensamblaje de especies actuales. Estudios de filogeografía comparada, revelaron patrones biogeográficos ocultos, en los que el aislamiento geográfico ha jugado un rol importante en el desarrollo de los patrones modernos de biodiversidad (Arbogast & Kenagy 2001).

1.2 Cambios climáticos del Pleistoceno Tardío

El período Cuaternario se ha caracterizado por períodos de enfriamiento global y avance de los glaciares. Esas oscilaciones de la temperatura global están relacionadas principalmente a excentricidades regulares de la órbita terrestre que se dan cada 100.000, 41.000 y 21.000 años aproximadamente (Hewitt 2004, Rabassa et al. 2005). Estas oscilaciones han producido cambios en el ambiente que incluyeron básicamente un aumento de las regiones frías hacia latitudes altas, un descenso en el nivel del mar y un aumento de los climas secos durante los picos de glaciación, mientras que durante los períodos interglaciares, el nivel del mar aumentaba. En esos cambios, las poblaciones o los linajes se pueden extinguir, se pueden perder alelos en cuellos de botella o por efecto fundador, y mutaciones que aparecen a lo largo del tiempo, pueden propagarse por selección o expansiones poblacionales (Hewitt 2004).

Se ha demostrado que en organismos terrestres, los ciclos de glaciación que ha sufrido el planeta, han afectado su abundancia y distribución (Knowles 2001, Márquez et al. 2006, Pinceel et al 2005, Starkey et al. 2003). En particular, los cambios climáticos del final del Pleistoceno han provocado cambios en la distribución latitudinal de muchas especies terrestres y dulceacuícolas (Hewitt 2000, Marko et al. 2010). La respuesta a los cambios paleoclimáticos de las poblaciones marinas ha sido más acotada porque la generación de refugios en el mar es menos evidente, dado la supuesta continuidad del hábitat. Algunos autores plantean que la influencia mayor estaría en aquellas especies costeras en las cuales la disponibilidad de aguas de baja profundidad pudiera ser un factor limitante para su distribución (Janko et al. 2007). Como regla, durante los períodos glaciales existió un retroceso del nivel del mar y un aumento en los interglaciares (Clapperton 1993).

1.3 Historia demográfica de las especies y estructuración de las poblaciones

Clásicamente se ha utilizado el flujo génico y el estadístico F_{ST} de Wright como indicador de la estructuración de las poblaciones. Estos métodos se basan en la suposición de que las poblaciones se parecen o se diferencian en función del flujo génico que mantienen, asumiendo que hay un equilibrio dinámico entre la migración y la deriva. No obstante, los supuestos no siempre se cumplen y otros efectos como el tiempo de divergencia de dos grupos, o el tamaño de la población pueden estar enmascarando la estructura de las poblaciones. Poblaciones que divergieron en un pasado muy antiguo pero que tuvieran un contacto secundario en el presente podrían mostrar valores de F_{ST} altos a pesar de niveles importantes de flujo génico actual. Asimismo, poblaciones que hubieran divergido en tiempos recientes, mostrarán valores de F_{ST} bajos, a pesar de tener niveles altos de flujo génico actual (Arbogast et al 2002, Slatkin 1993). Por lo tanto, es importante evaluar la historia de las poblaciones para contrastar con los valores estimados de flujo génico y estimar

con mayor seguridad si la estructuración detectada es debida a procesos actuales o del pasado.

La distribución geográfica de la diversidad genética de las especies puede estar relacionada a los procesos históricos de las regiones y los ambientes que han sostenido sus poblaciones. Esta historia ambiental, suele influenciar los patrones de diversidad de varias especies, encontrándose a veces concordancia en la distribución de la variación (Moritz & Faith 1998). La identificación de patrones compartidos de distribución geográfica de la diversidad genética, puede ser utilizada en la elección de Áreas Protegidas (en este caso marinas) con el criterio de maximizar la protección de la mayor cantidad de variación (D'Amen et al. 2013).

1.4 Factores que pueden modelar la estructura de las poblaciones

Áreas de cría

Se han descrito varias áreas de cría en el Atlántico sudoccidental entre Rio de Janeiro y Bahía Blanca, entre las que se encuentran la ría de Bahía Blanca, el Río de la Plata, Lagunas de la costa atlántica de Uruguay, la Laguna de los Patos, el Estuario de Paranaguá y la Bahía Sepetiba (Fabiano & Santana 2002, Lopez Casorla 2000, Muelbert & Weiss 1991, Vicentini & Araújo 2003).

Las áreas de desove y cría de juveniles en general no se distribuyen al azar, sino que suelen estar relacionadas con la existencia de presas adecuadas para las etapas larvales. También se ha propuesto que la elección del área de cría está relacionada con la capacidad de retención de larvas (evitando la dispersión), asegurando el reclutamiento a la población adulta (Braverman 2011). Si las áreas de cría tienen una distribución discreta y las especies mantienen cierta fidelidad con determinadas áreas para su reproducción, se podría generar el ámbito para la estructuración poblacional. Grupos de individuos en un determinado área, que tienden a reproducirse entre ellos, con

el tiempo se diferenciarán de individuos que se reproducen en otros lugares (Thorrold et al 2001).

Las corrientes marinas en el Atlántico Sudoccidental

Otra de las condiciones que puede influir la estructuración de las poblaciones, es la capacidad de dispersión de huevos y larvas, influenciada por las corrientes marinas. En el Atlántico Sudoccidental, entre Rio de Janeiro y Bahía Blanca, las corrientes presentes son la Corriente de las Malvinas y la Corriente del Brasil. La Corriente del Brasil moviéndose hacia el sur se separa de la plataforma entre los 33° y 38 °S aproximadamente, formando un frente con la Corriente de las Malvinas. La separación se produce más al norte en verano que en invierno (Tomczak & Stuart 2002). Durante los cambios climáticos del Pleistoceno, la confluencia de las dos corrientes ha sido diferente a la actual, moviéndose hacia el norte durante los períodos de glaciación (Rabassa et al. 2005).

1.5 Genética y estructura de las poblaciones en peces bajo explotación comercial

Definición de stocks

A los efectos del manejo de un recurso pesquero, un stock constituye una unidad biológica de una especie que forma un grupo de características ecológicas similares y, como unidad, es el sujeto de la evaluación y de la ordenación (Sparre et al 1989).

lhssen et al. (1981) realizaron una revisión de los diferentes métodos para la definición de stocks en peces. Los métodos que lhssen et al. (1981) analizan se basan en parámetros poblacionales, fisiológicos, de comportamiento, morfométricos y merísticos, abordando cada uno de ellos diferentes aspectos para definir un stock. Otro abordaje para la identificación de stocks muy utilizado en la actualidad es a través de estudios de genética molecular, en el

cual los stocks constituyen poblaciones unidas por la reproducción. Desde hace unas décadas existe un reconocimiento creciente a la importancia de la genética en relación a las pesquerías que operan simultáneamente sobre varias poblaciones de una especie, así como a la conservación y recuperación de especies en estado natural (Park et al. 1994). Existe un abanico de técnicas y herramientas muy utilizadas en estudios genéticos, que permiten resolver preguntas sobre la estructura de las poblaciones, tales como la definición de los grupos reproductivos o el flujo génico entre ellos. Los métodos genéticos desarrollados agregan un indicador robusto y consistente de que las diferencias reflejan la existencia de períodos prolongados de interrupción o disminución del flujo de genes entre las poblaciones. Estas herramientas se integran para conocer los stocks, así como en la toma de decisiones sobre los cupos de captura en una pesquería (Çiftci & Okumus 2002, Dizon et al 1992, Levy 1999, Waldman 2005).

En los estudios genéticos, una de las herramientas más utilizadas es el ADN mitocondrial (ADNmt). Este es una molécula de doble cadena, circular, cerrada, de aproximadamente 16.000 pb. Está compuesta de 37 genes y una región de control (D-Loop) no codificante y muy variable, de unos 1.000 pb. El ADNmt es ampliamente utilizado en estudios poblacionales dado que presenta algunas características muy útiles, como:

- herencia exclusivamente materna (por excepciones ver Gyllensten et al. 1991 y Hoeh et al. 1991) y ausencia de recombinación, facilitando la interpretación genética (por excepciones ver Rokas et al. 2003)
- gran variabilidad intra e inter poblacional
- sensibilidad a características de interés poblacional como la estructura geográfica, variación en zonas de desove, etc.

Existen numerosos estudios aplicados a peces, incluyendo por ejemplo estudios de estructura de poblaciones para manejo de pesquerías (Bermingham 1990), variación de secuencias en ADNmt en bacalao del

Atlántico Norte, *Gadus morhua* (Carr *et al.* 1995) y estudios de diversidad genética de stock en el género *Salmo* (Bernatchez & Osinov 1995), identificación de stocks de corvinas (Pereira *et al.* 2009) entre otros.

El ADN mitocondrial tiene como limitación que solo podemos seguir los linajes maternos, dado que la herencia es principalmente maternal. Las filogenias construidas solo con marcadores mitocondriales, muestran parte de la historia de las poblaciones o especies, en particular asociada a eventos relativamente antiguos, mientras que para reconstruir la historia completa hasta el presente, se requiera del uso complementario de marcadores nucleares (Godinho *et al.* 2008).

La identificación genética de stocks y la actividad pesquera

La identificación de las unidades poblaciones sobre las que opera una pesquería es una información básica para el manejo sostenible de un recurso natural. En pesquerías es común definir las unidades poblaciones como stocks, definidos según criterios operativos. La definición de stock en la cual la genética puede aportar elementos para la identificación, es aquella en la que se agrupan individuos porque comparten un mismo pool génico y la homogeneidad se mantiene por una reproducción entre estos individuos (Waldman 2005).

El concepto de stock se basa en dos conceptos: uno el cual asume que las especies están subdivididas en poblaciones locales; y que puede haber diferencias genéticas entre poblaciones locales que pueden ser adaptativas (Ciftci & Okumus 2002). No siempre las diferencias son adaptativas, porque la simple elección recurrente de sitios de reproducción diferente, puede por si mismo generar diferenciación genética. Dado que el factor que mantiene la homogeneidad en el tiempo de una unidad poblacional es la reproducción diferencial, la distribución geográfica de las variantes genéticas es una potente herramienta para la identificación de diferentes unidades evolutivas.

Una pesquería operando sobre múltiples unidades reproductivas, *a priori* consideradas como una unidad, podría contribuir rápidamente a la extinción de las unidades poblacionales de menor tamaño, con la consecuente pérdida de biodiversidad, y el colapso de la actividad extractiva (Rebordinos González 2007).

Las herramientas genéticas también han demostrado ser fundamentales en la identificación de especies crípticas, las cuales no han sido identificadas morfológicamente y que se las consideraba como una única especie (Guzmán et al. 2000, camarones; Santos et al. 2006, pescadillas de red; Solé-Cava et al. 1983, angelitos).

1.6 La Familia Sciaenidae: peces costeros de importancia comercial

La Familia Sciaenidae es una de las más diversas de peces costeros de zonas cálidas y templadas con más de 70 géneros y 270 especies (Chao 1978). Los sciaénidos son un recurso pesquero importante en aguas someras y estuarios de todo el mundo, utilizando muchas especies los ambientes estuarinos como sitio reproducción y/o cría de juveniles (Chao 1978).

Las especies de esta familia se encuentran asociadas a aguas rasas de la plataforma y a la desembocadura de grandes ríos (Menezes & Figueireido 1980), por lo que fueron escogidas como modelo para evaluar la estructuración genética y su relación con los cambios ambientales del pasado. Además, existe un interés adicional para el estudio de este grupo de peces dado que constituyen una parte importante de las capturas de las flotas pesqueras de Argentina, Uruguay y Brasil, especialmente la corvina y la pescadilla de calada. La pesca industrial generalmente explota estas especies con redes de arrastre, mientras que la artesanal utiliza redes de enmalle y espineles. Las especies de esta Familia también son objetivo importante de la pesca deportiva de mar y estuarina (Cergole et al. 2005).

La corvina *Micropogonias furnieri*

La corvina rubia (Figura 1.1) se distribuye desde las Antillas hasta la Argentina. También se la encuentra en ambientes estuarinos, principalmente los jóvenes que utilizan esos ambientes para alimentación y crecimiento (Menezes & Figueiredo 1980). Es una de las especies de mayor importancia comercial en Argentina, Uruguay, y las regiones el sur y sudeste de Brasil.

Se alimenta de organismos del fondo, principalmente de anélidos, crustáceos y pequeños peces. Si bien llega alcanzar los 60 cm de largo, los ejemplares adultos más comunes están entre los 40 y 50 cm. Se la encuentra en fondos de arena o barro, más comúnmente en profundidades menores de 60 m. En el Río de la Plata el desove se extiende de noviembre a marzo y se desarrolla en la parte interior del estuario, donde las aguas marinas y dulces forman un frente salino de fondo (Macchi et al. 1996, Macchi et al. 2003). En esta tesis se analizaron individuos desde el Chuy hasta Bahía Blanca.



Figura 1.1. Corvina rubia *Micropogonias furnieri*.

La pescadilla de red *Macrodon atricauda* (antes *Macrodon ancylodon*)

Hasta hace pocos años se consideraba que en el Atlántico Sudoccidental solo estaba presente la especie *Macrodon ancylodon* (Figura 1.2), distribuida desde

Venezuela hasta Argentina. Estudios genéticos y morfológicos dividieron la especie en dos, de las cuales *M. atricauda* se distribuye desde Espírito Santo en Brasil hasta Argentina. El desove de esta especie ocurre entre octubre y marzo, con un pico en noviembre y otro en marzo (Militelli & Macchi 2004). Tolerancia amplios rangos de salinidad y se distribuye principalmente en el interior del estuario (Cordo 1986). Esta especie fue muestreada en localidades del Río de la Plata, del Océano Atlántico de Uruguay, de São Paulo y Rio de Janeiro.



Figura 1.2. Pescadilla de red o pescadilla real *Macrodon atricauda*.

Las burriquetas *Menticirrhus americanus* y *M. littoralis*

La burriqueta, *Menticirrhus americanus* (Figura 1.3) se distribuye desde el Cabo Cod (Estados Unidos) hasta la Argentina. Generalmente se la encuentra sobre fondos de arena, o arena y barro, en aguas costeras de poca profundidad y también en regiones estuarinas. Es pescada por pescadores artesanales y deportivos (Menezes & Figueiredo 1980). El registro más al sur de la especie es en los 37° 27' S (Bacigalupo & Bustos 1984). Se alimenta de organismos bentónicos, especialmente gusanos y crustáceos. Para el Brasil también está descrita la especie *Menticirrhus littoralis* (Figura 1.4), la cual es morfológicamente muy parecida a *M. americanus*. En individuos adultos puede

identificarse a *M. americanus* por el mayor tamaño de sus escamas en la zona pectoral. En los individuos jóvenes, donde estas diferencias no son tan acentuadas, el largo relativo de las aletas pectorales puede ser usado para diferenciarlas, dado que en *M. littoralis* estas no alcanzan la punta de las aletas pélvicas.

La distribución descrita para *M. littoralis* es desde la Florida (EUA) hasta el sur de Brasil. En la costa de Paraná (Brasil) las larvas se encuentran durante todo el año aunque es más abundante en la primavera. En Rio Grande del Sur, las larvas se encuentran en verano y otoño (Braun & Montoura 2004).

En la Bahía de Sepetiba en Río de Janeiro, hacen uso de los ambientes con características marinas (Araújo et al. 2006).



Figura 1.3. Burriqueta *Menticirrhus americanus*.



Figura 1.4. Burriqueta *Menticirrhus littoralis*.

La pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa* (antes *Cynoscion striatus*)

La pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa* (Figura 1.5) es un pez demersal que penetra mucho en las aguas salobres, alcanzando su mayor abundancia en la plataforma cerca de la isobata 50m (Macchi 1998). Se distribuye desde Rio de Janeiro (22° 35' S) hasta el sur de la Provincia de Buenos Aires (41° S), aunque en verano se la ha registrado hasta los 43° 42'S (Bacigalupo & Bustos 1984). En invierno se han registrado concentraciones abundantes de individuos adultos en agua profundas, mientras que en otoño y primavera se detectan grandes concentraciones de la especie en aguas más cercanas a la costa (Bacigalupo & Bustos 1984), asociadas a la actividad reproductiva (Cousseau & Perrotta 2000). Por lo tanto se ha sugerido que la pescadilla de calada tiende a desplazarse hacia aguas más profundas, a medida que se detecta una baja de la temperatura en aguas más costeras (Bacigalupo & Bustos, 1984).

La especie es desovante múltiple (Macchi 1998) y la cría de los juveniles se produce en aguas costeras, y en particular en algunos estuarios. En Bahía Blanca se detectó que permanecen durante el primer año de vida (Lopez Cazorla 2000). En La Zona común de Pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU) es un componente importante de la comunidad de juveniles, dándose las mayores concentraciones de adultos entre Punta del Este y el Chuy (Carozza et al. 2003).



Figura 1.5. Pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa*.

1.7 Hipótesis de trabajo

- Dado que los integrantes de la familia Scianeidae tienen hábitos costeros, los eventos ambientales del pasado que modelaron los ambientes de aguas de plataforma debieron influenciar la distribución de la variabilidad genética de estas especies.
- Dado que la estructuración genética de una especie depende de la fidelidad de grupos de individuos a reproducirse en determinadas áreas y/o condiciones oceanográficas, las especies que tengan requerimientos reproductivos similares coincidirán en sus patrones de estructuración genética.
- Dado que los cambios climáticos en el pasado produjeron cambios en extensión de los ambientes utilizados por las especies de peces costeros, la genética de sus poblaciones mostrará evidencia de cambios en la demografía que podrán asociarse a los períodos en los cuales ocurrieron los cambios climáticos.

1.8 Objetivos

Objetivo general

Esta tesis tiene como meta estudiar cómo se estructuran genéticamente especies de la Familia Sciaenidae en el Atlántico Sudoccidental, y discutir cómo los cambios climáticos del final del Pleistoceno pudieron haber influenciado la historia demográfica de especies asociadas a la plataforma continental.

Objetivos específicos

- Analizar la estructura genética de la corvina (*Micropogonias furnieri*), la burriqueta (*Menticirrhus americanus*), la pescadilla de calada (*Cynoscion guatucuapa*) y la pescadilla de red (*Macrodon atricauda*).
- Evaluar la presencia de patrones filogeográficos interespecíficos en el Atlántico Sudoccidental.
- Relacionar los patrones filogeográficos de especies de la Familia Sciaenidae con eventos paleoambientales del final de Cuaternario.

CAPÍTULO 2. MÉTODOS GENERALES

Localidades

Se colectaron individuos de localidades ubicadas entre Espírito Santo en Brasil y Bahía Blanca en Argentina (Figura 2.1).

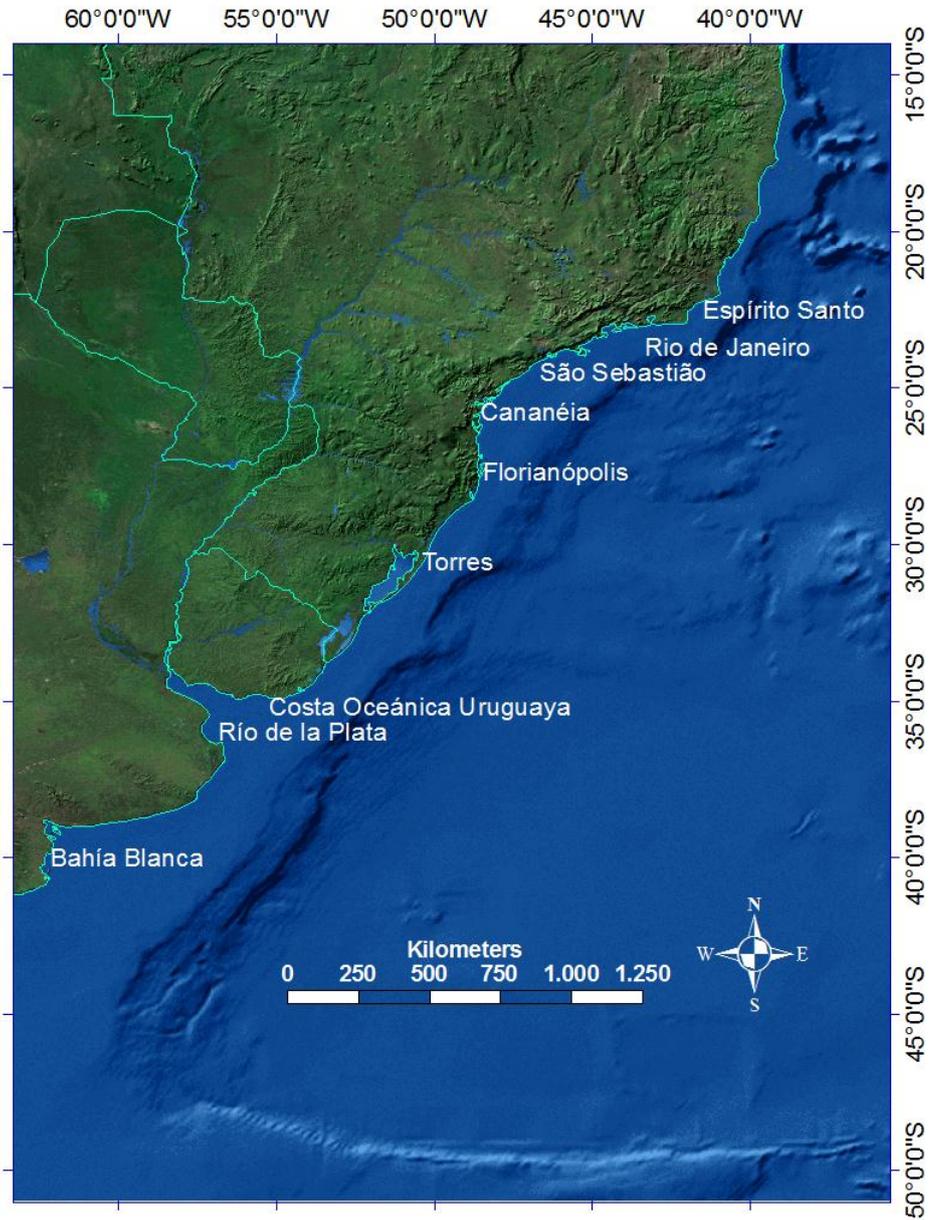


Figura 2.1. Localidades de muestreo.

Mediante colecta con pescadores artesanales, pesca deportiva, muestreo en desembarque de flota pesquera y del buque Aldebarán de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) se obtuvieron muestras de las especies corvina (*Micropogonias furnieri*), pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*), pescadilla de red (*Macrodon atricauda*) y de las burriquetas (*Menticirrhus americanus* y *Menticirrhus littoralis*), de Argentina, Uruguay y Brasil. Las dos especies de *Menticirrhus* son morfológicamente muy similares, en particular en estadios juveniles, por lo que la corroboración definitiva de la especie fue molecular.

Extracción y PCR

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo estándar con cloroformo-fenol (Sambrook et al. 1989) en las corvinas y el protocolo de extracción salina de Miller et al. (1988) con modificaciones para el resto de las especies.

Amplificación y secuenciación de la región control mitocondrial

La región control es sumamente variable y por lo tanto, los cebadores que amplifican esta región en una especie, no siempre son útiles para otra. Primariamente amplificaron fragmentos parciales de la región control mitocondrial de corvinas, utilizando los primers Thr (AGCTCAGCGCCAGAGCGCCGGTCTTGTA) (Lee et al. 1995), Phe (GCTTTARTTAAGCTACG) (Modificado de Nielsen et al. 1994) y 12S (ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT) (Palumbi et al. 1991). A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron los primers internos CorMed-F (GGTGGTAATACATAAGTGGGAGC) y CorMed-R (GCTCCCACTTATGTATTACCACC) y con las secuencias obtenidas se diseñaron primers específicos con homología en los genes que flanquean la región control: PhePer (GCCCATCTTAACATCTTCAGTGTTATGC) y Pro-Cor1 (CCCAAACTAGTATTCTAA). Este juego final de cebadores resultó útil para la amplificación mediante PCR y secuenciación de *Micropogonias*

furnieri y *Cynoscion guatucupa*. Con los primers Thr y PhePer se amplificó *Menticirrhus americanus*, *M. littoralis* y *Macrodon ancylodon*, utilizando los primers ProCor1 y PhePer para la secuenciación. Para la amplificación del citocromo b se utilizaron los primers MVZ05 (CCCAAAGTAGTATTCTAA) y MVZ16 (CCCAAAGTAGTATTCTAA) (Smiths & Patton 1993). Los productos de PCR fueron enviados a purificar y secuenciar en el servicio de secuenciación Macrogen Inc (Corea).

En total se obtuvo el siguiente número de individuos secuenciados:

<i>Menticirrhus littoralis</i>	30
<i>Menticirrhus americanus</i>	107
<i>Micropogonias furnieri</i>	80
<i>Macrodon atricauda</i>	83
<i>Cynoscion guatucupa</i>	136
	436

Análisis de datos

Los cromatogramas obtenidos en la secuenciación fueron editados y alineados con el programa BioEdit (Hall 1999). Para evaluar la diversidad genética se calculó el índice de diversidad nucleotídica, que mide la diversidad de las secuencias, calculando la probabilidad que dos nucleótidos homólogos de dos secuencias tomadas al azar sean iguales. También se calculó la diversidad haplotídica o génica que mide la diversidad en haplotipos que presenta la población, calculando la probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan el mismo haplotipo.

La estructuración de las poblaciones se evaluó utilizando los índices F_{ST} , comparando el número de diferencias pareadas entre localidades y calculando el test exacto de diferenciación. Para calcular los índices de diversidad y evaluar el grado de estructuración se utilizó el software Arlequín, Versión 3.5 (Excoffier and Lischer 2010).

El modelo de evolución molecular más adecuado para explicar la variación observada en las secuencias, se evaluó utilizando el criterio de Akaike implementado en jModelTest (Posada 2008). El modelo seleccionado fue utilizado para construir árboles de distancia con “unión de vecino” como algoritmo de agrupamiento en PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2001) con bootstrap de 1000 pseudoréplicas. También se construyeron redes de haplotipos con criterios de parsimonia utilizando Network (<http://www.fluxus-engineering.com>).

La historia demográfica de las poblaciones fue estimada a partir de la distribución de diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) (Rogers & Harpending 1992, Schneider & Excoffier 1999). Con esta aproximación, los estimadores $\tau=2\mu t$, $\theta_0 = 2N_0\mu$ y $\theta_1 = 2N_1\mu$ son estimados con simulaciones del coalescente en una expansión en un paso. Las variables θ_0 y θ_1 son proporcionales al tamaño poblacional antes y después de la expansión, y τ es el tiempo transcurrido desde la expansión. Cuando una población atravesó un evento de expansión reciente, la distribución de las diferencias entre pares de secuencias es unimodal. También fueron calculados los índices de neutralidad D de Tajima (1989) y de F_S de Fu (1997), los que permiten evaluar si la distribución de mutaciones se ajusta a un modelo de neutralidad. Estos índices muestran valores significativamente negativos cuando existe un alejamiento de la neutralidad, aunque el mismo resultado se observa cuando las poblaciones sufrieron una expansión poblacional. Si aceptamos que el marcador utilizado es selectivamente neutro, valores negativos significativos de D y de F_S podrán ser considerados evidencia de expansión poblacional.

CAPÍTULO 3. La corvina *Micropogonias furnieri*

Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay

A. N. Pereira*†, A. Márquez*, M. Marin‡ and Y. Marin§

*Laboratorio de Bioquímica de Organismos Acuáticos, DINARA, MGAP, Constituyente 1497, 4to piso. Montevideo, Uruguay 11200, †Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias, UDELAR, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay 11400, and §Laboratorio de Tecnología Pesquera, DINARA, MGAP, Constituyente 1494, 6to piso. Montevideo, Uruguay 11200

(Received 7 October 2008, Accepted 17 April 2009)

Analysis of the mitochondrial DNA control region resolved two stocks of whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in Uruguayan waters, one in the Río de la Plata and the other on the Uruguayan shelf. The whitemouth croaker is the most important coastal fishery resource along the coast and has the greatest commercial importance in the Río de la Plata and its oceanic front. The number of pair-wise differences (π) and haplotype diversity (h) showed significant differences between the two regions. Frequencies of mtDNA haplotypes did not differ between Río de la Plata from Bahía Blanca *M. furnieri*. Samples from the oceanic front showed greater genetic variability and a larger effective number of females that were an order of magnitude larger than that in Río de la Plata. Mismatch distributions showed evidence of a recent population expansion in the oceanic region, beginning *c.* 40 000 b.p. The presence of two stocks of the *M. furnieri* in the study area should be considered in the management of this species' fishery.

© 2009 The Authors Journal compilation © 2009 The Fisheries Society of the British Isles

Key words: marine fish; mtDNA control region; population structure; SW Atlantic.

INTRODUCTION

The whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest) is a sciaenid with a wide distribution in the central and south-western Atlantic Ocean. Populations of this fish are distributed from the southern Caribbean to the Gulf of San Matías in Argentina. In Uruguay, populations are found from San José in Río de la Plata to Rocha in the Atlantic Ocean. The species occurs along the coast, in the mouth of rivers and lagoons, as well as in coastal waters to 50 m. *Micropogonias furnieri* is a commercially important fishery resource in Uruguay and in nearby countries and, because of its popularity in the domestic market, it has a high landing value. It is caught by both artisanal and industrial fleets of several countries.

Catches in offshore areas are regulated by the Agreement of the Río de la Plata between the Argentinean and Uruguayan governments, which established the Argentinean – Uruguayan Common Fishing Zone (ZCPAU). This agreement allows fishing vessels of both countries to operate in the ocean frontal system. In this context, it is necessary to establish regulations regarding the distribution of the catches between both countries.

Several conservation measures have been implemented, because *M. furnieri* is considered to be 'fully exploited'. These measures include limiting the number of boats in the fishery, restricting fishing with beach seine, increasing gillnet size, protecting spawning areas (western Montevideo) and setting a minimum landing size. In spite of these management measures,

evidence shows that the species continues to be overexploited. Traditional models that are used to calculate the sustainable catch assume that the fishery of a species targets a discrete population. This assumption is important because marine and estuarine fishes are often managed as a single, genetically homogeneous stock to facilitate political or administrative conventions. For this reason, it is important to know whether the fishery is taking place on one or multiple stocks to sustainably manage *M. furnieri* populations.

A survey of allozyme markers (Maggioni *et al.*, 1994) failed to detect genetic differences among populations. The results of this study, however, are controversial, because meristic and morphometric traits (Figueroa & Díaz de Astarloa, 1991; Galli, 2001), ecopopulation variation (Puig & Mesones, 2005) and the distributions of breeding areas (Lasta & Acha, 1996) indicate two stock groups: one in the Río de la Plata and another in the adjacent coastal areas.

The goal of this study is to use mitochondrial (mt) DNA control region (CR) sequences to assess levels of genetic differentiation among populations of *M. furnieri* between Río de la Plata and Atlantic waters off the coast of Uruguay. Mitochondrial DNA sequences are used to test with a focus on management whether the *M. furnieri* at these locations consist of a single stock or if they are subdivided into distinct populations that should be treated as independent exploitation units.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLING AND DNA EXTRACTION

Samples of *M. furnieri* were collected from Uruguayan waters from the Estuary de la Plata estuary and the Atlantic Ocean close to Brazil, as well as from Bahía Blanca in Argentina, and from Rio de Janeiro and Florianópolis in Brazil (Fig. 1). Samples were obtained from fishermen or were collected with trawls by the research vessel B.I. Aldebarán.

Muscle samples were preserved in 96% ethanol at room temperature. DNA was extracted by digesting tissues overnight at 55° C in 500 µl extraction buffer [50 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% sodium dodecyl sulphate (SDS)] and proteinase K. DNA was purified using standard chloroform extraction and 100% ethanol precipitation (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA AMPLIFICATION AND SEQUENCING

Specific primers were designed for the amplification of a fragment of c. 750 base pairs (bp) of the mtDNA CR (ProCor1-F 5'-CCCAAACTAGTATTCTAA-3' and PhePer-R 5'-GCCCATCTTAACATCTTCAGTGTTATGC-3'). Each 50 µl of the polymerase chain reaction (PCR) contained 5 – 50 ng DNA, 10 mM Tris – HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 200 mM of each dNTP and 0.5 mM of each primer. Amplification was conducted under the following conditions: an initial denaturation step at 94° C (2 min), 35 cycles of 94° C (1 min), 52° C (1 min) and 72° C (1 min) and a final extension step at 72° C (5 min). PCR products were sequenced directly with the same primers used in the amplifications.



FIG. 1. *Micropogonias furnieri* sampling localities. Arrows indicate the direction of migration between localities, and numbers next to the arrows indicate the number of immigrants per generation estimated with Migrate.

DATA ANALYSIS

Sequences were aligned using Clustal W (Thompson et al., 1994) implemented in BioEdit (Hall, 1999). The dataset was tested for the most appropriate model of nucleotide substitution using hierarchical likelihood ratio tests (Huelsenbeck & Crandall, 1997) as implemented in MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998). The substitution model showing the best fit to the sequences was used to construct a neighbour-joining tree of genetic distances using PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2001) with a bootstraps from 1000 pseudo-replicates.

Levels of genetic diversity were estimated with the average number of pair-wise differences (π), haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) (Nei, 1987). Gene flow and population structure was assessed by F_{ST} and with an analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). All possible groupings using the Bahía Blanca, Río de la Plata and Atlantic Ocean were evaluated with AMOVA, as implemented in Arlequin 3.11 (Schneider et al., 2001). A maximum likelihood estimate of current effective population size was calculated with the parameter θ which is proportional to population size and the mutation rate ($\theta = 2 \mu N$), and g to evaluate whether populations have experienced growth or decline using the method of Kuhner et al. (1998), as implemented in Fluctuate 1.4. Analyses were repeated 10 times for each geographic region to ensure the stability of parameter estimates. The final analyses of each dataset employed 10 short Monte-Carlo chains of 200 steps each and five long chains of length 20 000, with a sample increment of 20. Immigration between regions was estimated with Migrate 2.1.3 (Beerli & Felsenstein, 2001). Analyses were repeated 10 times, to ensure stability of the estimates, with 10 short Monte-Carlo chains of 5000 steps and five long chains of 50 000 steps and with a sample increment of 20. This analysis was carried out with an exhaustive search using four heated chains (1, 4, 7 and 10) and an interval between swapping trees of 1.

Demographic histories of the populations were estimated from the distribution of mismatches between pairs of sequences (Rogers & Harpending, 1992; Schneider & Excoffier, 1999). In this approach, the estimates of $\tau = 2\mu t$, $\theta_0 = 2N_0 \mu$ and $\theta_1 = 2N_1 \mu$ were estimated with coalescent simulations of stepwise expansions. The variables θ_0 and θ_1 are estimates of population sizes before

and after an expansion, respectively, and τ is the time since the expansion occurred (Excoffier & Schneider, 1999). When a population has experienced a recent expansion, mismatches typically show a unimodal distribution. Schneider & Excoffier (1999) proposed a test to evaluate a unimodal distribution with the sum-of-the-squared differences (SSD) statistic. Fu's (1997) F_S , which is particularly sensitive to population growth, was used to test for departures from neutrality. These tests were made with Arlequin 3.11 (Schneider et al., 2001). Mutation rates proposed for the CR of fishes were used to estimate the absolute times of population events (Brown et al., 1993; Domingues et al., 2005).

RESULTS

A total of 87 *M. furnieri* individuals were analysed (Genbank accession: FJ160905-FJ160940): 27 from Monte Hermoso, near Bahía Blanca (Argentina), 26 from the Río de la Plata (Playa Pascual and Pajas Blancas) and 27 from the Atlantic Ocean near the Brazilian border. Five fish from Rio de Janeiro and two from Florianópolis (Brazil; Fig. 1) were included to estimate sequence divergences from the Uruguayan samples. The analyses were based on 36 haplotypes from a 739 bp fragment sequenced in all the individuals.

The distributions of haplotype frequencies showed differences between the sample from the Atlantic Ocean and both samples of Río de la Plata and Bahía Blanca fish. The Atlantic Ocean sample has the largest haplotype ($h = 0.986$) and nucleotide ($\pi = 0.0078$) diversities as well as the largest mean number of pair-wise differences ($\pi = 5.76$) (Table I). The sample from the Atlantic Ocean had the largest number of unique haplotypes ($n = 18$) (Table II). The average number of pair-wise differences between the Atlantic Ocean and Río de la Plata and Bahía Blanca was 0.50 and 0.46, respectively ($P < 0.02$). Differences between the last two regions were not significant.

The model of molecular substitution that best fit the sequences was the HKY85+I+G model, with the proportion of invariable sites of $I = 0.78$ and heterogeneity in the distribution of variable sites with a gamma distribution with shape $\alpha = 0.19$. Genetic distances based on this model were used to construct a neighbour joining tree (Fig. 2). This tree topology showed no geographic partitions of haplotypes among samples, because haplotypes were shared among locations.

TABLE I. Estimates of diversity in *Micropogonias furnieri*

Region	n	H	h	π	π
Bahía Blanca	27	8	0.558	0.0024	1.80
Río de la Plata	26	5	0.455	0.0036	2.63
Atlantic Ocean	27	23	0.986	0.0078	5.76

n , sample size; H , number of haplotypes; h , haplotype diversity; π nucleotide diversity; π , average number of pair-wise difference between sequences

TABLE II. Haplotype frequencies in *Micropogonias furnieri*

	RDLP	OA	BB	FLO	RJ	Total
MF001	19	3	18	0	0	40
MF001-A	1	1	0	0	0	2
MF001-B	0	0	1	0	0	1
MF002	4	0	0	0	0	4
MF003	0	1	0	0	0	1
MF004	0	1	0	0	0	1
MF005	0	1	0	0	0	1
MF006	0	2	0	0	0	2
MF007	1	1	0	0	0	2
MF008	0	1	0	0	0	1
MF009	0	1	0	0	0	1
MF010	0	1	0	0	0	1
MF011	0	0	0	0	1	1
MF012	0	0	0	0	1	1
MF013	0	0	0	0	1	1
MF014	1	0	1	0	0	2
MF015	0	0	0	1	0	1
MF016	0	1	0	0	0	1
MF017	0	1	0	0	1	2
MF018	0	1	0	0	0	1
MF019	0	2	0	0	0	2
MF020	0	1	0	0	0	1
MF021	0	1	0	0	0	1
MF022	0	1	0	0	0	1
MF023	0	1	2	1	0	4
MF023-A	0	1	0	0	0	1
MF024	0	1	0	0	0	0
MF025	0	1	0	0	0	1
MF026	0	1	0	0	0	1
MF027	0	0	0	0	1	1
MF028	0	0	2	0	0	2
MF029	0	0	1	0	0	1
MF030	0	1	0	0	0	1
MF031	0	1	0	0	0	1
MF032	0	0	1	0	0	1
MF033	0	0	1	0	0	1

RDLP, Río de la Plata; OA, Atlantic Ocean; BB, Bahía Blanca; FLO, Florianópolis; RJ, Río de Janeiro.

Estimates of gene flow with Migrate always showed similar asymmetries in the same directions, even though the magnitudes of the estimates varied among runs. The largest estimated net gene flow was always from the two coastal regions towards the Atlantic Ocean. Río de la Plata also showed a net flow towards Bahía Blanca (Fig. 1). F_{ST} between pairs of populations was significant in both between the Atlantic Ocean and the Río de la Plata ($F_{ST} = 0.104$; $P = 0.018$) comparison and between the Atlantic Ocean and the Bahía Blanca ($F_{ST} = 0.108$; $P < 0.001$) comparison. This statistic, however, failed to differentiate Río de la Plata from Bahía Blanca ($F_{ST} = 0.007$; $P = 0.225$). The largest percentage of explained molecular variance in the AMOVA appeared by grouping Bahía Blanca with Río de la Plata. This grouping showed significant values of Φ_{CT} .

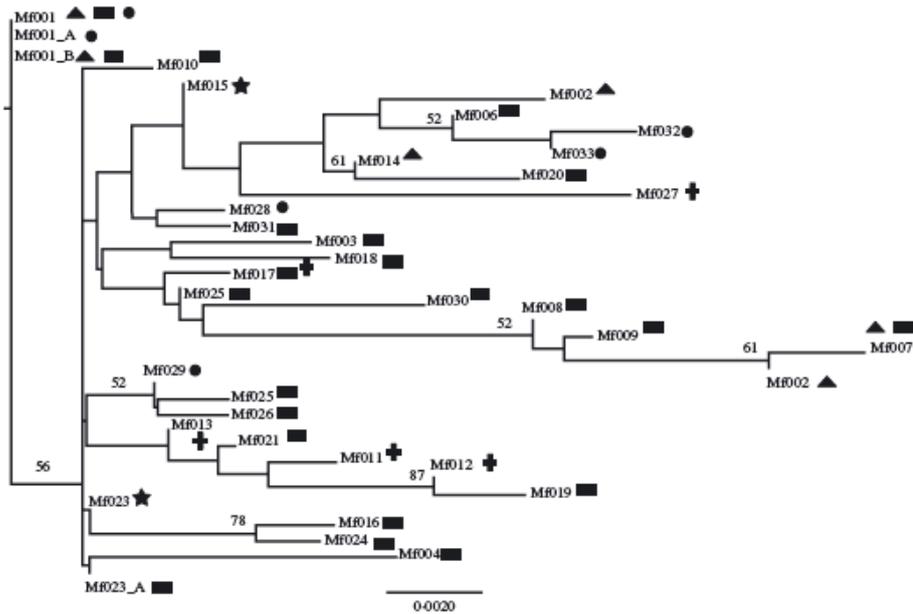


Fig. 2. Neighbour-joining tree of *Micropogonias furnieri*, *Micropogonias furnieri*, control region haplotypes. Numbers represent bootstrap supports above 50% (Río de la Plata, ▲; Atlantic Ocean, ■; Bahía Blanca, ●; Florianópolis, ★; Río de Janeiro, +).

Estimates of g from Fluctuate were negative for the Río de la Plata samples (between -147 and -197), indicating a decline in population sizes, whereas values for the Atlantic Ocean were positive (between 783 and 1125). Estimates of Θ for the Atlantic Ocean sample were two orders of magnitude larger (mean $\Theta = 0.1411$, s.d. = 0.0223) than that for the Río de la Plata samples (mean $\Theta = 0.0032$, s.d. = 0.0003). Mutation rates proposed for the mtDNA CR in fishes (see below) produced a surprisingly low estimate of the effective number of females ($17 - 26$) in Río de la Plata. This analysis produced estimates of N_e of $734 - 1158$ females from the Atlantic Ocean sample. Bahía Blanca showed positive g values (between 77 and 180), as well as the Atlantic Ocean, but the values of Θ were similar to those observed in Río de la Plata (average $\Theta = 0.0036$, s.d. = 0.0003).

The mismatch analyses showed differences between samples that may reflect differences in the demographic histories of these populations. The SSD statistic rejected the null hypothesis of a unimodal mismatch distribution in the sample from Bahía Blanca. The SSD for the sample from Río de la Plata, however, was not significant even though the shape of the mismatch distribution was similar to that for the sample from Bahía Blanca (Fig. 3). These tests for unimodal distributions may be too conservative to reject H_0 . Indeed, in Río de la Plata the values of θ_0 and θ_1 (population number before and after the expansion) were very similar (0.0000 and 0.4182 , respectively). In contrast, the Atlantic Ocean sample showed a unimodal mismatch distribution and noticeably larger values of θ_0 and θ_1 (0.6133 and 34.1699 , respectively), possibly indicating a recent population expansion. A recent history of population expansion was also supported by F_u 's test of neutrality. The sample from Bahía Blanca showed a negative, but non-significant value ($F_S = -2$; $P = 0.1430$),

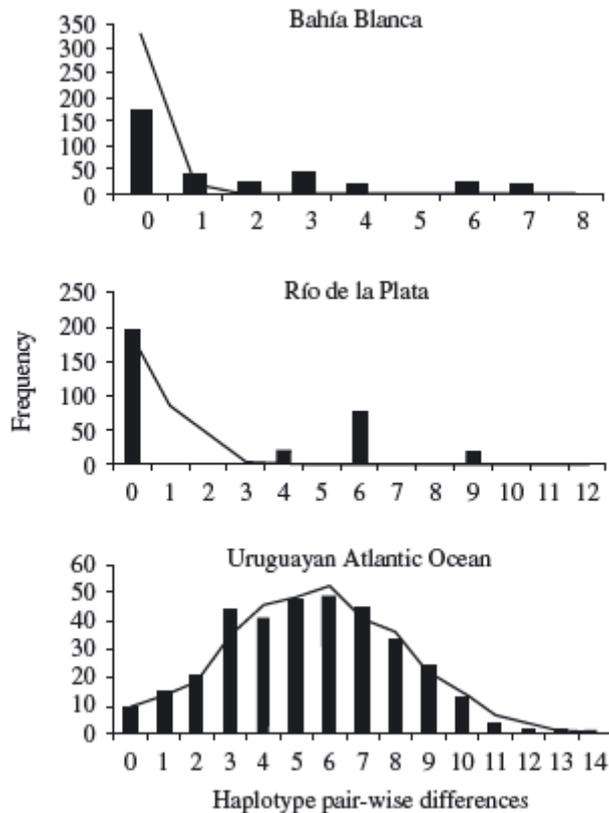


FIG. 3. Mismatch distribution of *Micropogonias furnieri* control region. The bars represent the observed frequency of the pair-wise differences among haplotypes, and the curve shows the expected distribution predicted for a population that has undergone a demographic expansion in the past.

whereas FS was positive (FS = 1.81290; P = 0.8630) for the Río de la Plata sample. These results may indicate stable population histories. The Atlantic Ocean sample, on the other hand, showed a significant large negative value (FS = -15.71; P < 0.001), indicating a strong signal of population expansion.

Tau (τ) is proportional to the amount of time that has elapsed since the beginning of an expansion ($\tau = 2tu$). To estimate absolute time, per site per year mutation rates (μ) of 8.24×10^{-8} and 9.30×10^{-8} were used, as proposed for the CR of *Chromis chromis* (L.) (Domingues et al., 2005), to calculate a mutation rate per sequence (u). Mutation rates over the 739 bp sequence (u) ranged between 6.09 and 6.87×10^{-5} year⁻¹. Brown et al. (1993) proposed a per site mutation rate (μ) slightly larger than 1.1×10^{-7} – 1.3×10^{-7} for *Acipenser transmontanus* Richardson. The mutation rate per sequence in *M. furnieri* with this rate is between 8.13 and 9.61×10^{-5} year⁻¹.

For the sample from the Uruguayan Atlantic Ocean, the estimated value of τ was of 5.267, with a minimum of 2.894 and a maximum of 8.166 ($\alpha = 0.05$). With the four mutation rates and the estimated value of τ , the estimate of time since population expansion is 27 400 – 43 200 years. The smallest and the largest values of τ produced estimates of 15 100 b.p. (highest rate) and 67 100 b.p. (lowest rate).

DISCUSSION

Distributions of haplotypes indicated two stocks of *M. furnieri* in the Uruguayan waters. This result was observed even though the sequences of the CR of this species were similar to those from Río de Janeiro to Bahía Blanca. Haplotype frequencies, as well as diversity indices, show some differentiation between populations in the Río de la Plata and the open coast of Uruguay. Both the F_{ST} and average number of pair-wise differences were significant. Although differentiation was observed between locations in Uruguay, no differences were detected between Río de la Plata and Bahía Blanca, even though distances between these two regions are much larger than that between the two Uruguayan localities. Populations of *M. furnieri* in Río de la Plata appear to have an effective population size much smaller than populations off the open coast. This may indicate a history of small effective population sizes or a current decline in the population. These estimates of effective size likely reflect historical, rather than contemporary sizes, as the methods implemented in Fluctuate and Migrate are based on coalescent theory and show historical values. In any case, both the smallest population sizes and the lowest levels of genetic variability appeared in Río de la Plata, making this stock vulnerable to overexploitation. The historical values of gene flow may reflect colonization events at various locations. Given the main direction of gene flow, the population expansion detected in the Atlantic could have been generated by dispersals from the southernmost populations.

This pattern of differentiation contrasts with the results for allozymes, which did not distinguish among *M. furnieri* stocks located from Cabo Frio, Brazil (22° 53 S; 42° 00 W) to Bahía Blanca (Maggioni et al., 1994; Levy et al., 1998). Studies conducted with restricted fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mtDNA also did not detect differences between *M. furnieri* from Río de Janeiro (23° S) to Chuy (34° S) (Puchnick-Legat & Levy, 2006). The discrepancies with these studies are probably because of the use of genetic markers with lower mutation rates than those for mtDNA CR sequences.

Vasconcello & Haimovici (2006), using models of exploitation, also proposed the presence of a single stock shared by Argentina, Uruguay and the southern Brazil. In contrast, Figueroa & Díaz de Astarloa (1991) identified morphometric differences between localities of Uruguay and Bahía Blanca, but did not find differences between the localities of Río de la Plata and the Atlantic Ocean of Uruguay. The authors suggested that even though the differences were not detected between the two localities, the analyses were inconclusive. Whereas, Galli (2001) found significant differences in morphology between *M. furnieri* from Río de la Plata and the open coast front. Puig & Mesones (2005), with the analysis of eggs and larvae, suggested that there was a group of spawning *M. furnieri* in oceanic waters to the east of Uruguay. Vazzoler (1991) concluded that there are at least two stocks of *M. furnieri* in Brazil between Cabo Frio and Chuy. The southern stock of Brazil apparently moves between Torres (29° 45 S, 49° 41 W) and Chuy (33° 45 S, 53° 23 W) and into Uruguayan waters, especially in summer. The stock identified in the oceanic waters of Uruguay is probably the same one as the one found off southern Brazil.

Differentiation between stocks in Río de la Plata and the Atlantic Ocean of Uruguay appears to have occurred recently in the evolutionary history of the species and is detectable only with a high-resolution molecular marker, capable of detecting events in the late Pleistocene. This region has experienced numerous ocean-climate temperature shifts, some of which influenced the shoreline configuration, and hence the currents, of Río de la Plata after the last glacial maximum (18 000 b.p.) near the end of the Pleistocene (Violante & Parker, 2004).

Before the formation of Río de la Plata and the Ria of Bahía Blanca and during lower sea levels, inshore waters were isolated from oceanic waters. The lack of differentiation among *M. furnieri* populations of Río de la Plata and Bahía Blanca may reflect a common and recent origin, given that the two regions were formed with the last advance of the sea only 10 000 years ago. An alternative hypothesis is that populations in these regions together form a unique stock, even though both regions are breeding areas without intervening breeding sites. Under this single-stock hypothesis, individuals travel long distances to reproduce without distinction between the regions. This alternative hypothesis, however, is unlikely because of the distance between breeding areas.

The two stocks in the Uruguayan waters appear to differ in their demographic histories. The Atlantic Ocean population has a genetic signature of a rapid expansion from a small population that began at the end of the Pleistocene 27 400 – 43 200 years before present, depending on the estimate

of the mutation rate. This population expansion may have been associated with an expansion of the breeding area. *Micropogonias furnieri* in southern Brazil, and probably those in the Atlantic

Ocean off Uruguay, breed in the area of Laguna de los Patos, a lagoon system that arose from several marine introgressions and regressions in the late Pleistocene (Villwock et al., 1986). The beginning of the expansion of the Atlantic Ocean stocks coincides with the physical development of this breeding area.

The detection of two stocks with genetic markers is important for the harvest management of this fishery resource. The presence of two stocks influences stock assessments, because a two-stock model in Uruguayan waters would produce lower numbers than single-stock model. Thus, fishery biomass evaluations should take into account the presence of two stocks. On the other hand, the two stocks in the Uruguayan waters may be shared with Argentina to the south and Brazil to the north. The Atlantic Ocean stock is exploited by the fisheries in these countries under the treaty of common fishing area between Uruguay and Argentina.

The conclusions of this study are based on only a single type of population marker encoded by mtDNA. These conclusions can potentially be strengthened by the evaluation of stock structure with other variable markers, such as nuclear microsatellites or other gene markers, capable of resolving small differences between populations.

We want to thank the authorities and the staff of Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) for financing and the support in the present study. Especially, we want to acknowledge the collaboration of the local fishermen with sample collection. We would also like to thank the co-workers of DINARA, who generously collected information in the investigation ship and gave us all their invaluable support to carry out this study and J. Arbiza for supplying samples from Brazil.

References

- Beerli, P. & Felsenstein, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4563–4568.
- Brown, J. R., Beckenbach, A. T. & Smith, M. C. (1993). Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution* **10**, 326–341.
- Domingues, V. S., Bucciarelli, G., Almada, V. C. & Bernardi, G. (2005). Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology* **14**, 4051–4063. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02723.x
- Excoffier, L. & Schneider, S. (1999). Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10597–10602.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.
- Figuroa, D. & Díaz de Astarloa, J. M. (1991). Análisis de los caracteres morfométricos merísticos de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) entre los 33° S y 40° S. *Atlántica* **13**, 75–86.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915–925.
- Galli, O. (2001). Estudio comparativo de los caracteres morfométricos y merísticos de la corvina *Micropogonias furnieri* en aguas uruguayas. In *El Río de la Plata, Investigación para la Gestión del Ambiente, los Recursos Pesqueros y la Pesquería en el Frente Salino* (Vizziano, D., Puig, P., Mesones, C. & Nagy, G., eds), pp. 165–172. Montevideo: Programa Ecoplata.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Huelsensbeck, J. P. & Crandall, K. A. (1997). Phylogeny estimation and hypothesis testing using

- maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 437–466.
- Kuhner, M. K., Yamato, J. & Felsenstein, J. (1998). Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics* **149**, 429–434.
- Lasta, C. A. & Acha, E. M. (1996). Cabo San Antonio: su importancia en el patrón reproductivo de peces marinos. *Frente Marítimo* **16**, 29–37.
- Levy, J. A., Maggioni, R. & Conceição, M. (1998). Close genetic similarity among populations of the white croaker (*Micropogonias furnieri*) in the South and South-Eastern Brazilian coast. I. Allozyme Studies. *Fisheries Research* **39**, 87–94.
- Maggioni, R., Pereira, A., Jerez, B., Conceição, M., Martins, L. & Levy, J. A. (1994). Estudio preliminar de la estructura genética de la corvina (*Micropogonias furnieri*) entre Río Grande (Brasil) y El Rincón (Argentina). *Frente Marítimo* **14**, 127–131.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY: Columbia University Press.
- Posada, D. & Crandall K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817–818.
- Puchnick-Legat, A. & Levy, J. A. (2006). Genetic structure of Brazilian populations of white mouth croaker *Micropogonias furnieri* (Perciformes: Sciaenidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 429–439.
- Puig, P. & Mesones, C. (2005). Determinación y caracterización de áreas de desove de corvina. *Frente Marítimo* **20**, 35–39.
- Rogers, A. R. & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 552–569.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2 edn. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schneider, S. & Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* **152**, 1079–1089.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2001). *Arlequin ver. 2. A Software for Population Genetics Data Analyses*, Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology. Switzerland: University of Geneva.
- Swofford, D. L. (2001). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0 beta 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Vasconcello, M. & Haimovici, M. (2006). Status of white croaker *Micropogonias furnieri* exploited in southern Brazil according to alternative hypotheses of stock discreteness. *Fisheries Research* **80**, 196–202.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1991). Síntese do conhecimento sobre a biologia da corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil. *Atlantica* **13**, 55–74.
- Villwock, J. A., Tomazelli, L. J., Loss, E. L., Dehnhar, E. A., Fo, N. O. H. & Bachi, F. A. (1986). Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. In *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* (Rabassa, J., ed.), pp. 79–97. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Violante, R. A. & Parker, G. (2004). The post-last glacial maximum transgression in the de la Plata River and adjacent inner continental shelf, Argentina. *Quaternary International* **114**, 167–181.

Anexo 3.1. *Micropogonias furnieri* (“Extended Bayesian Skyline plot”)

Dado que en el artículo publicado no se había realizado el análisis “Extended Bayesian Skyline plot”, el mismo se realizó para evaluar la dinámica historia del tamaño de las poblaciones y poder comparar el patrón observado con el de las otras especies (Figura 3.1). En este caso se utilizó una tasa de mutación de 5 % por MA (Ruzzante et al. 2008).

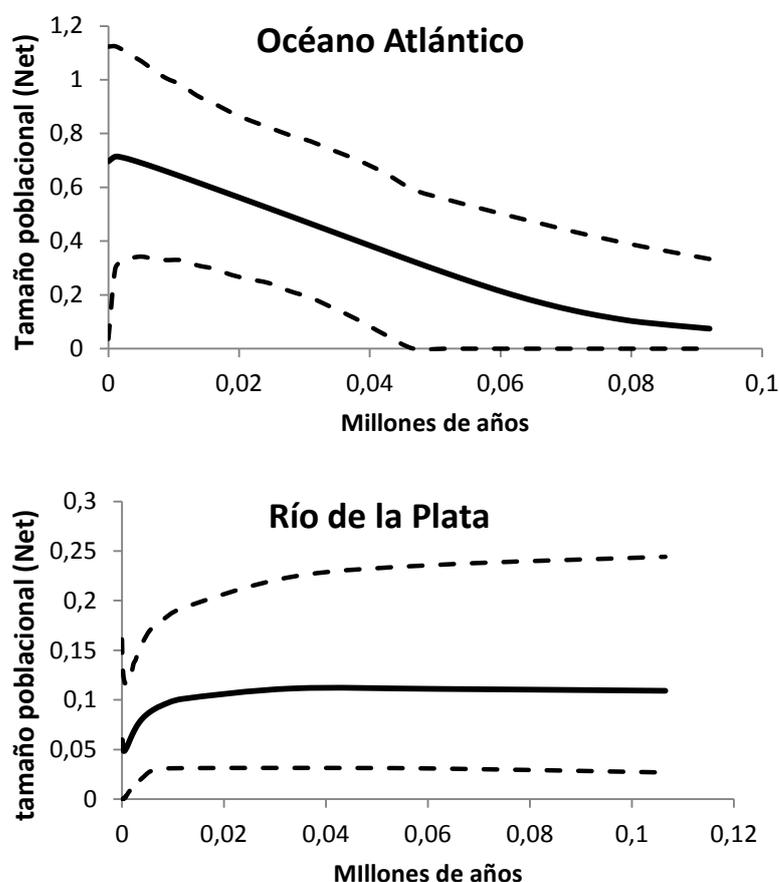


Figura 3.1. “Extended Bayesian Skyline plot” de las poblaciones de *M. furnieri* del océano Atlántico uruguayo y del Río de la Plata.

Este análisis muestra una tendencia en las corvinas del Río de la Plata, de una estabilidad demográfica en los últimos 100.000 años para decrecer en torno a los últimos 10.000 años. En cambio, las corvinas del Océano Atlántico

de Uruguay mostraron un crecimiento poblacional constante desde los últimos 90.000 años antes del presente.

La población del Océano Atlántico, muy probablemente compartida con el sur de Brasil, deba su expansión al proceso de generación del sistema de la Laguna de los Patos a causa de sucesivas regresiones y transgresiones marinas entre los 200.000 y los 40.000 años (Villwock et al. 1986). Para las corvinas de esa región, el estuario de la Laguna de los Patos es el principal sitio de reproducción (Braverman et al. 2009), por lo cual es razonable pensar que un aumento en el área disponible para la reproducción haya influenciado la dinámica poblacional de esta población.

CAPÍTULO 4. Las burriquetas *Menticirrhus americanus* y *M. littoralis*

4.1. Presencia de dos grupos filogenéticamente divergentes en la burriqueta (*Menticirrhus americanus*) en el Atlántico Sudoccidental

Introducción

La burriqueta *Menticirrhus americanus* (Linnaeus 1758) se distribuye desde Cabo Cod (EEUU) hasta la Argentina. El registro más austral de la especie es a los 37° 27' S, en aguas del Río de la Plata (Bacigalupo & Bustos 1984). Se alimenta de organismos bentónicos, especialmente poliquetos y crustáceos, y los adultos incluyen también otros peces (Haluch et al. 2009).

El género *Menticirrhus* es único en la familia Sciaenidae porque presenta la vejiga natatoria atrofiada durante el desarrollo, permaneciendo de manera vestigial en los adultos (Jardim 1988). Es un pez demersal que habita sustratos fangosos y mezclas de barro y arena en aguas costeras de regiones estuarinas (Menezes & Figueiredo 1980, Smith & Wenner 1985). La especie es considerada como estuarino-dependiente, utilizando los estuarios principalmente para la cría de juveniles (Harding & Chittenden 1987). Es una especie eurihalina, utilizando salinidades en el rango de entre 0,2 ‰ a 41 ‰ (Armstrong & Muller 1996). En el Atlántico Norte el desove parece ocurrir mayormente en invierno (Smith & Wenner 1985). Estudios sobre su reproducción desarrollados en el hemisferio norte, mostraron que madura a los 14 meses (Smith & Wenner 1985, Harding & Chittenden 1987). Aunque en el hemisferio sur la biología reproductiva no ha sido estudiada profundamente, se sabe que en Santa Catarina (Brasil), el desove ocurre en primavera y verano (Muniz & Chaves 2008). Otra especie del mismo género, *M. littoralis*, registrada en el sur de Brasil, tiene un período reproductivo de diciembre a marzo y los adultos se acercan a aguas someras para la reproducción (Braun & Fontoura 2004).

La burriqueta interactúa con diferentes tipos de pesca en mayor o menor medida a los largo de su distribución. En Sudamérica es objeto de pesca artesanal y deportiva (Menezes & Figueiredo 1980, Lewis et al. 1999). En

Estados Unidos, es un componente importante de la captura incidental en la pesquería del camarón (Harding & Chittenden 1987), mientras que en Brasil ha sido considerada como candidata para la acuicultura (Bouchereau et al. 2000).

La estructura genética de una especie explotada comercialmente, es un insumo necesario para el manejo adecuado de su pesquería, y por décadas, el uso de marcadores genéticos ha contribuido al manejo de las pesquerías. Tanto la estructura poblacional como la variación genética observada en una especie, en parte depende de la capacidad de dispersión y también de su historia evolutiva. Ha sido propuesto que las glaciaciones ocurridas durante el Pleistoceno fueron los eventos más significativos que dieron forma a los patrones filogenéticos observados con ADN mitocondrial y sobre la estructura poblacional de especies de peces marinos (Han *et al.* 2008). Uno de los efectos más evidentes de los eventos de glaciación, fue un importante cambio en el nivel del mar, con sus consecuencias sobre las zonas costeras y la posible generación de eventos de vicarianza, lo que a su vez puede influenciar la historia demográfica de las poblaciones y la distribución geográfica de la diversidad genética (Hewitt 2000).

En este capítulo, se utilizan secuencias del ADN mitocondrial para evaluar si *M. americanus* consiste en un único stock o está subdividida en poblaciones diferenciadas que deberían ser tratadas como unidades independientes, entre el Río de la Plata y Espírito Santo (Brasil), y se evalúa la influencia de los paleoclimas de Cuaternario en la variación genética de la especie.

Materiales y Métodos

Se analizó un total de 107 individuos de *M. americanus* colectados de 7 localidades entre el Río de la Plata (Uruguay) y Espírito Santo (Brasil): Río de la Plata (RP; N = 30), La Paloma (LP, Atlántico uruguayo) (N = 2), Chuy (CH, Atlántico uruguayo) (N = 4), Santos-Cananéia (SA, Sur de São Paulo, Brasil) (N = 24), São Sebastião (SS, Norte de São Paulo, Brasil) (N = 21), Rio de Janeiro (RJ, Brasil) (N = 21) y Vitória (ES, Brasil) (N = 5) (Figura 4.1.1). Fueron

obtenidas muestras de tejido a través de pescadores artesanales, pesca con caña desde la costa y en el buque de investigaciones B/I Aldebarán, y conservados en etanol 96%. El ADN fue aislado por extracción salina (modificado de Miller *et al.* 1988) digiriendo los tejidos a 55°C en 500 µl de buffer de extracción [50 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS] y proteinasa K. El ADN fue purificado usando una precipitación de las proteínas con NaCl, seguido de precipitación con etanol al 100 %. Se utilizaron los primers Procor1 y PhePer, para amplificar un fragmento de aproximadamente 800pb de la región control del ADN mitocondrial (CR). Las reacciones de PCR contuvieron 5-50 ng DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 2,5 U of Taq DNA polimerasa, 200 mM de cada dNTP and 0,5 mM de cada primer en un volumen final de 50 µl. La amplificación fue conducida en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C (2 min), 35 ciclos de 94°C (1 min), 52°C (1 min) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min). Los productos de pcr fueron secuenciados utilizando los mismos primers usados en la amplificación y las secuencias fueron editadas y alineadas con Bioedit (Hall 1999).

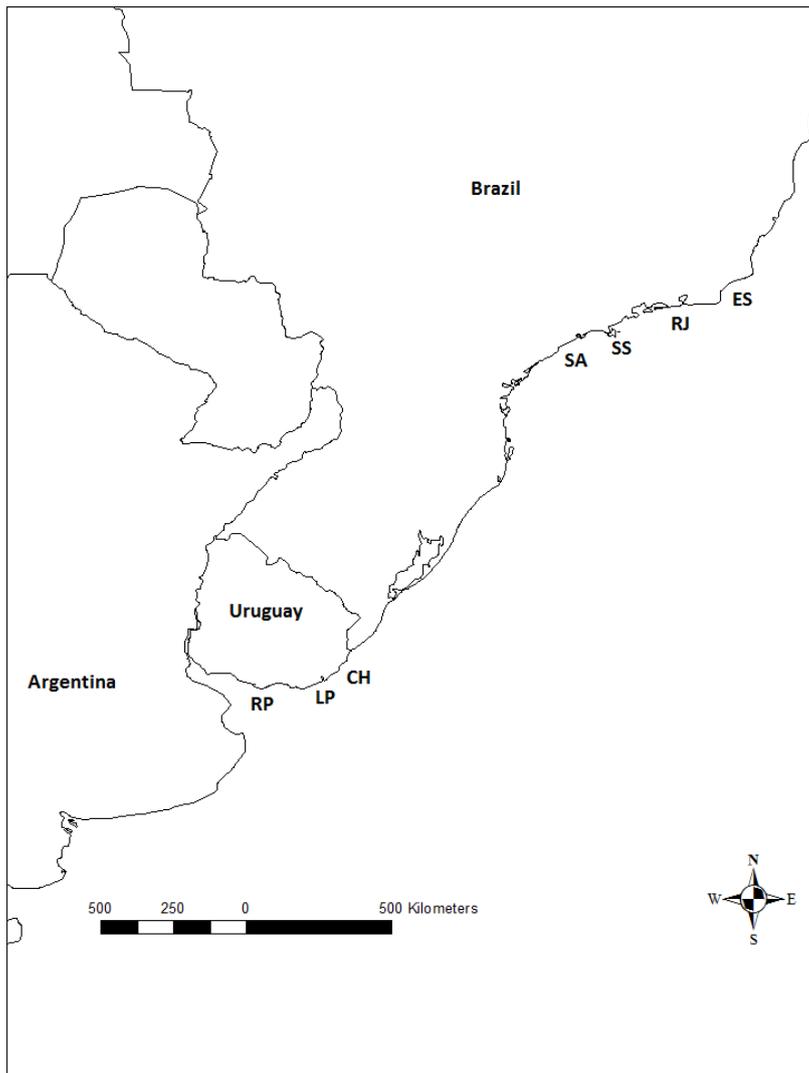


Figura 4.1.1. Localidades de muestreo. RP, Río de la Plata; LP, La Paloma; CH, Chuy; SA, Santos-Cananeia (Sur de São Paulo); SS, São Sebastião (Norte de São Paulo); RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo.

La diversidad genética se midió como: la diversidad haplotídica (H), que es la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar tengan secuencias diferentes de ADN; la diversidad nucleotídica (π), que es la probabilidad de que dos sitios homólogos escogidos al azar sean diferentes; y el número medio de diferencias pareadas (P) (Nei, 1987; Tajima, 1983). La estructura genética de las poblaciones fue evaluada utilizando los estadísticos F_{ST} , con la distancia

genética de Nei & Li (Nei & Li, 1979) que es el número corregido de diferencias pareadas entre localidades; y con el test exacto de diferenciación entre poblaciones. Los índices de diversidad genética y los análisis de estructuración poblacional fueron calculados con Arlequin, versión 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

El modelo de sustitución nucleotídica que explica la variación observada en el set de datos fue evaluado utilizando el criterio de Akaike implementado en JModeltest 3.06 (Posada 2008). El modelo seleccionado fue utilizado para construir un árbol de distancia con PAUP* 4.0b10 (Swofford 2001) con bootstrap de 1000 pseudoréplicas. Secuencias de *Menticirrhus littoralis* de Rio Grande do Sul, Sao Paulo y Rio de Janeiro fueron utilizadas como grupo externo. También se construyó una red de haplotipos en Network (Fluxus Technology 2008).

La historia demográfica de las poblaciones fue estimada de la distribución de diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) (Rogers & Harpending 1992, Schneider & Excoffier 1999), la cual es unimodal cuando las poblaciones experimentaron una expansión poblacional reciente. En esta aproximación, se calcula el $\tau = 2\mu t$ (el tiempo desde cuando se originó la expansión) con simulaciones del coalescente de una expansión en un paso (Excoffier & Schneider 1999). La distribución unimodal fue evaluada utilizando el estadístico SSD (“sum of the squared differences”), de acuerdo a Schneider & Excoffier (1999). Se calculó el índice r de Harpending, el cual toma valores mayores en poblaciones estacionarias con distribuciones de diferencias multimodales, que en poblaciones que sufrieron expansión poblacional cuyas distribuciones son unimodales (Harpending 1994). Valores pequeños y significativos de SSD y de r , no permiten rechazar la hipótesis nula de que la población atravesó una expansión poblacional. Se utilizaron los índices de Tajima, D (Tajima 1989) y de Fu, F_S (Fu 1997), los cuales son particularmente sensibles a desviaciones de la neutralidad, y a crecimientos rápidos de la población. Los test fueron realizados en Arlequin 3.5. La dinámica poblacional

hasta el presente también fue examinada utilizando el método denominado “Extended Bayesian Skyline-Plot” (Drummond et al. 2005). Esta aproximación está basada en la teoría del coalescente y relaciona las secuencias y la historia demográfica de una población (Ho & Shapiro 2011). En estos análisis se asumió una tasa de mutación por sitio de 4 % por sitio por millón de años (ver Discusión).

Resultados

Fueron secuenciadas 806 pb de la región control mitocondrial en un total de 107 individuos. Se identificaron 47 haplotipos, los cuales se redujeron a 45 al excluir dos indels (inserciones-delecciones) (Números de acceso al Genbank: JQ322702-JQ322748). Para evaluar los parámetros poblacionales solo se utilizaron las localidades con un número significativo de individuos: Río de la Plata, Santos-Cananéia, São Sebastião y Rio de Janeiro. Los individuos de las restantes localidades fueron utilizados para visualizar la distribución de la variación genética y evaluar la presencia de secuencias divergentes a través del área muestreada. Los valores de los índices que miden la diversidad genética, se muestran en la Tabla 4.1.1. El Río de la Plata mostró la mayor proporción de haplotipos divergentes mientras que la diversidad nucleotídica fue similar en las cuatro localidades. Las localidades de Brasil mostraron valores similares de variabilidad genética.

Región	<i>N</i>	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	π	<i>P</i>
Río de la Plata + LP	32	18	20	0,9133 (0,0394)	0,0041 (0,0024)	3,29 (1,74)

Chui	4	4	6	1,0000 (0,1728)	0,0037 (0,0029)	3,01 (1,97)
São Paulo Sur	24	12	14	0,7174 (0,1033)	0,0018 (0,0013)	1,46 (0,92)
São Paulo Norte	21	9	16	0,6286 (0,1228)	0,0025 (0,0016)	1,99 (1,17)
Rio de Janeiro	21	8	9	0,7381 (0,0844)	0,0016 (0,0011)	1,26 (0,83)
Espírito Santo	5	4	5	0,9000 (0,1610)	0,0025 (0,0020)	2,00 (1,35)

Tabla 4.1.1. Diversidad genética. n: tamaño de la muestra, k: número de haplotipos, S: número de sitios polimórficos, H: diversidad haplotídica; π : diversidad nucleotídica, P: número medio de diferencias entre pares de secuencias. Error standard entre paréntesis. LP: La Paloma.

El modelo de evolución molecular que mejor ajustó a la variación observada en el set de secuencias fue HKY (Hasegawa-Kishino-Yano). con 87,2 % de sitios invariables. En el software Arlequin, el número de modelos de evolución molecular es limitado y el modelo HKY no está disponible. Considerando que las distancias genéticas calculadas son menores del 4 %, en Arlequin se utilizó un modelo más simple (Jukes-Cantor), al considerar que con distancias genéticas menores a 10 %, no muestran diferencias significativas en las estimaciones de distancia (Nei & Kumar 2000), pero un modelo más simple tiene una varianza menor. Esto es válido cuando los cambios en las secuencias no siguen una distribución gama (Arbogast et al. 2002).

El número corregido de diferencias entre pares de secuencias, entre el Río de la Plata y las otras localidades fue 17,0 ($p < 0,001$). En cambio, cuando las localidades brasileñas fueron comparadas entre ellas, las diferencias no fueron significativamente diferentes de 0. El Río de la Plata mostró los mayores valores pareados de F_{ST} , mientras que cuando las localidades brasileñas fueron comparadas entre sí, los F_{ST} no fueron significativos.

El árbol de distancia mostró dos grupos monofiléticos bien distinguibles con un apoyo de bootstrap muy significativo (Figura 4.1.2). Uno de los grupos está integrado por secuencias obtenidas de individuos colectados en su mayoría en el Río de la Plata, y dos colectados cercanos a La Paloma (bootstrap 96%). Este grupo fue llamado “grupo sur”. El segundo grupo monofilético estuvo

formado por secuencias encontradas desde el Chuy hasta Espírito Santo (Brasil) (bootstrap 90%). Dentro de esos dos agrupamientos principales, la mayoría de los subgrupos no mostraron apoyos de bootstrap. La red de haplotipos tuvo una topología en forma de estrella en los dos grupos de secuencias (Figura 2.1.3). La distancia genética media entre los dos grupos principales fue de 0,026 mientras que la distancia media de cada uno de los grupos con *M. littoralis* fue de 0,21. Con esto se descarta que los dos grupos correspondieran a esta otra especie morfológicamente similar.

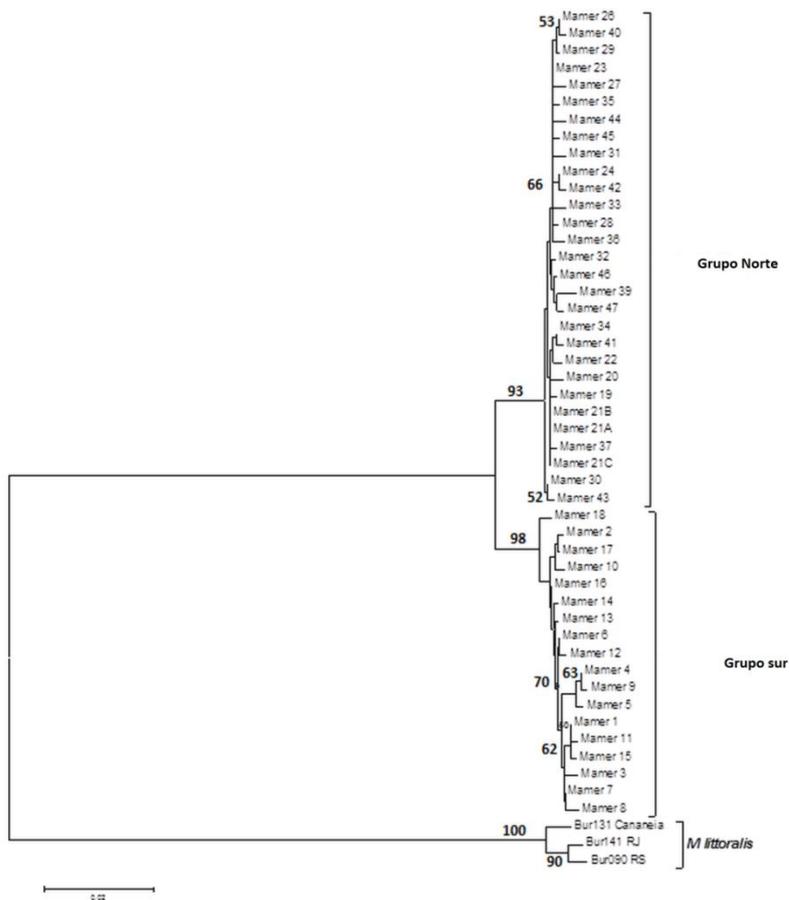


Figura 4.1.2. Árbol de unión de vecinos (“neighbour-joining”) de haplotipos de *Menticirrhus americanus*. El “grupo norte” corresponde a individuos colectados entre Chuy y Espírito Santo, mientras que el “grupo sur” a muestras del Río de la Plata y La Paloma. Los números representan apoyos de bootstrap por encima de 50%.

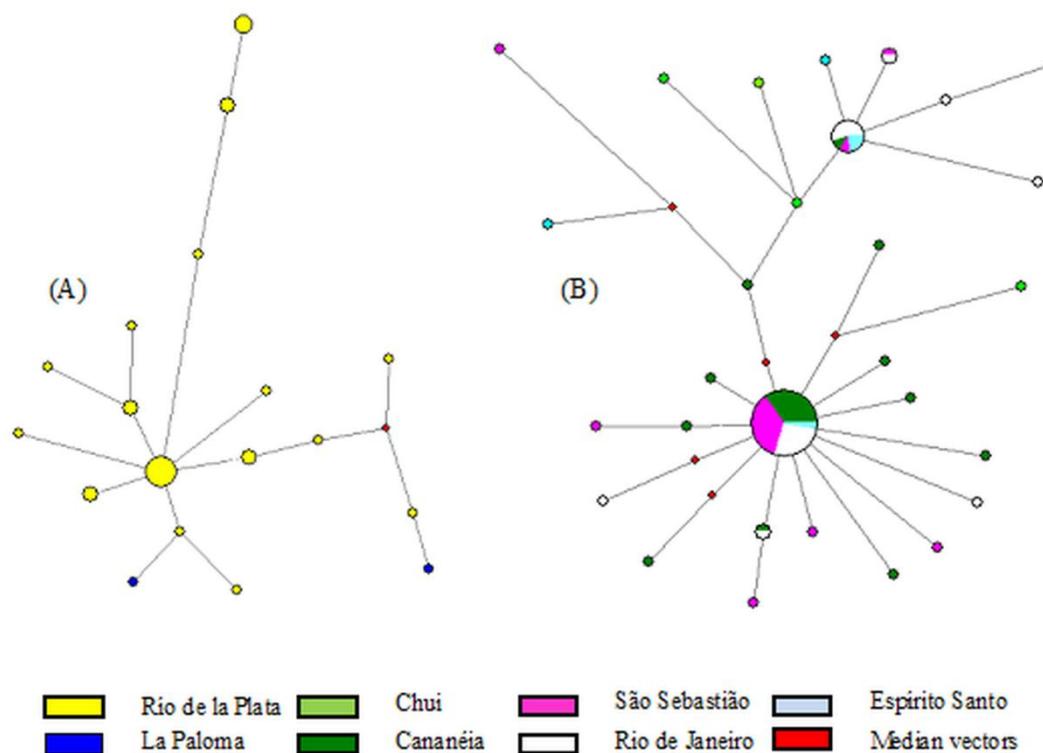


Figura 4.1.3. Red de haplotipos de los dos clados de *Menticirrhus americanus*. (A): Grupo sur; (B) Grupo norte. “Median vectors” son haplotipos hipotéticos no muestreados.

Inferencias históricas

Dada la divergencia observada entre los dos agrupamientos, éstos fueron analizados separadamente. Como las localidades brasileñas no se diferenciaron y sus secuencias formaron un grupo monofilético, las secuencias entre el Chuy y Espírito Santo se agruparon para evaluar la historia demográfica del clado. El otro clado analizado incluyó las secuencias del Río de la Plata y La Paloma. En el “grupo sur”, el índice de Tajima (D) fue negativo pero no significativo ($D=-1,17$; $p=0,099$) mientras que el de Fu fue negativo y significativo ($F_S=-9,92$, $p<0,001$). En el “grupo norte” ambos índices fueron negativos y significativos ($D=-2,19$; $p=0,099$; $F_S=-26,68$; $p<0,001$). La distribución de las diferencias pareadas fue unimodal solamente en el grupo sur, aunque tanto el SSD y el índice r fueron pequeños y no se rechazó la

hipótesis de una expansión poblacional, en ambos clados (Figura 4.1.4; tabla 4.1.2). Las estimaciones basadas en la distribución de diferencias indicaron que el “grupo norte” ($\tau = 1.500$; tiempo desde la expansión = 23,200 años antes del presente, YBP) se expandió más recientemente que el grupo sur ($\tau = 2.676$; tiempo desde la expansión = 41,500 YBP) (Tabla 4.1.2). Sin embargo, el intervalo de confianza fue muy amplio y solapa las dos estimaciones (“grupo sur”: 12.700 a 109.500 YBP; “grupo norte”: 11.000 a 145.200 YBP).

	τ	SSD	r	D	Fs
Grupo norte	1,500	0,0211 (p=0,46)	0,0672 (p=0,39)	-2,19 (p<0,001)	-26,68 (p<0,001)
Grupo sur	2,676	0,0024 (p=0,74)	0,0150 (p=0,91)	-1,17 (p=0,099)	-9,92 (p<0,001)

Tabla 4.1.2. Valores de τ estimados con la distribución de diferencias pareadas y los índices de neutralidad de Tajima (D) y Fu (FS). (SSD: suma de los desvíos cuadrados, r: test de Harpending)

El método bayesiano mostró una estimación similar a la obtenida con el método anterior: en el “grupo sur” se observó una expansión originada cercana a los 50.000 años con secuencias coalesciendo en los 78.000 años; mientras que en el “grupo norte” la expansión habría comenzado hace 25.000 años, con secuencias coalesciendo alrededor de los 41.000 YBP (Figura 4.1.4).

En el “grupo norte” se observó una topología en forma de estrella, con varios haplotipos difiriendo en 2 o 3 bases de 2 haplotipos abundantes y ubicados en posición central. Los haplotipos centrales son abundantes y ampliamente distribuidos. La típica topografía en forma de estrella no es tan evidente en la red de haplotipos del “grupos sur” (Figura 4.1.3).

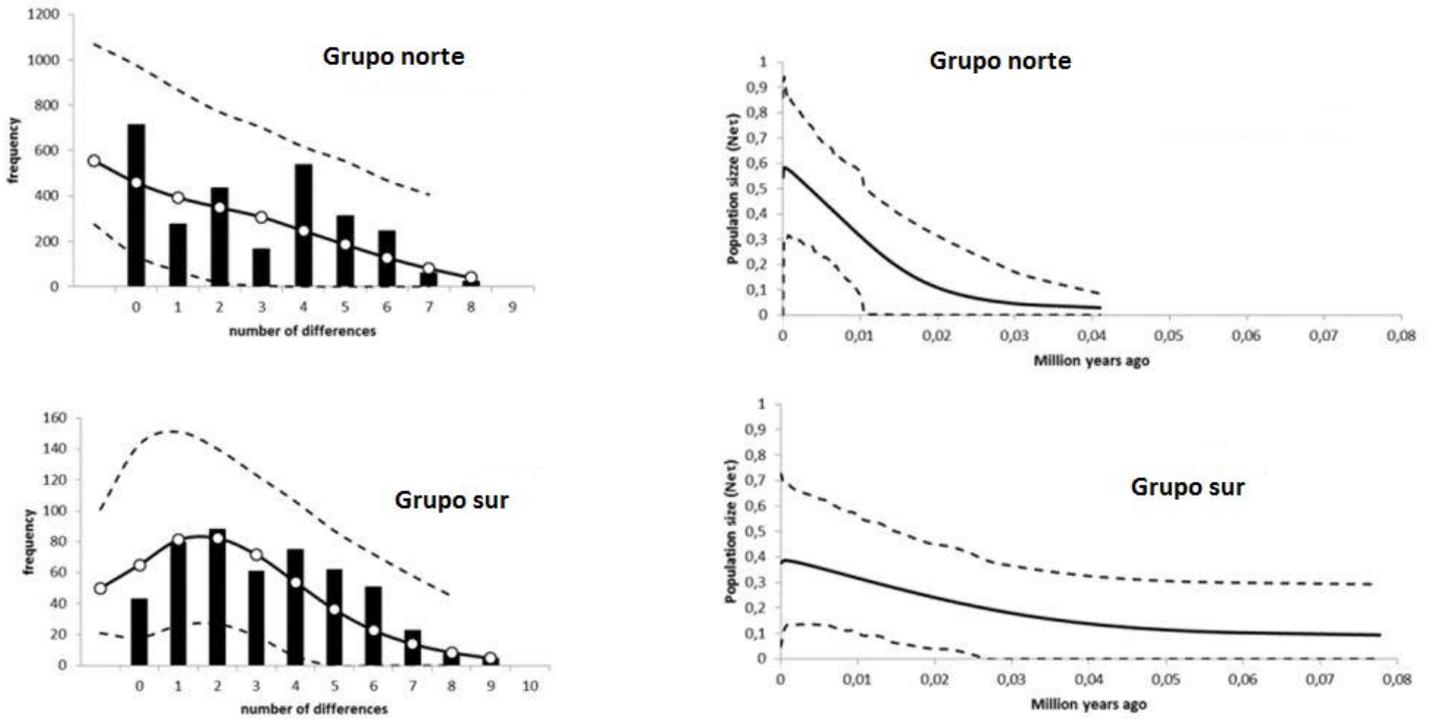


Figura 4.1.4. Izquierda: Distribución de diferencias (“mismatch distribution”) de *M. americanus* para el grupo norte “Grupo norte” (arriba) y del “Grupo sur” (abajo). Derecha: “Bayesian skyline plot” para los grupos norte y sur de secuencias de *Menticirrhus americanus*. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95 %.

Discusión

En este capítulo se observó la presencia de dos unidades evolutivas significativas (Moritz 1994) de burriquetas en el Atlántico Sudoccidental. La evidencia más clara de la divergencia observada es la presencia de dos grupos recíprocamente monofiléticos: uno conformado con secuencias encontradas en el Río de la Plata, y el segundo representado por individuos colectados desde Chuy hasta Espírito Santo (Brasil). El primer grupo parece estar restringido al Río de la Plata, alcanzando las aguas oceánicas, al menos hasta La Paloma. Los dos grupos estarían en alopatría. En las aguas oceánicas uruguayas *M. americanus* parece no ser una especie muy común, donde *M. littoralis* es más

abundante. Esto es la causa del bajo muestreo obtenido en las localidades de La Paloma y Chuy. Los individuos que pertenecían a grupos diferentes y que fueron colectados más cerca (La Paloma en el “grupo sur” y Chuy en el “grupo norte”) estuvieron separados por 100 km. Por lo tanto, de existir una zona de contacto entre las dos unidades evolutivas, esta sería muy débil.

La distancia genética observada en las dos unidades evolutivas fue aproximadamente la décima parte de la observada entre éstas y *M. littoralis*, apoyando la idea de que se observa es una diferenciación poblacional importante, más que la presencia de una especie críptica. Por lo tanto, la diferenciación observada en *M. americanus* podría deberse a una divergencia reciente, probablemente como respuesta a cambios en el clima y en el nivel del mar del final del Pleistoceno (Hewitt 2000).

La utilización de una mayor cantidad de marcadores moleculares independientes permitirá evaluar el grado de diferenciación, y si la misma es una diferenciación poblacional o es debida a la presencia de dos especies hermanas.

La biología de la especie no es muy conocida en la región, lo que dificulta explicar qué factores pueden haber generado y estar manteniendo las diferencias observadas. En la especie emparentada *M. littoralis*, se ha detectado poco movimiento de juveniles en su área de cría en el sur de Brasil (Braun & Fontoura 2004). Si los juveniles de *M. americanus* tuvieran el mismo comportamiento, la baja dispersión podría ser un factor contribuyendo a la diferenciación observada entre áreas distantes y mantener diferencias locales. La hipótesis requiere que las hembras mantengan fidelidad a los sitios de desove y haya un efecto menor de las corrientes en el intercambio de huevos y larvas entre diferentes sitios de cría. La limitación del “grupo sur” al Río de la Plata sugiere que podría existir cierta adaptación a ese ambiente típicamente estuarino, posiblemente para alimentación y reproducción. En la corvina blanca, *Micropogonias furnieri*, también fue detectada la presencia de dos

stocks genéticamente distinguibles, uno asociado al Río de la Plata y otro en aguas oceánicas de Uruguay (Pereira et al. 2009, D'Anatro et al. 2011). Esta especie desova en la confluencia de las aguas marinas y dulces (Acha et al. 1999), y dado que a *M. americanus* se la ha asociado a ambientes estuarinos, una estrategia de desove similar a la corvina rubia podría contribuir a una diferenciación local. Braun & Fontoura (2004), basados en un incremento en la costa de las hembras en condición reproductiva durante la época de desove, propusieron que *M. littoralis* y *Micropogonias furnieri* tendrían estrategias reproductivas similares. Haluch et al. (2011) encontraron que el periodo reproductivo de *M. americanus* en el estado de Santa Catarina (Brasil) estuvo asociado con altas temperaturas y bajas salinidades. Como las bajas salinidades están asociadas a los estuarios, y estos no son ambientes continuos a lo largo de la costa marina, la reproducción asociada con estuarios como el Río de la Plata podría ser un factor generando la diferenciación poblacional observada.

No se observaron diferencias significativas entre las localidades de Brasil, aunque la presencia de alelos exclusivos en cada localidad sugiere cierta restricción en el flujo génico. Una hipotética diferenciación en estas localidades necesitaría ser evaluada con la utilización de un número mayor de individuos analizados y/o con la utilización de marcadores moleculares adicionales. Asimismo, dado que estas localidades compartieron una historia común reciente con un evento de expansión demográfica, el efecto de ésta podría estar enmascarando estructuración actual de las poblaciones.

Historia demográfica

Los dos agrupamientos mostraron eventos de expansión poblacional recientes, aunque difirieron ligeramente. Para obtener una estimación del tiempo absoluto de los procesos demográficos se necesita tener una estimación de la tasa de mutación de la región control mitocondrial, lo cual es una fuente importante de incertidumbre (Ruzzante et al. 2008) En los peces se ha observado que la tasa

de sustitución nucleotídica es muy variable (Sato et al. 2003, Sturmbauer et al. 2001, Domingues et al. 2005, Brown et al. 1993, Bowen et al. 2006), variando entre 2,2 %MA⁻¹ y 10 % MA⁻¹.

Un criterio para escoger una tasa de mutación para la región control en un grupo de especies emparentadas, es comparar las diferencias observadas con este marcador, con las diferencias que surgen de utilizar un marcador genético con una tasa de cambio más estable en diferentes grupos taxonómicos (Bowen et al. 2006). Para esto, se puede utilizar la distancia observada con citocromo b, cuya tasa de sustitución es menos variable en peces, alrededor de 2% MA⁻¹ (Brown et al. 1979, Bowen et al. 2006). De acuerdo a este criterio, se usaron secuencias del citocromo b mitocondrial de *M. americanus* y *M. littoralis* (colectadas en aguas uruguayas) y se calculó una divergencia de 10 %, mientras que la diferencia observada con la región control fue del 20 %. Por lo tanto, una tasa de sustitución razonable para el género *Menticirrhus* estaría alrededor del 4 % MA⁻¹. Con esta tasa de divergencia, la expansión demográfica en el Río de la Plata (“grupo sur”) habría ocurrido entre los 40.000 y los 50.000 años antes del presente, y en los 25.000 años en el “grupo norte”, integrado por individuos presentes desde el este de Uruguay y Brasil. Estas estimaciones indican que las poblaciones crecieron desde los últimos eventos de glaciación del final del Pleistoceno, cuando el nivel del mar era menor que en el presente. Para la Plataforma Argentina, el último máximo de glaciación (UMG) ocurrió entre los 15.000 y los 20.000 años antes del presente, y en ese tiempo el nivel del mar estaba en -100 m, mientras que para 50.000 años atrás, se ubicaba en -50 m (Violante & Parker 2004). Por lo tanto, durante largos períodos existieron menor cantidad de sitios con aguas poco profundas porque la costa estuvo más cerca del límite de la plataforma continental. Esto puede ser un factor importante para la distribución de esta especie que actualmente se la encuentra en profundidades mayores a los 20 m. Con el aumento del nivel del mar que siguió a los últimos máximos de glaciación, el aumento en el tamaño de la población pudo haber sido el resultado de una expansión en el hábitat disponible (esto es, disponibilidad de aguas poco profundas).

El proceso de expansión demográfica puede estar relacionado a las respuestas a los cambios ambientales ocurridos cerca del final de las glaciaciones del Pleistoceno tardío. Dado que los individuos del “grupo sur” están restringidos a la región del Río de la Plata, podría inferirse que la dinámica histórica de esta población estuvo influenciada por la historia del estuario. Antes de la última transgresión marina, el Río de la Plata no era un estuario sino un gran delta (Violante & Parker 2004). Por lo tanto, aunque la especie probablemente no tenía tanto hábitat disponible como en el presente, fue suficiente para mantener poblaciones de un tamaño significativo, lo cual podría explicar el incremento más lento de las poblaciones en respuesta a la transgresión marina que formó el Río de la Plata.

La respuesta demográfica del “grupo norte” a los eventos de glaciación parece haber sido algo diferente, con un incremento 20 veces mayor en el tamaño de la población, en un tiempo más reciente. La especie no es capturada en profundidades mayores a los 20 m. Por tanto, cuando el nivel del mar estuvo a -100 m durante el UMG, y la línea de costa estuvo más cerca del límite de la plataforma, el hábitat disponible en regiones oceánicas probablemente fue mucho menor que en el presente. Este efecto seguramente fue mayor en latitudes bajas, dado que allí la plataforma es más angosta. Esta especie depreda sobre presas bentónicas (Haluch et al. 2009) como crustáceos y moluscos, en particular en estadios juveniles, por lo que la disponibilidad de alimento depende de la extensión de la plataforma y las aguas someras. La última transgresión marina incrementó las áreas del mar con aguas poco profundas, aumentando el hábitat disponible para alimentación, reproducción y cría de juveniles. La extensión de la plataforma continental Atlántica es mayor en latitudes altas de Sudamérica, por lo que el impacto de la caída en el nivel del mar para peces costeros pudo haber sido menos importante para el “grupo sur” y esto podría explicar la respuesta demográfica más atenuada de *M. americanus* en el Río de la Plata.

Janko et al. (2007) sugieren que las especies bentónicas podrían ser más

sensibles a las glaciaciones más recientes que los depredadores pelágicos, dado que en la columna de agua la disponibilidad de alimentos no necesariamente dependerá de la extensión de la plataforma. *M. americanus* parece ser un caso de especie bentónica cuya dinámica demográfica estuvo influenciada por los eventos climáticos pre-Holocénicos, probablemente mediados por la disponibilidad de hábitat adecuado.

El efecto de las glaciaciones sobre las poblaciones de peces y su diversidad genética ha sido ampliamente estudiado en peces de agua dulce, donde la reducción del agua durante las épocas de hielo parece haber creado refugios y aislamiento (Ruzzante et al. 2008). En los períodos post-glaciales, poblaciones pequeñas que sobrevivieron en refugios pudieron expandirse con el incremento del hábitat. Sin embargo, en los mares la posibilidad de aislamiento es menor dado la mayor continuidad de los hábitats. Esto hace más llamativa la identificación de dos unidades tan diferenciadas en un medio donde los límites para el flujo génico no son tan evidentes.

La identificación de un grupo genéticamente divergente en el Río de la Plata es importante desde la perspectiva de la conservación de los recursos genéticos, en particular en especies costeras. Las costas tienen una alta diversidad en comparación con las aguas abiertas, y a su vez son más vulnerables a los disturbios por la presencia de ciudades, y más general, la concentración de las actividades humanas, como el tráfico marino y las pesquerías (Gray 1997). En particular, el Río de la Plata es usado por Argentina y Uruguay, presenta dos puertos importantes y sostiene una importante actividad pesquera, por lo que el estuario podría ser vulnerable a sufrir un impacto sobre la biodiversidad. Desde esta perspectiva, la identificación de grupos genéticamente divergentes en el Río de la Plata, tanto en *Menticirrhus americanus* como en otros sciaénidos (Pereira et al. 2009, D'Anatro et al. 2011) indica que la región mantiene niveles de biodiversidad que la diferencian de regiones vecinas, mostrando que el estuario pudo tener una historia que afectó a varias de sus especies.

Material suplementario

Frecuencias haplotídicas absolutas de *Menticirrhus americanus* (RP: Río de la Plata; LP: La Paloma; CH: Chuy; SA: Santos-Cananéia; SS: São Sebastião; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo).

Haplotipo	Localidades						
	RP	LP	CH	SA	SS	RJ	ES
Mamer01	2						
Mamer02	1						
Mamer03	1						
Mamer04	3						
Mamer05	1						
Mamer06	1						
Mamer07	9						
Mamer08	1						
Mamer09	2						
Mamer10	1						
Mamer11	1						
Mamer12	1						
Mamer13	2						
Mamer14	2						
Mamer15	1						
Mamer16	1						
Mamer17		1					
Mamer18		1					
Mamer19			1				
Mamer20			1				
Mamer21A			1				
Mamer21B				1			

Mamer21C		1	1	5	2
Mamer22	1				
Mamer23		13	13	10	1
Mamer24		1			
Mamer26		1			
Mamer27		1			
Mamer28		1			
Mamer29		1		1	
Mamer30		1			
Mamer31		1			
Mamer32		1			
Mamer33		1			
Mamer34				1	
Mamer35			1		
Mamer36			1		
Mamer37			1	1	
Mamer39			1		
Mamer40			1		
Mamer41			1		
Mamer42			1		
Mamer43				1	
Mamer44				1	
Mamer45				1	
Mamer46					1
Mamer47					1

4.2. Confirmación molecular y diversidad de la burriqueta *Menticirrhus littoralis* en aguas uruguayas

Introducción

La burriqueta *Menticirrhus littoralis* (Holbrook, 1847) es una especie de la Familia Sciaenidae ampliamente distribuida en el Atlántico Sudoccidental y el Golfo de México. De acuerdo a algunos autores, esta especie se distribuye desde Florida (USA) hasta el sur de Brasil (Menezes & Figueiredo 1980). La especie no está registrada en las listas de peces de Uruguay o Argentina (Nion et al. 2002). Sin embargo, en una revisión de la nomenclatura y la taxonomía de las especies de *Menticirrhus* en el Atlántico sur, Jardim (1988) sugiere que su distribución alcanza la Argentina, en base a descripciones hechas por diferentes autores (Buen 1950, Devincenzi 1924) aunque nombrándola como *M. martinicensis* (sinónimo de *M. littoralis*). No obstante esto, en Uruguay, los estudios ecológicos y pesqueros consideran que *M. americanus* es la única especie con presencia en este país (Nion et al. 2002).

En algunas partes del Atlántico Sudoccidental la especie co-distribuida con la especie morfológicamente similar *Menticirrhus americanus*. La diferencia en el tamaño de las aletas pectorales y el color del cuerpo a menudo permiten discriminar entre ambas especies (Menezes & Figueiredo 1980). En los individuos juveniles, donde esas diferencias no son tan pronunciadas, la identificación de las especies con estas claves se hace más difícil.

Los marcadores moleculares pueden utilizarse en la diferenciación de especies, particularmente en casos de divergencia reciente, donde puede haber escasez de caracteres morfológicos diagnósticos (Meyer, 1997; Avise, 2004). y son una herramienta muy útil en la identificación de muestras colectadas por pescadores o personal con poca calificación en la identificación de las especies. En un muestreo de burriquetas *M. americanus*, como parte de un estudio que involucraba el análisis de secuencias de la región control mitocondrial, se observó una secuencia con un alto grado de divergencia en

aguas uruguayas. Según Nion et al. (2002), la única especie registrada para Uruguay es *M. americanus*, por lo que la posible existencia de otra especie tiene consecuencias para el conocimiento de la biodiversidad y el manejo de pesquerías. De existir más de una especie del género *Menticirrhus* en aguas uruguayas, los estudios sobre la diversidad de peces y de estadística pesquera, actualmente estarían subestimando la diversidad.

En este trabajo se usaron secuencias de ADN mitocondrial para evaluar la hipótesis sobre la presencia de *Menticirrhus littoralis* en Uruguay, por lo que esta especie debería ser considerada como parte de la fauna ictícola del Uruguay.

Materiales y Métodos

Se extrajo ADN de muestras de músculo para amplificar en reacciones de PCR y secuenciar, fragmentos parciales de la región control y del citocromo b mitocondriales (métodos descritos en Pereira et al. 2009) de individuos de Uruguay y de 3 localidades de Brasil (Figura 4.2.1). En Brasil las muestras fueron obtenidas con pescadores artesanales, mientras que en Uruguay fueron colectadas con pesca con caña desde la costa o con pesca de arrastre en el buque de investigaciones Aldebarán, a profundidades menores de 15 m.

Para evaluar si el individuo problema pertenece a una especie diferente de *M. americanus*, se obtuvo una secuencia de 850 pb del citocromo b mitocondrial de ese individuo y de otros 2 de *M. americanus* y se las comparó con secuencias depositadas en el genbank (números de acceso: DQ060513 y DQ060512). Se construyó un árbol de distancia con estas secuencias utilizando el software MEGA (Tamura et al. 2011). La diversidad genética fue medida como: diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y el número medio de diferencias pareadas (P) (Nei 1987, Tajima 1983) calculadas en el software Arlequin, version 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Se construyó una red de haplotipos (Bandelt et al. 1999) de las secuencias de la región control de *M. littoralis* con Network (Fluxus Technology 2008), en la cual no se observó

partición geográfica de las secuencias, dado que individuos de Uruguay compartieron haplotipos con otros de Cananéia y Rio de Janeiro

La historia demográfica se evaluó con el método de la distribución de las diferencias pareadas (mismatch distribution”) (Rogers & Harpendings 1992) y con un método bayesiano (”skyline plot”) (Drummond et al. 2005).

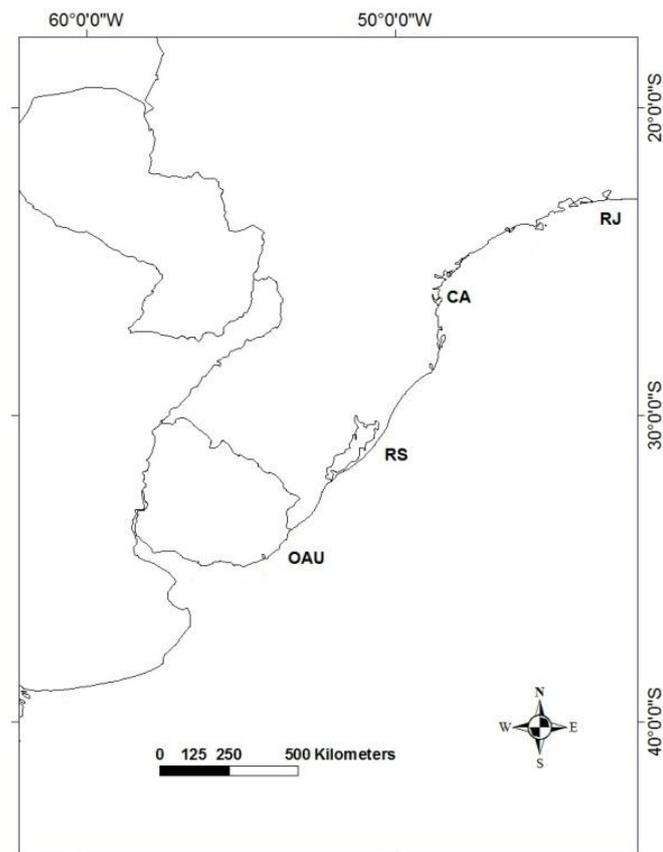


Figura 4.2.1. Localidades de las muestras. OAU, Océano Atlántico de Uruguay; RS, Torres (Rio Grande do Sul); CA, Cananéia (Sur de São Paulo); RJ, Rio de Janeiro.

Resultados

El árbol de distancia mostró que la secuencia de citocromo b del individuo problema (etiquetado como *Menticirrhus* sp) se agrupó con las secuencias de *M. littoralis*, confirmando la presencia de la especie en aguas uruguayas (Figura 4.2.2).

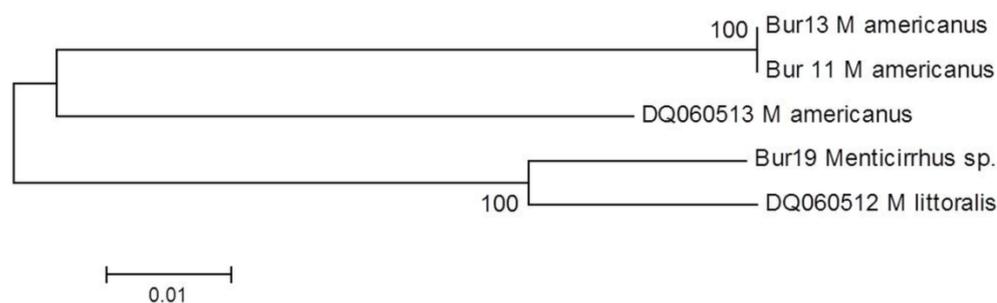


Figure 4.2.2. Árbol de distancia construido con las secuencias de citocromo b de dos individuos de *M. americanus* de Uruguay, el individuo problema colectado en Uruguay y dos secuencias depositadas en el Genbank (DQ060513: *M. americanus*; DQ060512: *M. littoralis*).

Una vez que la presencia de *M. littoralis* fue corroborada, se analizaron secuencias de 816 pb de la región control mitocondrial de un mayor número de individuos que se pudieron asociar a *M. littoralis* colectadas en la costa atlántica uruguaya (n=16), Torres (sur de Brasil) (n=4), Cananéia (Estado de Sao Paulo) (n=3) y de Rio de Janeiro (n=4). Fueron identificados 22 haplotipos (Genbank números de acceso: JQ322679- JQ322698). La diversidad genética observada fue alta, observándose con un gran número de haplotipos. La diversidad nucleotídica también fue alta y el número medio de diferencias entre secuencias (P) refleja la presencia de secuencias con cierta divergencia (Tabla 4.2.1). Este valor fue del orden del que mostraron grupos divergentes de *M. americanus* (Capítulo 4.1). (Figura 4.2.3).

Región	N	L	k	S	H	π	P
Atlántico uruguayo	16	816	12	50	0,9583 (0,0363)	0,0130 (0,0070)	10,63 (5,11)
Torres (Brasil)	4	816	4	14	1,0000 (0,1768)	0,0091 (0,0065)	7,50 (4,44)
Cananéia (Brasil)	3	816	3	11	1,0000 (0,2722)	0,0090 (0,0015)	7,33 (4,73)
Rio de Janeiro (Brasil)	4	816	4	33	1,0000 (0,1768)	0,0217 (0,0146)	17,67 (10,01)
Todo	27	816	20	69	0,9772 (0,0158)	0,0135 (0,0071)	11,04 (5,18)

Tabla 4.2.1. Diversidad genética de *Menticirrhus littoralis*. (n: tamaño de la muestra, L: longitud de las secuencias, k: número de haplotipos, S: número de sitios polimórficos, H: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica, P: número medio de diferencias pareadas, error standard entre paréntesis)

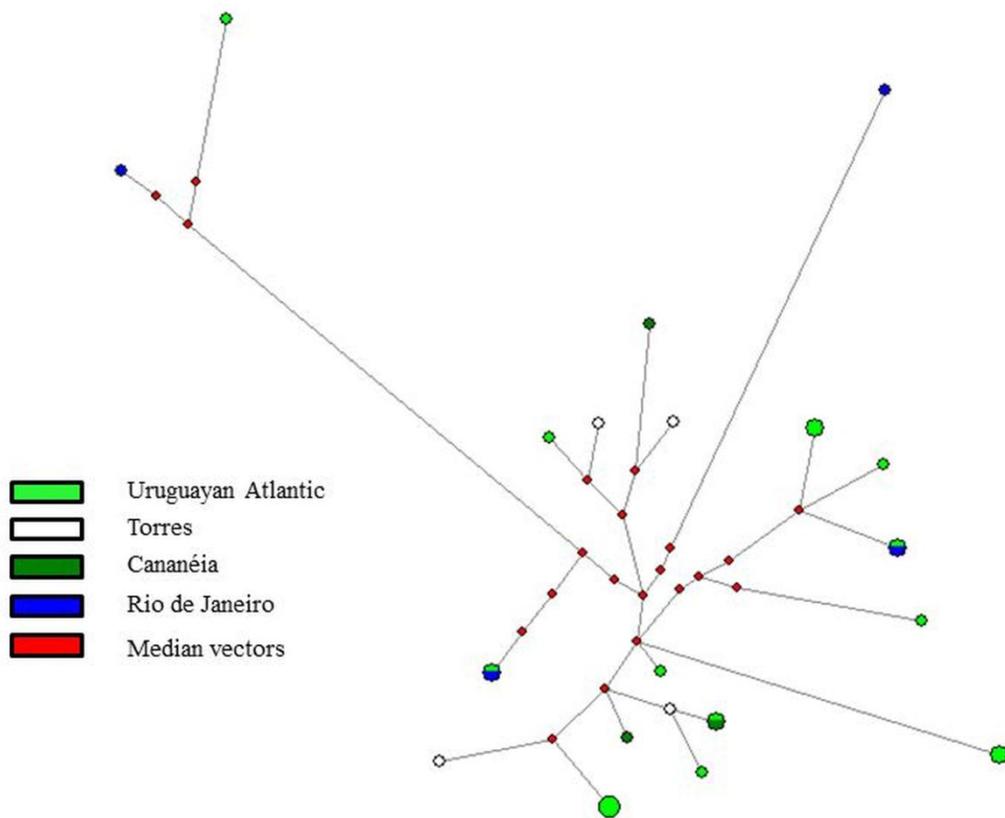


Figure 4.2.3. Red de haplotipos construida con las secuencias de la región control de *M. littoralis*.

Tanto el índice SSD ($SSD=0,0109$; $p=0,355$) como el “Harpending's Raggedness index” ($r=0,0114$; $p=0,659$), mostraron que de la “mismatch distribution” no se puede descartar la hipótesis que la población atravesó por una expansión poblacional (Figura 4.2.4). Si bien la distribución de las diferencias es multimodal, típica de poblaciones con estabilidad demográfica, el intervalo de confianza no permite descartar el ajuste a una distribución unimodal típica de poblaciones en expansión. El método basado en la “mismatch distribution” es muy conservador para descartar la hipótesis nula de expansión, y aunque no es descartada, no se resuelve claramente la historia demográfica. Esto se muestra en el amplio rango del intervalo de confianza, ya que el tiempo absoluto para una expansión se estima en torno a los 100.000

años aunque con un intervalo que llega hasta los 320.000 años (Tabla 4.2.2). Un resultado similar se obtiene al utilizar el método bayesiano (“skyline plot”), que mostró que la historia demográfica de la especie sostuvo un ligero crecimiento desde los 200.000 YBP (Figura 4.2.5).

	valor medio	mínimo	Máximo
Tao	8,266	4,660	20,908
T absoluto	126.624	71.385	320.282

Tabla 4.2.2. Estimaciones de los tiempos de expansión basados en el método de la distribución de diferencias “mismatch distribution”.

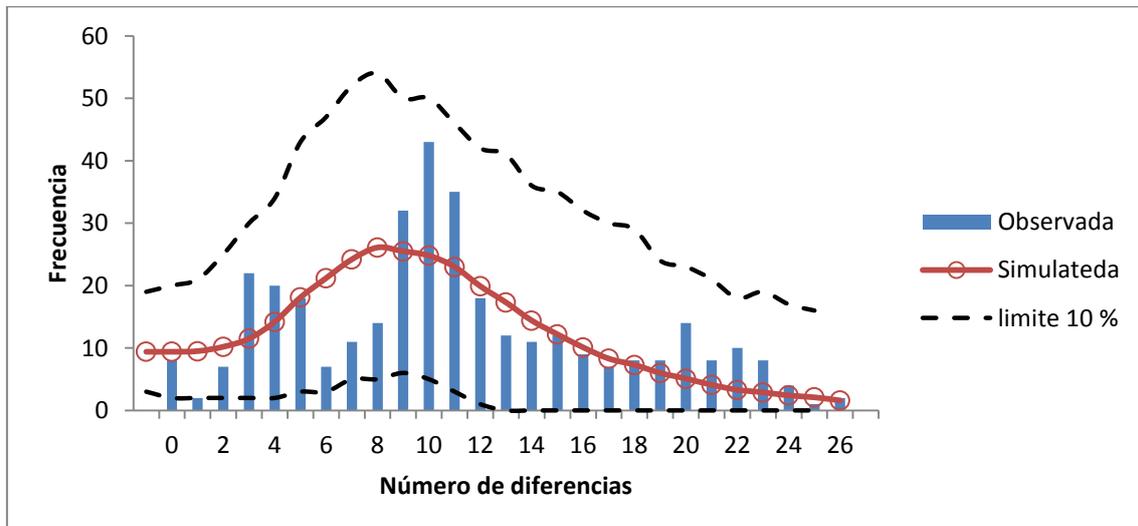


Figura 4.2.4. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias de *Menticirrhus littoralis*.

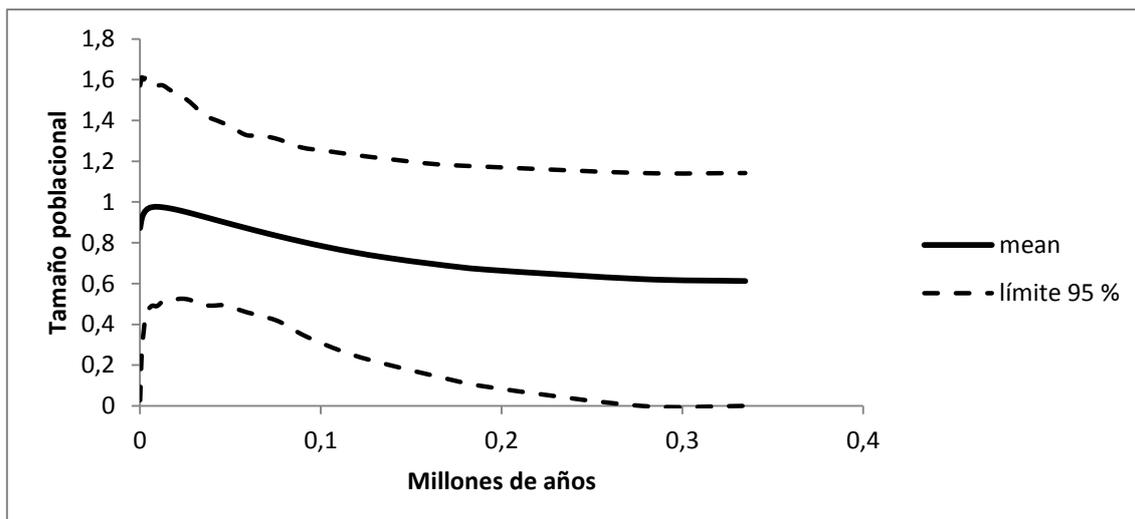


Figura 4.2.5. “Bayesian skyline plot” mostrando la historia demográfica modelada para *Menticirrhus littoralis*.

Discusión

La ocurrencia de *M. littoralis* en aguas uruguayas fue corroborada con marcadores moleculares. Esto significa que *M. americanus* no es la única especie del *Menticirrhus* en el Uruguay. Jardim (1988), en una sinopse realizada sobre la taxonomía de las especies del género *Menticirrhus* del Atlántico Oriental, cita referencias que incluyen esta especie en Uruguay e inclusive algunas en Argentina (Buen 1950, Devincenzi 1924), aunque refiriéndose a esta especie como *Menticirrhus martinicensis*. No obstante, en Uruguay esta especie no era considerada como integrante de la ictiofauna uruguaya. Este resultado era improbable dada su presencia en el sur de Brasil. La co-ocurrencia de las dos especies en el sur de Brasil es bien conocida, donde *M. littoralis* es más abundante en las zonas marinas costeras mientras que *M. americanus* está asociada a zonas estuarinas (Haluch et al. 2009, Rodrigues & Vieira 2010). En Uruguay podría estar sucediendo algo similar, dado que un muestreo de burriquetas en la costa uruguaya no detectó la presencia de *M. littoralis* en el estuario del Río de la Plata, donde *M. americanus* fue la única especie encontrada (Figura 4.2.6). Dado este

resultado, probablemente el límite sur de la especie esté en la costa oceánica uruguaya y no llegue a la Argentina como fue citado en alguna oportunidad (Jardim 1988).

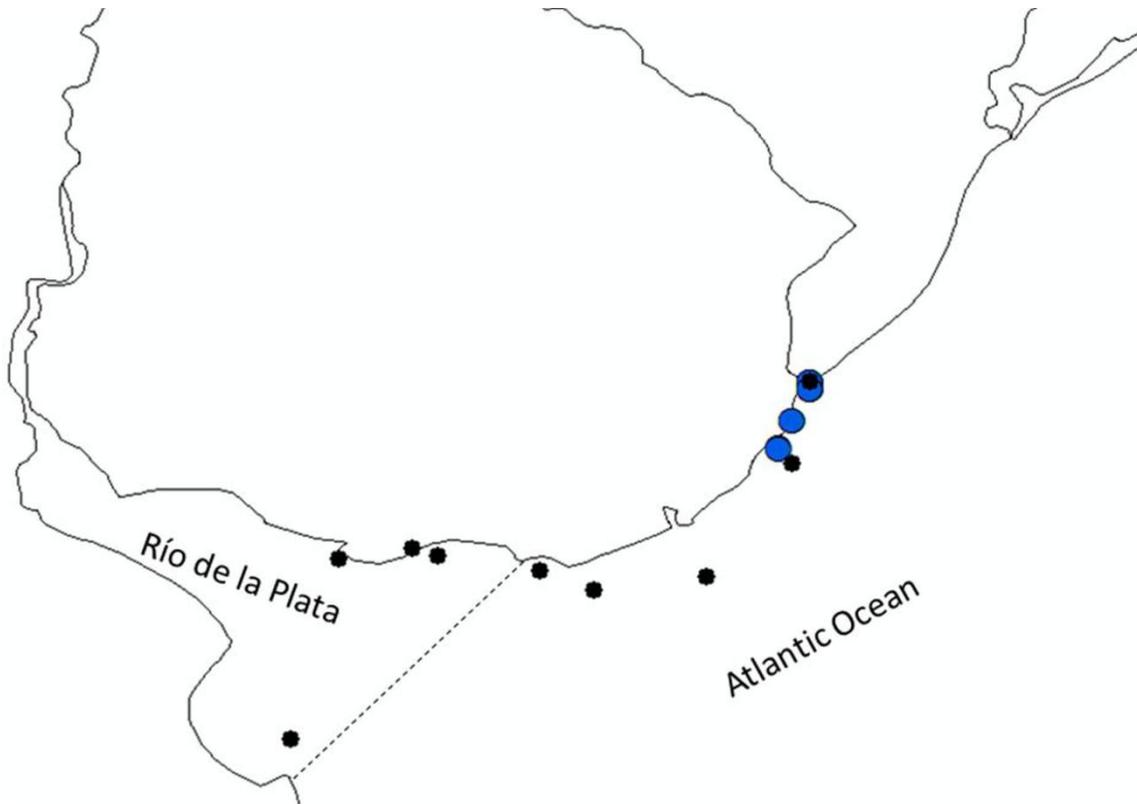


Figure 4.2.6. Distribución de los puntos de muestreo de *Menticirrhus* en el Río de la Plata y la costa oceánica de Uruguay. Los puntos negros corresponden a individuos identificados como *M. americanus* y los puntos grises a *M. littoralis*.

Recientemente, otra especie de la familia Sciaenidae fue detectada en costa oceánica de Uruguay (Segura et al. 2009). Esto sugiere que la diversidad de peces de la familia Sciaenidae pudo haber sido subestimada. El uso del ADN mitocondrial resultó útil para detectar la presencia y abundancia relativa de *M. littoralis* en aguas uruguayas, y particularmente en la identificación de muestras colectadas por pescadores que en general no diferencian entre las especies de *Menticirrhus*. Los investigadores que evalúan la diversidad de peces de Uruguay así como los que realizan estadísticas pesqueras, deberían considerar la presencia de las dos especies, en particular en la costa oceánica.

El análisis Bayesiano mostró un crecimiento poblacional leve que comenzó hace unos 200.000 años antes del presente. Dado que la expansión es antigua, el tiempo transcurrido hasta el presente ha hecho que las evidencias típicas de una expansión demográfica fueran haciéndose menos evidentes. Esto puede ser la causa de que la distribución multimodal de la “mismatch distribution” y la red de haplotipos no mostraron una forma de estrella típica, teniendo incluso algunos haplotipos divergentes.

**CAPÍTULO 5. Estructura genética comparada de las
pescadillas: *Cynoscion guatucupa* y *Macrodon
atricauda***

Introducción

El margen Sudoccidental del Océano Atlántico a lo largo de las costas de Brasil, Uruguay y Argentina, es una de las regiones más productivas de los océanos del mundo (Windom et al. 2008). La pescadilla de red *Macrodon atricauda*, antes *M. ancylodon*, y la pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa*, antes *C. striatus*, son dos especies costeras de la Familia Sciaenidae que co-ocurren a lo largo de su distribución, en el Atlántico Sudoccidental. De acuerdo a Chao (1978), ambos géneros pertenecen al Supra-Género *Cynoscion*, aunque Vergara-Chen et al. (2009) proponen que *Cynoscion guatucupa* es una especie hermana del Supra-Género *Cynoscion*, el cual incluye el género *Macrodon*. Ambas especies utilizan aguas de poca profundidad para la cría de juveniles, especialmente los estuarios. Junto con la corvina *Micropogonias furnieri* y el córvalo *Paralichthys brasiliensis*, son las especies de sciaénidos más abundantes en el Río de la Plata y su frente oceánico (Militelli 2007).

La pescadilla de red está asociada a los fondos blandos y sitios con aporte de agua dulce, como aquellos de los estuarios del Río de la Plata y el sistema lagunar Patos-Merín (Cardoso & Haimovici 2007). Hasta hace pocos años, el nombre aceptado para esta especie desde el sur de Brasil hasta el norte de Argentina era *Macrodon ancylodon*, pero Santos et al. (2006) y Carvalho Filho et al. (2010) encontraron dos grupos filogenéticamente divergentes en el Atlántico Sudoccidental. De acuerdo a esos autores, *Macrodon atricauda* se distribuye entre Espírito Santo (Brasil) y el norte de Argentina, y *Macrodon ancylodon* desde Espírito Santo hasta Venezuela. Basados en análisis de otolitos, ha sido propuesta la existencia de diferentes stocks entre los 18 ° 36 ' (Espírito Santo) and 32 ° 10' (Rio Grande do Sul) (Yamaguti 1979).

La pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa*, alcanza las mayores abundancias a los 50 metros de profundidad (Macchi 1998). En invierno se concentra en aguas profundas mientras que en otoño y primavera se mueve a aguas más someras, cercanas a la costa, probablemente en un movimiento asociado a la reproducción (Cousseau & Perrota 1998). Basado en la dinámica

reproductiva, la distribución de áreas de cría y movimientos estacionales, se ha sugerido que la pescadilla de calada forma un único stock entre el Cabo Santa Marta (29° S) y la Provincia de Buenos Aires en Argentina (Vieira & Haimovici 1997). Sin embargo, para algunos autores existe evidencia de una unidad poblacional en aguas cercanas a Bahía Blanca en Argentina (Cordo 1986, Díaz de Astarloa & Bolasina 1992). La especie muestra diferencias latitudinales en algunos parámetros tales como la edad máxima, y parámetros de crecimiento y mortandad natural (Ruarte & Sáez 2008). Estudios genéticos y morfológicos que incluyeron individuos provenientes de Samborombón en el Río de la Plata hasta Bahía Blanca no encontraron evidencia de partición poblacional (Fernández Iriarte et al. 2011, Sabadín et al. 2010).

Estas dos especies son explotadas por la pesquería demersal de diferentes países a lo largo de sus distribuciones. Las flotas de Uruguay y Argentina capturan más intensamente a *C. guatucupa* mientras que *M. atricauda* es capturada incidental o es mayormente capturada por la flota artesanal (Chiesa 2010). En el sur de Brasil, ambas especies son objetivo de la flota pesquera aunque *M. atricauda* es uno de los componentes principales de la pesca de arrastre, con una importancia relativa mayor que en Uruguay y Brasil (Haimovici 1988). En ese país, se ha considerado en declinación desde que la pesquería de camarones cambió hacia la explotación de productos demersales (Castro & Petrere Jr 2001).

En este capítulo se utilizan secuencias de la región control mitocondrial (RC) para conocer la estructura genética de *Cynoscion guatucupa* y *Macrodon atricauda*, en una zona donde son plenamente explotadas. Las secuencias de la RC se utilizaron para evaluar si las especies consisten en un único stock, o están subdivididas en poblaciones diferentes que deberían ser tratadas como unidades de manejo independientes. Se extendió el rango geográfico utilizado en trabajos previos en *C. guatucupa*, aumentando también el segmento de ADN analizado en otros trabajos (Fernández Iriarte et al. 2011, Sabadín et al. 2010). El presente trabajo representa el primero utilizando secuencias de

región control en una perspectiva poblacional en *M. atricauda*.

Se ha propuesto que las glaciaciones del Pleistoceno constituyen los eventos más significativos para modelar los patrones filogenéticos y la estructura poblacional de los peces marinos (Han et al. 2008, Hewitt 2000). Se evalúa como el efecto de las glaciaciones, en particular el cambio en el nivel del mar pudieron influenciar la historia demográfica de las poblaciones y la distribución geográfica de la diversidad genética de las dos especies.

Materiales y Métodos

Muestras de *C. guatucupa* fueron colectadas en Bahía Blanca, Montevideo, Samborombón, Piriápolis, La Paloma, Chuy, Torres (Brasil) y Rio de Janeiro (Brasil). Las muestras de *M. atricauda* fueron obtenidas de Montevideo, Piriápolis, Chuy, São Sebastião (Brasil) y Rio de Janeiro. Las colectas fueron realizadas por pescadores artesanales o con redes de arrastre por el B/l Aldebarán de la DINARA (Figura 5.1). Se colectaron muestras de músculo que se preservaron en alcohol 96% y fueron mantenidas a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó digiriendo los tejidos en baño maría a 55°C en 500 µl de buffer de lisis [50 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA), 1% dodecyl sulfato de sodio (SDS)] y proteinasa K. La purificación del ADN fue realizada con precipitación de proteínas con NaCl, seguida de precipitación de los ácidos nucleicos con etanol 100%.

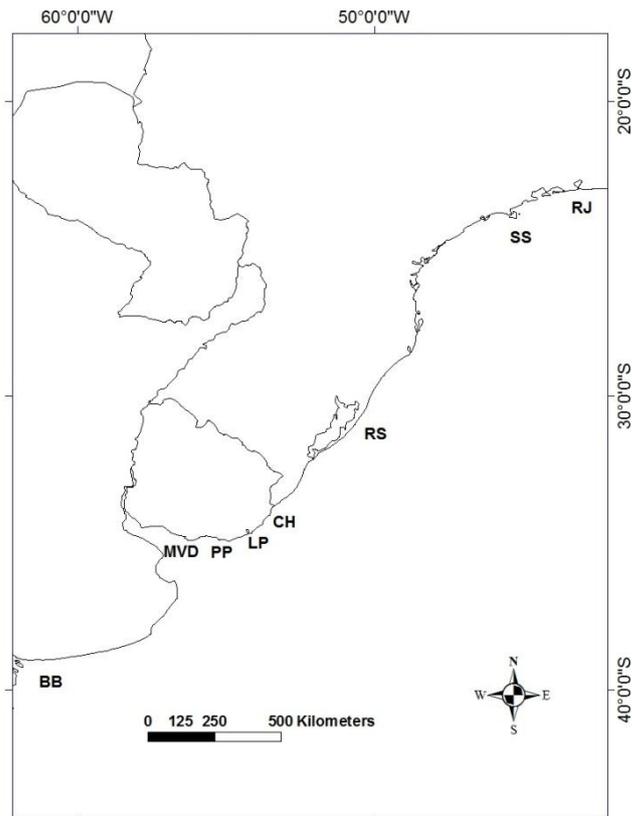


Figura 5.1 Localidades de muestreo. BB, Bahía Blanca; MVD, Montevideo; PP, Piriápolis; LP, La Paloma; CH, Chuy; RS, (Torres, Rio Grande do Sul); SS, São Sebastião; RJ, Rio de Janeiro.

Se amplificaron unas 800pb de la región control mitocondrial utilizando los primers Procor1 y Pheper en reacciones de PCR. Las mismas se realizaron en un volumen de 50 μ l que contenían 5-50 ng de ADN, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerasa, 200 mM de cada dNTP y 0,5 mM of cada primer. La amplificación se realizó en las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial a 94°C (2 min), 35 ciclos de 94°C (1 min), 52°C (1 min) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando los mismos primers que en la amplificación y las secuencias fueron editadas y alineadas en Bioedit (Hall 1999).

Los niveles de diversidad genética fueron medidos a través de la diversidad haplotídica (H), la diversidad nucleotídica (π) y el número medio de diferencias pareadas (P) (Nei 1987, Tajima 1983). La estructura de la población fue evaluada con los índices de fijación F_{ST} pareados, con la distancia de Nei y Li (Nei & Li 1979) que es el número corregido de diferencias entre pares de secuencias, y con el test exacto de diferenciación. También se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA), en el que se evaluó la significancia de la distribución geográfica de las variantes genéticas comparando diferentes agrupamientos de poblaciones. Los valores de diversidad y los análisis de estructuración genética fueron calculados usando Arlequin, versión 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Para evaluar qué modelo de sustitución nucleotídica explica mejor la variación observada en el set de datos, se utilizó el criterio de Akaike implementado en jMODELTEST 3.06 (Posada 2008). Se construyeron redes de haplotipos utilizando el programa Network (Fluxus Technology, <http://www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm>).

Dado que la estructura de las poblaciones depende de sus procesos históricos, la demografía histórica de las especies fue evaluada de la distribución de las diferencias pareadas (Bandelt et al. 1999, Rogers & Harpending 1992). Cuando una población experimenta una expansión reciente, esta distribución es típicamente unimodal. En esta aproximación, $\tau = 2\mu t$, el tiempo transcurrido desde la expansión, se calcula mediante simulaciones del coalescente bajo la hipótesis de una expansión en un paso. Los desvíos de modelo fueron evaluados usando el estadístico SSD (Schneider & Excoffier 1999) y el índice r de Harpending (Harpending 1994). Estos toman valores grandes para distribuciones multimodales, comunes en poblaciones con estabilidad demográfica. También se calcularon los índices de neutralidad de Tajima D (1989) y de Fu F_S (1997), los cuales son sensibles a alejamientos de la neutralidad, pero también a los crecimientos poblacionales. Estos muestran valores negativos cuando existe un alejamiento significativo de la neutralidad,

aunque el mismo resultado se observa cuando las poblaciones atravesaron una expansión poblacional. Estos test fueron realizados en Arlequin 3.5. Para estimar el tiempo absolutos de los procesos demográficos, asumimos una tasa de sutitución nucleotídica de 5% / MA (Ruzzante et al. 2008).

Resultados

Macrodon atricauda

Se obtuvieron secuencias de 800 pb de la región control mitocondrial de de 83 individuos de *Macrodon atricauda* que resultaron en 28 haplotipos. La variación genética fue media (Tabla 5.1). Todas las localidades compartieron un haplotipo, en frecuencias que van desde 0,33 (Rio de Janeiro) hasta 0,714 (Montevideo), aunque cada localidad mostró haplotipos exclusivos. Exceptuando Rio de Janeiro de los análisis dado que solamente se obtuvieron 3 secuencias, el resto de las localidades tuvo una diversidad haplotídica media, entre 0,4921 en Montevideo y 0,7863 en el Chuy. Para toda la muestras la diversidad haplotídica fue 0,6515. La diversidad nucleotídica fue de 0,0016 para el conjunto de los individuos y varió entre 0,0010 y 0,0025 en las localidades. Los F_{ST} pareados y las diferencias pareadas corregidas no fueron significativamente diferentes de 0.

Region	<i>N</i>	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	π	<i>P</i>
Montevideo	28	7	8	0,4921 (0,1137)	0,0010 (0,0008)	0,83 (0,61)
Piriápolis	17	8	10	0,6691 (0,1292)	0,0016 (0,0012)	1,28 (0,84)
Chuy	24	11	14	0,7862 (0,0826)	0,0019 (0,0013)	1,52 (0,95)
Sao Sebastiao	11	5	8	0,6182 (0,1643)	0,0022 (0,0015)	1,75 (1,09)
Rio de Janeiro	3	3	3	1,0000 (0,2722)	0,0025 (0,0024)	2,00 (1,51)
All	83	28	30	0,6515 (0,0619)	0,0022 (0,0014)	1,73 (1,02)

Cynoscion guatucupa

Región	<i>N</i>	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	π	<i>P</i>
Bahía Blanca	12	10	23	0,9818 (0,0463)	0,0086 (0,0049)	7,10 (3,61)
Samborombón	1	1	-	-	-	-
Montevideo	20	20	32	1,0000 (0,0158)	0,0073 (0,0041)	6,02 (3,00)
Piriápolis	23	23	39	1,0000 (0,0128)	0,0091 (0,0049)	7,51 (3,64)
La Paloma	32	29	60	0,9919 (0,0110)	0,0101 (0,0054)	8,34 (3,97)
Chuy	25	25	46	0,9967 (0,0125)	0,0099 (0,0053)	8,18 (3,92)
Torres	16	14	31	0,9750 (0,0348)	0,0092 (0,0051)	7,58 (3,73)
Rio de Janeiro	8	8	22	1,0000 (0,0625)	0,0082 (0,0049)	6,74 (3,55)
All	136	129	108	0,9990 (0,0011)	0,0092 (0,0048)	7,54 (3,54)

Tabla 5.1. Diversidad genética.. *N*: tamaño de la muestra, *k*: número de haplotipos, *S*: número de sitios polimórficos, *H*: diversidad haplotídica; π : diversidad nucleotídica, *P*: número medio de diferencias entre pares de secuencias. Errores estándar entre paréntesis.

En los análisis de AMOVA, el porcentaje de varianza genética debido a diferencias entre grupos fue baja, mientras que la mayoría de las diferencias fue explicada por las diferencias entre individuos, lo cual es un indicador de falta de estructura genética.

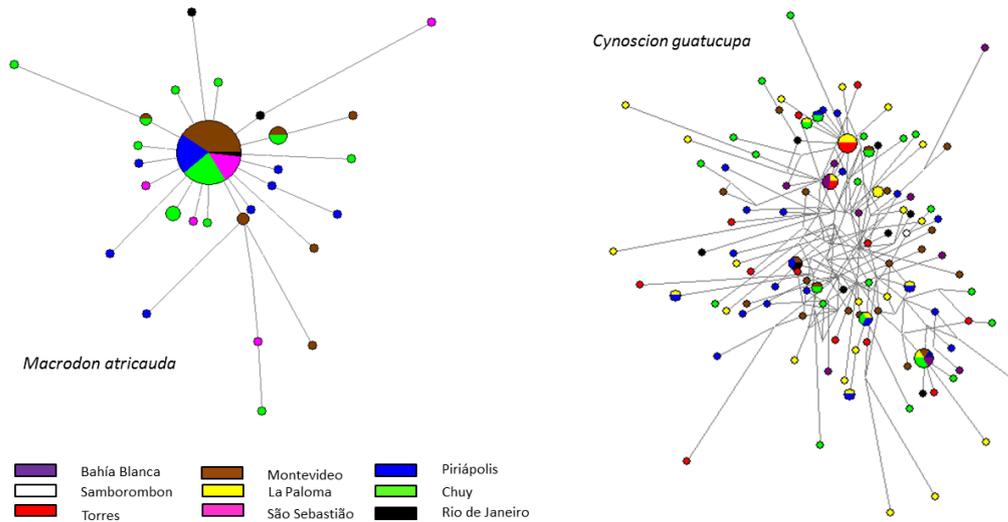


Figura 5.2. Redes de haplotipos de *Macrodon atricauda* y *Cynoscion guatucupa*.

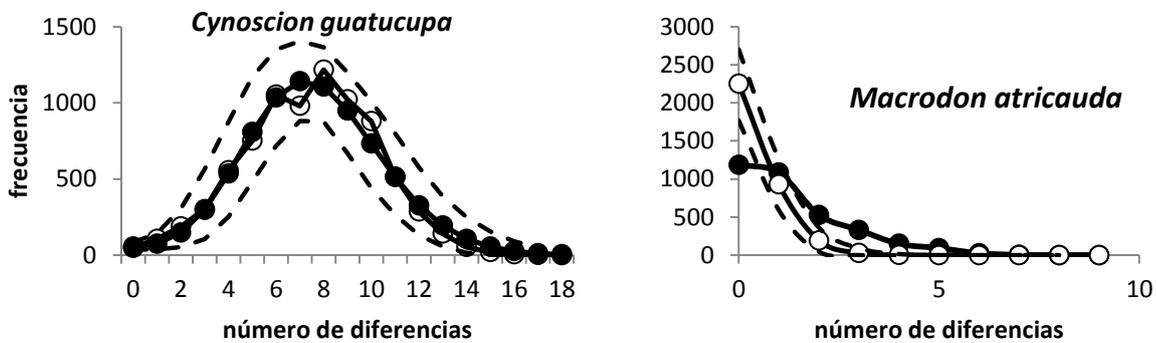


Figura 5.3. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“Mismatch ditribution”) de individuos de *Cynoscion guatucupa* colectados desde Torres (Rio Grande do Sul, Brazil) hasta Bahía Blanca (Argentina) (arriba) y *Macrodon atricauda* desde Montevideo a Rio de Janeiro (abajo). (valores observados en círculos abiertos; valores esperados en círculos cerrados; líneas punteadas: intervalo de confianza, $\alpha = 0.10$)

La red de haplotipos mostró una topología en forma de estrella, lo cual es típico en poblaciones que experimentaron una expansión poblacional rápida (Figura 5.2). La distribución de las diferencias pareadas fue unimodal (Figura 5.3), y el índice de Harpending no rechazó la hipótesis de una expansión poblacional para el conjunto de la muestra. No obstante, el SSD sí rechazó la hipótesis de expansión. Los dos índices de neutralidad fueron negativos y significativos ($D = -2,41$, $p < 0,001$; $F_S = -28,73$, $p < 0,001$) (Tabla 3.2). El estimador del tiempo de

expansión fue muy bajo ($\tau = 0,396$) y utilizando una tasa de mutación propuesta para la región control (5,0 % / MA), el tiempo absoluto de la expansión queda en torno a los 5.000 años antes del presente.

El modelo de evolución molecular HKY+G ($\alpha=0,011$) fue utilizado en el análisis “Extended Bayesian Skyline Plot”, el cual reveló un proceso de expansión originado entre los 30.000 y 40.000 años antes del presente, poco después de las secuencias coalescer en los 43.000 años (Figura 3.4).

Cynoscion guatucupa

Se obtuvieron secuencias de 824 pb de la región control mitocondrial de 136 individuos, las que definieron 111 haplotipos. La variación genética fue alta. La diversidad haplotípica varió entre 0,9750 y 1.000, mientras que la diversidad nucleotídica estuvo entre 0,0073 y 0,0101. El número medio de diferencias pareadas fue entre 6,02 y 8,35 (Tabla 5.1).

Los F_{ST} pareados estuvieron entre 0,00 y 0,065 indicando baja diferenciación genética, aunque las comparaciones entre Montevideo y La Paloma, Bahía Blanca y Torres resultaron significativas. Agrupando todas las localidades exceptuando Rio de Janeiro en los análisis de AMOVA, mostró que la varianza molecular entre poblaciones fue cercana a cero y que la mayoría de la variación genética estuvo distribuida dentro de las poblaciones ($\Phi_{ST}=0,0016$; $P=0,551$), lo cual es un indicador de la falta de estructuración genética. El test exacto de diferenciación no rechazó la hipótesis nula de la no diferenciación entre todos los pares de localidades. El número neto de diferencias nucleotídicas entre poblaciones no fue significativamente diferente de cero en ninguna de las comparaciones de localidades, excepto entre Montevideo y La Paloma y Montevideo y Chuy. Los valores significativos de diferenciación entre estos pares de localidades, con bajos valores de F_{ST} , probablemente sean debidos a la presencia de varios haplotipos únicos en las localidades, consecuencia de la gran variación haplotípica observada en la especie.

La alta diversidad haplotídica observada se refleja en la red de haplotipos donde existen muchas conexiones alternativas (Figura 5.2). Los haplotipos más frecuentes fueron compartidos en varias localidades y se ubicaron en posición central. Dado la falta de evidencia clara de diferenciación, se juntaron todas las localidades para los análisis de la historia demográfica. La distribución de las diferencias pareadas fue unimodal (Figura 5.3) y tanto el índice SSD (SSD=0,0010; p=0,353) y el de Harpending (r=0,0079; p=0,478) no descartaron la hipótesis que la población atravesó una expansión demográfica reciente (Tabla 5.2). El estimador del tiempo de expansión fue $\tau = 7,820$ y el tiempo absoluto de la expansión fue 95.000 años antes del presente. Ambos índices de neutralidad resultaron negativos y significativos ($D = -1,98$, $p = 0,005$; $F_S = -24,74$, $p < 0,001$).

	τ	SSD	r	D	F _S
<i>Macrodon atricauda</i>	0,396	0,1291 (p=0,002)	0,0244 (p=1,000)	-2,41 (p<0,001)	-27,73 (p<0,001)
<i>Cynoscion guatucupa</i>	7,820	0,0010 (p=0,353)	0,0079 (p=0,478)	-1,98 (p=0,005)	-24,74 (p<0,001)

Tabla 5.2. Valores de τ estimados con la distribución de las diferencias pareadas (“mismatch distribution”), índices de de neutralidad de Tajima’s (D) y Fu’s (F_S). (SSD: suma de los desvíos cuadráticos, r: test de Harpending)

El modelo de evolución molecular que mejor ajusto a la variación observada fue TrN+I+G (P_{inv} = 0,78; $\alpha = 0,71$). El análisis “Extended Bayesian Skyline Plot” mostró expansión que comenzó en torno a los 100.000 años antes del presente (Figura 5.4), y los haplotipos coalesciendo en los 140.000 años.

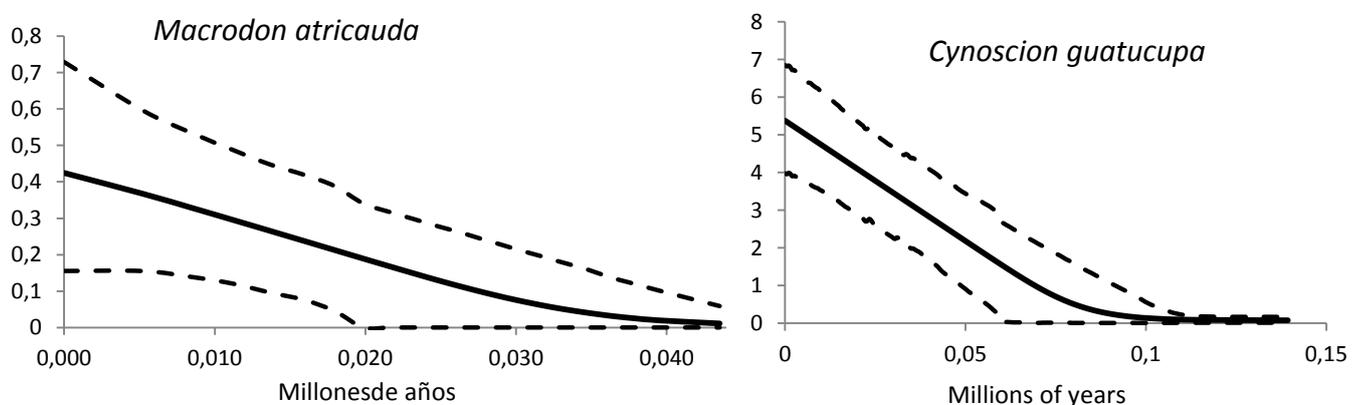


Figura 5.4 “Bayesian skyline plot” de *Macrodon atricauda* y *Cynoscion guatucupa*. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza de 95 %

Discusión

Las dos especies exhibieron niveles bien diferentes de variabilidad genética. *C. guatucupa* presentó altos niveles de variación genética con una mayoría de haplotipos en baja frecuencia, mientras que en *M. atricauda* fue baja o media, con un haplotipo en alta frecuencia y ampliamente distribuido. Las especies no mostraron evidencias de estructuración genética de las poblaciones, aunque este resultado pueda ser consecuencia de procesos demográficos históricos y no necesariamente de procesos actuales.

Los altos niveles de variación genética observados en *C. guatucupa* podrían deberse a grandes tamaños poblacionales, lo que si esto es sostenido a lo largo del tiempo, permite la generación y mantenimiento del gran número de variantes observadas. La gran cantidad de variantes en baja frecuencia, puede resultar en una diferenciación significativa por la presencia exclusiva local de algunos haplotipos. Esta tendencia de variantes en baja frecuencia puede ser el resultado de una expansión poblacional, y por estar en baja frecuencia, disminuye la probabilidad de que un haplotipo sea colectado en más de una localidad. El origen del crecimiento poblacional detectado en *C. guatucupa*, pudo estimarse en torno a los 100.000 años antes del presente. En *M. atricauda*, la amplia distribución de alelos de baja frecuencia también puede enmascarar procesos recientes de estructuración poblacional. La distribución de haplotipos en esta especie es típica de poblaciones con expansiones

poblacionales recientes, un proceso que puede sobrestimar el flujo génico y enmascarar diferenciación poblacional (Marko & Hartl 2011, McGovern et al. 2010). De hecho, El origen de la expansión poblacional detectada pudo ser estimado muy recientemente, cerca del último máximo de glaciación, entre los 20.000 y los 30.000 años antes del presente. La expansión demográfica estimada, hace que los estadísticos F_{ST} estén marcados por la expansión, y por lo tanto pueden no estar mostrando una eventual subdivisión actual.

Janko et al. (2007) sugirieron que la respuesta demográfica de las especies bentónicas podría ser mayor a los eventos más recientes de glaciación que las especies pelágicas. Estos autores proponen que especies que se alimentan principalmente de peces serán menos sensibles a las alteraciones provocadas por los eventos de glaciación y sus consecuencias, dado que las especies se alimentan en la columna del agua no dependerían de la distribución de las aguas poco profundas. Aquellas especies que se alimenten en el fondo experimentarían una reducción del hábitat disponible durante los retrocesos del mar de los máximos de glaciación. En ambas especies, los peces son un componente importante de la dieta pero en *M. atricauda*, los pre-adultos incluyen en su dieta organismos bentónicos como cangrejos (Camargo & Isaac 2005), mientras que la dieta de los juveniles de *C. guatucupa* incluye crustáceos zooplanctónicos como misídeos y camarones (Lopez Cazorla 1996). Por lo tanto, al menos en parte, la respuesta demográfica de *M. atricauda* podría estar explicada por la disponibilidad de organismos bentónicos con el avance del nivel del mar que siguió al último máximo de glaciación. En contraste, la menor respuesta a los últimos eventos de glaciación de *C. guatucupa* podría estar ligada a la depredación sobre ítems pelágicos, los cuales no necesariamente tuvieron que declinar significativamente con la contracción de las aguas poco profundas.

La pescadilla de red parece tener una dependencia mayor sobre los ambientes costeros y estuarinos, dado que desova en el gradiente salino de fondo, cuando se encuentran las aguas del estuario con las marinas. En las aguas

uruguayas, las mayores concentraciones de *M. atricauda* han sido reportadas principalmente en dos lugares. Al oeste de Montevideo y en aguas oceánicas cerca del límite con Brasil, decreciendo en densidad hacia zonas intermedias (Acuña & Viana 1996). En esas zonas, ha sido registrada la presencia de dos stocks en la corvina *Micropogonias furnieri*, la cual es una especie con una estrategia de desove similar a la de *M. atricauda* [Pereira et al. 2009, D'Anatro et al. 2011]. Por esta razón, no debería descartarse la posibilidad de que la falta de estructura genética observada en la pescadilla de red pudiera ser el efecto de una expansión poblacional. Con la utilización de modelos menos sensibles a cambios demográficos y/o modelos más complejos de divergencia y flujo génico con múltiples marcadores, se podría avanzar en la evaluación de la importancia relativa de la alopatria y el flujo génico (IM IMA Hey & Nielsen 2004, 2007, ABC Csilléry et al. 2010).

La pescadilla de calada desova en aguas con características marinas (Militelli & Macchi 2006), dónde las corrientes podrían dispersar los individuos a lo largo de toda la región, lo que podría explicar la falta de estructuración genética observada entre el sur de Brasil y Bahía Blanca. Este resultado también fue observado en pescadillas de calada colectadas entre bahía Blanca y el Río de la Plata analizando un fragmento menor de la región control [15]. Por lo tanto, la homogeneidad de las poblaciones puede ver extendiéndose desde el sur de Brasil hasta Bahía Blanca, cubriendo el área completa donde la pesquería de esta especie es mayor. Consecuentemente, las pesquerías de Argentina, Uruguay y Brasil estarían operando sobre un único stock.

Argentina y Uruguay han establecido un Zona Común de Pesca (ZCPAU) mediante un acuerdo que permite a las flotas pesqueras de los dos países puedan operar en aguas del Río de la Plata y su Frente Oceánico. Por otro lado, no existen acuerdos de pesca de Uruguay con el Brasil. En este contexto, la presencia de un único stock en el límite sur de distribución de la especie es una información importante para establecer las regulaciones que tienen que ver con las capturas permitidas y la distribución de cupos por países, en particular

para Argentina y Uruguay porque el 70 % de la captura está concentrada en la ZCPAU. El restante 30 % se distribuye en Rio Grande do Sul y Rio de Janeiro, aunque la mitad de esa captura se concentra en el sur de Brasil (Haimovici & Miranda 2005) y por lo tanto sobre un stock con alta presión pesquera. Por otro lado, los estudios sobre la biomasa de la especie en la región debería considerar la extensión del recurso conformando un único stock que se extiende entre Bahía Blanca hasta, al menos el sur de Brasil.

En la ZCPAU, los volúmenes de la pesca de la pescadilla de red no alcanzan los valores registrados por la pescadilla de calada, mientras que en el sur de Brasil es un recurso plenamente explotado. Si existiera estructuración genética actual no detectada con el marcador molecular utilizado, las consecuencias de la actividad pesquera sobre las eventuales poblaciones sería consecuencia de la actividad de la flota pesquera demersal brasileña.

CAPÍTULO 6. Discusión General, Conclusiones y Perspectivas

6.1 Discusión General

En esta tesis se analizaron los patrones de estructuración genética de especies de peces costeros que co-ocurren de la Familia Scianidae, con el objetivo de evaluar el grado de concordancia en la distribución de la variabilidad genética.

Las especies analizadas tuvieron en común su distribución en la plataforma continental, y fueron escogidas para evaluar hipótesis sobre la respuesta demográfica a eventos paleoclimáticos del final del Cuaternario que pudieron influenciar la extensión de dicha plataforma.

La información de la estructuración genética de las poblaciones, la concordancia o no entre varias especies, y las hipótesis sobre la generación de los patrones de diversidad, por sí mismas tienen un interés biológico, pero también tienen una importancia particular en aquellas poblaciones naturales en las que existe una extracción comercial. El grado de estructuración genética, la concordancia entre especies, y la caracterización de patrones históricos generando patrones de biodiversidad, generan insumos para un manejo adecuado de los recursos explotados. Los recursos pesqueros son un ejemplo en el cual es necesario identificar y caracterizar las poblaciones de las especies para que el manejo no afecte la viabilidad a largo plazo de las especies y/o poblaciones.

Patrones de estructuración de las poblaciones

Se analizó la distribución de la variabilidad genética de 5 especies de la Familia Sciaenidae. Los patrones de diversidad genética de las especies de sciaenidos en la región, no fueron homogéneos. En algunos casos se observó concordancia entre patrones de diferentes especies, aunque no fue la regla general. La corvina (*Micropogonias furnieri*) y una de las burriquetas (*Menticirrhus americanus*) concordaron en sus patrones de estructuración, dado que ambas especies presentaron poblaciones diferenciadas asociadas al Río de la Plata.

La pescadilla de calada resultó ser la especie con mayor variabilidad genética, y conformó un único stock desde Rio Grande do Sul hasta Bahía Blanca, mientras que la pescadilla de red fue la menos variable. En esta última especie, la baja variabilidad observada y la señal de una expansión poblacional reciente, hace que no pueda descartarse la existencia de estructuración genética en el presente.

La burriqueta *M. littoralis* mostró un número medio de diferencias entre pares de secuencias muy alto, del orden del observado entre los dos grupos de *M. americanus* lo que podría ser un indicador de grupos divergentes similares en *M. littoralis*, o la permanencia de un polimorfismo ancestral en una población de Número Efectivo (N_e) grande, dado que las secuencias de los dos grupos no se observan en alopatria. En el resto de las especies no se identificó estructuración poblacional en el área estudiada.

La estructuración genética de las poblaciones podría estar explicada, al menos en parte por la fidelidad a lugares de desove donde la influencia de las corrientes no es importante, como en aquellas especies que desovan en la confluencia del frente salino de fondo. Este es el caso de la corvina. En cambio en aquellas especies que presentan un desove en aguas abiertas y con mayor influencia de las corrientes, estas homogeneizan las poblaciones por la deriva de los desoves.

Dado que la obtención de información sobre el desove de las especies costeras ha seguido la importancia económica de las mismas, no existen demasiados datos sobre la estrategia de desove de las especies del género *Menticrhrus*.

Estudios poblacionales en otras especies costeras en el Atlántico Sudoccidental

Además de las especies analizadas en esta tesis, existen antecedentes en otras dos especies costeras, y con alguna similitud de hábitos con las aquí analizadas. El pejerrey *Odontesthes argentinensis* (Orden Atheriniformes) que, al menos en la región costera uruguaya, co-ocurre con las especies analizadas

en esta tesis. La otra especie es la lacha *Brevoortia aurea* (Orden Clupeiformes), que también co-ocurre en aguas marinas y estuarinas con las especies analizadas. Además, esta especie presenta las mismas estrategias reproductivas de algunas de las especies analizadas.

Estas dos especies no están filogenéticamente relacionadas con las especies de la Familia Sciaenidae (Orden Perciformes), dado que pertenecen a Órdenes diferentes. La inclusión de éstas en la Discusión General se realiza para evaluar si los procesos que influenciaron la estructuración poblacional e historia demográfica en especies de la familia Sciaenidae, tuvieron consecuencias sobre grupos taxonómicos diferentes.

Odontesthes argentinensis

Beheregaray & Sunnuks (2001), con el mismo marcador utilizado en esta tesis en pejerreyes de la especie *Odontesthes argentinensis*, encontraron un alto grado de estructuración genética entre las localidades de Puerto Madryn, Montevideo, Laguna de Rocha, Cassino (Rio Grande do Sul), Laguna de los Patos, y Laguna Custodia (Rio Grande do Sul). Esta estructuración la explicaron como una respuesta de la especie a la dinámica ambiental del final del Cuaternario aunque no evaluaron la historia demográfica de estas poblaciones. Por ello, se utilizaron los datos de estos autores para calcular la distribución de las diferencias pareadas (“mismatch distribution”) (Figura 6.2), los tiempos de expansión (Figura 6.3), la historia demográfica con “Extended Bayesian Skyline Plot” (Figura 6.1) y se construyeron redes de haplotipos (Figura 6.1 i, j, k), para Montevideo, Cassino (localidad del sur de Brasil) y Laguna de los Patos (analizada por ser una región de reproducción de especies de sciaenidos).

La localidad de Montevideo no mostró evidencia de cambios demográficos, al menos en los últimos 230.000 años. En cambio, tanto las poblaciones de Cassino y de la Laguna de los Patos tuvieron una expansión poblacional. La expansión poblacional de la población de Cassino fue moderada y originada

hace aproximadamente 160.000 años antes del presente, mientras que en la Laguna de los Patos la respuesta fue más marcada y estimada en uno 130.000 años antes del presente.

Brevoortia aurea

García et al. (2008) analizaron secuencias del citocromo b mitocondrial para evaluar el grado de estructuración genética en la lacha *Brevortia aurea*. Las secuencias se distribuyeron en 4 clados, proponiendo que cada uno de ellos correspondería a 4 unidades poblacionales que se estarían mezclando en las aguas uruguayas. Una interpretación alternativa podría involucrar que los clados observados en el árbol de secuencias, fueran el fruto de una divergencia en alopatria en el pasado con un contacto secundario. De ser así, esta composición de clados diferentes, no necesariamente sería evidencia de estructuración genética actual en la región. Si bien estos autores no evaluaron la historia demográfica, valores negativos de los índices de neutralidad y partes de la red de haplotipos con forma de estrella, no descartan la posibilidad de una expansión poblacional. Dado que el citocromo b es un marcador relativamente conservado y que por lo tanto nos muestra eventos relativamente antiguos en la historia de la especie, puede no estar mostrando estructuración genética actual. Un marcador más variable como la región control mitocondrial o los microsatélites permitirían evaluar el grado de estructuración genética actual de las poblaciones de esta especie.

Esta especie tiene hábitos pelágicos pero una estrategia reproductiva similar a la de *Micropogonias furnieri*, desovando en el frente salino de fondo en el estuario del Río de la Plata (Acha & Macchi 2000). Cualquiera sea la interpretación de los resultados obtenidos en *B. aurea*, no presenta la segregación en dos poblaciones entre el Río de la Plata y el O. Atlántico observada en *M. furnieri* y en *M. americanus*.

Historia demográfica y glaciaciones

Las poblaciones del Río de la Plata y de Bahía Blanca mostraron la variabilidad genética más baja (Fig. 6.1a, 6.1b, 6.2), con señales de haber atravesado una disminución poblacional. La población de Montevideo del pejerrey *Odonthestes argentinensis* (6.1i) parece haber tenido una estabilidad demográfica en los últimos 200.000 años. El resto de las poblaciones analizadas tuvieron expansiones demográficas, aunque no todas de la misma magnitud u origen temporal. Aquellas cuya expansión pudo estimarse más recientemente, presentaron una “mismatch distribution” claramente unimodal y redes de haplotipos con forma de estrella más definidas (Fig. 6.1e, 6.1g, 6.1f, 6.2). Esto fue observado en el grupo Norte de *Menticirrhus americanus* (aprox. 20.000-25.000 años), *Macrodon atricauda* (aprox. 25.000- 35.000 años) y el clado Sur de *Menticirrhus americanus* (aprox. 30.000-40.000 años) (Fig. 6.3).

Otro grupo de especies tuvieron expansiones originadas en torno a los 100.000 años (Fig. 6.3). En la población oceánica de la corvina, pudo estimarse un origen de la expansión en torno a los 80.000-100.000 años, y se asoció a la generación de la Laguna de los Patos, dado que ésta representa un lugar de cría de la especie. La pescadilla de calada también mostró evidencias de una expansión poblacional generada en torno a los 100.000 años, con una distribución unimodal de la “Mismatch distribution”, aunque con una red de haplotipos muy compleja dada por la alta variabilidad observada en esta especie. Los análisis realizados no descartaron una expansión poblacional en *Menticirrhus littoralis* aunque aquí la evidencia fue la menos clara y el rango de tiempo para el origen de esta respuesta demográfica fue amplio (entre 100.000 y 320.000 años). Las poblaciones de Laguna de los Patos y de Cassino del pejerrey *Odonthestes argentinensis*, también presentaron evidencias de expansión, originadas también en este período (entre los 130.000 y 160.000 años).

En conclusión, se detectaron tres tipos de respuestas. La primera fue una reducción o estabilidad demográfica en las poblaciones más australes de

corvinas, tal vez asociada a la división de una población única originada por la generación de los estuarios del Río de la Plata y de Bahía Blanca. La población de Montevideo del pejerrey parece haber seguido este patrón, dado que no se encontró en ella evidencias de expansión demográfica.

La segunda respuesta demográfica está asociada a los últimos eventos de glaciación del Período Cuaternario, entre los 20.000 y 50.000 YBP. Esta respuesta podría deberse a una dependencia importante de las especies con la disponibilidad del hábitat, y por lo tanto los cambios en la composición y disponibilidad de lugares para alimentación y/o reproducción generados por los últimos eventos en la glaciación podría ser la causa de esta respuesta en este período.

El tercer tipo de respuesta corresponde a expansiones poblacionales más antiguas, asociadas a eventos climáticos ocurridos en torno a los 100.000 años. Estas poblaciones podrían tener una dependencia menor a los cambios en la distribución y composición de la costa dado que el crecimiento demográfico estimado parece haber sido constante desde los 100.000 años, sin verse afectados por los retrocesos de la plataforma continental generados en los máximos de glaciación más recientes.

Implicancias para el manejo de las pesquerías

La pesca de sciaénidos más importante en la región es aquella que se focaliza en la corvina *Micropogonias furnieri* y la pescadilla de calada *Cynoscion guatucupa*. Entre Uruguay y Argentina existen tratados que co-administran estos recursos en la ZCPAU. Si bien se fijan cupos y medidas de protección para la pesca de estas especies, la pesquería de una especie puede capturar a la otra dado que la eficiencia en la pesca de un recurso nunca es total.

La falta de concordancia en los patrones de estructuración genética de estas dos especies no permite sugerir medidas que afecten de igual manera a ambas. En la corvina se detectó la presencia de dos stocks parcialmente

diferenciados, uno asociado al Río de la Plata y el otro ubicado en aguas oceánicas de Uruguay y probablemente también en el sur de Brasil. Por cuestiones de logística de la flota pesquera, la actividad extractiva de este recurso está concentrada principalmente en el Río de la Plata, lo cual implica que la explotación se realiza sobre una población concentrada en el estuario. Dada la presencia de dos stocks podría considerarse, como una medida de relajamiento de la presión sobre el stock del Río de la Plata, la pesca de esta especie en aguas más oceánicas utilizando como puerto base a La Paloma.

Por otro lado, los tamaños poblacionales de cada uno de esos stocks, es menor al tamaño de la población que la considerara como una única unidad. Por lo tanto, los estudios sobre la biomasa del recurso, básicos para la obtención de las capturas máximas sostenibles, deberían considerar esta división de las corvinas en dos poblaciones en la ZCPAU, de manera de no subestimar los números poblacionales.

En el caso de la pescadilla de calada, si bien no existe en Uruguay una pesca dirigida a esta especie, se captura por la flota que pesca corvina, y representa la tercera especie en volúmenes de desembarque después de la merluza y la corvina (Chiesa 2010). La explotación principal de este recurso por parte de Argentina y Uruguay está concentrada en la parte exterior del Río de la Plata, y en el estado de Rio Grande do Sul, por parte de Brasil (Haimovici & Miranda 2005). Dada la presencia de un único stock entre Rio Grande do Sul (Brasil) y Bahía Blanca (Argentina), la población mantendría un relajamiento de la presión pesquera, en áreas de explotación baja en las aguas más oceánicas de la ZCPAU donde la flota pesquera argentino-uruguaya prácticamente no opera. Los análisis de biomasa en esta especie en su distribución sur, deberían considerar los datos de investigación pesquera de Argentina, Uruguay del sur de Brasil.

Las otras especies analizadas tienen una importancia relativa menor en la ZCPAU. La pescadilla de red mostró baja variabilidad genética, probablemente

debida a un evento de expansión poblacional reciente, lo cual no permite diferenciar poblaciones, aunque datos sobre la distribución de los individuos de la especie, así como sus hábitos costeros, hacen sospechar que exista algún tipo de estructuración no detectada con el marcador molecular utilizado. Se sugiere dejar abierta la posibilidad de una estructuración genética. La utilización de métodos que tengan en cuenta el efecto de la historia demográfica y del flujo génico, así como el análisis de otros loci, permitirá evaluar esa hipótesis. Esto podría brindar elementos para el manejo de la pesquería de esta especie en Brasil, dónde ha mostrado señales de explotación máxima (Haimovici & Miranda 2005).

En el caso de las burriquetas, se destaca la presencia de un grupo genéticamente muy divergente de *Menticirrhus americanus* en el Río de la Plata, en alopatria con otro grupo compuesto por individuos distribuidos desde Rocha (Uruguay) hasta, al menos, Espirito Santo en Brasil. El descubrimiento de este grupo divergente aporta al conocimiento de patrones de biodiversidad del Río de la Plata, y dado que es coincidente con el descubrimiento de un stock de corvinas en esa área, sugiere que este estuario podría mantener una diversidad biológica diferenciada del resto de la costa oriental de Sudamérica.

En esta tesis también se detectó la presencia de una especie de burriqueta no registrada hasta ahora para Uruguay, *Menticirrhus littoralis*. En estudios sobre la biodiversidad de la costa uruguaya, la presencia de dos especies de *Menticirrhus* debe ser considerada, así como el hecho que *M. americanus* presenta dos grupos filogenéticamente divergentes.

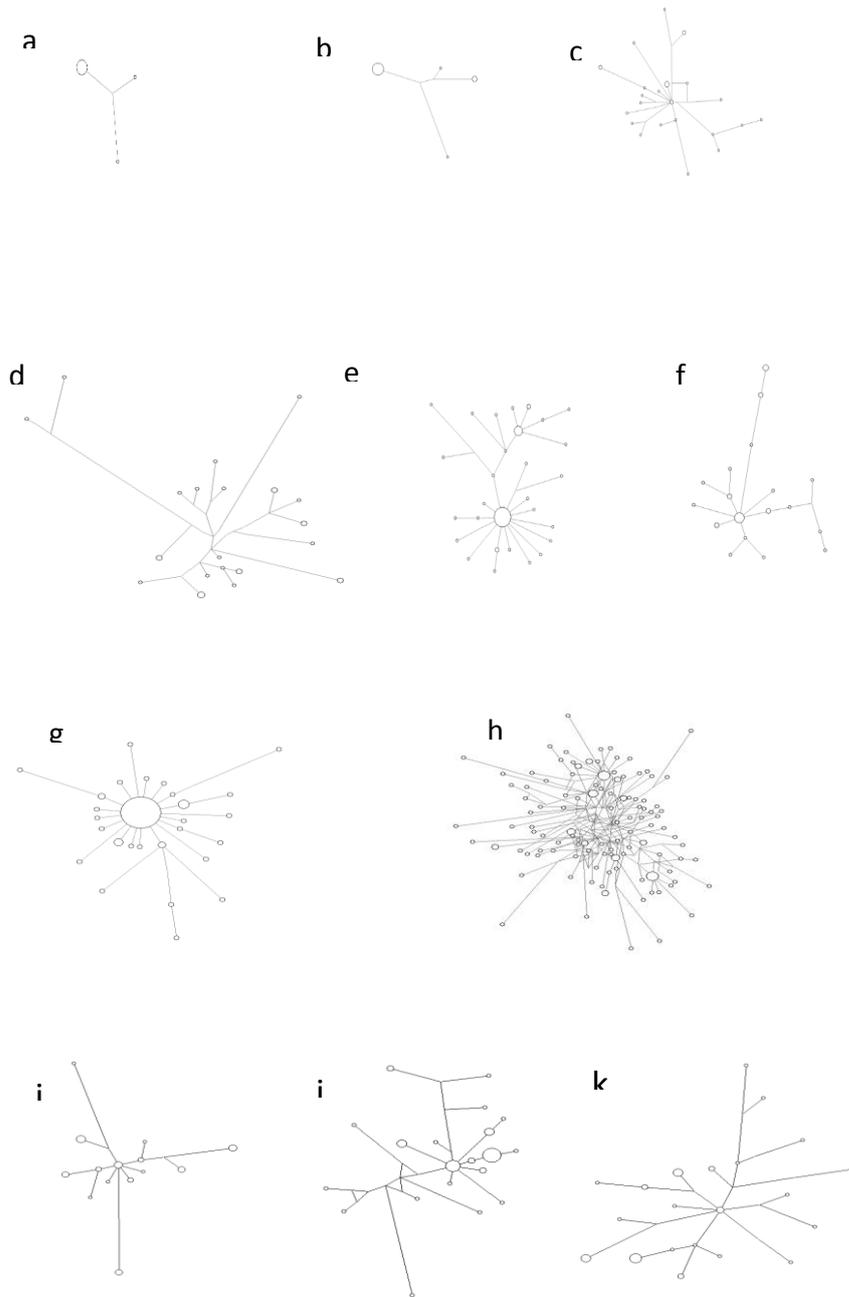


Figura 6.1. Redes de haplotipos. (a) *Micropogonias furnieri* (Bahía Blanca); (b) *M. furnieri* (Río de la Plata); (c) *M. furnieri* (Océano Atlántico); (d) *Menticirrhus littoralis*; (e) *M. americanus*, clado norte; (f) *M. americanus*, clado sur; (g) *Macrodon atricauda*; (h) *Cynoscion guatucupa*; (i) *Odontesthes argentinensis*, Montevideo; (j) *O. argentinensis*, Cassino; (k) *O. argentinensis*, Lagoa dos Patos.

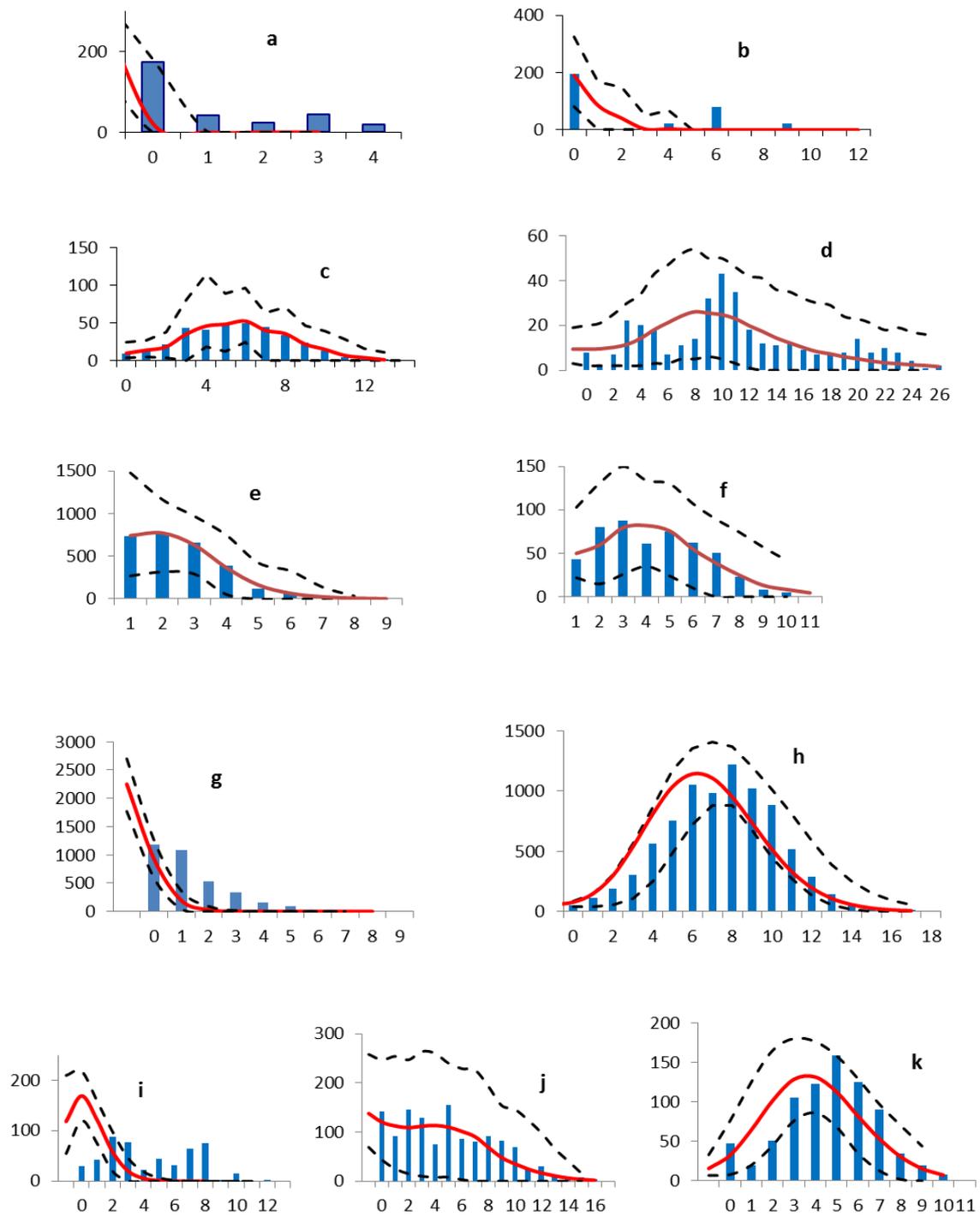


Figura 6.2. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”). Referencias igual que en Figura 5.1.

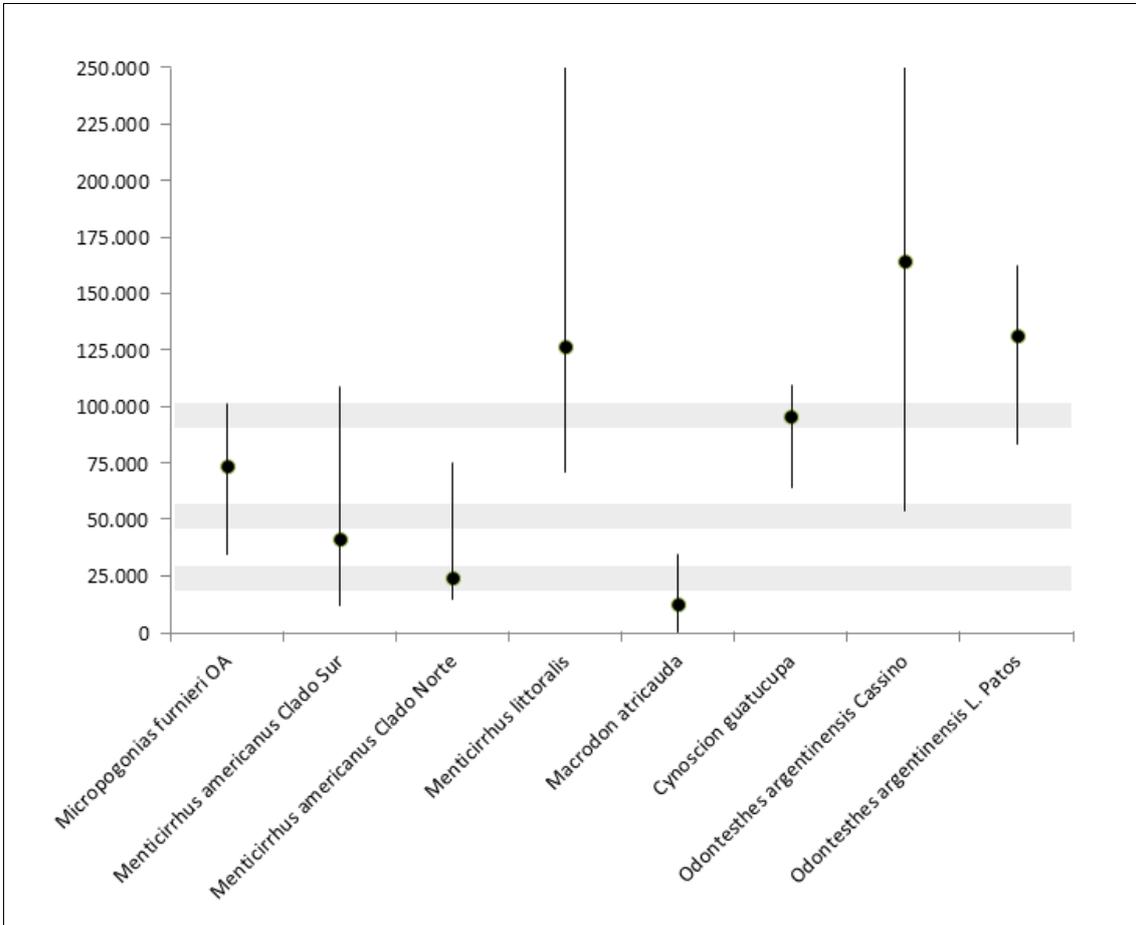


Figura 6.3. Estimaciones de tiempo de expansión en las poblaciones y/o poblaciones en las cuales no se descartó un proceso de expansión, basado en la “mismatch distribution”. Se muestran los valores centrales y el intervalo de confianza ($\alpha=10$). Las franjas grises muestran los últimos máximos de glaciación.

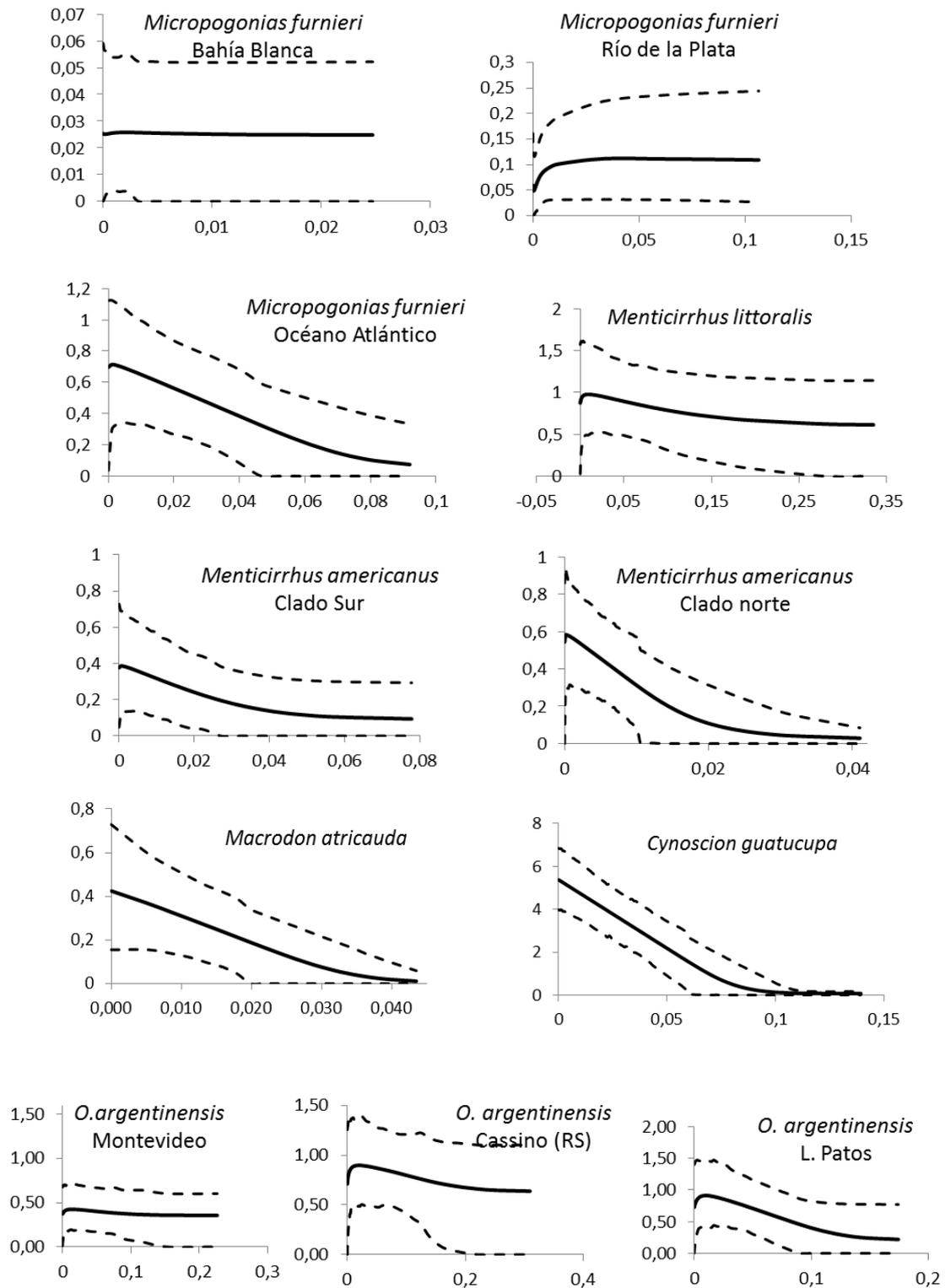


Figura 6.4. "Extended Bayesian Skyline Plot".

6.2 Conclusiones

- Los patrones de diversificación de las especies y de las poblaciones de los Sciaenidae analizados, no siempre presentaron concordancia.
- Se detectó la presencia de dos stocks de *corvina Micropogonias furnieri*: uno asociado al Río de la Plata y otro en aguas oceánicas de Uruguay. Esta estructuración podría haberse generado por una fidelidad de la especie para desovar en aguas del Río de la Plata.
- La pescadilla de calada *Cynoscion guatucua* conformó un único stock entre el sur de Brasil y Bahía Blanca, lo cual podría ser consecuencia del tipo de desove en aguas abiertas.
- Se detectó un grupo filogenéticamente divergente de *Menticirrhus americanus* en el Río de la Plata.
- No se detectó diferenciación genética entre las localidades muestreadas de *Macrodon atricauda*.
- El Río de la Plata presentó grupos diferenciados genéticamente en dos especies de peces costeros, lo que sugiere que podría representar una región con una diversidad genética diferenciada de zonas adyacentes. La región atlántica de Uruguay mostró continuidad con la región Sur y Sudeste de Brasil.
- La respuesta demográfica de las especies a los cambios ambientales del pasado, principalmente debida a la disponibilidad de plataforma continental, fue de 3 tipos:
 - Decrecimiento poblacional o estabilidad demográfica
 - Crecimiento demográfico relacionado a los últimos eventos de glaciación en torno a los 30.000-50.000 años antes del presente
 - Crecimiento demográfico relacionado a eventos de glaciación de 100.000 años o más antes del presente.

- Se confirma por primera vez para Uruguay, la presencia de *Menticirrhus littoralis*.

6.3 Perspectivas

Los resultados de esta tesis sientan las bases para estudios de estructuración genética y sobre la influencia de los cambios climáticos del pasado sobre la demografía histórica de las poblaciones de peces costeros del Atlántico Sudoccidental. Existen otras especies costeras, algunas de la Familia Sciaenidae, que podrían estudiarse para completar el panorama distribución de la diversidad genética en el área. En este sentido, en especies como el córvalo *Paralichthys brasiliensis*, el pargo blanco *Umbrina canosai*, y varias especies de *Cynoscion* de distribución en Brasil, y con estrategias reproductivas similares a la observada en *Cynoscion guatucupa*, se esperaría una tendencia a la homogeneidad genética. En cambio otras con estrategia reproductiva parecida a la que presenta la corvina rubia *Micropogonias furnieri*, con desoves en el gradiente salino, son candidatos a presentar estructuración genética. Un ejemplo de este tipo de especies es la corvina negra *Pogonias cromis*.

En la pescadilla de red *Macrodon atricauda*, el marcador genético utilizado no detectó diferenciación poblacional, probablemente por una sobrestimación del flujo génico debido a una expansión poblacional reciente. Con la utilización de loci adicionales, nucleares o mitocondriales, y métodos de análisis de datos que permitan evaluar el efecto conjunto de los procesos históricos y del flujo génico, se podrá evaluar la importancia relativa de la alopatría y de la historia demográfica en la estructuración actual de las poblaciones.

La detección de un grupo filogenéticamente divergente de *Menticirrhus americanus* en el estuario del Río de la Plata plantea la necesidad de la utilización de marcadores independientes al ADN mitocondrial para evaluar el grado de diferenciación en la especie (subespecies, especies, unidades evolutivas). Esta especie tiene una distribución muy amplia, desde EUA hasta

el Río de la Plata, por lo que un muestreo más amplio podría evidenciar la presencia más unidades genéticas diferenciadas.

La alta divergencia de haplotipos observada en *M. littoralis* podría ser evaluada con un muestreo dirigido a esta especie. La colecta de esta especie en esta tesis, fue incidental en la colecta de la especie objetivo *M. americanus*.

Referencias

Acha EM, Macchi GJ (2000) Spawning of Brazilian menhaden, *Brevoortia aurea*, in the Río de la Plata estuary off Argentina and Uruguay. *Fishery Bulletin* **98**, 227-235.

Acha EM, Mianzan H, Lasta CA, Guerrero RA (1999) Estuarine spawning of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae), in the Río de la Plata, Argentina. *Marine and Freshwater Research* **50**, 57-65.

Acuña Plavan A, Viana F (2001) Reproductive cycle and environmental characteristics of the spawning area of the king weakfish (*Macrodon ancylodon*) and the striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) in the Uruguayan coast. En: Vizziano D, Puig PE, Mesones C, Nagy GJ (eds). The Río de la Plata. Research for the Management of the Environment, the Fisheries resources and Fishery in the saline front. Ecoplata Program, Montevideo, Uruguay.

Araújo FG, Guimarães FJ and Costa MR (2006) Environmental influences on distribution of four Sciaenidae species (Actinopterygii, Perciformes) in a tropical bay at Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **23**(2), 497-508.

Arbogast BS and Kenagy GJ (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* **28**, 819-826.

Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P, Slowinski JB (2002) Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review in Ecology and Systematics* **33**, 707-740.

Armstrong MP, Muller RG (1996) A summary of biological information for Southern kingfish (*Menticirrhus americanus*), gulf kingfish (*M. littoralis*), and Northern kingfish (*M. sexatilis*) in Florida waters. Report to the Florida Marine Fisheries Commission. 26pp

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

Avise JC, Arnold J, Ball RM et al. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.

Bacigalupo ML, Bustos C (1984) La distribución de las especies de la Familia Sciaenidae en la Zona Común de Pesca y plataforma argentina. Seminario del Curso de Oceanografía Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. MS. Biblioteca INIDEP, Mar del Plata, 31 pp.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.

Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* **17**, 3754–3777.

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

Bermingham E (1990) Mitochondrial DNA and the analysis of fish population structure. Electrophoretic and isoelectric focusing. En, Techniques in fisheries management. Ed. Whitmore, D.H. CRC Press. 197-221.

Bermingham E, Martin AP (1990) Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* **7**, 499-517.

Bernatchez L, Osinov A (1995) Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology* **4**, 285-297.

- Bouchereau JL, Chaves PT, Albaret J (2000) Selection of candidate fish species for farming in the Bay of Guaratuba, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **43**, 15-25.
- Bowen BW, Muss A, Rocha LA, Grant WS (2006) Shallow mtDNA coalescence in Atlantic pygmy angelfishes (genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean. *Journal of Heredity* **97**, 1-12. doi: 10.1093/jhered/esj006
- Braun AS and Fontoura NF (2004) Reproductive biology of *Menticirrhus littoralis* in southern Brazil (Actinopterygii: Perciformes: Sciaenidae). *Neotropical Ichthyology* **2**, 31-36.
- Braverman M.S. (2011) historia de vida temprana de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*, Sciaenidae) en el Estuario del Río de la Plata. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 207pp.
- Braverman MS, Acha EM, Gagliardini DA, Rivarossa M (2009) Distribution of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest 1823) larvae in the Río de la Plata estuarine front. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **82**, 557-565.
- Brown JR, Beckenbach AT, Smith MC (1993) Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution* **10**, 326–341.
- Buen, F (1950) El mar de Solís y su fauna de peces del Uruguay. *Publicaciones Científicas del Servicio Oceanográfico*. Pesca. Montevideo, (2da pt), 46-144.
- Camargo M, Isaac V (2005) Reproductive biology and spatio-temporal distribution of *Stellifer rastrifer*, *Stellifer naso* and *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae) in the Caeté Estuary, Northern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* **53**, 13-21.
- Cardoso L, Haimovici M. (2011). Age and changes in growth of the king

weakfish *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) between 1977 and 2009 in southern Brazil. *Fisheries Research* **111**, 177-187. doi: 10.1016/j.fishres.2011.06.017

Carozza CR, Izzo P, Colonello J and Lasta CA (2003) Análisis de las densidades y áreas de concentración de las principales especies demersales costeras en el área del Río de la Plata y la Zona Común de Pesca, durante los años 1993, 1994, 1999 y 2001. Informe Preliminar, Freplata (PNUD/GEF/RLA/99/G31) Acuerdo N° 100.

Carvalho-Filho A, Santos S, Sampaio I (2010) *Macrodon atricauda* (Günther, 1880) (Perciformes: Sciaenidae), a valid species from the southwestern Atlantic, with comments on its conservation. *Zootaxa* **2519**, 48 - 58.

Castro LAB, Petrere Jr M (2001) Estrutura populacional e mortalidade de *Micropogonias furnieri*, *Macrodon ancylodon* and *Cynosion jamaicensis*, no Sudeste do Brasil, de 1982 a 1996. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo* **27**, 61-76.

Cergole MC, Avila-da-Silva AO, Rossi-Wongtschowski (2005) Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Série documentos Revizee, São Paulo, Brazil, pp 40-45.

Chao LN (1978) A Basis for Classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA Technical Report Circular 415, 64 p.

Chao LN. (1978) Sciaenidae. En: FAO species identification sheets of fishery purposes. Western Central Atlantic (fishing area31). V. IV. W Fisher (eds). FAO, Rome.

Chiesa E (2010) La pesquería de pescadilla en el Uruguay. *Frente Marítimo* **21**, 51-56.

Çiftci Y, Okumus I (2002) Fish population genetics and applications of

molecular markers to fisheries and aquaculture: I- Basic principles of fish population genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **2**, 145-155.

Clapperton C. 1993. Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier Science Publishes B.V., 779p.

Cordo HD (1986) Estudios biológicos sobre peces costeros con datos de dos campañas de investigación realizadas en 1981. III. La pescadilla de red. *Publicaciones de la Comisión Técnico Mixta del Frente Marítimo* **1**, 15-27.

Cousseau MB, Perrotta, RP. (1998) Peces Marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca. Mar del Plata, Argentina, 163 pp.

Cousseau MB & Perrotta RG (2000) Peces marinos de Argentina: Biología, distribución y pesca. INIDEP, Mar del Plata (Argentina), 163 pp.

Csilléry K, Blum MGB, Gaggiotti OE, François O (2010) Approximate Bayesian Computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology and Evolution* **25**, 410-418.

D'Amen M, Zimmermann NE, Pearman PB (2013) Conservation of phylogeographic lineages under climate change. *Global Ecology and Biogeography* **22**, 93-104.

D'Anatro A, Pereira AN, Lessa EP (2011) Genetic structure of the white croaker, *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) along Uruguayan coasts: contrasting marine, estuarine, and lacustrine populations. *Environmental Biology of Fishes* **91**, 407-420.

Devioncenzi, GJ (1924) Peces del Uruguay. Anales del Museo Nacional, Montevideo, serie II, **1** (5), 139-283.

Díaz de Astarloa JM, Bolasina SN (1992) Análisis estadístico de los caracteres morfométricos y merísticos de la pescadilla de red (*Cynoscion striatus*) en el

area comprendida entre 34° y 39° 30'S. *Frente Marítimo* **11**, 57-62.

Dizon AE., Lockyer C, Perrin WF, Demaster DP, Sisson J (1992) Rethinking the Stock Concept : A Phylogeographic Approach. *Conservation Biology* **6**, 24–36.

Domingues VS, Bucciarelli G, Almada VC, Bernardi G (2005) Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology* **14**, 4051-4063.

Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1185-92.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Excoffier L, Schneider S (1999) Why hunter-gatherer populations do not show signs of pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 597-602.

Fabiano G, SANTANA O (2002) Las pesquerías en las lagunas costeras salobres de Uruguay. In: Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Menafrá R.; Rodríguez-Gallego, L.; Scaravino F. & D. Conde (Eds.). (. p 611-630). Vida Silvestre Uruguay, GRAPHIS Ltda., Montevideo.

Fernández Iriarte PJ, Alonso MP, Sabadin DE, Arauz, PA, Iudica CM. (2011) Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. *Scintia Marina* **75**, 701-706.

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

García G, Vergara J, Gutiérrez V (2008) Phylogeography of the Southwestern

Atlantic menhaden genus *Brevoortia* (Clupeidae, Alosinae). *Marine Biology* **155**, 325-336.

Godinho, R., Crespo, E.G., Ferrand, N. (2008) The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* **17**, 4670-4683.

Gray JS (1997) Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* **6**, 153-175.

Gusmão J, Lazoski C and Solé-Cava AM (2000) A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology* **137**, 435-446.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**, 255-257.

Haimovici M (1988) Crecimiento de la pescadilla real (*Macrodon ancylodon*) en el sur de Brasil en el período 1984-1986. *Frente Marítimo* **4**, 99-105.

Haimovici M, Miranda LV (2005) *Cynoscion guatucupa*, (Cuvier 1830). En: Cergole MC et al. (eds) Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Série documentos Revizee, São Paulo, Brazil, pp 40-45.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.

Haluch CF, Freitas MO, Corrêa MFM, Abilhoa V (2009) Variação sazonal e mudanças ontogênicas na dieta de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba-Enseada, Santa Catarina, Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **4**, 347-356.

- Haluch CF, Abilhoa V, Freitas MC, Correa MFM, Hostim-Silva M (2011) Estrutura populacional e biologia reprodutiva de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba-Enseada, Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* **24**, 47-59.
- Han Z-Q, Gao T-X, Yanagimoto T, Sakurai Y (2008) Deep phylogeographic break among white croaker *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in North-western Pacific. *Fisheries Science* **74**, 770–80.
- Harding SM, Chittenden ME (1987) Reproduction, movements, and population dynamics of the Southern Kingfish, *Menticirrhus americanus*, in the Northwestern Gulf of Mexico. NOAA Technical Report NMFS 49
- Harpending RC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* **66**, 591-600.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-13. doi: 10.1038/35016000.
- Hewitt GM (2004) The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* **16**, 1-16.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence times, with applications to divergence of *Drosophila pseudoobscura* y *D. persimilis*. *Genetics* **167**, 747-760.
- Hey J, Nielsen R (2007) Integration with Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 2785-2790.
- Ho SYW, Shapiro B (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* **11**, 423-434.

Hoeh WR, Blakley KH, Brown M (1991) Heteroplasmy suggest limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* **251**, 1488-1490.

Janko K., Lecointre G., Devries A., Couloux A., Cruaud C. and Marshall C. (2007) Did glacial advances during the Pleistocene influence differently the demographic histories of benthic and pelagic Antarctic shelf fishes?--Inferences from intraspecific mitochondrial and nuclear DNA sequence diversity. *BMC Evolutionary Biology* **220**.

Jardim LFA (1988) Sinopse das espécies de *Menticirrhus* Gill, 1861 (Osteichthyes, Sciaenidae) do Atlântico Ocidental. *Revista Brasileira de Zoologia* **5**, 179-187.

Knowles LL (2001) Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology* **10**, 691– 701.

Lee W-J, Conroy J, Howell WH, Kocher TD (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* **41**(1), 54-66.

Levy JA. (1999) La importancia de las técnicas genético moleculares en la investigación pesquera. En, Avances en Métodos y Tecnología Aplicados a la Investigación Pesquera. Seminario final del Proyecto INIDEP-JICA sobre Evaluación y Monitoreo de los Recursos Pesqueros 1994-1999. Instituto Nacional de Investigación y desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina. 249 p.

Lewis DS, Braun AS, Fontoura NF (1999) Relative seasonal fish abundance caught by recreational fishery on Cidreira Pier, southern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology* **15**, 149-151.

Lopez Cazorla A (1996) The food of *Cynoscion striatus* (Cuvier) (Pisces: Sciaenidae) in the Bahía Blanca area, Argentina. *Fisheries Research* **28**, 371-

379.

Lopez Cazorla A (2000) Age structure of the population of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Cuvier) in the Bahía Blanca waters, Argentina. *Fisheries Research* **46**, 279–286.

Macchi GJ (1998) Preliminary estimate of spawning frequency and batch fecundity of striped weakfish, *Cynoscion striatus*, in coastal waters off Buenos Aires province. *Fishery Bulletin* **96**, 375-381.

Macchi GJ, Acha EM and Militelli MI (1996) Seasonal egg production of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Fishery Bulletin* **101**, 332-342.

Macchi GJ, Acha EM and Militelli MI (2003) Seasonal egg production of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Fishery Bulletin* **101**, 332-342.

Marko PB, Hart MW (2011) The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology and Evolution* **26**, 448-456. doi: 10.1016/j.tree.2011.05.007.

Marko PB, Hoffman JM, Emme SA., MCGovern TM, Keever CC and Nicole Cox L (2010) The “Expansion-Contraction” model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? *Molecular Ecology* **19**, 146-169.

Márquez A, Maldonado JE, González S, Beccaceci MD, Garcia JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics*, **7** 563–575.

McGovern TM, Keever CC, Saski CA, Hart MW, Marko PB (2010) Divergence genetics analysis reveals historical population genetic processes leading to contrasting phylogeographic patterns in co-distributed species. *Molecular*

Ecology **19**, 5043-5060. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04854.x

Menezes NA, Figueiredo JL (1980) Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. IV Teleostei. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 98pp

Militelli M. (2007). Biología reproductiva comparada de especies de la familia Sciaenidae en aguas del Río de la Plata y Costa Bonaerense. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

Militelli MI and Macchi GJ (2004) Spawning and fecundity of king weakfish, *Macrodon ancylodon*, in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **84**, 443-447.

Militelli M, Macchi G (2006) Spawning and fecundity of striped weakfish, *Cynoscion guatucupa*, in the Río de la Plata estuary and adjacent marine waters, Argentina–Uruguay. *Fisheries Research* **77**, 110-114. doi: 10.1016/j.fishres.2005.08.004.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**, 1215.

Moritz G (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 373-375.

Moritz C, Faith DP (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* **7**, 419–429.

Muelbert JH, Weiss G (1991) Abundance and Distribution of Fish Larvae in the Channel Area of the Patos Lagoon Estuary, Brazil. NOAA Technical Report NMFS 95: Larval Fish Recruitment and Research

Muniz R, Chaves C (2008) Condição reprodutiva da betara preta, *Menticirrhus americanus* (Teleostei, Sciaenidae), na pesca realizada no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences* **30**, 339-344. doi:

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**, 5269-5273.

Nielsen JL, Tupper D, Thomas WK (1994) Mitochondrial DNA polymorphism in unique runs of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from the Sacramento-San Joaquin river basin. *Conservation Biology* **8**, 882-884.

Palumbi SR, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) *The simple fool's guide to PCR, version 2.0*. University of Hawaii, Honolulu, p. 47.

Park LK, Moran P and Waples RS (1994) Application of DNA technology to the management of Pacific salmon: Proceedings of the workshop. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-17, 178 p.

Pereira AN, Márquez A, Marin M and Marin Y (2009) Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *Journal of Fish Biology* **75**, 321-31.

Pinceel J, Jordaens K, Pfenninger M, Backeljau T (2005) Rangewide phylogeography of a terrestrial slug in Europe: evidence for Alpine refugia and rapid colonization after the Pleistocene glaciations. *Molecular Ecology* **14**, 1133–50.

Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253–1256.

Provan J and Bennett KD (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 564-71.

Rabassa J, Coronato A and Salemme M (2005) Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* **20**, 81-103.

Rebordinos González L (2007) Programas de gestión y conservación de recursos genéticos marinos. En, Uso eficiente y sostenible de los recursos naturales. Ramos Castellanos Eds. Ediciones Universidad de Salamanca, 443 pp.

Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 552-69.

Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* **18**(8), 411-417.

Ruarte CO, Sáez MB (2008) Estudio preliminary sobre la estructura de edades y el crecimiento de la pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*, Pisces, Sciaenidae) en el área sur de la provincia de Buenos Aires. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* **19**, 37-44.

Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit E, Zemplak TS, Adams EDM (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* **17**, 2234-2244.

Sabadín D, González Castro M, Iudica C, Díaz de Astarloa J, Fernández Iriarte, P (2010) Morphometric and genetic assessment of *Cynoscion guatucupa* population structure from Buenos Aires coast, Argentine Sea. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **45**, 513-517.

Sambrook J, Fritsch EF, T Maniatis (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2 edn. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

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

Sato A, Takezaki N, Tichy H, Figueroa F, Mayer WE, Klein J (2003) Origin and speciation of haplochromine fishes in East African Crater Lakes investigated by the analysis of their mtDNA, MHC Genes, and SINEs. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1448-1462.

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.

Slatkin M (1993) Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution* **47**, 264–279.

Smith JW, Wenner CA (1985) Biology of the Southern Kingfish in the South Atlantic Bight. *Transactions of the American Fisheries Society* **114**, 356-366.

Smith MF, Patton JL (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequences data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* **50**, 149-177.

Solé-Cava AM, Vooren CM and Levy JA (1983) Isozymic differentiation of two sibling species of *Squatina* (Chondrichthyes) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology* **75B**, 355-358.

Sparre P, Ursin E, Venema SC (1989) Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual. Rome: FAO, 1989.

Starkey DE, Shaffer HB, Burke RL, et al. (2003) Molecular systematics, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution* **57**, 119–28.

Sturmbauer C, Baric S, Salzburger W, Rüber L, Verheyen E (2001) Lake level fluctuations synchronize genetic divergences of cichlid fishes in African Lakes. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 144–154.

Swofford DL (2001) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0 beta 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

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

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

Thorrold SR, Latkoczt C, Swart PK, Jones CM (2001) Natal homing in a marine fish metapopulation. *Science* **291**, 297-299.

Tomczak M, Godfrey JS (2002) The Atlantic Ocean. In: Regional Oceanography: an Introduction, Vol. 2. pp. 229-2252.

Vergara-Chen C, Aguirre WE, González-Wangüemert M, Bermingham E. (2009) A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the *Cynoscion* group (Pisces: Sciaenidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **53**, 602–7.

Vicentini RN, Araújo FG (2003) Sex ratio and size structure of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) in the Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **63**, 559–566.

Vieira PC, Haimovici M (1997) Reprodução da pescada olhuda *Cynoscion guatucupa*, sin. *C. striatus* (Sciaenidae, Teleostei) no sul do Brasil. *Atlântica* **19**,

133-144.

Villwock JA, Tomazelli LJ, Loss E L, Dehnhar EA, Fo NOH, Bachi F A (1986) Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. *En Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* (Rabassa J, ed), pp. 79–97. Rotterdam: A. A. Balkema.

Violante RA, Parker G (2004) The post-last glacial maximum transgression in the de la Plata River and adjacent inner continental shelf, Argentina. *Quaternary International* **114**, 167-181.

Waldman JR (2005) definition of stocks: An evolving concept. En, Stock Identification: Applications in fishery science. Cadrin SX, Friedland KD, Waldman JR Eds. Elsevier Academic Press, 719 pp.

Windom H, Piola A, McKee B. Carbon and Nutrient Cycling in the Southwestern Atlantic Ocean: State of Knowledge on the Southwestern Atlantic Ocean Margin; Montevideo, Uruguay, 16–22 November 2008, *Eos Trans. AGU*, 90, 11,

Yamaguti N (1979) Diferenciação genética de *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) na costa brasileira, entre as latitudes 18 ° 36'S e 32 ° 10'S, Fase I. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo* **28**, 53–118.

Zink RM (2002) Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 953-959.