

**SISTEMÁTICA Y BIOGEOGRAFÍA DE LOS PECES ANUALES DE LA
SUBTRIBU CYNOLEBIATINA (CYPRINODONTIFORMES:
RIVULIDAE: CYNOLEBIATINAE)**

Marcelo Loureiro

Tesis de Doctorado

PEDECIBA
Area Biología-SubArea Zoología
2004

Orientador: Raúl Vaz-Ferreira
Co-orientador: Rafael O. de Sá

Tribunal: Enrique Lessa
Fernando Perez-Miles
Ekaterina Scvortzoff

Laboratorio de ejecución: Sección Vertebrados, Facultad de Ciencias

Agradecimientos

- A** Rafael de Sá por apoyarme y animarme constantemente.
- A** Raúl Vaz-Ferreira por iniciarme en el universo de los peces anuales.
- A** Enrique Lessa, Fernando Peres-Miles y Ekaterina Scvortzoff por aceptar leer el trabajo y por las subsecuentes correcciones y sugerencias.
- A** Claudia por bancarse la demencia de lo pasado y por todo lo demás.
- A** A mis padres y hermanas, que también y tan bien me soportan.
- A** Graciela García y Nibia Berois por su apoyo y compañerismo.
- A** los alevines, presentes y pasados: Franco Teixeira de Mello, Alejandro D'Anatro, Daniel García, Esteban Charbonier y Lucia Boccardi por su desinteresada e invalorable ayuda en el trabajo de campo.
- A** Carlos Hernández, Gabriel Yemini, Javier García y Marcelo Rodríguez por la colaboración en el campo.
- A** Tito Olivera por la colaboración en todo lo que complementa al trabajo de campo.
- A** Luis Giménez por el estímulo intelectual y filosófico.
- A** Javier Sawchik por hacer de la Facultad un lugar más soportable (volví Sawchi).
- A** todos los integrantes de la Sección Limnología, especialmente a Daniel Conde, Nestor Mazzeo, Rafael Arocena, Javier Gorga y Luis Aubriot por su constante disposición a colaborar.
- A** Verónica Korenko y Manuela Sarasola por la misma razón.
- A** Arley Camargo por su hospitalidad en Richmond 2001 y sus aportes bibliográficos.
- A** los integrantes de la Sección Vertebrados que facilitaron este trabajo.
- A** Guillermo D'Elia por el soporte (de Bremer).
- A** Mercedes Azpelicueta por *arachan*.
- A** Richard Fariña y Felipe García-Rodríguez por las paleocharlas.
- A** Mark Sabaj (Academy of Sciences of Philadelphia) y Doug Nelson (University of Michigan) por los ejemplares de peces anuales prestados.
- A** Roberto Reis por la iniciación en la Morfometría Geométrica.
- A** Don Juan Matus, Mark Smith, Horacio Quiroga, Sonic Youth, David Lynch, Alfredo, Tim Both, Syd Barret, *Psilocibe*, familia Tripaldi, equipo Picadilly (sister morphine), Claudia, Flavito, Gordwo, Javier, Cabelo, Negro, Charly, Mariel, Alimoche, Moton, Panco, Flaco, Leticia, Benito, Gatus, Rubito y Cucho por las demás realidades.
- A** la Panspermia Multiversal.

Esta tesis fue financiada por: PEDECIBA, DINACYT Fondo Clemente Estable, CSIC y FMLAT (Fundación Marcelo Loureiro por el avance de su tesis).

“Break my shape - in light I trust
None exist - save space and dust
None exist - just lights in time
Space divides the borderline

Don't exist just lights in time
Space divides the changing line
Space between and space inside
My four walls my shape defines
Space defines

You'd better get over yourself
You gotta get out of the frame
Gotta learn to see yourself
A total stranger
You gotta get out of the frame
Gotta give yourself a brand new name
Gotta learn to see yourself
A total stranger

It's a shock to my system
To wind up back where I have come from
It's a crime in my child's eyes
To find out life is in disguise”

“Space”, tomado de “Pleased to meet you” (James, 2002).

Índice General

	Página
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vi
Índice de Apéndices	vi
Resumen	vii
Introducción General	1
Capítulo I	
Introducción.....	7
Materiales y Métodos.....	9
Resultados.....	12
Discusión.....	23
Capítulo II	
Introducción.....	29
Materiales y Métodos.....	30
Resultados.....	34
Discusión.....	63
Capítulo III	
Introducción.....	80
Materiales y Métodos.....	81
Resultados.....	81
Discusión.....	87
Conclusiones y Perspectivas	92
Referencias bibliográficas	95
Apéndices	108

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.....	5
Figura 2.....	8
Figura 3.....	11
Figura 4.....	14
Figura 5.....	17
Figura 6.....	19
Figura 7.....	20
Figura 8.....	22
Figura 9.....	34
Figura 10.....	35
Figura 11.....	35
Figura 12.....	36
Figura 13.....	37
Figura 14.....	37
Figura 15.....	38
Figura 16.....	38
Figura 17.....	39
Figura 18.....	39
Figura 19.....	40
Figura 20.....	41
Figura 21.....	41
Figura 22.....	42
Figura 23.....	43
Figura 24.....	43
Figura 25.....	43
Figura 26.....	44
Figura 27.....	44
Figura 28.....	45
Figura 29.....	47
Figura 30.....	47
Figura 31.....	48
Figura 32.....	51
Figura 33.....	54
Figura 34.....	56
Figura 35.....	57
Figura 36.....	58
Figura 37.....	60
Figura 38.....	61
Figura 39.....	62
Figura 40.....	64
Figura 41.....	65
Figura 42.....	82
Figura 43.....	82
Figura 44.....	84
Figura 45.....	85
Figura 46.....	86
Figura 47.....	86

Índice de Tablas

	Página
Tabla I.....	14
Tabla II.....	16
Tabla III.....	16
Tabla IV.....	18
Tabla V.....	19

Índice de Apéndices

	Páginas
Apéndice I.....	108
Apéndice II.....	112
Apéndice III.....	113
Apéndice IV.....	114
Apéndice V.....	115
Apéndice VI.....	116
Apéndice VII.....	117
Apéndice VIII.....	118
Apéndice IX.....	119

Resumen

La región Neotropical presenta el mayor número de especies de peces dulceacuícolas del planeta, siendo la familia Rivulidae uno de los taxa con mayor diversidad específica de esta región. Una de las características de varios géneros de esta familia es su ciclo de vida anual. El mismo consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan. Las características de hábitat fragmentado en que los peces anuales se desarrollan, son propicias para que mecanismos evolutivos tales como deriva genética, cuellos de botella, efecto fundador, la selección sexual y la endogamia tengan influencia sobre la evolución y la probabilidad de extinción de las poblaciones. La escasa vagilidad de estos organismos favorecería además el aislamiento entre las poblaciones. La acción conjunta de los mecanismos evolutivos mencionados propiciaría por tanto la diferenciación entre las poblaciones con la potencial probabilidad de la ocurrencia de eventos de especiación. Estas características biológicas los hacen un modelo ideal para estudios de especiación así como de particular interés para el análisis de la relación entre fenómenos de rápida diferenciación poblacional y especiación en vertebrados.

La presente tesis tuvo como objetivo el estudio de la sistemática y biogeografía de los géneros de peces anuales pertenecientes a la subtribu Cynolebiatina (Rivulidae, Cynolebiatinae, Cynolebiatidi): *Cynolebias*, *Megalebias* y *Austrolebias*; utilizando caracteres morfológicos. El abordaje del mismo se realizó a dos escalas diferentes. Por un lado un abordaje poblacional donde se realizó un estudio detallado de la variación intraespecífica de las poblaciones de *Austrolebias* del grupo “adloffii” de la planicie costera del Este del Uruguay incluida en el sistema Laguna de los Patos-Laguna Merín. Por otra parte se realizó un análisis filogenético y biogeográfico de las especies de los géneros *Cynolebias*, *Megalebias* y *Austrolebias* (Cynolebiatina, Cynolebiatinae).

La variación intraespecífica de las poblaciones del grupo “adloffii” se analizó a nivel de diseño, merístico y morfométrico. En los tres niveles analizados se detectó que la variación morfológica previamente mencionada para las mismas correspondió a variación interespecífica asociada a dos taxa de este grupo. Una especie está ubicada al Norte del Río Cebollatí, y tiene características que permiten asignarle el estatus de nueva especie; mientras que otra especie se localizó al sur del mencionado río y tiene características que corresponden a *Austrolebias charrua*, especie previamente descrita para el extremo sur de Brasil. También se encontró que fueron los machos los que presentaron un mayor nivel de segregación, principalmente a nivel del diseño corporal y de las aletas; lo que sugiere que la selección sexual estaría jugando un papel importante en la diferenciación de estos taxa.

El análisis filogenético de la subtribu Cynolebiatina confirmó la monofilia de la misma. La condición de poseer entre 16 y 23 neuromastos en la serie supraorbital, la presencia de órganos de contacto en toda la extensión de varios radios de la aleta anal de los machos son nuevas sinapomorfias para el grupo. Sin embargo, replanteó la relación de hermandad entre los géneros *Cynolebias* y *Megalebias*. La hipótesis de hermandad entre estos dos taxa estuvo apoyada por 10 sinapomorfias: 1) presencia del proceso del esfenótico robusto, 2) presencia de denticulos sobre las branquiespinas del ceratobranquial 1, 3) tamaño del basihyal reducido, 4) presencia del proceso ventral del posttemporal en 80 a 89% de los individuos, 5) presencia de un promedio de 30 radios en la aleta caudal, 6) aleta dorsal posteriormente posicionada en los machos, 7) aleta dorsal posteriormente posicionada en las hembras, 8) presencia de más de 40 escamas en la línea lateral, 9) porción anteroventral de la serie de neuromastos infraorbitales fuertemente expandida ventralmente, 10) presencia de 5 o más vértebras sosteniendo el esqueleto caudal. El género *Austrolebias* también quedó definido como monofilético; sin embargo los valores de soporte del grupo (Bootstrap, Índice de Bremer) fueron bastante bajos.

Las especies de la tribu Cynolebiatina se distribuyen en tres grandes áreas geográficas: la cuenca media y baja del Plata (*Megalebias* y *Austrolebias*), los sistemas costeros Atlántico y Los Patos-Merín (*Megalebias*, *Austrolebias* y “*Megalebias cheradophilus*”) y la cuenca del Río Jaguaribe (pequeña cuenca costera del nordeste de Brasil, donde se encuentra *C. microphthalmus*). Además hay que agregar a esta distribución, la cuenca del Río San Francisco, en la misma región que la anterior, donde están las restantes especies de *Cynolebias*. En cuanto a las características y relación de las diferentes áreas geográficas y de acuerdo a los criterios explicitados previamente, podemos afirmar que la zona alta del río Paraná, la zona baja de la misma, la zona media de la cuenca del Río Uruguay, la zona media de la cuenca del Río Negro y el sistema Los Patos-Merín son áreas de endemismos. Esta última es el área que presenta mayor número de endemismos en la zona sur de la distribución de Cynolebiatina. La posible relación de este sistema tanto con la cuenca del Río Negro, como con la cuenca del Paraná hace que los eventos de transgresiones y regresiones marinas no solamente hayan tenido un efecto local en la diversificación del grupo sino que también un efecto regional al relacionar este sistema con los otros. La diversificación de los peces anuales en esta zona parece haberse originado a lo largo de diferentes eventos de cambios en el nivel del mar, lo que propicia la existencia de especies con diferentes “edades” en la zona.

Introducción General

La región Neotropical presenta el mayor número de especies de peces dulceacuícolas del planeta, reconociéndose en la actualidad aproximadamente 5.500 especies (Vari & Malabarba, 1998). Schaefer (1998) estimó que este número ascendería a cerca de 8000 especies (24% del total de especies de peces conocidas). Esta gran diversidad específica, la cual se habría originado en gran parte durante el Cretácico tardío y el Cenozoico (Lundberg *et al.*, 1998), está correlacionada con una gran radiación y diversidad a nivel morfológico, ecológico y de ciclos de vida. No obstante, las relaciones filogenéticas dentro de los grandes grupos permanecen sin resolución, principalmente a niveles taxonómicos inferiores (Vari & Malabarba, 1998). El conocimiento de las relaciones evolutivas es imprescindible para poder resolver preguntas tales como ¿cuál es el origen de la gran diversidad Neotropical? ¿cuáles son las relaciones con la fauna dulceacuícola de Africa? ¿cómo evolucionaron estrategias de vida como el anualismo y la viviparidad?, etc. Acompañado a esto, la compleja historia geomorfológica (Lundberg *et al.*, 1998) y la topografía accidentada de la región Neotropical hacen de su ictiofauna una importante fuente potencial en estudios de biogeografía histórica.

Parte de esta gran diversidad Neotropical corresponde a varias familias de Cyprinodontiformes, orden que se encuentra entre los cinco grupos con mayor número de especies en esta región (Vari & Malabarba, 1998). Entre ellas, la familia Rivulidae presenta varios géneros con un ciclo de vida anual único entre los vertebrados. El mismo consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan. Estos huevos presentan una capa coriónica externa extremadamente gruesa y ornamentada que los aísla del medio externo adverso (Simpson, 1979; Loureiro & de Sá, 1996, 2000). Además, los embriones tienen la capacidad de atravesar hasta tres períodos de diapausa (Wourms, 1972a,b) lo que les permiten retrasar el tiempo de

desarrollo hasta el momento en que las condiciones ambientales son nuevamente propicias para la eclosión de los alevines y el desarrollo de los adultos. Estas adaptaciones del desarrollo embrionario, son complementadas con una alta tasa metabólica que permite a los juveniles alcanzar la madurez sexual pocas semanas después de la eclosión, en algunos casos solamente 4 semanas después del nacimiento (Cardozo, 1999). Una vez adultos, los peces anuales se reproducen constantemente hasta su muerte, la cual ocurre poco antes de secarse los charcos, posiblemente por las altas temperaturas de fines de primavera (Simpson, 1979; Errea & Danulat, 2001) y la concomitante disminución de las concentraciones de oxígeno en estos pequeños y someros cuerpos de agua. El comportamiento reproductivo también se encuentra asociado a este particular ciclo de vida. El mismo consiste en el despliegue de determinadas conductas de atracción y respuesta por parte del macho y la hembra, cuya culminación es el enterramiento total o parcial de la pareja con el fin de depositar los huevos dentro del sustrato (Vaz-Ferreira *et al.* 1964, 1971; Belote & Costa, 2002). Cabe destacar que el fenómeno del anualismo no se presenta en todas las taxa de la familia Rivulidae ni tampoco es exclusivo a la misma ya que al menos dos géneros africanos de Aplocheilidae, grupo hermano de Rivulidae, (Parenti, 1981; Costa, 1998a) son también anuales. Este hecho ha ocasionado controversias acerca del origen único o múltiple e independiente del anualismo (Parenti, 1981; Costa, 1990, 1998; Murphy *et al.*, 1999b; Hrbek & Larson, 1999).

Los taxa de Cyprinodontiformes de ciclo anual y otros no anuales relacionados a estos, estaban agrupados hasta principios de la década de los 80 en la familia Aplocheilidae. Sin embargo, los géneros Neotropicales fueron elevados al rango de familia por Parenti (1981) basada en un análisis filogenético del orden mencionado. Rivulidae pasó a estar conformada por: *Rivulus* Poey, 1860, *Trigonectes* Myers, 1925, *Pterolebias* Garman, 1895, *Rachovia* Myers, 1927, *Neofundulus* Myers, 1924, *Austrofundulus* Myers, 1932 y *Cynolebias* Steindachner, 1876 (Fig. 1A). Dentro de la sinonimia de *Cynolebias* Parenti incluyó:

Cynopoecilus Regan, 1912, *Leptolebias* Myers, 1952, *Simpsonichthys*, Carvalho, 1959, *Campellolebias* Vaz-Ferreira & Sierra, 1974 y *Terranatos* Thaporn & Thomerson, 1978. Subsecuentemente, el género *Cynolebias sensu* Parenti (1981) fue elevado a la categoría de subfamilia por Costa (1990), quien revalidó los géneros agrupados (excepto *Simpsonichthys*) y redefinió *Cynolebias* en base a cinco sinapomorfias (Costa, 1989). La subfamilia Cynolebiatinae pasó entonces a ser el grupo hermano de la subfamilia Rivulinae, que incluye todos los demás rivulidos (Fig. 1B). Posteriormente, el mismo autor (Costa, 1995) presentó un análisis filogenético de *Cynolebias*, en el que define tres clados principales dentro del género. Costa (1996), revalidó *Simpsonichthys*, y quedó conformado por varias especies previamente asignadas a *Cynolebias*; además sugirió a este género como grupo hermano de *Cynolebias*. Loureiro & de Sá (1998) propusieron nuevas sinapomorfias óseas para dos de los clados de *Cynolebias* definidos por Costa (1995), el complejo de especies “bellottii” y el complejo de especies “elongatus” y también para *Simpsonichthys*. Costa (1998a) definió tres nuevos géneros de Cynolebiatinae: 1) *Nematolebias* Costa, 1998, fue creado para acomodar a algunas especies de *Simpsonichthys*, 2) *Austrolebias* Costa, 1998 (corresponde al complejo “bellottii” de *Cynolebias*), y 3) *Megalebias* Costa, 1998 (corresponde al complejo “elongatus” de *Cynolebias*). *Cynolebias sensu stricto* quedó restringido a las especies del complejo “porosus” previamente definido por Costa (1995). Estos tres géneros pasaron a conformar la subtribu Cynolebiatina (Fig. 1C). En subsecuentes trabajos, Costa (2001, 2002) también planteó hipótesis filogenéticas intragenéricas para estos taxa. Sin embargo, algunas de estas hipótesis han sido cuestionadas por García *et al.* (2000, 2002) y Loureiro (2001) basándose en análisis realizados con caracteres moleculares y morfológicos respectivamente.

Las características de hábitat fragmentado en que los peces anuales se desarrollan, son propicias para que mecanismos evolutivos tales como deriva genética (Gillespie, 2001), cuellos de botella, efecto fundador (Carvalho & Hauser, 1999) y endogamia tengan influencia

sobre la evolución y la probabilidad de extinción de las poblaciones (Whitlock, 2000). Estos mecanismos, junto con las altas tasas metabólicas encontradas en estos organismos (Cardozo, 1999), las características estresantes del ambiente que ocupan y el corto tiempo generacional de estas especies provocarían altas tasas de evolución que propiciarían una alta variabilidad morfológica y molecular. La escasa vagilidad de estos organismos favorecería además el aislamiento entre las poblaciones. La acción conjunta de los mecanismos evolutivos mencionados propiciaría por tanto la diferenciación entre las poblaciones con la potencial probabilidad de la ocurrencia de eventos de especiación.

El sistema de la Laguna de los Patos y Laguna Merín es una de las áreas con mayor número de especies endémicas de peces anuales de la región subtropical del Neotrópico (Costa, 2002). Para esta región se ha reportado, la existencia de alta variabilidad intra-específica a nivel morfológico, cromosómico y genético en poblaciones de al menos dos taxa; *A. luteoflamulatus* Vaz-Ferreira *et al.*, 1964 (Reichert, 1994; Wildekamp, 1995; Loureiro 1996, Loureiro & D'Anatro, 2003) y *A. adloffii* Ahl, 1922 (Loureiro, 1996, 1999; García *et al.*, 1993, 1995, 2000; Vaz-Ferreira & Melgarejo, 1984). Esta última, sin embargo, ha sido subdividida en varias especies por Costa & Cheffe (2001). No obstante, estos autores no utilizaron especímenes de las poblaciones de la región suroeste de la cuenca de la Laguna Merín. Por tanto, el estado taxonómico de las poblaciones uruguayas previamente incluidas en la variación de *A. adloffii* permanece sin dilucidar. La región de la planicie costera de este sistema ha estado sujeta a transgresiones y regresiones marinas al menos desde el Mioceno, entre 15 y 30 millones de años atrás (Sprechmann, 1978). La última de estas transgresiones es muy reciente y data de solamente cinco mil años atrás (García-Rodríguez *et al.*; 2002, García-Rodríguez & Witkowiaki, 2003). Esto sugiere que muchas de las especies de esta zona, así como su variabilidad intraespecífica sería de origen relativamente reciente.

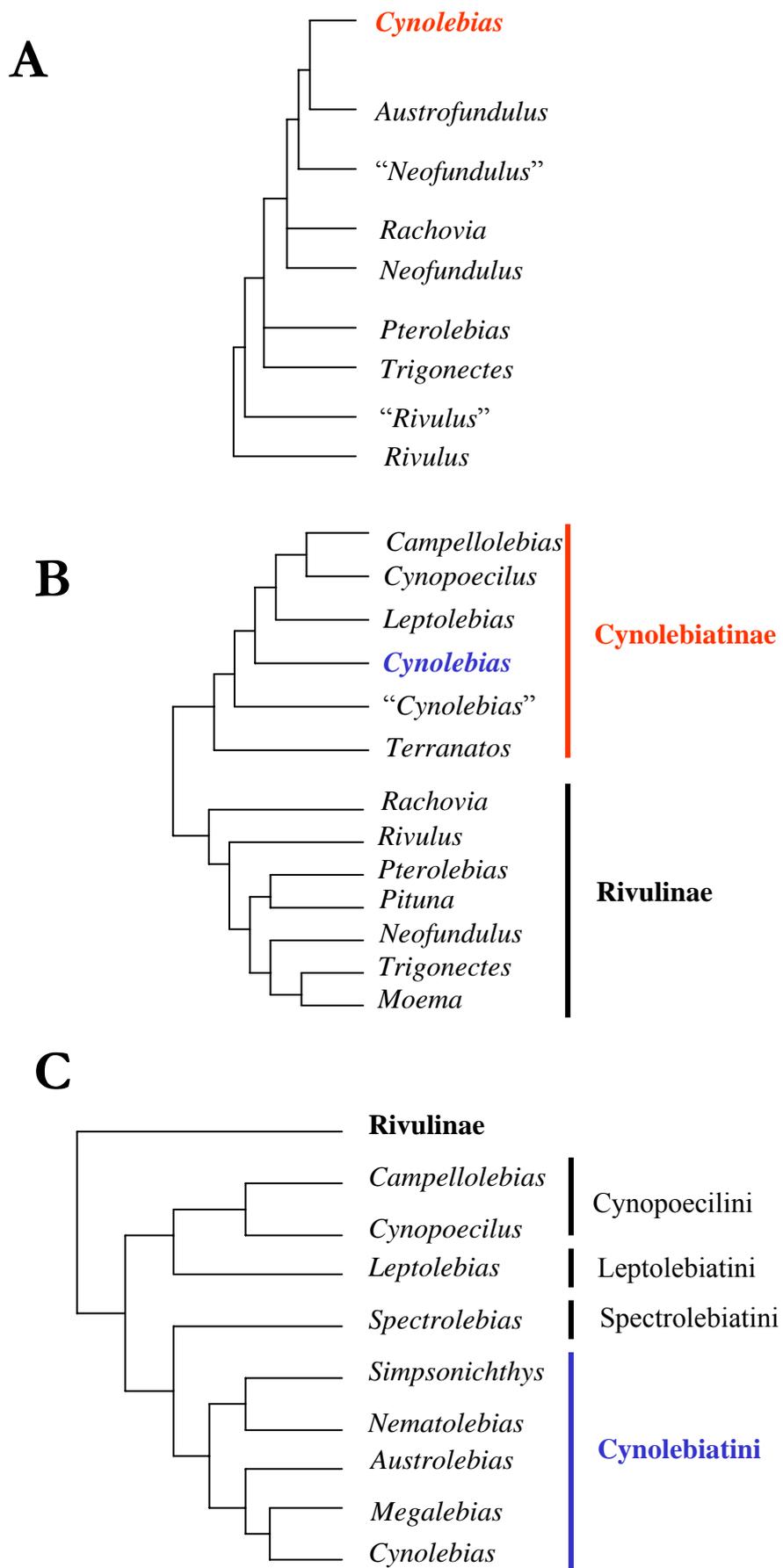


Figura 1. Relaciones filogenéticas de la familia Rivulidae. **A.** Parenti, 1981; **B.** Costa, 1990; **C.** Costa 1998

La variación es la materia prima de la evolución; por tanto las características biológicas mencionadas para este grupo de peces los hacen un modelo ideal para estudios de especiación así como de particular interés para el análisis de la relación entre fenómenos de rápida diferenciación poblacional y especiación en vertebrados. La investigación en estas áreas dentro de la familia Rivulidae es de gran importancia además en la dilucidación de las causas que hacen que la ictiofauna Neotropical sea una de las más diversas del planeta.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de la sistemática y biogeografía de los géneros de peces anuales pertenecientes a la subtribu Cynolebiatina (Rivulidae, Cynolebiatinae, Cynolebiatidi): *Cynolebias*, *Megalebias* y *Austrolebias*; utilizando caracteres morfológicos. El abordaje del mismo se realizó a dos escalas diferentes y por tanto se divide en dos objetivos particulares:

1.- Estudio detallado de la variación intraespecífica de los taxa del grupo “adloffii” de la planicie costera del Este del Uruguay incluida en el sistema Laguna de los Patos-Laguna Merín.

2.- Análisis filogenético y biogeográfico de las especies de los géneros *Cynolebias*, *Megalebias* y *Austrolebias* (Cynolebiatina, Cynolebiatinae) .

CAPÍTULO I

Variación morfológica de las especies del grupo “adloffii” de la planicie costera del Este del Uruguay

Introducción

Austrolebias adloffii presentaba hasta hace muy poco tiempo una de las distribuciones más amplias dentro del género; desde el extremo norte de la Laguna de los Patos, en las cercanías de Porto Alegre (localidad típica) hasta el extremo sur de la Laguna Merín, en los humedales del Este de Uruguay.

Por un lado, varios autores han mencionado la existencia de una gran variabilidad intraespecífica en las poblaciones sureñas de la especie, a nivel morfológico (Reichert, 1994), cromosómico (García *et al.*, 1993, 1995, 2001) y genético (García *et al.*, 2000). También se ha planteado que estas poblaciones presentarían características en los patrones de pigmentación intermedias entre las poblaciones de *A. adloffii* de la localidad típica y *A. viarius* (Vaz-Ferreira & Melgarejo, 1984), especie localizada alopatricamente al sur de la distribución de *A. adloffii*. La hipótesis de un origen híbrido de estas poblaciones fue propuesta por García (1996) quien planteó la ocurrencia de algún evento de introgresión post-pleistocénico entre los taxa mencionados.

Por otra parte, Costa & Cheffe (2001) describieron tres nuevas especies de *Austrolebias* previamente incluidas en la variación de *A. adloffii*: *A. nigrofasciatus* Costa & Cheffe, 2001, distribuida en las tierras bajas costeras occidentales de la Laguna Merín, entre Pelotas y el Río Yaguarón (Brasil); *A. minuano* Costa & Cheffe, 2001, distribuida en localidades al sur de la Laguna de los Patos (Brasil) y *A. charrua* Costa & Cheffe, 2001, la cual se extiende a lo largo de las tierras bajas costeras orientales de la Laguna Merín entre

Curral Alto y Chuy (Brasil y Uruguay). Con la excepción de dos poblaciones fronterizas de esta última (A° San Miguel y Barra del Chuy), ninguna de las poblaciones del suroeste de la cuenca de la Laguna Merín fueron incluidas en las nuevas especies descritas. En cuanto a *A. adloffii sensu stricto*, quedó restringida a localidades de las cercanías de Porto Alegre (Brasil) en el extremo norte de la cuenca de la Laguna de los Patos (Fig. 2).

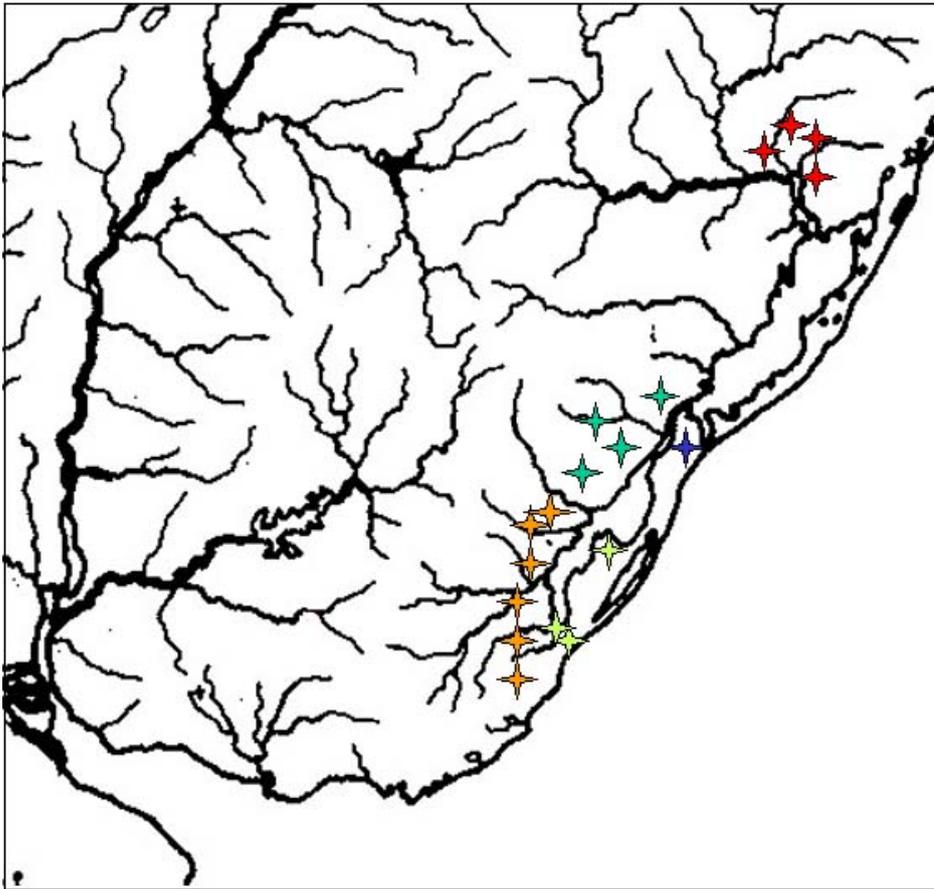


Figura 2. Distribución geográfica de las especies de *Austrolebias* del complejo “adloffii”: estrellas rojas, *A. adloffii*; estrellas celestes, *A. nigrofasciatus*; estrella azul, *A. minuano*; estrellas turquesa, *A. charrua*; estrellas rosadas *A. sp.*

Una de las consecuencias de este nuevo escenario es que las poblaciones de la zona suroeste de la cuenca de la Laguna Merín no estén asignadas actualmente a ninguna especie.

Otra consecuencia es que si hubo algún evento de hibridación, *A. adloffii sensu stricto* quedaría descartada como una de las especies parentales.

El objetivo en este capítulo es el de caracterizar la variación morfológica de las poblaciones del grupo “adloffii” del suroeste de la cuenca de la Laguna Merín. Además, a partir de este análisis se establecerá si las mismas corresponden a alguna de las especies ya descritas o si por el contrario se está en presencia de nuevas especies para el género.

La hipótesis de trabajo es que, dada la baja vagilidad de estos peces, la variabilidad morfológica estará estructurada geográficamente.

Materiales y métodos

Los ejemplares examinados pertenecen a la Colección de Vertebrados, Facultad de Ciencias, Uruguay (ZVC-P). Los detalles de los lotes utilizados para cada especie se dan en el Apéndice I. Para complementar los datos obtenidos de las colecciones y obtener una idea más precisa de la distribución de las poblaciones, se realizaron muestreos con red de mano desde 1998 hasta 2001, a lo largo de toda la cuenca de la Laguna Merín, desde el suroeste de la Laguna Negra (Departamento de Rocha) hasta la cuenca del Río Yaguarón (Departamento de Cerro Largo). Con fines comparativos se utilizaron ejemplares de *A. charrua* y datos bibliográficos de *A. nigrofasciatus*, especies limítrofes con las poblaciones de Uruguay. Machos y hembras fueron tratados independientemente en todos los análisis debido a su marcado dimorfismo sexual.

Los caracteres morfológicos utilizados fueron: diseño, merísticos y morfométricos. Los caracteres de diseño utilizados fueron: patrones de pigmentación de las aletas pares e impares, patrones de pigmentación del cuerpo, frecuencia de aparición de manchas del pedúnculo caudal y del flanco. Los caracteres merísticos utilizados y sus correspondientes

abreviaturas en el texto y figuras, fueron: número de radios óseos de las aletas pectorales (**Pc**), pélvicas (**Pv**), dorsal (**D**), anal (**A**) y caudal (**C**); número de escamas en las serie lateral (**El**), alrededor del pedúnculo (**Ep**) y predorsales (**Ed**) contadas como la serie que va desde la región anterior de la cabeza hasta el origen de la aleta dorsal; número de neuromastos en la serie supraorbital (**N**). Los conteos de estructuras bilaterales se realizaron siempre del lado izquierdo. La variación de los mismos fue analizada mediante el Análisis Discriminante. Previo al análisis, las variables fueron estandarizadas a una media de cero y desvío estándar de 1 para aproximar a la normalidad y la homoscedasticidad. Como los datos no pudieron ser normalizados el análisis discriminante fue usado como técnica exploratoria (James & McCulloch, 1990), por tanto las diferencias entre caracteres entre pares de grupos fueron testadas con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

La variación en la forma fue analizada a través de datos morfométricos utilizando los marcos anatómicos homólogos (“landmarks”) del cuerpo de los especímenes. Estos fueron fotografiados con una cámara digital Sony Mavica montada en un trípode, ubicada siempre a la misma distancia del ejemplar (15 cm). Los marcos anatómicos fueron digitalizados a partir de las fotografías mediante el programa *tpsDig* (version 1.31) por F. James Rohlf. Catorce marcos anatómicos por espécimen fueron digitalizados en vista lateral. (Fig. 3): (1) unión de los ceratohyales con el basihyal (2) punta del hocico, (3) margen anterior del ojo, (4) margen posterior del ojo (5) origen de la aleta dorsal, (6) final de la aleta dorsal, (7) origen dorsal de la aleta caudal, (8) final del pedúnculo caudal, (9) origen ventral de la aleta caudal, (10) final de la aleta anal, (11) origen de la aleta anal, (12) origen de la aleta pélvica, (13) inserción dorsal de la aleta pectoral en el cuerpo y (14) inserción de la membrana opercular en la cabeza.

Cada marco anatómico queda definido por dos coordenadas Cartesianas, una en el eje *x* y otra en el eje *y*. Como consecuencia cada individuo podrá ser visualizado como un vector

de coordenadas, dos por marco anatómico. Las coordenadas Cartesianas no pueden ser estudiadas directamente como las distancias medidas en una estructura, pues su variación

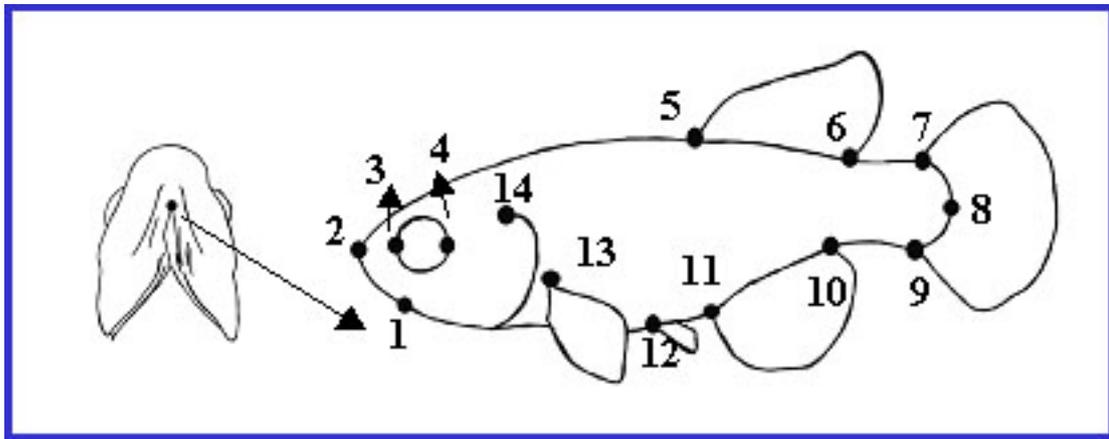


Figura 3. Marcos anatómicos utilizados en el análisis de morfometría.

sufre la influencia de la posición, de la orientación y tamaño y de la forma de los organismos durante la captura de los marcos anatómicos. Como lo que interesa en este caso es el estudio de la variación de la forma, el resto de la información debe ser retirada. Para lograr esto las configuraciones de marcos de cada individuo se trasladan, escalan y rotan de manera de minimizar las distancias cuadradas sumadas entre los marcos correspondientes. Esta sobreposición es realizada por una técnica de mínimos cuadrados ortogonales conocida como sobreposición de Procrustes (Rohlf & Slice, 1990). Este proceso de sobreposición produce un conjunto de coordenadas que localizan a cada espécimen en una superficie curva. Para que la variación y covariación sean estudiadas con técnicas estadísticas multivariadas lineales, los especímenes deben ser proyectados desde ese espacio de forma no lineal a un espacio tangente lineal. Para lograr ese propósito utilicé la aproximación “thin plate spline” y componente uniforme, desarrollada por Bookstein (1991). Esta técnica modela las transformaciones de la forma como si la configuración consenso (la configuración promedio de todos los especímenes) yaciera en la superficie de una placa de metal fina infinita. La función deforma la placa para transformar la configuración de referencia (consenso) en otra

configuración (la deseada) y minimiza la energía necesaria para doblar la placa de metal. Los parámetros de la función ajustada representa un nuevo conjunto de variables que están contenidos en una nueva matriz llamada matriz de peso (“warps” parciales). Cada fila de esa matriz corresponde a un individuo y cada columna a una de las nuevas variables. Las últimas dos columnas son los componentes de forma uniformes los cuales representan cambios generales y uniformes. Las otras columnas representan cambios en la forma más localizados. La matriz de peso de la muestra puede entonces ser analizada por técnicas multivariadas lineales. Todos los pasos computacionales de esta técnica han sido extensamente descritos por Bookstein (1991).

En este trabajo se realizó un análisis discriminante sobre la matriz de peso, incluyendo el componente uniforme, generada por el programa *tpsRelw* (version 1.24) por F. J. Rohlf, para examinar la importancia de los marcos anatómicos en el agrupamiento de los individuos con forma diferente.

Resultados

Diseño de los machos (fig. 4A,C, tabla I)

Todos los individuos analizados presentaron varias características típicas del grupo “adloffii”: aleta pectoral hialina con el borde inferior de color negro intenso, aletas pélvicas celestes, flancos del cuerpo con bandas verticales negras o marrón oscuro sobre fondo grisáceo, dos manchas negras alineadas verticalmente en el pedúnculo caudal presentes en parte de los individuos. Sin embargo, se identificaron dos fenotipos de macho claramente diferenciados a nivel del diseño de las aletas dorsal y anal y del flanco del cuerpo que se distribuyeron en regiones geográficas diferentes.

Fenotipo 1 (subsecuentemente *A. sp1*) (fig. 4A, tabla I): Aleta dorsal oscura con bandas verticales celeste-amarillentas en la porción basal. En el borde posterior de la aleta se

observa una mancha vertical de color negro con el borde anterior de color celeste brillante. Aleta anal celeste uniforme con una mancha en su borde posterior de similares características al de la aleta dorsal. Bandas negras del cuerpo finas, la relación promedio entre el grosor de la banda y el espacio entre bandas fue de 0.58 (ds = 0.14). El número promedio de bandas fue 7.9 (rango = 5-12, ds = 1.28). En este grupo la frecuencia de ocurrencia de las manchas en el pedúnculo caudal fue de 40%.

Fenotipo 2 (subsecuentemente *A. sp2*) (fig. 4C, tabla I): Aleta dorsal oscura con manchas celeste-amarillentas circulares a levemente alargadas en la mitad proximal de la aleta. Aleta anal celeste con manchas similares a las de la aleta dorsal. Aleta caudal similar al grupo anterior. Bandas negras gruesas, la relación promedio de banda y el espacio entre bandas fue de 1.04 (ds = 0.39), número promedio de bandas fue de 10.4 (rango = 7-15, ds = 1.72). La frecuencia de ocurrencia de las manchas en el pedúnculo caudal fue de 53.4%. Además, en este grupo el 4.8 % de los individuos presentan 1 o 2 manchas negras en el flanco.

Los machos de *A. charrua* analizados presentaron un patrón de diseño de aletas y cuerpo coincidente con *A. sp2*. Incluso el número promedio bandas presentó el mismo valor, 10.4 (rango = 8-14, ds = 1.88). La relación promedio entre el grosor de las bandas y el espacio interbanda fue levemente superior, 1.13 (ds = 0.35). La frecuencia de ocurrencia de las manchas en el pedúnculo fue en este caso de 44.4%. No se encontraron individuos de esta especie con manchas en el flanco.

Diseño de las hembras (fig. 4 B,D, tabla I)

Todos los individuos presentaron un patrón de pigmentación similar. Tanto la aleta dorsal, como la anal y la caudal presentan un fondo hialino con pequeñas manchas marrones con forma y distribución irregular en los $\frac{3}{4}$ proximales. Las aletas pectorales y las pélvicas

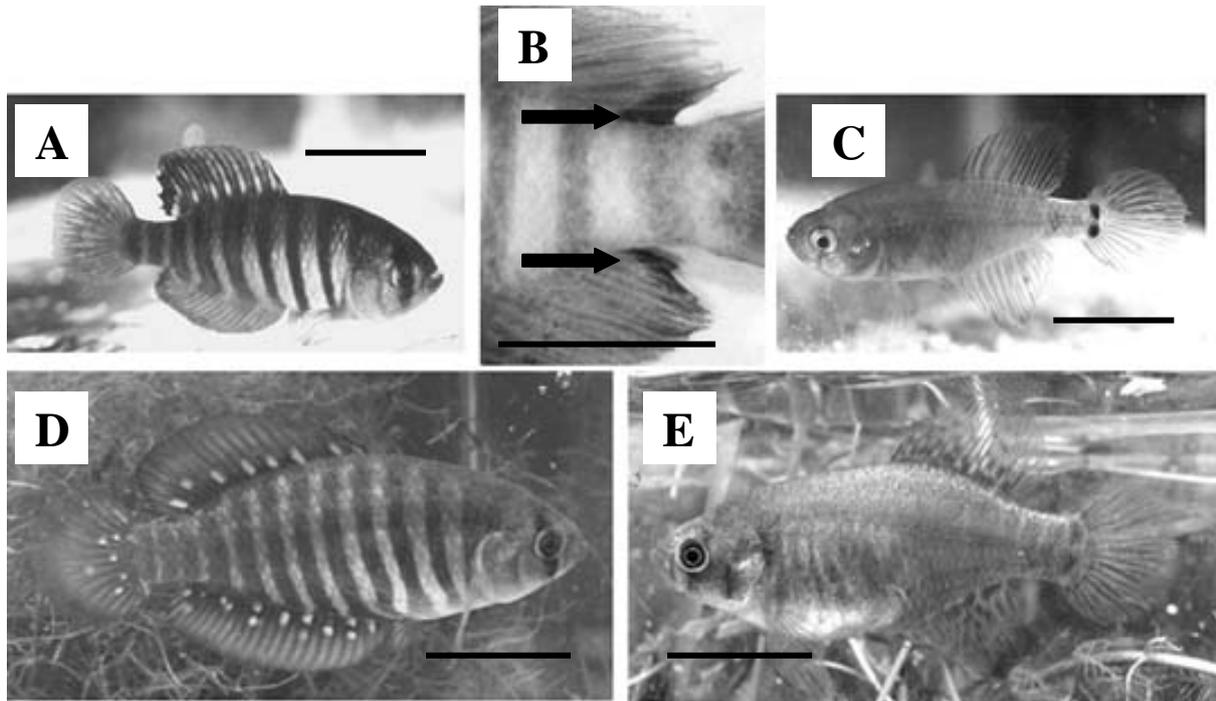


Figura 4. **A**, macho de *A. sp1*; **B**, detalle de la región posterior de las aletas dorsal y anal del macho de *A. sp1* (las flechas indican las manchas característica de este fenotipo); **C**, hembra de *A. sp1*; **D** y **E**, macho y hembra de *A. sp2*. Escala = 1 cm.

Tabla I. Resumen de las características de diseño de machos y hembras de *A. sp1*, *A. sp2* y *A. charrua*.

	Número de bandas	Grosor	Frec. Manchas del pedúnculo (%). ♂/♀	Frec. Manchas en el flanco (%). ♂/♀
<i>A. sp 1</i>	7.9 (5-12)	0.58 (0.14)	40/80.7	0/0
<i>A. sp 2</i>	10.4 (7-15)	1.04 (0.39)	53.4/70.6	4.8/6.3
<i>A. charrua</i>	10.4 (8-14)	1.13 (0.25)	44.4/78.4	0/7.1

presentaron una coloración hialina. El cuerpo presentó color marrón anaranjado con manchas marrones circulares a verticalmente alargadas. Al igual que en los machos, el pedúnculo caudal también presentó dos manchas negras alineadas verticalmente; en las correspondientes a *A. sp1*, la frecuencia de ocurrencia de las mismas fue de 80.7%, mientras que en *A. sp2* fue de 77.6% (tabla I). En estas últimas también se observaron en algunos ejemplares la presencia de 1 a 3 manchas negras en el flanco, con una frecuencia de ocurrencia de 6.3% (tabla I).

No se encontraron diferencias con el patrón de pigmentación en las hembras de *A. charrua*. La frecuencia de ocurrencia de las manchas en el pedúnculo en este caso fue de 78.4%, mientras que la de las manchas en el flanco fue de 7.1% (tabla I).

Caracteres Merísticos

En la tabla II se presentan los estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos de los machos *A. sp1*, *A. sp2* y *A. charrua* respectivamente.

Estos grupos fueron los seleccionados *a priori* para realizar el Análisis Discriminante. El porcentaje total de individuos correctamente clasificados fue de 77% (tabla IV). El análisis evidenció la segregación entre los individuos de *A. sp1* de *A. sp2*, no así la de estos últimos con *A. charrua* (fig. 5A). La segregación ocurrió a nivel de la raíz 1 que representó el 91% de la variación total. Estos resultados fueron confirmados mediante el test de Mann-Whitney, donde la mayoría de las variables analizadas presentaron diferencias significativas entre *A. sp1* y *A. sp2* y entre *A. sp1* y *A. charrua*, y solamente dos variables presentaron diferencias significativas entre *A. sp2* y *A. charrua* (tabla II).

En la tabla III se presentan los estadísticos descriptivos de los caracteres merísticos de las hembras de los grupos estudiados. En este caso el porcentaje de individuos correctamente clasificados *a priori* fue de 75% (tabla IV). El resultado del análisis fue similar al obtenido en los machos; *A. sp1* separado de *A. sp2* y *A. charrua* y estos dos últimos solapados en gran medida (fig. 5B). La segregación ocurrió a nivel de la raíz 1 que representó el 88% de la variación total. Los resultados de los test de Mann-Whitney también corroboraron la segregación obtenida por el AD (tabla III). En este caso 6 variables presentaron diferencias significativas entre *A. sp1* y *A. sp2*, y entre *A. sp1* y *A. charrua*, mientras que 2 variables fueron estadísticamente diferentes entre *A. sp2* y *A. charrua*.

Tabla II. Caracteres merísticos los machos de *A. sp1*, *A. sp2* y *A. charrua*; D. E. = desvío estandar, Mín. = mínimo, Máx = máximo. En rojo se representa el valor que fue significativamente diferente de los demás (analizados de a pares) de acuerdo al test de Mann - Whitney a un $p < 0.05$.

	<i>A. sp1</i> (n = 69)				<i>A. sp2</i> (n = 146)				<i>A. charrua</i> (n = 18)			
	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Media	D.E.	Mín.	Máx.
D	21.57	1.22	19	24	22.83	1.54	19	27	22.61	1.85	18	26
A	23.54	1.32	20	27	25.70	1.62	20	29	25.67	1.53	23	28
C	21.66	1.83	18	33	23.08	1.46	19	29	22.72	2.14	17	26
Pc	11.55	0.69	10	13	11.40	0.69	10	13	11.39	0.78	10	13
Pv	5.41	0.56	4	6	5.43	0.54	4	7	5.17	0.51	4	6
El	29.79	1.58	27	34	30.77	1.35	27	34	30.67	1.46	28	33
Ep	17.34	2.52	14	23	16.76	1.58	14	20	15.56	1.50	13	18
Ed	18.54	2.66	14	23	21.02	2.25	15	27	20.22	1.96	16	23
N	21.42	2.36	15	27	21.70	2.50	15	29	23.28	2.99	18	28

Tabla III. Caracteres merísticos las hembras de *A. sp1*, *A. sp2* y *A. charrua*; D. E. = desvío estandar, Mín. = mínimo, Máx = máximo. En rojo se representa el valor que fue significativamente diferente de los demás (analizados de a pares) de acuerdo al test de Mann - Whitney a un $p < 0.05$.

	<i>A. sp1</i> (n = 62)				<i>A. sp2</i> (n = 143)				<i>A. charrua</i> (n = 28)			
	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Media	D.E.	Mín.	Máx.
D	17.01	1.11	15	19	18.78	1.33	16	23	18.38	1.42	15	21
A	19.76	1.28	16	23	22.01	1.39	18	25	21.64	1.42	19	25
C	21.40	1.62	14	26	22.41	1.46	20	27	22.88	1.67	18	26
Pc	11.40	0.66	10	13	11.35	0.68	10	13	11.21	0.88	10	14
Pv	5.31	0.53	4	6	5.41	0.59	4	7	5.18	0.61	4	6
El	29.69	1.11	27	33	30.69	1.44	26	34	30.29	1.56	27	33
Ep	16.21	1.33	14	20	16.52	1.49	14	21	15.25	1.29	13	18
Ed	22.24	2.25	17	27	23.10	2.15	18	31	22.21	2.33	18	29
N	20.58	1.81	16	25	21.65	2.77	14	31	21.96	1.97	19	25

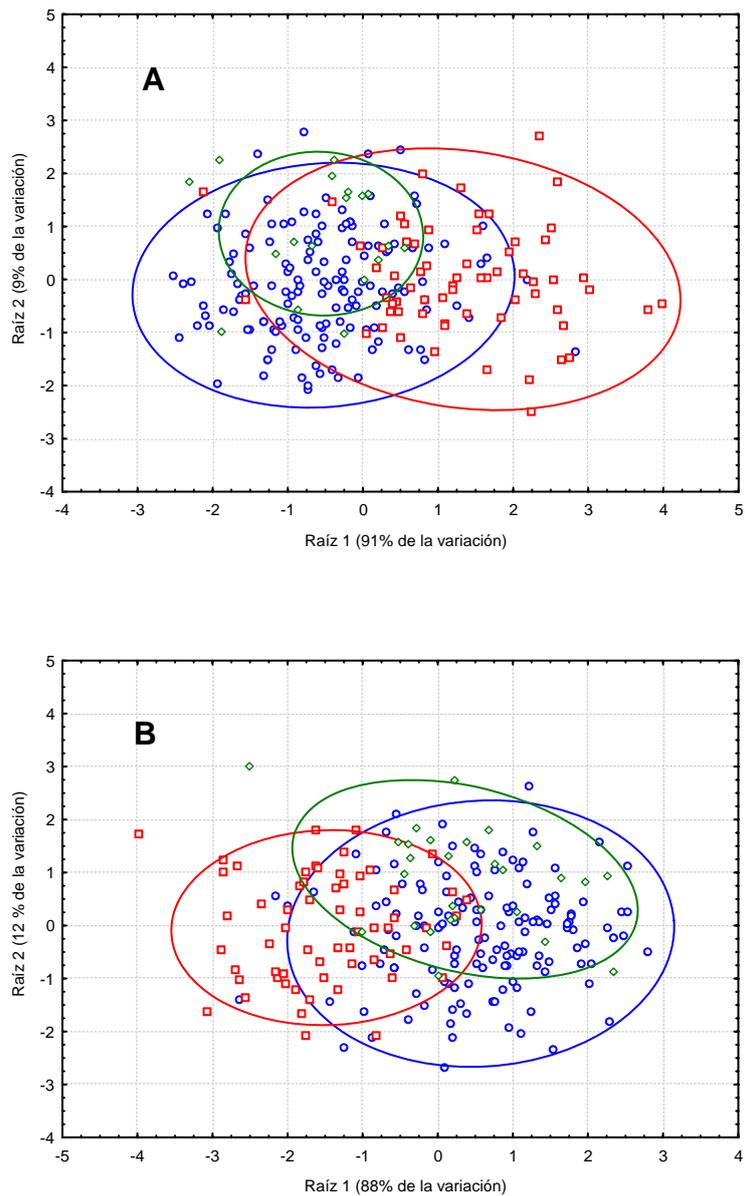


Figura 5. Proyección de las coordenadas de los individuos sobre las raíces canónicas de los análisis discriminantes basados en los caracteres merísticos. **A.** machos, **B.** Hembras; cuadrados rojos = *A. sp1*, círculos azules = *A. sp2*, rombos verdes = *A. charrua*.

Tabla IV. Matriz de clasificación *a posteriori* del Análisis Discriminante realizado en base a los caracteres merísticos en machos y hembras; % cc = porcentaje de individuos correctamente clasificados.

	♂				♀			
	% cc	A. sp1	A. sp2	A. charrua	% cc	A. sp1	A. sp2	A. charrua
A. sp1	64.61	42	23	0	74.19	46	16	0
A. sp2	93.15	9	136	1	89.51	11	128	4
A. charrua	0	0	18	0	7.14	2	24	2
TOTAL	77.73	51	177	1	75.54	59	168	6

Caracteres Morfométricos

El análisis discriminante de la matriz de “warps” parciales y componentes uniformes combinados en los machos resultó en una clara discriminación de *A. sp1* de *A. sp2* y *A. charrua* a lo largo de la raíz 1, la cual representó el 87% de la variación total (fig. 6A). Los cambios en forma asociados con los valores positivos de esta raíz (*A. sp1*) involucraron principalmente un aumento relativo en el tamaño de la cabeza (fig. 6B), un desplazamiento posterior del origen de las aletas pélvicas y anal y un desplazamiento anterior de la aleta dorsal. Los cambios en forma asociados con los valores negativos de esta raíz (*A. sp2* y *A. charrua*) involucraron cambios opuestos a los anteriores (fig. 6C). Las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los centroides de los grupos corroboraron esta segregación con diferencias significativas entre *A. sp1* y *A. sp2* y entre *A. sp1* y *A. charrua* (tabla V). Por otra parte, *A. charrua* se diferenció levemente (no significativamente) de *A. sp2* a lo largo de la raíz 2, la cual representó el 13% de la variación total (fig. 6A). Los cambios asociados con los valores positivos de esta raíz involucraron principalmente una disminución en la altura relativa del cuerpo (fig. 6D). Sin embargo, las diferencias entre los centroides de los grupos de *A. charrua* y *A. sp2* no fueron significativas (tabla V).

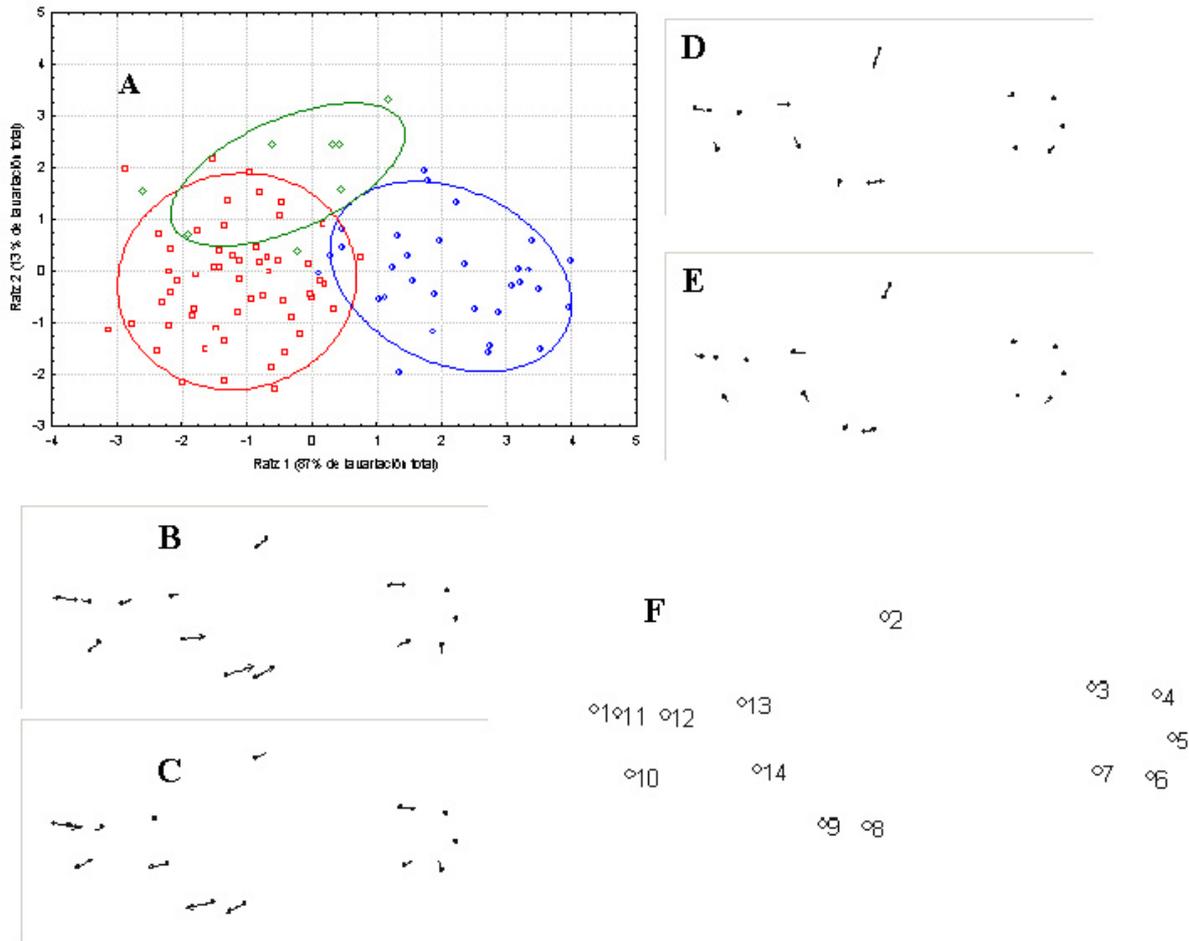


Figura 6. A. Proyección de las coordenadas de los individuos sobre las raíces canónicas del Análisis Discriminante de los machos en base a los caracteres morfométricos; B. y C. Deformación correspondiente a los valores positivos y negativos, respectivamente, de la raíz 1 con relación a la configuración consenso (magnificadas x3); D. y E. Deformación correspondiente a los valores positivos y negativos, respectivamente de la raíz 2 con relación a la configuración consenso (magnificadas x3); F. Configuración consenso obtenida a partir de la superimposición de Procrustes. Símbolos: círculos azules = *A. sp1*, cuadrados rojos = *A. sp2*, rombos verdes = *A. charrua*.

Tabla V. Distancias de Mahalanobis entre los centroides de los grupos analizados en base a los caracteres morfométricos. Valores en rojo representan diferencias significativas con $p < 0.05$. Valores sobre la diagonal = ♀; valores por debajo de la diagonal = ♂.

	<i>A. sp1</i>	<i>A. sp2</i>	<i>A. charrua</i>
<i>A. sp1</i>	0	5.09	6.06
<i>A. sp2</i>	11.19	0	3.23
<i>A. charrua</i>	10.55	5.03	0

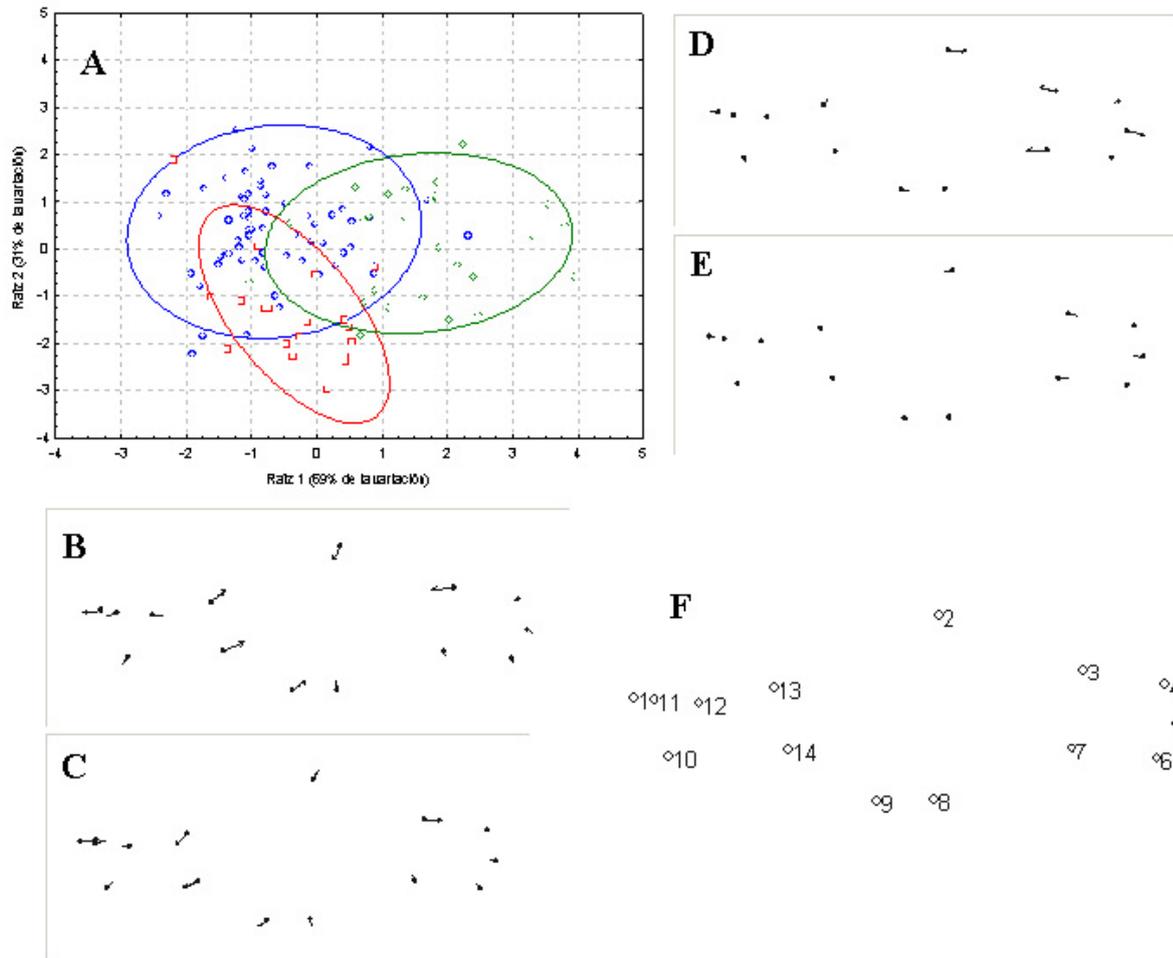


Figura 7. **A.** Proyección de las coordenadas de los individuos sobre las raíces canónicas del Análisis Discriminante de las hembras en base a los caracteres morfométricos; **B.** y **C.** Deformación correspondiente a los valores positivos y negativos, respectivamente, de la raíz 1 con relación a la configuración consenso (magnificadas x3); **D.** y **E.** Deformación correspondiente a los valores positivos y negativos, respectivamente de la raíz 2 con relación a la configuración consenso (magnificadas x3); **F.** Configuración consenso obtenida a partir de la superimposición de Procrustes. Símbolos: círculos azules = *A. sp1*, cuadrados rojos = *A. sp2*, rombos verdes = *A. charrua*.

En el caso de las hembras, se observaron resultados similares a los de los machos. Tanto *A. sp2* como *A. charrua* presentaron diferencias significativas en las distancias cuadradas de Mahalanobis de los centroides con *A. sp1* no así entre ellas (tabla V). Este último grupo se diferenció de los otros dos a lo largo de la raíz 1, la cual representó el 69% de la variación total (fig. 7A). Los cambios en la forma asociados con los valores positivos de esta raíz (*A. sp1*) involucraron un aumento relativo en el tamaño de la cabeza, una

disminución relativa de la altura del cuerpo y un acortamiento de la aleta dorsal desde su extremo posterior (fig. 7B). Los cambios de forma asociados con los valores negativos de esta raíz involucraron cambios opuestos (fig. 7C). A pesar de no presentar diferencias significativas con *A. sp2*, las hembras de *A. charrua* se diferenciaron de las primeras a lo largo de la raíz 2, la cual representó el 31% de la variación total (fig. 7A). Los cambios asociados con los valores negativos de esta raíz (*A. charrua*) involucraron un leve alargamiento de la aleta dorsal (fig. 7E).

Distribución geográfica de los taxa (figura 8)

En la figura 8 se presenta la distribución de los taxa estudiados en este trabajo y de las especies limítrofes del grupo “adloffii” de acuerdo a Costa & Cheffe (2001). Todas las poblaciones fueron encontrados en charcos temporales entre 0 y 50 metros sobre el nivel del mar.

Austrolebias sp1 se encuentra desde la cuenca del Río Yaguarón, en charcos temporales cercanos a la ciudad de Río Branco (32°35' S 53°23' W) hasta la cuenca media del A° Parao (32°59' S, 53°52' W), el cual es afluente del Río Cebollatí. En la margen Sur de la zona baja de esta cuenca es substituida abruptamente por *A. sp2* (33°01'S, 53°42'W). Esta se extiende hacia el Suroeste, hasta la región más occidental de la cuenca de la Laguna Negra en las inmediaciones de la ciudad de Castillos (34°07'S, 53°50'W). Incluso se han encontrado localidades muy cercanas a la divisoria de aguas que separa la cuenca de la Laguna Negra de la cuenca de la Laguna Castillos (34°12'S, 53°46'W). En esta zona se encuentran poblaciones de *A. sp2* en la misma planicie y a escasos 70 metros de charcos temporales habitados por *A. viarius*, especie endémica de la última cuenca mencionada (figura 8), sin barreras geográficas aparentes entre ambas poblaciones. Hacia el Oeste se la encuentra en la zona más alta de la cuenca del A° Sauce de los Amarales (34°03'S, 54°07'W).

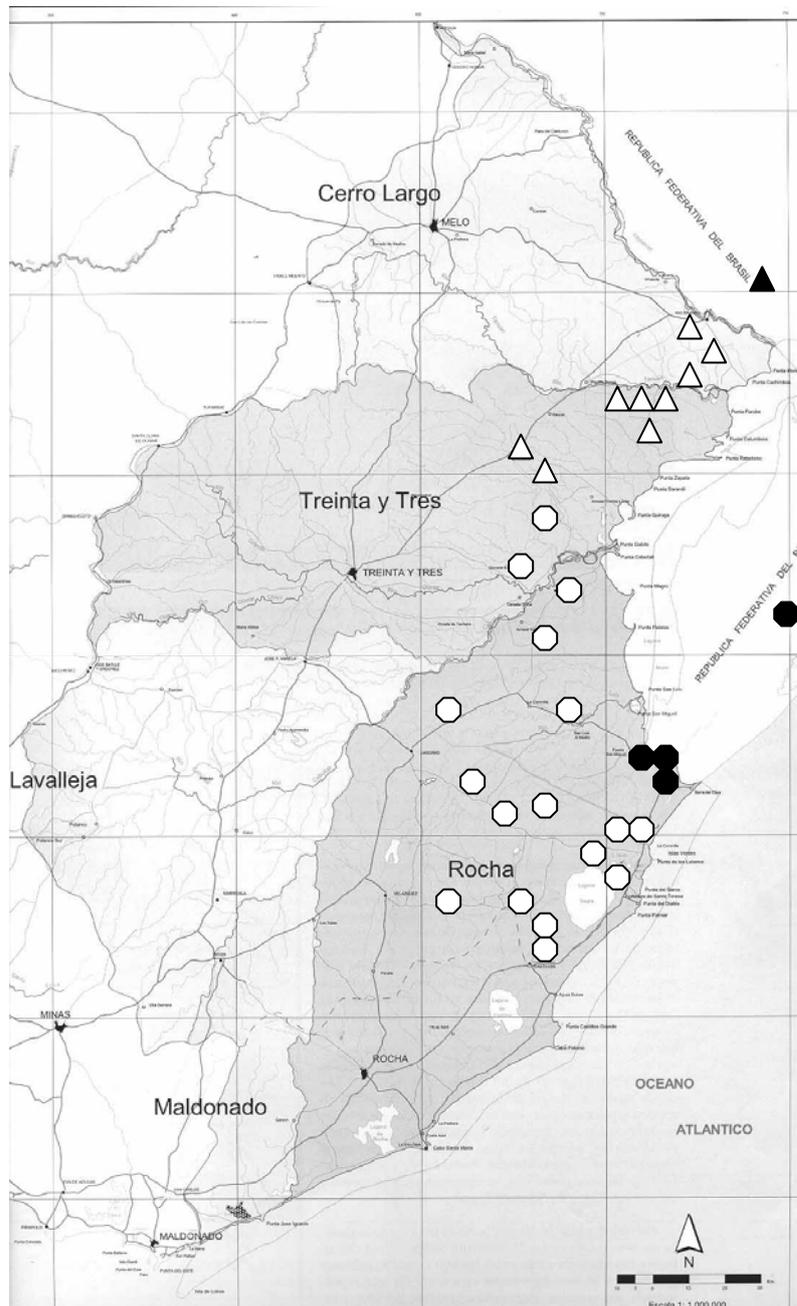


Figura 8. Distribución geográfica de las especies del grupo “adloffii” del Uruguay: triángulos blancos = *A. sp1*; círculos blancos = *A. sp2*; triángulo negro = límite sur de *A. nigrofasciatus*; círculos negros = *A. charrua*. Mapa modificado de PROBIDES, 1999.

Discusión

De manera general se ha confirmado la hipótesis de trabajo planteada en esta sección de la tesis. Este análisis ha mostrado que al menos gran parte de la variabilidad morfológica intraespecífica reportada previamente para las poblaciones del grupo “adloffii” en la planicie costera del este de Uruguay corresponde a variación interespecífica asociada a dos taxa diferentes, distribuidos primariamente de manera alopátrica. Sin embargo, una exploración exhaustiva de la zona que los limita podría determinar una distribución parapátrica. Ambos difieren entre sí, en mayor o menor medida, en la mayoría de los caracteres analizados: diseño, merísticos y morfométricos.

Hacia el Norte de esta región se encuentra un taxa (*A. sp1*) que de acuerdo a sus características cromáticas y merísticas correspondería a *A. nigrofasciatus*. Incluso, la presencia de una mancha negra con borde anterior celeste en la región posterior de las aletas dorsal y anal en *A. sp1*, es uno de los caracteres diagnósticos de *A. nigrofasciatus* (Costa & Cheffe, 2001). La distribución geográfica de ambas apoya esta afirmación, la especie descrita por Costa & Cheffe (2001) se encuentra desde las inmediaciones de la ciudad de Pelotas hasta la margen Norte de la cuenca del Río Yaguarón, mientras que *A. sp1* se distribuye hasta la margen sur de la mencionada cuenca. Sin embargo, existen evidencias filogenéticas a nivel de análisis de secuencias del citocromo b que sugieren que *A. nigrofasciatus* no está directamente emparentada con *A. sp1*, sino que sería la especie hermana de *A. charrua* (García, en prep.). Por esta última causa podemos considerar entonces que *A. sp1* es un taxon diferente de *A. nigrofasciatus* y nuevo para el grupo “adloffii” (Loureiro & García, en prensa). Estas características, incluida la distribución contigua de los taxa, plantean una situación compleja a nivel de las tasas de diferenciación morfológica y molecular diferenciales en ambos. Uno de los factores que se plantean como causantes de estos patrones de

incongruencia entre las características diagnósticas de dos especies y sus correspondientes patrones filogenéticos es la existencia de procesos de hibridación entre los taxa (Lehman et al, 1991, Redenbach & Taylor, 2002) Entre las consecuencias evolutivas causadas por este fenómeno se encuentra la evolución reticulada, es decir la formación de una nueva especie por “fusión” de dos taxa diferentes (Arnold, 1992). Cabe destacar que la hibridación introgresiva ya ha sido hipotetizada por García (1996, ver adelante) para otras poblaciones del grupo “adloffii”.

También se ha mostrado que el otro taxon encontrado en esta zona (*A. sp2*) corresponde a *A. charrua*. Las características del diseño del cuerpo del macho encontradas en *A. sp2* (bandas verticales oscuras tan o más gruesas que el espacio entre ellas) solamente es encontrada en *A. charrua* y *A. minuano*, esta última distribuida aproximadamente a 200 km hacia el Norte. Los análisis de los caracteres merísticos también han mostrado que las diferencias entre *A. sp2* y *A. charrua* son escasas, las que podrían deberse en este caso a variabilidad intraespecífica. Incluso, los rangos de variación de estos caracteres reportados por Costa & Cheffe (2001) para *A. charrua*, quedan incluidos en los encontrados en este trabajo para *A. sp2*. Además, la distribución de ambos grupos es claramente continua. Una de las localidades más occidentales reportadas en la descripción original (Costa & Cheffe, 2001) corresponde a la parte baja de la cuenca del A° San Miguel, mientras que varias de las localidades de *A. sp2* corresponden a puntos ubicados en los bañados asociados a la parte media de este arroyo y al sector oriental de la cuenca de la Laguna Negra, la cual alimenta los sistemas mencionados.

Al comparar los resultados obtenidos en machos y hembras, se pudo observar que a nivel morfométrico las hembras de *A. sp1* y *A. charrua* (incluida *A. sp2*) son más similares entre sí que los machos. Las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los grupos de machos fueron el doble que las obtenidas para las hembras. Una situación similar ocurrió a

nivel de diseño, donde que fue imposible diferenciar las hembras de ambos grupos utilizando estos caracteres, mientras que los machos presentaron dos patrones claramente diferenciados. Por el contrario, las diferencias a nivel merístico fueron similares en ambos sexos. Resultados similares se han obtenido para *A. luteoflamulatus*, especie simpátrica en parte de su distribución con *A. sp1* y *A. charrua* (Loureiro & D'Anatro, en revisión). Al igual que en estas especies, los machos de *A. luteoflamulatus* de diferentes cuencas presentaron diferencias en el diseño, no así las hembras. Sin embargo, en esta especie fueron los caracteres merísticos los que presentaron mayor diferenciación en machos que en hembras, mientras que morfométricamente ambos sexos se discriminaron en igual grado. Estas diferencias podrían deberse a las diferencias en las escalas de trabajo de ambos estudios. Mientras que en *A. luteoflamulatus* el análisis se centró en variación intraespecífica, en este trabajo estamos en presencia de dos especies diferentes, cuya relación de parentesco no está claramente dilucidada. El tiempo de aislamiento entre los grupos analizados en uno y otro trabajo puede estar marcando estas diferencias. Otro factor podría ser el filogenético, *A. luteoflamulatus* pertenece a un clado diferente al de *A. sp1* y *A. charrua*, ¿evolucionan estos grupos a velocidades diferentes?. Al momento no existen datos como para testar esta hipótesis. De cualquier manera los patrones observados robustecen la hipótesis de que la selección sexual estaría ejerciendo gran influencia sobre la evolución y la especiación en este grupo de peces, principalmente la selección intersexual a través de las preferencias de la hembra. Este tipo de selección podría estarse sumando a las otras causas mencionadas para provocar una rápida diferenciación en estos peces. Los modelos teóricos desarrollados en este contexto han demostrado que las preferencias de la hembra pueden alterar drástica y rápidamente las características del macho (Lande, 1981; Hall *et al.*, 2000).

Todas las regiones costeras del planeta (Lambeck *et al.*, 2002), incluida la región de los humedales del Este (Sprechmann, 1978) han estado sujetas a transgresiones y regresiones

marinas, al menos durante los últimos 35 mil años. Más aún, en los últimos 7 mil años se han registrado cambios drásticos en los niveles del mar en esta área (García-Rodríguez *et al.*, 2002; García-Rodríguez & Witkowiak, 2003) así como también en toda la región costera del sur de Brasil (Villwock & Tomazelli, 1995 en Beheregaray *et al.*, 2001). De acuerdo a las altitudes registradas para las localidades en donde se encuentra *A. charrua* (entre 0 y 50 metros sobre el nivel de mar), se puede sugerir que el origen de esta especie es relativamente reciente. Las estimaciones realizadas por García *et al.* (2002) sobre el tiempo de divergencia de las especies del grupo “adloffii” confirman esta hipótesis. Alternativamente, cabe la posibilidad de que algunas poblaciones de origen no tan reciente, permanezcan en localidades de zonas más altas durante los períodos de transgresión y luego ocurra una recolonización de las áreas bajas al disminuir los niveles del mar y formarse las zonas de humedales. Es posible estimar si una población está en expansión o regresión utilizando marcadores moleculares, además de establecer las relaciones de jerarquía entre diferentes poblaciones; por lo que se hace imprescindible conocer la estructura genética de las poblaciones de ésta y otras especies en el área. Resultará interesante la exploración de zonas “altas” de las cuencas que alimentan a este sistema (por ej. la cuenca del Río Cebollatí) en busca de poblaciones de esta especie. Se conocen poblaciones de peces anuales en este tipo de localidades de al menos dos especies, *A. gymnoventris* Amato, 1986, y *M. prognathus* Amato, 1986 (Apéndice I). Beheregaray *et al.* (2001), utilizando secuencias de microsatélites y de la región control del ADN mitocondrial, han demostrado la existencia de eventos de rápida diferenciación y especiación alopátrica extremadamente recientes en los pejerreyes del género *Odonthestes* Evermann & Kendall, 1906, del grupo “perugiaie” en el sistema Laguna de los Patos-Merín no mayores a 5000 años, asociados a las fluctuaciones marinas costeras del Holoceno. Eventos de rápida especiación en peces asociados a cambios climáticos en este período ya han sido reportados para regiones

costeras de otras partes del mundo (Bernatchez & Dodson, 1991; Hewitt, 1996), incluso dentro de la familia Aplocheilidae, el grupo hermano de Rivulidae (Murphy *et al.*, 1999a).

García (1996) planteó la hipótesis de un origen híbrido de *A. charrua* (*C. adloffii* 2, en ese trabajo), con *A. viarius* Vaz-Ferreira *et al.*, 1964, como una de las potenciales especies parentales. En este trabajo se han encontrado algunos caracteres cromáticos que apoyarían esa idea. Varios caracteres típicos de *A. viarius*, como la presencia de manchas oscuras en el flanco en ambos sexos, bandas verticales oscuras más gruesas que el espacio entre ellas y aletas dorsal y anal con manchas redondas o ligeramente alargadas en la porción basal de las aletas en los machos (Vaz-Ferreira *et al.*, 1964), también han sido encontradas en *A. charrua* y no en otras especies del grupo “adloffii”. De cualquier manera se debe ser cauto en la interpretación de estos caracteres ya que por ejemplo la presencia de manchas en el flanco es plesiomórfica para *Austrolebias* (ver más adelante) y su presencia en *A. charrua* podría ser primitiva y la ausencia una condición derivada para las otras especies del grupo “adloffii”. Resta también confirmar si a nivel morfométrico ocurre algo similar. El lugar de posible contacto entre ambas especies ha sido localizado en los alrededores de la ciudad de Castillos, y a pesar de que ambas especies se encuentran en cuencas separadas, la cercanía entre los límites de distribución de ambas es sorprendente, más aún dadas las características del lugar.

Otro hecho a resaltar es el límite entre las distribuciones de *A. spl* y *A. charrua*. Se podría pensar en primera instancia que el Río Cebollatí actúa como límite entre ambas especies. Sin embargo, en la zona baja del mismo este no parece actuar como barrera a la dispersión de *A. charrua*. Queda por responder entonces cual es la causa de la distribución de ambas taxa en esa zona. ¿Refleja ese patrón una configuración de la geografía histórica del cauce del río? ¿ha ocurrido en esa zona algún evento de hibridación? Es claro el hecho de que para varias de las especies del género distribuidas en la cuenca del Plata, los grandes cursos de agua como el Río Uruguay no han sido una barrera a la dispersión de las mismas,

encontrándose poblaciones de una misma especie en ambos márgenes del mismo. Sin duda es necesaria una exploración más exhaustiva de la zona. Hasta el momento las localidades más cercanas entre ambas especies distan una de otra aproximadamente 1 km. El hecho de no existir barreras geográficas aparentes plantea la posibilidad de una distribución parapátrica de ambos taxa. ¿Por qué no coexisten ambas especies en los mismos charcos?. Una posibilidad es la existencia de híbridos no detectados hasta el momento en la zona. La otra es que exista exclusión competitiva que impida la coexistencia de las mismas, fenómeno que ha sido invocado ampliamente para explicar patrones de distribución de especies muy similares (Huston, 1994).

Los procesos de especiación no producen meramente especies sino que producen especies hermanas (Brooks & McLennan, 1991), por lo que no se pueden formular hipótesis acerca de los modos de especiación basados en una única especie. Los mismos no pueden ser estudiados sin antes haber determinado las relaciones de “hermandad” en el sistema de interés. En este caso las hipótesis acerca del parentesco de las especies del grupo “adloffii” no están resueltas. De acuerdo al análisis filogenético realizado en este trabajo (ver adelante) los dos taxa (*A. spl* y *A. charrua*) no serían especies hermanas, estos resultados estarían apoyados por los análisis filogenéticos en base a caracteres moleculares (García, en prep.) y por los análisis realizados por Costa (2002). Sin embargo, hasta el momento ningún trabajo ha incluido todos los taxa del grupo “adloffii” en un único análisis, lo que es imprescindible para una correcta interpretación de las relaciones de ancestría entre los taxa.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA TRIBU CYNOLEBIATINA

Introducción

Las hipótesis existentes acerca de las relaciones filogenéticas dentro de la tribu Cynolebiatina son controversiales. Costa (1998a), definió dos nuevos géneros a partir de *Cynolebias*: *Megalebias* género hermano de *Cynolebias* y *Austrolebias* género hermano del clado *Cynolebias-Megalebias*. Costa (2002), confirmó el monofiletismo de *Megalebias* y *Austrolebias*, y propuso la siguiente relación entre los géneros ((*Megalebias-Austrolebias*) *Cynolebias*). Hipótesis filogenéticas propuestas en base a secuencias de citocromo b y ARN ribosomal muestran que *Austrolebias* sería parafilético en relación a *Megalebias* (García *et al.*, 2000, 2002). Este último aparece anidado entre las especies del primero. Resultados similares fueron obtenidos en un análisis filogenético preliminar en base a caracteres morfológicos (Loureiro, 2001), donde los caracteres continuos fueron analizados de manera ordenada (Thiele, 1993). Ninguno de estos análisis incluyeron ejemplares de *Cynolebias sensu stricto*.

Por otra parte, los análisis previos basados en morfología (Costa 1998, 2002) no han tenido cuenta la variabilidad intraespecífica encontrada en este nivel en varias especies de estos peces, lo cual podría estar sesgando los resultados obtenidos en los análisis correspondientes (Wiens, 1995).

El objetivo de este capítulo es realizar un análisis filogenético de las especies de la subtribu Cynolebiatina, en base a caracteres morfológicos y teniendo en cuenta la variabilidad intraespecífica mediante el empleo de un número de individuos por especie más amplio que el utilizado hasta el momento.

La hipótesis de trabajo para este objetivo es que la subtribu *Cynolebiatina* es monofilética basado en Costa (1998, 2002).

Materiales y métodos

Los ejemplares examinados pertenecen a las colecciones de las siguientes instituciones: Colección de Vertebrados, Facultad de Ciencias, Uruguay (ZVC-P); Museo de Zoología, Universidad de Michigan, Estados Unidos de América (UMMZ); Museo de Zoología, Academia de Ciencias de Philadelphia, Estados Unidos de América (ANSP); Museo de Ciencia y Tecnología, Pontificia Universidad de Rio Grande del Sur, Brasil (MCP). Se analizaron ejemplares pertenecientes a 15 especies válidas y a 3 no descritas del género *Austrolebias*: *A. adloffi*, *A. affinis* Amato, 1986, *A. alexandri* Castello & López, 1975, *A. arachan*, Loureiro *et al* (en prensa) *A. bellottii* Steindachner, 1876, *A. charrua* Costa & Cheffe, 2001 *A. cinereus* Amato, 1986, *A. cyaenus* Amato, 1987, *A. duraznensis* García *et al*, 1995, *A. gymnoventris*, *A. luteoflamulatus*, *A. melanoorus* Amato 1986, *A. nigripinnis* Regan, 1912, *A. vandenbergi* Huber, 1995, *A. vazferreirai* Berkenkamp *et al*, 1994, *A. viarius*, *A. sp1* y *A. sp3*; 1 especie válida de *Cynolebias*: *C. microphthalmus* Costa, 1995; y 4 especies válidas de *Megalebias*: *M. cheradophilus* Vaz-Ferreira, Soriano y Scaglia, 1964, *M. elongatus* Steindachner, 1876 *M. prognathus* Amato, 1986 y *M. wolterstorffi* Ahl, 1925. Los detalles de los lotes utilizados para cada especie se dan en el Apéndice I.

Para este análisis se utilizaron caracteres osteológicos, de morfología externa y merísticos. Los elementos óseos fueron observados bajo lupa binocular en especímenes doblemente transparentados para cartílago y hueso con el procedimiento de Dingerkus & Uhler (1977). El centro caudal compuesto fue contado como un elemento único en los conteos vertebrales totales y parciales. La terminología de huesos y cartílagos corresponde a Parenti

(1981) y a Costa (1990 y 1998). La nomenclatura de las series de neuromastos corresponde a Costa (2001). En las figuras de elementos óseos en vista lateral la parte anterior está hacia la izquierda; en las de vista ventral o dorsal la parte anterior está hacia arriba.

Los caracteres polimórficos fueron codificados y analizados alternativamente mediante los siguientes métodos: “frequency bins” y “no ordenado” (Wiens, 1995; Wiens & Servedio, 1997; Wiens, 2000). Estos métodos son utilizables cuando el polimorfismo consiste solamente de dos estados. El primero asigna un peso al estado del carácter de acuerdo a la frecuencia de aparición del estado derivado, por ej. **estado 0** = frecuencia del estado derivado entre 0 y 10%, **estado 1** = frecuencia del estado derivado entre 11 y 20%, etc. Luego los estados del carácter se analizan de manera ordenada asumiendo que una característica derivada debe pasar por un estado polimórfico entre la ausencia y la fijación. El método “no ordenado” codifica la ausencia total como un estado, el polimorfismo (sin importar su frecuencia) como otro y la presencia total como otro. Luego los caracteres se analizan de manera no ordenada.

Los caracteres cuantitativos discretos con amplia variación, como son los caracteres merísticos, fueron codificados mediante dos métodos alternativos: a) el método de cuartiles modificado (Almeida & Bisby, 1984) y b) el método “gap weighting” definido por Thiele (1993).

Para definir el umbral donde el estado del carácter cambia, el primer método divide el rango de variación total de cada especie en cuartiles que luego son utilizados para encontrar las áreas donde no hay sobre-posición entre especies o donde la misma ocurre en los cuartiles externos. Como la utilización de los cuartiles permite que especies con hasta un 25% de sobre-posición sean asignadas con estados del carácter diferentes, en este trabajo utilicé percentiles, permitiendo una sobre-posición máxima del 10% para asignar especies con

diferentes estados del carácter, o sea que solo utilicé el 80% central de los individuos por especie para asignar los caracteres.

El segundo método utiliza como base alguna medida de centralidad de la distribución de las variables (media, moda o mediana) y luego la estandariza sobre el rango de variación total en los taxa incluidos en el análisis de acuerdo a la siguiente expresión:

$$x_s = \frac{x - \min(\text{total})}{\max(\text{total}) - \min(\text{total})} \times n$$

donde x es la medida central utilizada y n el máximo número de estados del carácter permitidos por el algoritmo de búsqueda utilizado. Los valores obtenidos son redondeados al número entero más cercano. El valor mínimo obtenido es asignado con el estado del carácter 0 y los demás se van asignando ordenadamente respetando las diferencias relativas entre los mismos. Por ejemplo, si la especie **A** presenta el valor mínimo ajustado = 6, ésta recibe el estado del carácter 0, entonces la especie **B** que es la que presenta el valor siguiente = 9, recibe el estado del carácter 3, y así sucesivamente. Los caracteres así codificados son analizados como multiestados ordenados. En el caso del programa utilizado en este trabajo (PAUP), el número máximo de caracteres es 32.

Una de las consecuencias de la utilización de caracteres multiestado analizados de manera ordenada (“frequency bins” y “gap weighting”) es la diferencia de peso que se genera con relación a otros caracteres; cuanto más estados tenga el carácter mayor es la ponderación de unos sobre otros. Como lo que se intenta en este caso es afinar la discriminación entre diferentes estados del carácter y no asignar mayor peso a esos caracteres sobre los otros, se realizó un pesado diferencial de los mismos con el fin de asignar igual importancia a todos los caracteres al realizar el análisis. El criterio de pesado corresponde al llamado “escalamiento

entre caracteres” (Wiens, 2001), en el cual se asigna a estos caracteres un peso igual al de los caracteres de doble estado. Los caracteres codificados con “frequency bins” presentan 10 estados por tanto estos fueron pesados con un factor de 0.1 (1/10). Los caracteres codificados con el método de Thiele presentan 32 estados por tanto fueron pesados por un factor de 0.03 (1/32).

En todos los casos los caracteres cualitativos multiestado no polimórficos se analizaron de manera no ordenada. Los caracteres continuos, salvo donde especificado, fueron codificados mediante el método de percentiles y de manera no ordenada.

Para la polarización de los caracteres y el enraizamiento de los árboles se utilizó el criterio del grupo externo (Maddison *et al.*, 1984). El criterio para la elección de los grupos externos sigue la hipótesis de relaciones filogenéticas de la familia Rivulidae propuestas por Costa (1998a). Los grupos externos utilizados fueron: *Simpsonichthys constanciae* Myers, 1942, *S. chacoensis* Amato, 1986 y *Nematolebias whitei* Myers, 1942, miembros de Simpsonichthyina, grupo hermano de Cynolebiatina (*Cynolebias* + *Megalebias* + *Austrolebias*); *Cynopoecilus melanotaenia* Regan, 1912, miembro de Cynopoecilini grupo hermano de Cynolebiatini (Simpsonichthyina + Cynolebiatina); *Papiliolebias bitteri* Costa, 1998 y *Rivulus* sp miembros de Rivulinae, grupo hermano de Cynolebiatinae (Cynopoecilini + Cynolebiatini) (figura 1C).

El principio de máxima parsimonia (Wiley, 1981) fue usado para encontrar la topología del o los árboles filogenéticos que más “económicamente” resumen los resultados del análisis de los caracteres. Los árboles filogenéticos construidos, sus índices de consistencia (IC) y retención (IR) fueron obtenidos utilizando el algoritmo heurístico general con el software PAUP*, version 4.0 (Swofford, 1998). La optimización de los cambios de estado de los caracteres se realizó mediante el procedimiento ACCTRAN (Accelerated Transformation), el cual ante la ocurrencia de homoplasias privilegia un origen basal de los

caracteres seguido de reversiones (Kitching *et al.*, 1998). El soporte de los nodos de los árboles obtenidos fue calculado mediante análisis de Bootstrap (Felsenstein, 1985) usando el algoritmo heurístico simple de PAUP 4.0 con 1000 replicas, y el índice de Bremer utilizando el programa TreeRot (M. D. Sorenson, Univ. of Michigan, Ann Arbor, 1996).

Resultados

Series de transformación de los caracteres

Cráneo

1. Serie exterior de dientes en las mandíbulas: uno o dos dientes caniniformes en el dentario y la premaxila más desarrollados que el resto de los dientes en los grupos externos, *C. microphthalmus*, *M. cheradophilus* y *Austrolebias* (**estado 0**) (fig. 9B), varios dientes caniniformes en esos elementos óseos en *M. elongatus*, *M. prognathus* y *M. wolterstorffi* (**estado 1**) (fig. 9A).
2. Largo de la mandíbula: del mismo largo que el suspensorio en grupos externos, *C. microphthalmus*, *M. cheradophilus* y *Austrolebias* (**estado 0**) (fig 9B), más larga que el suspensorio *M. elongatus*, *M. prognathus* y *M. wolterstorffi* (**estado 1**) (fig. 9A).

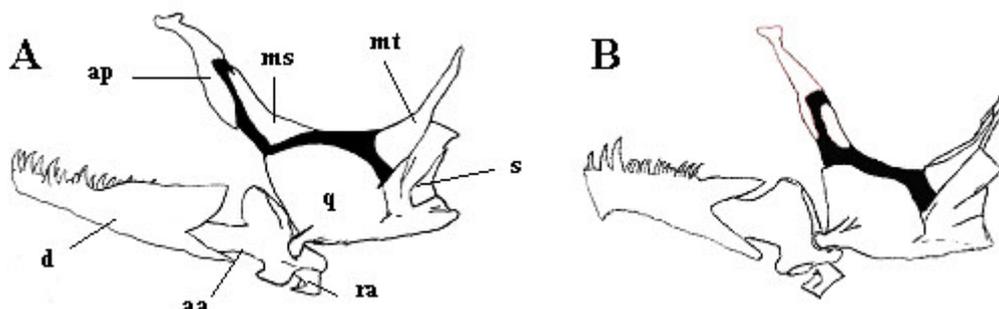


Figura 9. Vista lateral izquierda del arco mandibular inferior y arco suspensorio de: **A.** *M. prognathus* y **B.** *M. cheradophilus*; **aa** = anguloarticular, **ap** = autopalatino, **d** = dentario, **ms** = mesoptergoides, **mt** = metaptergoides, **q** = cuadrado, **ra** = retroarticular, **s** = simplético. Área en negro representa cartilago.

3. Proceso anterior del brazo alveolar de la premaxila: desarrollado en la mayoría de las especies (**estado 0**) (fig. 11A,C), reducido en *M. prognathus*, *M. elongatus* (**estado 1**) (fig. 11B,D).
4. Proceso ascendente del premaxilar: largo (aprox. 1/3 del resto del hueso) (**estado 0**) (fig. 11A,C), corto (aprox. 1/4 del resto del hueso) en *M. prognathus* y *M. wolterstorffi* (**estado 1**) (fig. 11B).
5. Proceso dorsal de la maxila reducido en *Rivulus* sp, *P. bitteri* y *C. melanotaenia* (**estado 0**) (fig. 10A), desarrollado en todos los demás (**estado 1**) (fig. 10B).

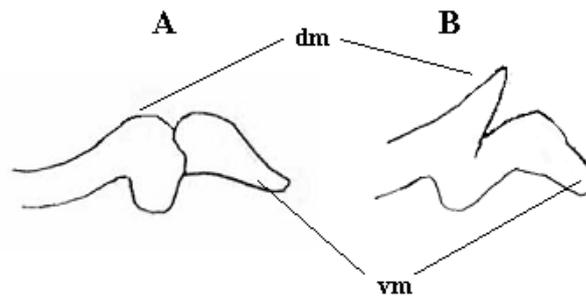


Figura 10. Vista dorsal del extremo dorsal de la maxila en: **A.** *Rivulus* sp, **B.** *A. sp1*.

6. Maxila: fina en todos excepto en los indicados (**estado 0**) (fig. 11D), gruesa en *Rivulus* sp, *S. constanciae* y *C. microphthalmus* (**estado 1**) (fig. 11C).

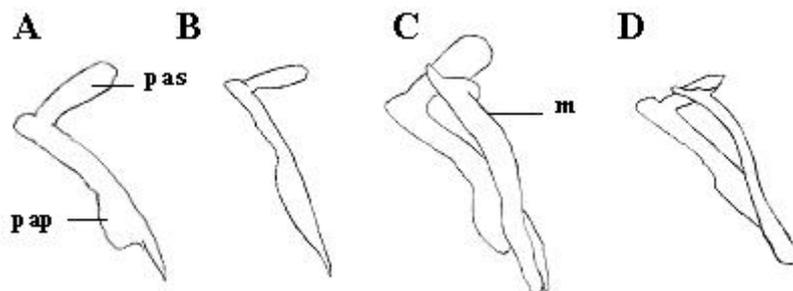


Figura 11. Vista lateral izquierda de: **A.** premaxila de *A. sp1*, **B.** premaxila de *M. prognathus*, **C.** premaxila y maxila de *C. microphthalmus*, **D.** premaxila y maxila de *M. elongatus*; **pas** = proceso ascendente de la premaxila, **pap** = proceso alveolar de la premaxila.

7. Desarrollo del proceso dorsal del anguloarticular: reducido en los grupos externos (**estado 0**)(fig. 12B), medio en la mayoría excepto los indicados (**estado 1**)(fig. 12C), muy desarrollado en *Megalebias* y *A. vazferreirai* (**estado 2**)(fig. 12A).
8. Proceso ventral del anguloarticular: medio (**estado 0**)(fig. 12A,C), muy desarrollado en *N. whitei* (**estado 1**) (fig. 12B).

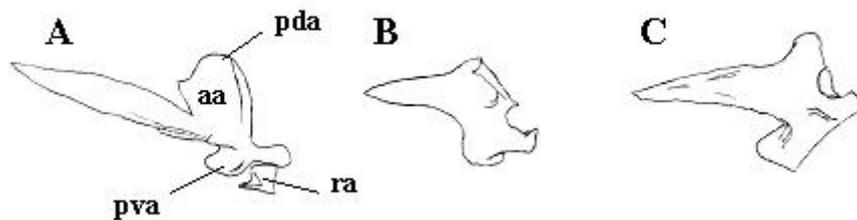


Figura 12. Vista lateral izquierda de: **A.** anguloarticular de *M. prognathus*, **B.** anguloarticular de *N. whitei*, **C.** anguloarticular de *C. microphthalmus*; **aa** = anguloarticular, **pda** = proceso dorsal del anguloarticular, **pva** = proceso ventral del anguloarticular, **ra** = retroarticular.

9. Proceso dorsal del autopalatino: ausente en grupos externos (**estado 0**)(fig. 13B), presente en *Cynolebias*, *Megalebias* y *Austrolebias* (**estado 1**) (fig. 13A).
10. Porción ectopterigoidea del autopalatino: de igual longitud que la porción dérmica del autopalatino (**estado 0**)(fig. 13A), reducida en *N. whitei*, *C. melanotaenia*, *S. chacoensis* (**estado 1**)(fig. 13B).
11. Largo del mesopterigoidea: más corto que el autopalatino en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *S. constanciae* y *S. chacoensis* (**estado 0**)(fig 13B), tan largo como el autopalatino en todos los demás (**estado 1**) (fig. 13A).

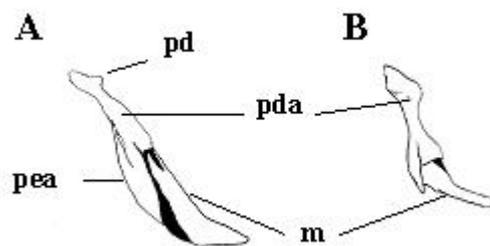


Figura 13. Vista lateral izquierda del autopalatino y mesopterigoides de: **A.** *A. arachan*, **B.** *S. chacoensis*; **m** = mesopterigoides, **pd** = proceso dorsal del autopalatino, **pda** = porción dérmica del autopalatino, **pea** = porción ectopterigoidea del autopalatino. Area en negro representa cartilago.

12. Porción anterior expandida del metapterigoides: ausente (**estado 0**)(fig. 9B), presente en *C. microphthalmus* y *M. prognathus* (**estado 1**) (fig. 9A).

13. Cartílago rostral: mitad anterior cubierta por el proceso ascendente del premaxilar (**estado 0**)(fig. 14B), solamente borde anterior cubierto por el proceso ascendente del premaxilar en *N. whitei*, *S. constanciae*, *S. chacoensis* (**estado 1**) (fig. 14A).

14. Forma del Cartílago rostral: más largo que ancho (**estado 0**)(fig. 14B), más ancho que largo en *N. whitei* y *A. melanoorus* (**estado 1**) (fig. 14A).

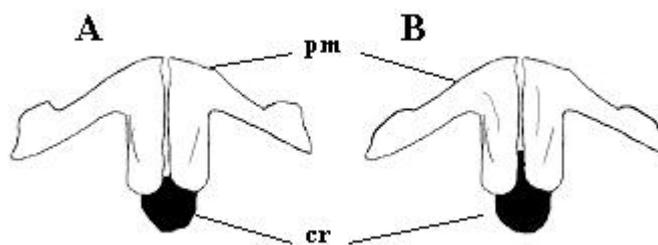


Figura 14. Vista dorsal de la premaxila y el cartílago rostral de: **A.** *N. whitei*, **B.** *A. vazferreirai*; **cr** = cartílago rostral, **pm** = premaxila. Area en negro representa cartilago.

15. Osificación dorsal del dermoesfenótico: presente en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *S. chacoensis*, *S. constanciae*, *N. whitei*, *A. vandenbergi*, *A. bellottii*, *A. melanoorus* (**estado 0**) (fig. 15)., ausente en los demás (**estado 1**)

16. Osificación ventral del dermoesfenótico: ausente (**estado 0**), presente en *S. constanciae*, *A. bellottii*, *A. vandenbergi* (**estado 1**) (fig. 15).

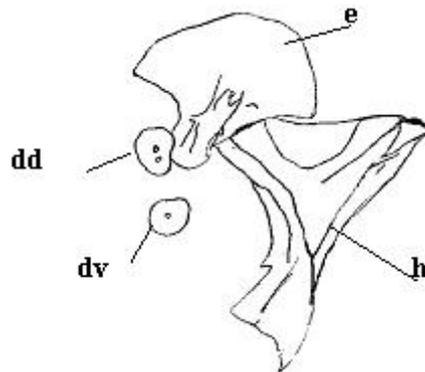


Figura 15. Vista lateral izquierda de las osificaciones del dermoesfenótico en *A. vandenbergi*; **dd** = osificación dorsal del dermoesfenótico, **dv** = osificación ventral del dermoesfenótico, **e** = esfenótico, **h** = hiomandibular.

17. Superficie de articulación del lacrimal con el etmoides lateral: ausente (**estado 0**) (fig. 16C), presente en *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 1**) (fig. 16A,B).

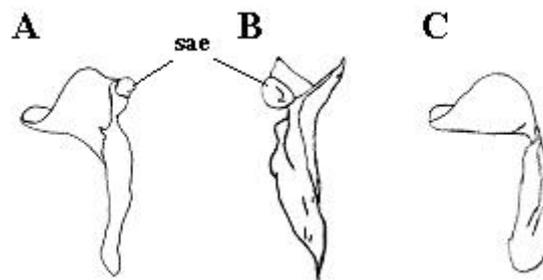


Figura 16. Hueso lacrimal: **A.** vista lateral izquierda y **B** vista posterior de *M. elongatus*, **C.** lateral de *A. vandenbergi*; **sae** = superficie de articulación con el etmoides lateral.

18. Procesos supraoccipitales: separados en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia* y *N. whitei* (**estado 0**)(fig. 17A), unidos en su borde proximal en *P. bitteri*, *S. constanciae*, *C.*

microphthalmus, *Megalebias* y la mayoría de *Austrolebias* (**estado 1**)(fig. 17B), fusionados en *A. melanoorus* (**estado 2**) (fig. 17C).

19. Tamaño del epiótico: extremo anterior no sobrepasa la curvatura lateral del supraoccipital en la mayoría excepto donde indicado (**estado 0**) (fig. 17 B,C), extremo anterior sobrepasa la curvatura lateral del supraoccipital en *N. whitei*, *S. chacoensis* y *S. constanciae* (**estado 1**) (fig. 17A).

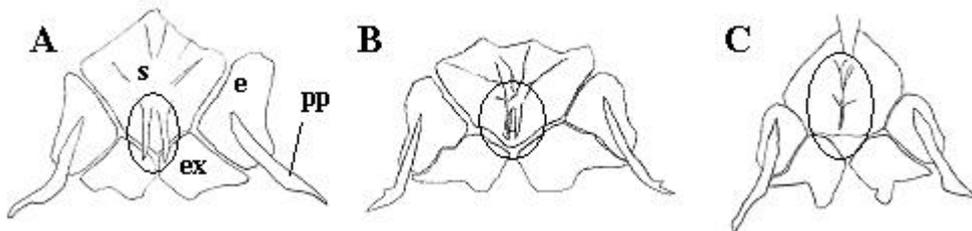


Figura 17. Vista dorsal de la porción posterior del cráneo de: **A.** *N. whitei*, **B.** *A. sp1*, **C.** *A. melanoorus*; **e** = epiótico, **ex** = exoccipital, **pp** = posttemporal, **s** = supraoccipital. Los círculos indican los procesos supraoccipitales.

20. Proceso del esfenótico: angosto (**estado 0**)(fig. 18B), robusto en *Megalebias* y *C. microphthalmus* (**estado 1**) (fig. 18A).

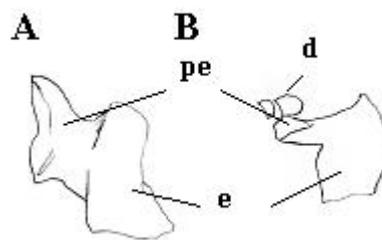


Figura 18. Vista dorsal del esfenótico de: **A.** *M. prognathus*, **B.** *A. vandenbergi*; **d** = osificaciones del dermosfenótico, **e** = esfenótico, **pe** = proceso del esfenótico.

Arcos branquiales

21. Hueso ceratohyal: corto (**estado 0**)(fig 19B), expandido en *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 1**) (fig. 19A).

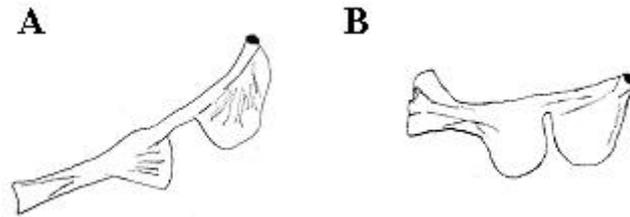


Figura 19. Vista lateral izquierda del ceratohyal de: **A.** *M. prognathus*, **B.** *M. cherdophilus*.

22. Número de branquiespinas en epibranchial 1: entre 0 y 1 en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**), entre 1 y 2 en *C. melanotaenia* (**estado 1**), entre 2 y 3 en *Symptsonichthys*, *A. gymnoventris*, *A. arachan*, *A. sp1*, *A. adloffii*, *A. nigripinnis*, *A. duraznensis*, *A. cyaenus*, *A. affinis*, *A. charrua*, *A. alexandri*, *A. cinereus*, *A. luteoflamulatus*, *M. wolterstorffi* (**estado 2**), entre 3 y 5 en *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *A. vandenbergi*, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. sp3*, *A. vazferreirai*, *A. melanoorus*, *M. cherdophilus*, *M. elongatus*, *M. prognathus* (**estado 3**).
23. Número de branquiespinas en ceratobranquial 1: menos de 7 en *P. bitteri* (**estado 0**), entre 7 y 8 en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *A. nigripinnis*, *A. duraznensis*, *A. cyaenus*, *A. affinis*, *A. alexandri*, *A. luteoflamulatus*, *A. gymnoventris* (**estado 1**), entre 8 y 12 en *N. whitei*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *C. microphthalmus*, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. vazferreirai*, *A. charrua*, *A. melanoorus*, *A. adloffii*, *A. cinereus*, *A. sp1*, *A. arachan* y *A. sp3*, *M. cherdophilus* y *M. wolterstorffi* (**estado 2**), más de 12 en *A. vandenbergi*, *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 3**).

24. Denticulos sobre branquiespinas del ceratobranquial 1: ausentes (**estado 0**), presentes en *C. microphthalmus*, *M. wolterstorffi* y *M. prognathus* (**estado 1**) (fig. 20).

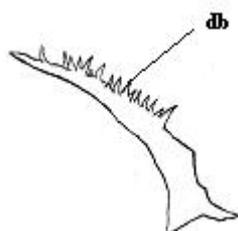


Figura 20. Vista lateral izquierda de una branquiespina del ceratobranquial 1 de *M. prognathus*; **db** = denticulos.

25. Dientes en el faringobranquial 2: sin dientes en *C. microphthalmus*, *N. whitei* y *M. cheradophilus* (estado 0)(fig. 21A), con número variable de dientes en todos los demás (estado 1)(fig. 21B).

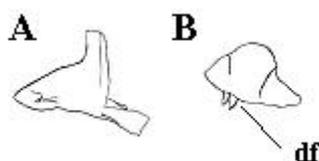


Figura 21. Vista anterior del faringobranquial 2 izquierdo de: **A.** *C. microphthalmus*, **B.** *A. arachan*; **df** = dientes del faringobranquial 2.

26. Porcentaje de cartilago en el basihyal: menos de 45% en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *N. whitei*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *C. microphthalmus*, *A. vazferreirai*, *A. gymnoventris*, *A. luteoflamulatus*, *M. cheradophilus*, *M. elongatus* (**estado 0**)(fig. 22B), entre 45 y 70% en *C. melanotaenia*, *A. adloffii*, *A. nigripinnis*, *A. duraznensis*, *A. cyaeus*, *A. affinis*, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. charrua*, *A. alexandri*, *A. melanoorus*, *A. cinereus*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3*, *M. prognathus* y *M. wolterstorffi* (**estado 1**)(fig. 22 C), más de 70% en *A. vandenbergi* (**estado 2**) (fig. 22A).

27. Forma del basihyal: triangular en *Rivulus* sp, *S. chacoensis*, *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *M. elongatus*, *M. cheradophilus*, *M. prognathus*, *A. vazferreirai* y *A. cinereus* (**estado 0**)(fig. 22B), alargado en *P. bitteri*, *S. constanciae* y *C. melanotaenia* (**estado 1**)(fig. 22C), forma de paleta en *A. adloffii*, *A. nigripinnis*, *A. duraznensis*, *A. cyaenus*, *A. affinis*, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. charrua*, *A. alexandri*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3*, *A. vandenbergi*, *A. melanoorus* y *M. wolterstorffi* (**estado 2**) (fig. 22A).

28. Tamaño del basihyal: grande, más de tres veces el largo del hipohyal ventral en la mayoría excepto donde indicado (**estado 0**)(fig. 22 A,C), reducido (no más de dos veces el largo del hipohyal ventral) en *M. elongatus*, *M. wolterstorffi*, y *M. cheradophilus* (**estado 1**) (fig. 22B).

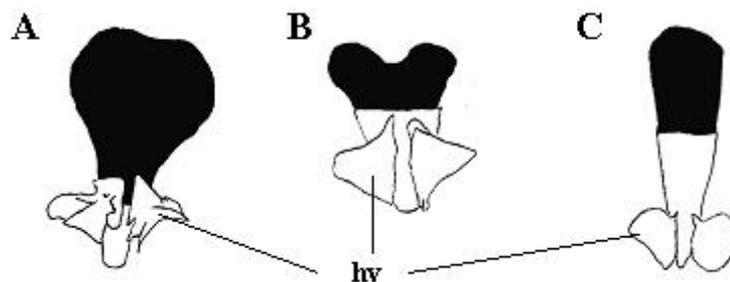


Figura 22. Vista ventral del basihyal y los hipohyales ventrales de: **A.** *A. vandenbergi*, **B.** *M. cheradophilus*, **C.** *C. melanotaenia*; **hv** = hipohyal ventral. Area en negro representa cartilago.

29. Forma del basibranchial 1: estrangulado en la porción central dorsal y ventral en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**)(fig. 23A), no estrangulado en todos los demás (**estado 1**) (fig. 23B).

30. Forma del basibranchial 2: porción media escotada en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**)(fig. 23A), forma escamoide en todos los demás (**estado 1**) (fig. 23B).

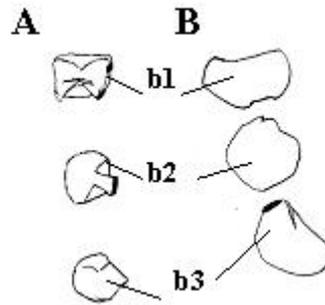


Figura 23. Vista ventral de los basibranchiales de: **A.** *P. bitteri*, **B.** *A. vazferreirai*; **b1** = basibranchial 1, **b2** = basibranchial 2, **b3** = basibranchial 3. Area en negro representa cartilago.

31. Forma del urohyal: alargado (relación largo alto $\frac{1}{4}$) en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *M. wolterstorffi*, *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 0**)(fig. 24A), alto (relación largo alto $\frac{1}{3}$) en *P. bitteri*, *M. cheradophilus* y *Austrolebias* (**estado 1**) (fig. 24B).

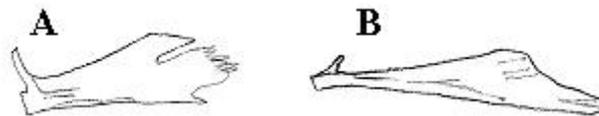


Figura 24. Vista lateral izquierda del urohyal de: **A.** *M. cheradophilus*, **B.** *M. prognathus*.

32. Forma del faringobranquial 2: triangular (**estado 0**)(fig. 21B), forma de “helice” con tres puntas en *C. microphthalmus* y *N. whitei* (**estado 1**) (fig. 21A).

33. Expansión dorsal del epibranchial 4: desarrollada en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**)(fig. 25B), poco desarrollada en todos los demás (**estado 1**) (fig. 25A).

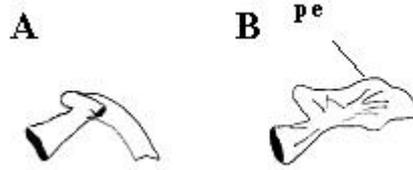


Figura 25. Vista anterior del epibranchial izquierdo de: **A.** *A. arachan*, **B.** *P. bitteri*; **pe** = expansión dorsal del epibranchial. Área en negro representa cartílago.

Serie Opercular

34. Expansión anterior del preopérculo: muy desarrollada en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia* y *N. whitei* (**estado 0**)(fig. 26A), expansión pequeña en todos los demás (**estado 1**) (fig. 26B).

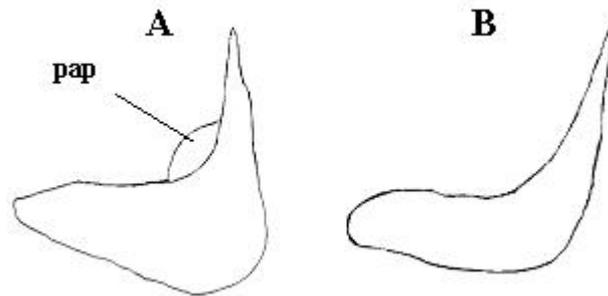


Figura 26. Vista lateral izquierda del preoperculo de: **A.** *C. melanotaenia*, **B.** *M. wolterstorffi*; **pap** = proceso anterior del preoperculo.

35. Proceso dorsal del interopérculo: desarrollado (**estado 0**)(fig. 27B), reducida o ausente en *M. wolterstorffi*, *A. luteoflamulatus* y *A. gymnoventris* (**estado 1**) (fig. 27A).



Figura 27. Vista lateral izquierda del interopérculo de: **A.** *A. gymnoventris*, **B.** *A. arachan*. La flecha indica el proceso dorsal.

Cinturas

36. Proceso ventral del postemporal:

A (no ordenado), ausente en 100% de los individuos en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *M. prognathus* (**estado 0**) (fig. 28B), polimórfico en *S. constanciae*, *A. cyaeus*, *A. affinis*, *A. luteoflamulatus*, *A. nigripinnis*, *A. alexandri*, *A. gymnoventris*, *A. duraznensis*, *A. vazferreirai*, *A. cinereus*, *A. viarius*, *A. charrua*, *A. adloffii*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3*, *M. cheradophilus*, *M. elongatus* y *M. wolterstorffi* (**estado 1**) presente en todos los individuos en *P. bitteri*, *S. chacoensis*, *A. vandenbergi*, *A. bellottii*, *A. melanoorus* (**estado 2**) (fig. 28A).

B (frequency bins), 100 a 90% ausente (**estado 0**), entre 89 y 80% (**estado 1**), entre 79 y 70% (**estado 2**), entre 69 y 60% (**estado 3**), entre 59 y 50% (**estado 4**), entre 49 y 40% (**estado 5**), entre 39 y 30% (**estado 6**), entre 29 y 20% (**estado 7**), entre 19 y 10% (**estado 8**), entre 9 y 0% (**estado 9**).

37. Relación postemporal-supracleitro: supracleitro más pequeño que postemporal en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**) (fig 28C), ambos huesos similares en tamaño en todos excepto donde indicado (**estado 1**) (fig 28A,B).

38. Fusión de postemporal y supracleitro: fusionados en *Rivulus* sp y *C. microphthalmus* (**estado 0**) (fig. 28C), no fusionados en todos los demás (**estado 1**) (fig. 28A.C).

39. Forma del Cleitro: ancho en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia* y *N. whitei* (**estado 0**) (fig. 29A), estilizado en todos los demás (**estado 1**) (fig. 29B).

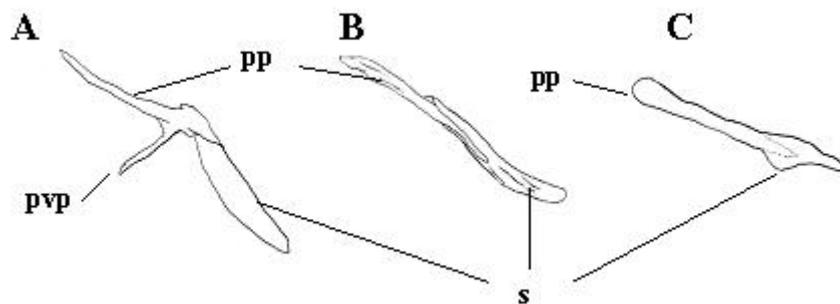


Figura 28. Vista lateral izquierda del posttemporal y supracleitro de: **A.** *A. vazferreirai*, **B.** *M. prognathus*, **C.** *C. microphthalmus*; **pp** = posttemporal, **pvp** = proceso ventral del posttemporal, **s** = supracleitro.

40. Forma de la escápula: triangular en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia*, *N. whitei* y *S. constanciae* (**estado 0**) (fig. 29A), circular en todos los demás (**estado 1**) (fig. 29B).

41. Forma del coracoides: borde inferior dirigido ventralmente en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia* y *N. whitei* (**estado 0**)(fig. 29A), borde inferior dirigido anteriormente (**estado 1**) (fig. 29B).

42. Presencia del radial pectoral dorsal:

A (no ordenado), presente en 100% de los individuos en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *S. chacoensis* y *N. whitei* (**estado 0**)(fig. 29A), polimórfico en *A. belllotti*, *A. melanoorus*, *A. cyaenus*, *A. nigripinnis*, *A. affinis*, *A. duraznensis*, *A. alexandri*, *A. gymnoventris*, *A. viarius*, *A. charrua*, *A. luteoflamulatus*, *A. sp1*, *A. arachan*, *M. cheradophilus*, *M. wolterstorffi* y *M. elongatus* (**estado 1**), ausente en todos los demás (**estado 2**) (fig. 29B).

B (frequency bins), entre 100 y 90% (**estado 0**), entre 89 y 80 (**estado 1**), entre 79 y 70 (**estado 2**), entre 69 y 60 (**estado 3**), entre 59 y 50 (**estado 4**), entre 49 y 40 (**estado 5**), entre 39 y 30 (**estado 6**), entre 29 y 20 (**estado 7**) entre 19 y 10 (**estado 8**) entre 9 y 0 (**estado 9**).

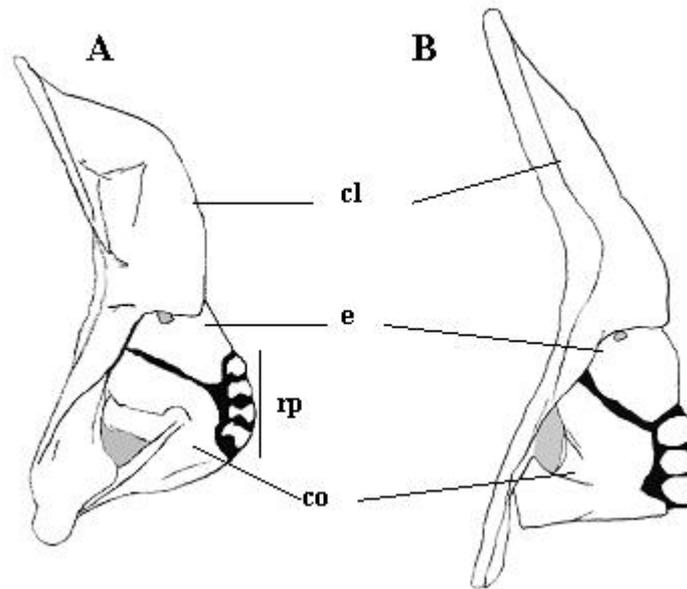


Figura 29. Vista lateral izquierda de la cintura pectoral de: **A.** *N. whitei*, **B.** *C. microphthalmus*; **cl** = cleitro, **co** = coracoides, **e** = escápula, **rp** = radiales pectorales. Área en negro representa cartilago.

43. Huesos pélvicos: solapados en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**)(fig. 30A), juntos en el borde en interno en *A. bellottii* y *A. vandenbergi* (**estado 1**)(fig. 30B), separados en todos los demás (**estado 2**) (fig. 30C).

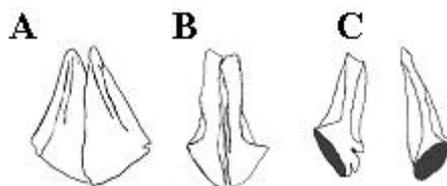


Figura 30. Vista ventral de los huesos pélvicos de: **A.** *P. bitteri*, **B.** *A. vandenbergi*, **C.** *A. arachan*. Área en negro representa cartilago.

Vértebras

44. Número de vértebras caudales: menos de 16 en *P. bitteri*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *A. gymnoventris*, *A. nigripinnis* y *A. alexandri* (**estado 0**), entre 16 y 19 vértebras en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *N. whitei*, *A. adloffii*, *A. duraznensis*, *A.*

cyaenus, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. vazferreirai*, *A. charrua*, *A. luteoflamulatus*, *A. melanoorus*, *A. cinereus*, *A. sp1*, *A. arachan* y *A. sp3* (**estado 1**), más de 19 vértebras en *C. microphthalmus*, *Megalebias* y *A. vandenbergi* (**estado 2**).

45. Número de vértebras abdominales: menos de 14 en todos excepto donde indicado (**estado 0**), más de 14 en *M. cheradophilus*, *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 1**).

46. Prezygapophysis de las vértebras abdominales anteriores:

A (no ordenado), desarrolladas en el 100% de los individuos en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *S. chacoensis*, *C. microphthalmus*, *A. vandenbergi* (**estado 0**)(fig. 31A), polimórfico en *C. melanotaenia*, *N. whitei*, *S. constanciae*, *A. cinereus*, *A. nigripinnis*, *A. vazferreirai*, *A. bellottii*, *A. cyaenus*, *A. affinis*, *A. duraznensis*, *A. melanoorus*, *A. gymnoventris*, *A. alexandri*, *A. charrua*, *A. luteoflamulatus*, *A. viarius*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3*, *M. prognathus*, *M. cheradophilus* (**estado 1**) ausente en todos los individuos en *A. adloffii*, *M. elongatus*, *M. wolterstorffi* (**estado 2**)(fig. 31B).

B (frequency bins), 100 a 90% desarrolladas (**estado 0**), 89 a 80% (**estado 1**), 79 a 70% (**estado 2**), 69 a 60% (**estado 3**), 59 a 50% (**estado 4**), 49 a 40% (**estado 5**), 39 a 30% (**estado 6**), 29 a 20% (**estado 7**), 19 a 10% (**estado 8**), 9 a 0% (**estado 9**).

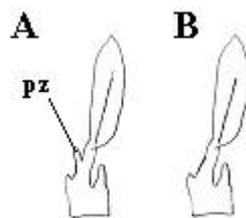


Figura 31. Vista lateral izquierda de la segunda vértebra de: **A.** *A. vandenbergi*, **B.** *A. adloffii*; pz = prezygapófisis anterior.

47. Número de vértebras que participan en el sostén de la aleta caudal: entre 3 y 5 vértebras (**estado 0**), más de 5 vértebras en *C. microphthalmus* y *Megalebias* (**estado 1**).

Aletas

48. Número de radios de aleta caudal:

A. Percentiles, menos de 26 radios en *P. bitteri*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *A. vandenbergi*, *A. charrua*, *A. adloffii*, *A. luteoflamulatus*, *A. viarius*, *A. affinis*, *A. gymnoventris*, *A. duraznensis*, *A. bellottii*, *A. nigripinnis*, *A. alexandri*, *A. sp 3*, *A. sp1*, *A. arachan* (**estado 0**), entre 26 y 30 radios en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *N. whitei*, *A. cyaeus*, *A. melanoorus*, *A. cinereus*, *A. vazferreirai* (**estado 1**), entre 30 y 34 radios en *C. microphthalmus*, *M. cheradophilus*, *M. prognathus*, *M. wolterstorffi* (**estado 2**), más de 34 radios en *M. elongatus* (**estado 3**).

B. “Gap weighing” (apéndice II)

49. Número de radios de la aleta dorsal de los machos:

A. Percentiles, menos de 10 radios en *Rivulus* sp (**estado 0**), entre 10 y 15 radios en *P. bitteri* (**estado 1**), entre 15 y 19 radios en *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *M. elongatus*, *M. prognathus* y *M. wolterstorffi* (**estado 2**), más de 19 radios en *Austrolebias*, *M. cheradophilus* (**estado 3**).

B. “Gap weighing” (apéndice III).

50. Número de radios del aleta dorsal de las hembras:

A. Percentiles, menos de 10 radios en *Rivulus* sp (**estado 0**), entre 10 y 16 radios en *P. bitteri* y *N. whitei* (**estado 1**), más de 16 radios en todos los demás (**estado 2**).

B. “Gap weighing” (apéndice IV).

51. Número de radios de la aleta anal en los machos:

A. Percentiles, menos de 14 radios en (**estado 0**), entre 14 y 20 radios en *P. bitteri* y *C. microphthalmus* (**estado 1**), entre 20 y 28 radios en *C. melanotaenia*, *N. whitei*, *Megalebias* y mayoría de *Austrolebias* (**estado 2**), más de 28 radios en *A. bellottii* y *A. vandenbergi* (**estado 3**).

B. “Gap weighing” (apéndice V).

52. Número de radios de la aleta anal de las hembras:

A. Percentiles, menos de 16 radios en *Rivulus* sp (**estado 0**), entre 16 y 25 radios en todos los demás excepto donde indicado (**estado 1**), más de 25 radios en *A. bellottii* y *A. vandenbergi* (**estado 2**).

B. “Gap weighing” (apéndice VI).

53. Número de radios de las aletas pectorales: entre 10 y 13 radios en *S. constanciae*, *S. chacoensis* y *Austrolebias* (**estado 0**), entre 12 y 15 radios en todos los demás (**estado 1**).

54. Número de radios de las aletas pélvicas: menos de 4 radios en *M. cheradophilus* (**estado 0**), entre 4 y 6 radios en todos los demás excepto donde indicado (**estado 1**), más de 6 radios en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 2**).

55. Radios medio-posteriores de aleta dorsal de los machos alargados: ausentes en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *Austrolebias*, *Megalebias* y *C. microphthalmus* (**estado 0**), presentes en los demás (**estado 1**) (fig. 32A).
56. Radios medio-posteriores de aleta anal de los machos alargados: ausentes en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *Austrolebias*, *Megalebias* (**estado 0**), presentes en los demás (**estado 1**) (fig. 32A).
57. Forma de aleta anal de las hembras: todos los radios de longitud similar en todos excepto donde indicado (**estado 0**)(fig. 32C), radios anteriores notoriamente más largos en *S. chacoensis*, *A. bellottii*, *A. vandenbergi*, *A. melanoorus*, *A. adloffii*, *A. viarius*, *A. charrua*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3* (**estado 1**) (fig. 32B).

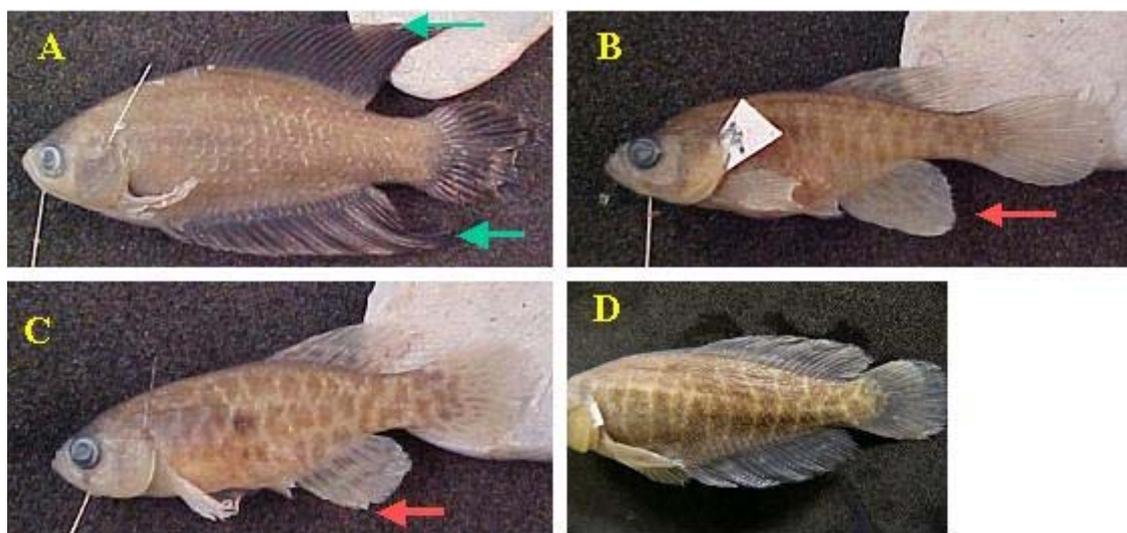


Figura 32. **A.** macho de *S. chacoensis*, **B.** hembra de *A. arachan*, **C.** hembra de *A. affinis*, **D.** macho de *A. vazferreirai*. La flechas verdes señalan los radios de la aleta dorsal y anal alargados; las flechas rojas indican los radios anteriores de la aleta pévica.

58. Posición de las aletas pélvicas: separadas en la mayoría de los individuos en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia*, *C. microphthalmus*, *M. wolterstorffi*, *M. cherdophilus*, *M. elongatus*, *M. prognathus*, *A. luteoflamulatus*, *A. affinis*, *A. cyaenus*, *A. duraznensis*, *A. gymnoventris*, *A. alexandri*, *A. nigripinnis* y *A. vazferreirai* (**estado 0**), aletas unidas por membrana en mayoría de los individuos en *A. viarius*, *A. melanoorus*, *A. charrua*, *A. sp1*, *A. arachan* (**estado 1**), aletas unidas en todos los individuos en *A. adloffii*, *A. bellottii*, *A. vandenbergi*, *A. sp3* (**estado 2**).

59. Posición de la aleta dorsal de los machos:

A. Percentiles, entre V6 y V10 en todos excepto donde indicado (**estado 3**), entre V10 y V14 en *P. bitteri*, *N. whitei*, *M. cherdophilus*, *M. wolterstorffi* (**estado 2**), entre V14 y V18 en *C. microphthalmus*, *M. elongatus* y *M. prognathus* (**estado 1**), más allá de V18 en *Rivulus* sp (**estado 0**) (fig 42).

B. “Gap weighing” (apéndice VII).

60. Posición de aleta dorsal de las hembras:

A. Percentiles, anterior a V12 en todos excepto donde indicado (**estado 0**), entre V13 y V17 en *P. bitteri*, *N. whitei*, *C. microphthalmus* y *Megalebias* (**estado 1**), más allá de V17 en *Rivulus* sp (**estado 2**).

B. “Gap weighing” (apéndice VIII).

61. Papila urogenital de los machos unida al primer radio anal: ausente en todos excepto donde indicado (**estado 0**), presente en *A. bellottii*, *A. melanoorus*, *A. sp3* (**estado 1**).

Escamas

62. Número de escamas en la línea lateral: entre 27 y 35 escamas (**estado 0**), entre 35 y 40 escamas en *M. wolterstorffi* (**estado 1**) más de 40 en *C. microphthalmus*, *M. prognathus*, *M. cheradophilus* *M. elongatus* (**estado 2**).
63. Escamas sobre aleta anal: ausente (**estado 0**), presente en *C. microphthalmus*, *A. vandenbergi*, *M. prognathus* y *M. elongatus* (**estado 1**).
64. Numerosas series de escamas sobre aleta caudal: ausentes (**estado 0**), presentes en *M. elongatus* (**estado 1**).
65. Escamas en región abdominal y preopercular: presentes (**estado 0**), ausentes en *A. gymnoventris* (**estado 1**).
66. Reducción en el tamaño de las escamas: ausente (**estado 0**), presente en *M. cheradophilus*, *M. prognathus*, *M. elongatus* (**estado 1**).

Neuromastos

67. Número de neuromastos supraorbitales: menos de 10 en *Rivulus* sp y *P. bitteri* (**estado 0**), entre 10 y 16 en *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *N. whitei*, *A. duraznensis*, *A. luteoflamulatus*, *A. nigripinnis*, *A. alexandri*, *A. gymnoventris*, *A. affinis*, *A. cyaenus* (**estado 1**), entre 16 y 23 en *A. viarius*, *A. charrua*, *A. vandenbergi*,

A. adloffii, *A. melanoorus*, *A. cinereus*, *A. vazferreiai*, *A. bellottii*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3*, *M. cheradophilus* (**estado 2**), entre 23 y 32 poros en *M. wolterstorffi* y *M. prognathus* (estado 3), más de 32 poros en *C. microphthalmus* y *M. elongatus* (**estado 3**).

68. Número de neuromastos parietales: menos de 2 en *Rivulus* sp, *P. bitteri*. *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *N. whitei*, *C. melanotaenia*, *A. duraznensis*, *A. luteoflamulatus*, *A. nigripinnis*, *A. alexandri*, *A. gymnoventris*, *A. vazferreirai*, *A. affinis*, *A. cyaenus*, *M. cheradophilus* (**estado 0**), más de 2 en todos los demás (**estado 1**).

69. Porción anteroventral de la serie de neuromastos infraorbital: levemente expandida ventralmente (**estado 0**)(fig. 33A), fuertemente expandida en *Megalebias* y *C. microphthalmus* (**estado 1**) (fig. 33B).

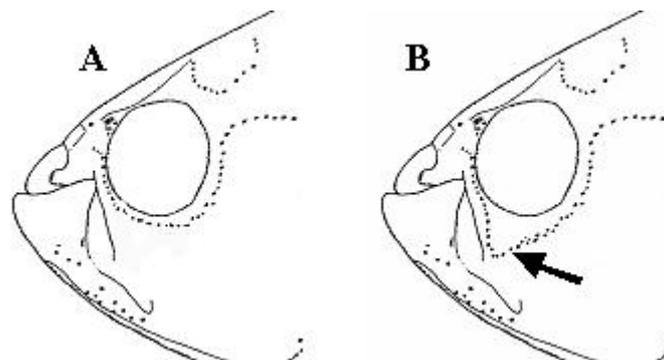


Figura 33. A. *A. vazferreirai*, B. *M. cheradophilus*. La flecha indica la expansión ventral de la serie infraorbital.

Órganos de contacto

70. Órganos de contacto en escamas de los machos (fig. 34A): ausentes en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *N. whitei*, *C. microphthalmus* (**estado 0**), presentes en todos los demás (**estado 1**).
71. Órganos de contacto en la aleta pectoral de los machos (fig. 34B): ausentes en *Rivulus* sp, *P. bitteri*, *C. melanotaenia*, *S. constanciae*, *S. chacoensis*, *A. gymnoventris*, *M. wolterstorffi*, *M. prognathus* (**estado 0**), moderadamente desarrollados en *A. affinis*, *A. cyaenus*, *A. duraznensis*, *A. nigripinnis*, *A. melanoorus*, *A. alexandri*, *A. cinereus*, *A. charrua*, *A. adloffii*, *A. bellottii*, *A. vandenbergi*, *A. viarius*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3* (**estado 1**), muy desarrollados con base ósea en *N. whitei*, *C. microphthalmus*, *A. luteoflamulatus*, *A. vazferreirai*, *M. cheradophilus*, *M. elongatus* (**estado 2**).
72. Órganos de contacto en aleta anal de los machos (fig. 34C): ausentes (**estado 0**), presentes en porción distal de radios anteriores en *A. viarius* y *A. sp 1* (**estado 1**), presentes en toda la extensión de varios radios en *C. microphthalmus*, *A. luteoflamulatus*, *A. cinereus*, *A. vazferreirai*, *M. prognathus*, *M. cheradophilus*, *M. elongatus* (**estado 2**).
73. Órganos de contacto de la aleta anal con base ósea: ausentes (**estado 0**), presentes en *A. luteoflamulatus*, *A. vazferreirai*, *M. cheradophilus*, *M elongatus* (**estado 1**).

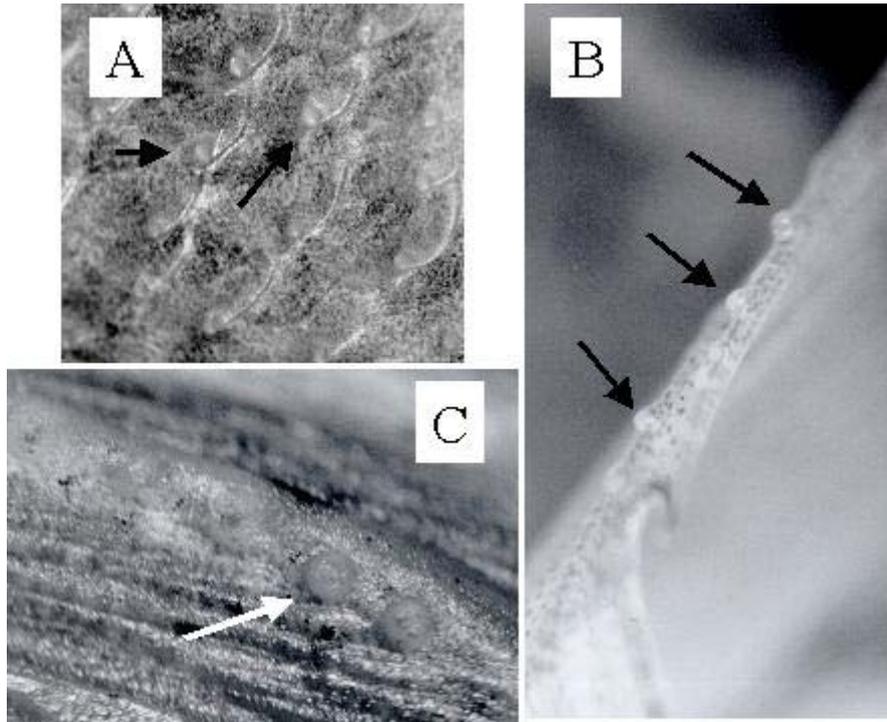


Figura 34. Órganos de contacto en: **A.** escamas del macho de *A. vazferreirai*, **B.** radios de la aleta pectoral de macho de *A. arachan*, **C.** aleta anal de macho de *A. vazferreirai*. Las flechas indican los órganos de contacto.

Pigmentación

74. Manchas en el flanco de las hembras: ausentes en *Rivulus* sp, *C. melanotaenia*, *C. microphthalmus*, *Megalebias*, *A. luteoflamulatus*, *A. gymnoventris*, *A. sp1*, *A. sp2*, *A. sp3* (**estado 0**), presentes en todas las demás (**estado 2**) (fig. 35B).
75. Manchas en el flanco de los machos: ausentes (**estado 0**), presentes en *A. charrua*, *A. viarius*, *A. bellottii*, *A. vandenbergi*, *A. vazferreirai*, *A. cinereus* (**estado 1**) (fig. 35A).
76. Manchas en el pedúnculo caudal: ausentes (**estado 0**), alineadas verticalmente en *A. adloffii*, *A. charrua*, *A. sp1* (**estado 1**), dispuestas irregularmente en *A. duraznensis*, *A. affinis*, *A. cyaenus*, *A. alexandri* (**estado 2**) (fig. 35D).

77. Manchas oscuras en la cabeza: ausentes (**estado 0**), presentes en *C. melanotaenia*, *C. microphthalmus*, *M. cheradophilus* (**estado 1**).

78. Borde inferior de la aleta pectoral negro en ejemplares fijados: ausente (**estado 0**), *A. adloffii*, *A. charrua*, *A. bellottii*, *A. melanoorus*, *A. sp1*, *A. arachan*, *A. sp3* (**estado 1**) (fig. 35C).

79. Banda supraorbital en machos: ausente (**estado 0**), presente en *Austrolebias* y *Megalebias* (**estado 1**) (fig. 35C).

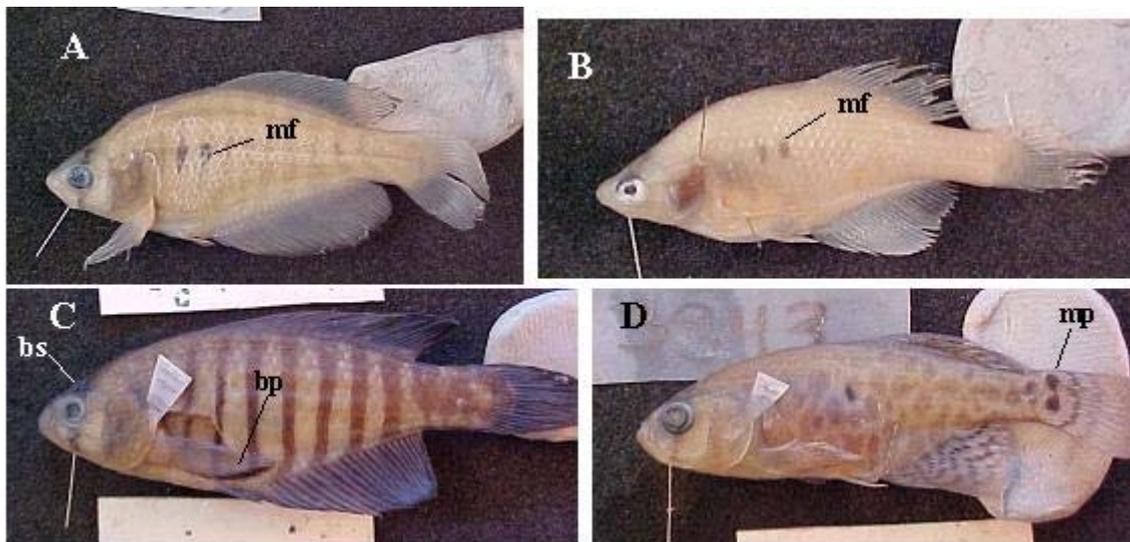


Figura 35. A. macho de *A. vanderbergi*, B. hembra de *A. vanderbergi*, C. macho de *A. sp1*, D. hembra de *A. charrua*; **bp** = banda oscura del borde inferior de la aleta pectoral, **bs** = banda supraorbital, **mf** = manchas en el flanco, **mp** = manchas pedunculares.

80. Mancha negra en porción anterior de aleta dorsal en juveniles: ausente (**estado 0**), presente en *A. nigripinnis* y *A. alexandri* (**estado 1**).

81. Hileras verticales de máculas celestes en el cuerpo de los machos: ausentes (**estado 0**), presentes en *N. whitei*, *S. chacoensis*, *A. bellottii*, *A. vanderbergi*, *A. nigripinnis*, *A. affinis*, *A. cyaenus*, *A. duraznensis*, *A. sp3* (**estado 1**) (fig. 36B)

82. Patrón de pigmentación corporal en machos reticulado: ausente (**estado 0**), presente en *A. vazferreirai* y *A. cinereus* (**estado1**) (fig. 32D).

83. Bandas verticales negras sobre fondo gris claro: ausentes (**estado 0**), presentes en mitad posterior del cuerpo en *A. luteoflamulatus* (**estado 1**) (fig. 36A), presentes en todo el cuerpo en *A. alexandri*, *A. melanoorus*, *A. adloffii*, *A. charrua*, *A. sp2* (**estado 2**)(fig. 35C).



Figura 36. A. *A. luteoflamulatus*, B. *A. nigripinnis*.

Análisis filogenéticos

Del total de 83 caracteres analizados, 80 resultaron filogenéticamente informativos. En el apéndice IX se presenta la matriz utilizada en los análisis.

Caracteres Polimórficos

Se reconocieron 3 caracteres polimórficos doble estado (ch 42, 49 y 53). Para probar los diferentes métodos de codificación de estos caracteres todos los demás fueron analizados de manera no ordenada.

Método “no ordenado”

En este análisis se obtuvieron 8 árboles igualmente parsimoniosos, con un largo de 243 pasos, IC = (0.50 e IR = 0.67). El árbol de consenso estricto, los valores de bootstrap y del índice de Bremer para cada nodo son mostrados en la figura 37.

Método “frequency bins”(0.1)

En este análisis se obtuvieron 2 árboles igualmente parsimoniosos con un largo de 236.9 pasos (IC = 0.46 e IR = 0.65). El árbol de consenso estricto se presenta en la figura 38.

Caracteres cuantitativos

En este caso los caracteres cualitativos (polimórficos o no) fueron siempre analizados de manera no ordenada. Se reconocieron 7 caracteres cuantitativos discretos (ch 59, 61, 63, 65, 67, 75 y 77).

Percentiles (ordenados)

Con este método se obtuvieron 14 árboles igualmente parsimoniosos con un total de 245 pasos, un (IC = 0.50 e IR = 0.68). El árbol de consenso estricto se muestra en la figura 40.

Gap weighting (ordenados)0.03

Con este tipo de codificación se obtuvieron un total de 10 árboles igualmente parsimoniosos con un total de 229.17 pasos, (IC = 0.48 e IR = 0.67). El árbol de consenso estricto se observa en la figura 40.

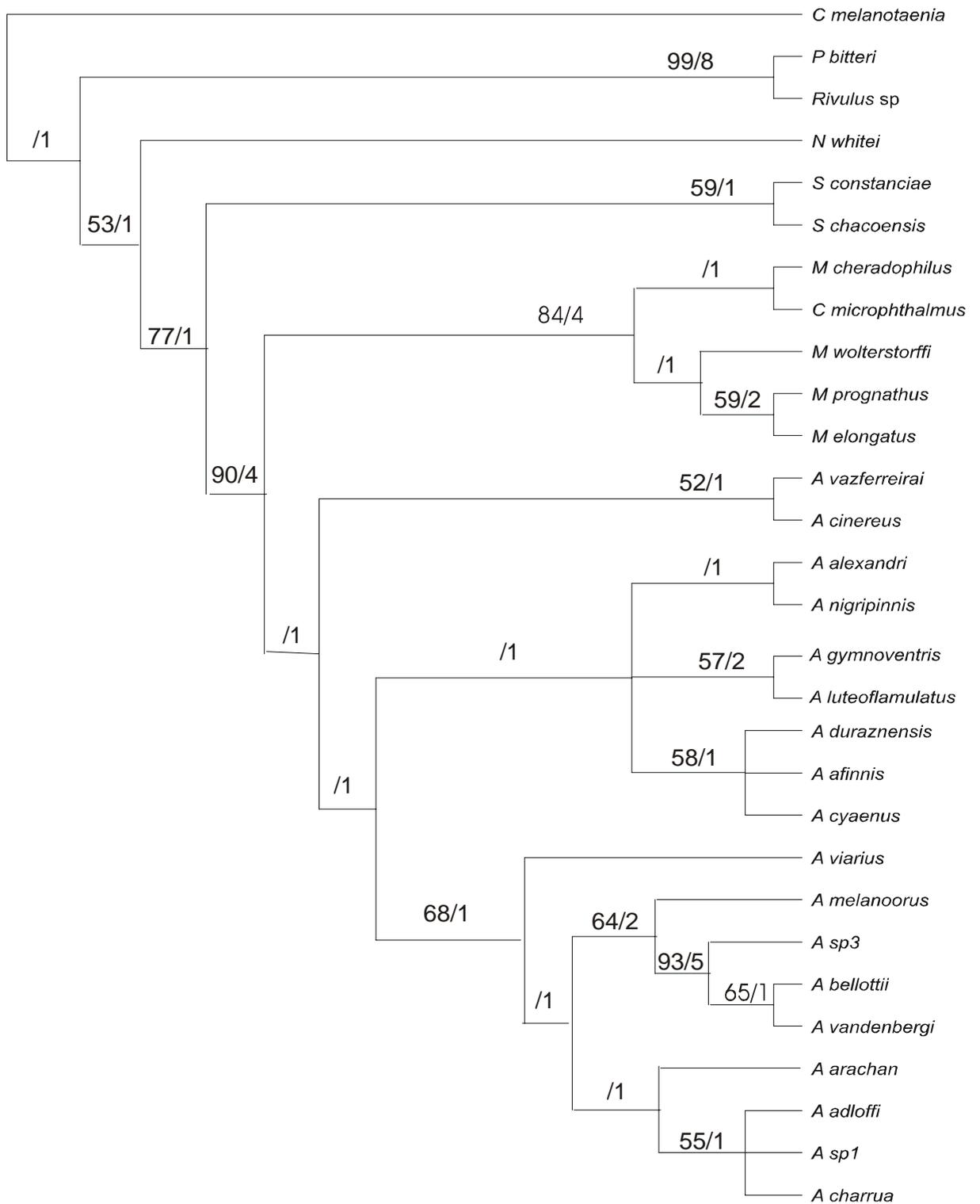


Figura 37. Arbol de consenso estricto correspondiente al análisis codificando todos los caracteres de manera no ordenada. Los valores de Bootstrap aparecen en la base de cada nodo a la izquierda de la barra, los valores del índice de Bremer aparecen en la base de cada nodo a la derecha de la barra.

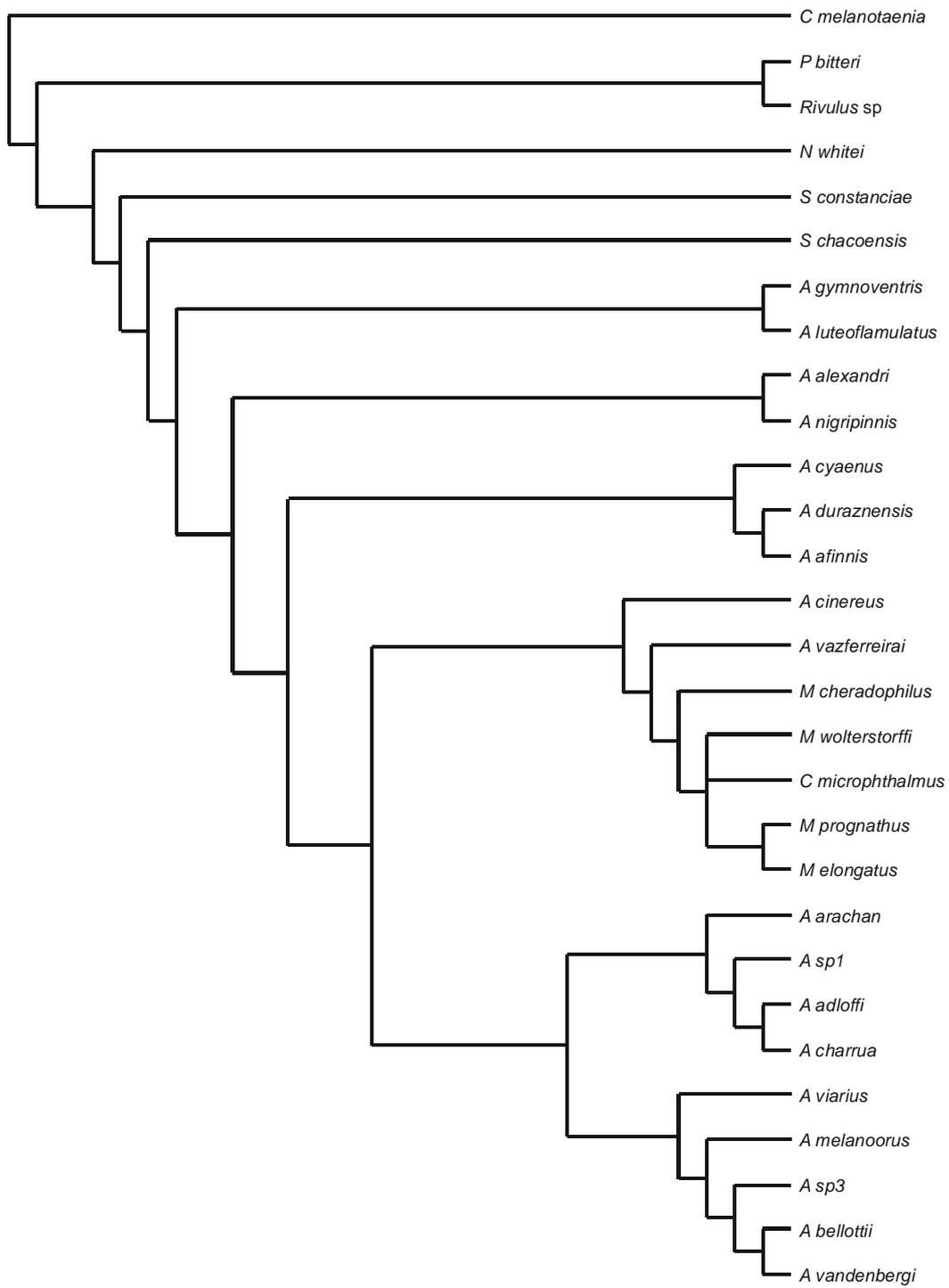


Figura 38. Arbol de consenso estricto correspondiente al análisis donde los caracteres polimórficos fueron codificados por el método frequency bins.

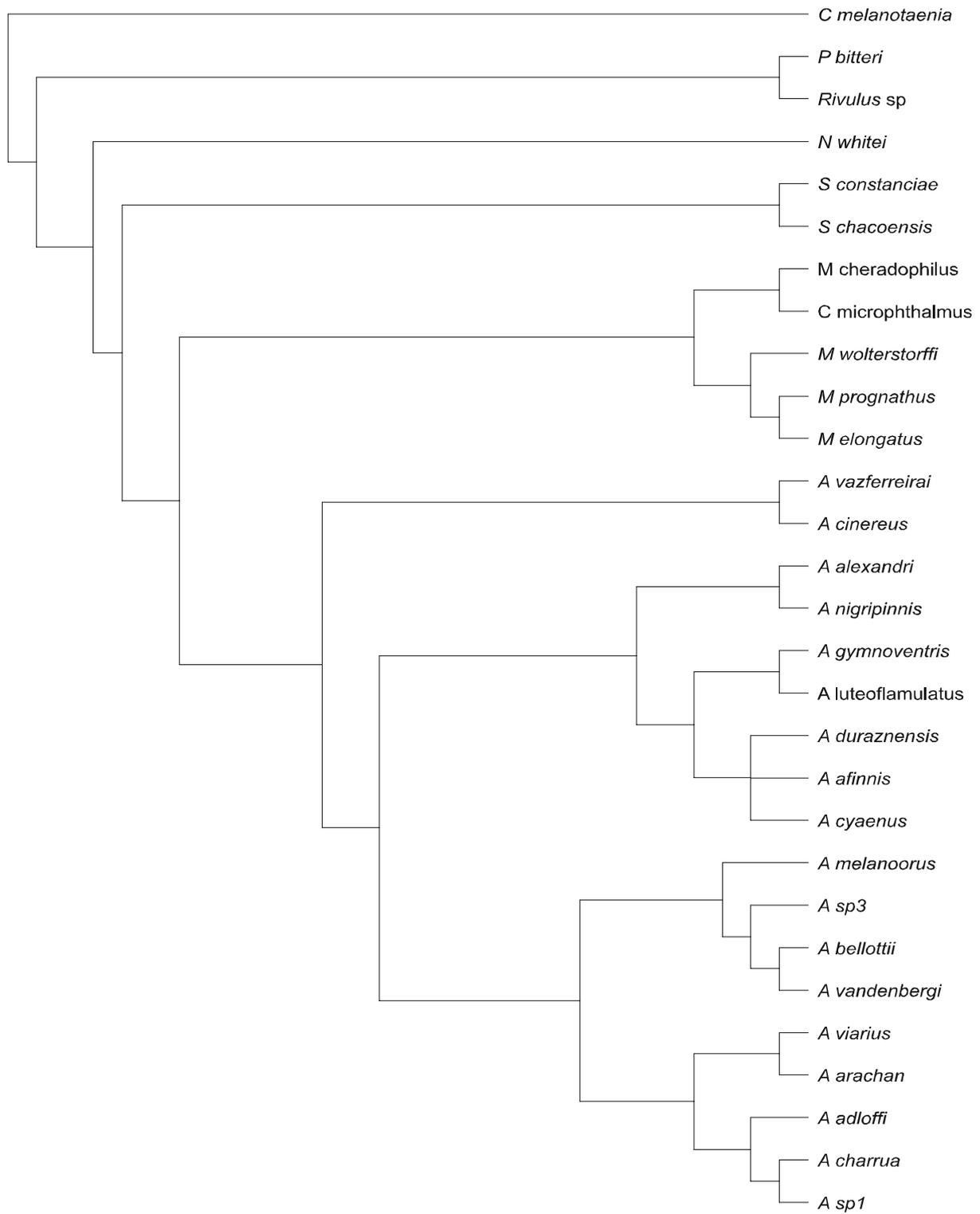


Figura 39. Arbol de consenso estricto correspondiente al análisis donde los caracteres cuantitativos (merísticos) fueron analizados con el método de percentiles.

Frecuency bins + Gap weighting combinados

La combinación de los dos métodos de codificación que resultaron en los árboles más cortos, resultó en un solo árbol de 223.67 pasos (IC = 0.48, IR = 0.68), los valores de bootstrap y del índice de Bremer para cada nodo son mostrados en la figura 41.

Discusión

Uno de los debates que han surgido últimamente en el análisis cladista de los caracteres morfológicos se centra en la utilización de los caracteres con variación intraespecífica, tanto los caracteres polimórficos como los cuantitativos. La controversia se ha centrado en la inclusión o no de estos caracteres en los análisis, y en el caso de ser incluidos cómo son codificados (Thiele, 1993; Wiens, 1995; Murphy & Doyle, 1998; Swiderski *et al.*, 1998). En recientes trabajos se ha testado la “performance” de diferentes métodos de codificación de estos caracteres, tanto en simulaciones como en casos reales (Thiele, 1993; Wiens, 1995, 2001, 2003; Wiens & Servedio, 1997). Los mismos han mostrado que este tipo de caracteres poseen información filogenética y sugieren que no deberían ser excluidos de los análisis. En este trabajo, la utilización de los caracteres polimórficos codificados por el método “frequency bins” (Wiens, 1995) y de los caracteres merísticos codificados por el método “gap weighting” (Thiele, 1993), ha resultado en la obtención de árboles más cortos, con valores de los índices de consistencia y de retención, y soporte de los nodos por Bootstrap e Índice de Bremer similares a los análisis con caracteres codificados de manera tradicional

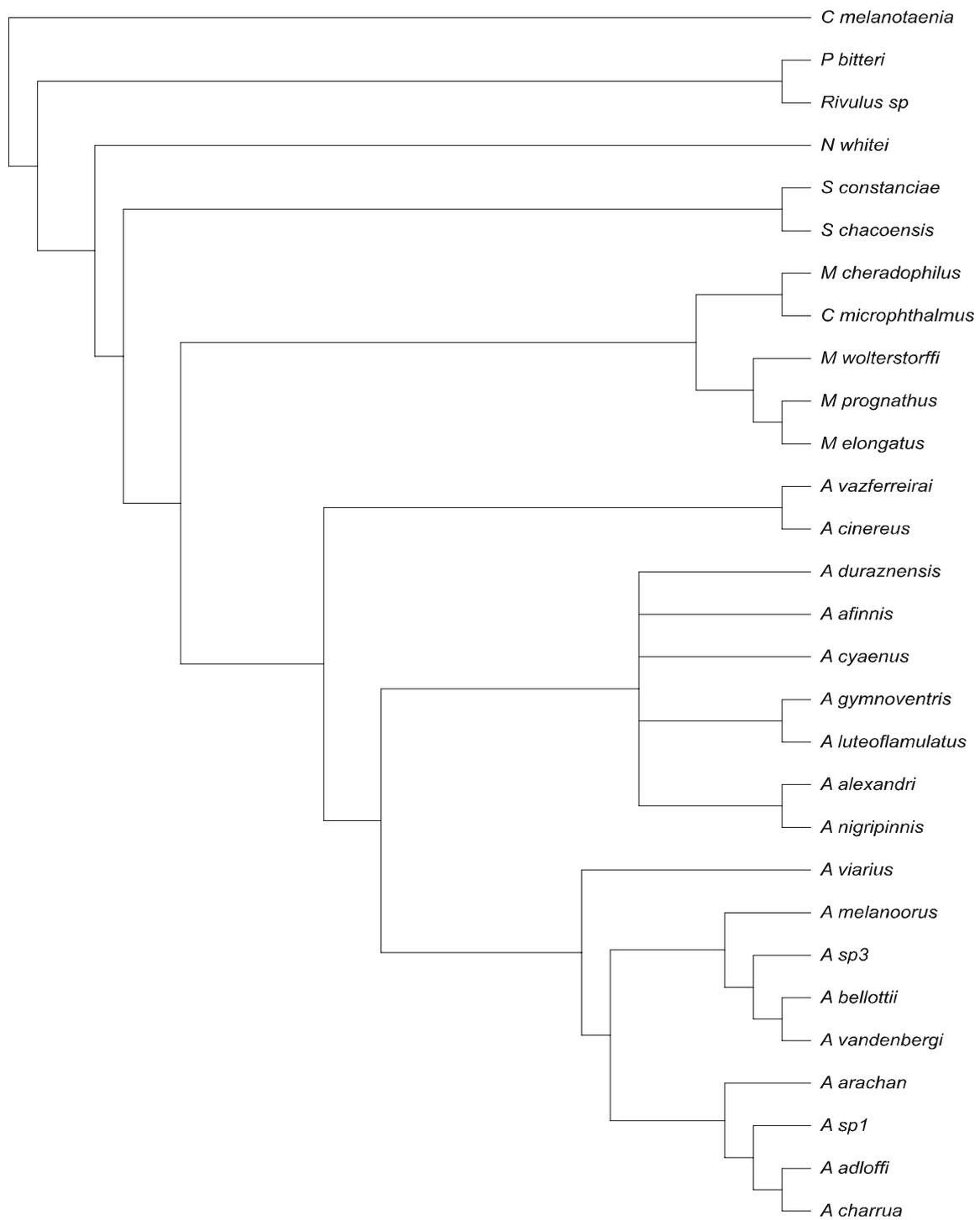


Figura 40. Arbol de consenso estricto correspondiente al análisis de los caracteres cuantitativos codificados con el método de gap weighting”.

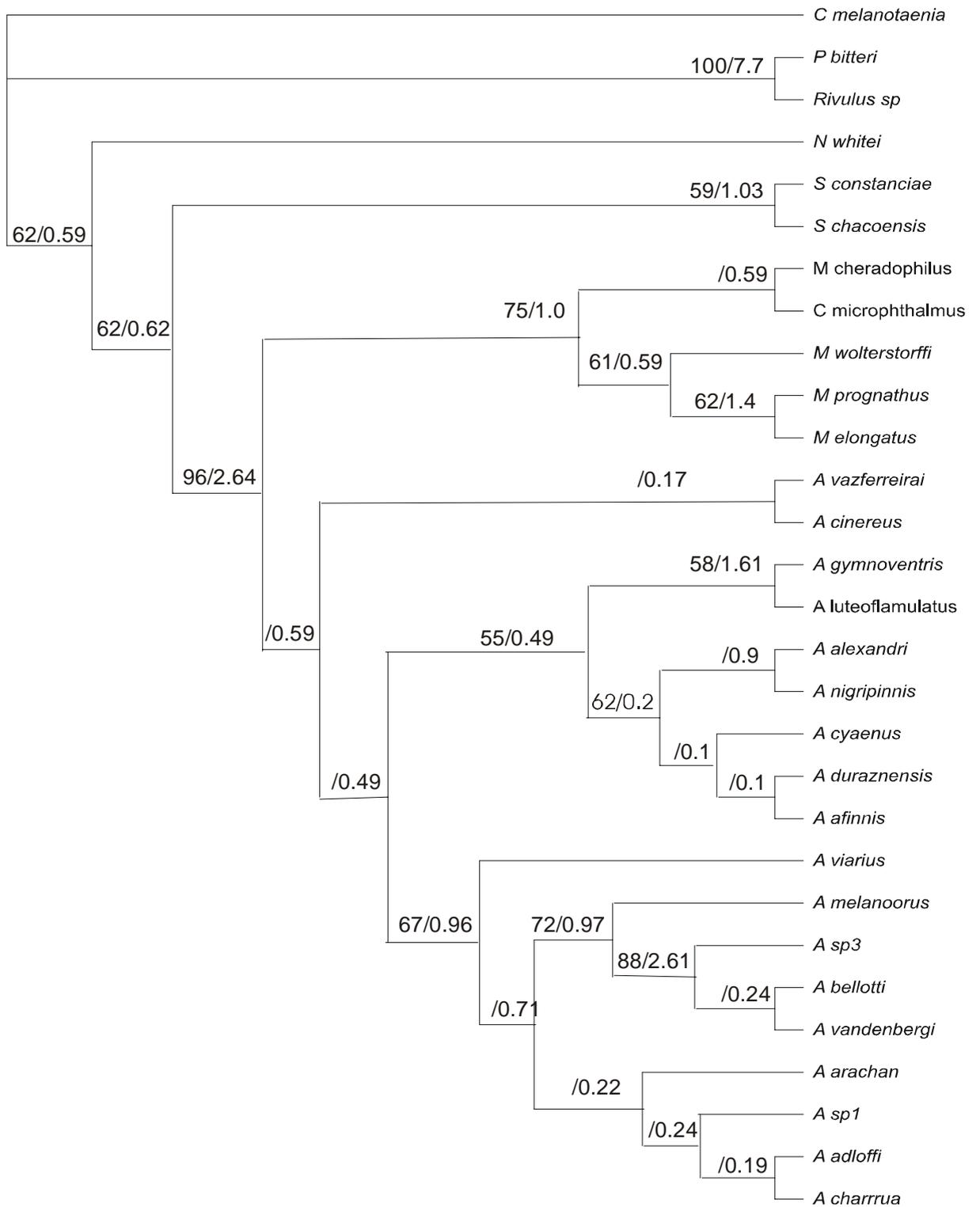


Figura 41. Arbol obtenido a partir del análisis combinando la metodología “frequency bins” para los caracteres polimórficos y “gap weighting” para los caracteres merísticos. Los valores de Bootstrap aparecen en la base de cada nodo a la derecha de la barra, los valores del índice de Bremer aparecen en la base de cada nodo a la izquierda de la barra.

(método no ordenado). Más aún, el árbol resultante de la combinación de ambos métodos de codificación, logró resolver las politomías que los otros análisis no lograban. Por tanto la discusión de las relaciones de ancestría entre los diferentes taxa se realizará en base a este árbol.

Monofilia de la subtribu Cynolebiatina (Cynolebias + Megalebias + Austrolebias)

El árbol filogenético obtenido apoya las hipótesis previas de Costa (1998, 2002) acerca de la monofilia de este grupo, en base a 8 sinapomorfías.

Dos de esos caracteres ya han sido postulados como derivados para este clado por Costa (1998, 2002): presencia del proceso dorsal del autopalatino (carácter 9.1) y presencia de la banda supraorbital en los machos (79.1).

El mismo autor ha planteado que un proceso coronoide pequeño del anguloarticular sería una condición general para todos los Aplocheiloidei y el desarrollo del mismo la condición derivada en *Cynolebias* (Costa 1998, 2002). Sin embargo, en este trabajo se ha encontrado algunas discrepancias con esos estados del carácter. En primer término, se propone la existencia de un estado intermedio a esas dos alternativas (7.1) que sería además carácter derivado para Cynolebiatina. Incluso, la condición de desarrollo del proceso coronoide no se ha encontrado en *C. microphthalmus* (el representante de *Cynolebias* en este trabajo), sino en todas las especies de *Megalebias* y en *A. vazferreirai*.

La presencia del radial pectoral dorsal en estado polimórfico fue propuesto por Costa (1998, 2002) como sinapomorfía para el clado; utilizando el método “frequency bins” la presencia de este elemento óseo en entre el 9 y 0 % de los individuos (42.9) pasa a ser la sinapomorfía para la subtribu, con posteriores reversiones en algunos clados más inclusivos.

La condición de poseer entre 16 y 23 neuromastos en la serie supraorbital (67.2), la presencia de órganos de contacto en toda la extensión de varios radios de la aleta anal de los machos (72.2) son nuevas sinapomorfias para *Cynolebiatina*. En el segundo caso, Costa (2002) ha planteado que esta condición habría surgido independientemente en dos clados menos inclusivos dentro de este grupo. Sin embargo, la topología obtenida en el presente análisis apoya a esta condición como derivada para la subtribu y la subsecuente pérdida (reversión) en clados menos inclusivos.

Costa (2002) considera que la condición de un basihyal con más de 50% de porción cartilaginosa es una sinapomorfia de *Austrolebias*. En este estudio, esa condición (26.1) también fue encontrada en 2 especies de *Megalebias* y de acuerdo a la topología obtenida es considerada aquí como sinapomorfia de *Cynolebiatina* con tres subsecuentes reversiones independientes dentro del grupo.

También la presencia de órganos de contacto en las escamas de los machos (70.1) sería una nueva sinapomorfia para este clado. No obstante, esta presencia ha sido reconocida también en *Leptolebias minimus* (Costa, 2002), representante de la supertribu *Cynopoecilidi*, grupo hermano de *Cynolebiatidi* (grupo que incluye a *Cynolebiatina*). En este trabajo, el representante de *Cynopoecilidi* utilizado como grupo externo fue *Cynopoecilus melanotaenia*, el cual carece de órganos de contacto. Por tanto, esta sinapomorfia sería un carácter homoplásico.

Costa (2002) ha planteado dos sinapomorfias más para este grupo: borde postero-lateral del autopterótico expandido y de 20 a 27 radios en la aleta dorsal de los machos. En el primer caso, he constatado una extremada variabilidad intraespecífica en este carácter como para codificarlo sin ambigüedad y utilizarlo en el análisis. En el segundo caso, en este análisis se plantea que esa condición habría sido adquirida independientemente en dos taxa de *Cynolebiatina* y además en uno de los grupos externos (*S. chacoensis*).

Relaciones intergenéricas en Cynolebiatina

Los resultados de este trabajo apoyan las hipótesis previas acerca de la monofilia de *Austrolebias* (Costa, 1998a, 2002). En cuanto a *Megalebias*, este también sería monofilético si excluimos a *M. chardophilus*. En el árbol más parsimonioso encontrado en este trabajo esta especie sería la especie hermana de *Cynolebias* y por tanto pasaría a formar parte de este género. El uso de una sola especie de *Cynolebias* y el bajo soporte que recibe el clado *M. chardophilus* y *C. microphthalmus* en este análisis relativiza este resultado. Otra diferencia con estudios anteriores es que en este análisis, *Megalebias* quedaría como el grupo hermano de *Cynolebias* y ambos hermanos de *Austrolebias*. Esta hipótesis había sido planteada por Costa (1998a). No obstante, el mismo autor la desechó posteriormente y planteó que *Megalebias* y *Austrolebias* serían los taxa hermanos y *Cynolebias* el hermano de ambos (Costa 2001, 2002). Por otra parte, estos resultados no son congruentes con las hipótesis generadas en base a secuencias mitocondriales obtenidos por García *et al.* (2002). En los mismos, las especies de *Megalebias* aparecen anidadas dentro de *Austrolebias*.

Austrolebias

En este análisis este género estaría definido por cinco sinapomorfias: proceso ventral del posttemporal ausente en entre 29 y 20% de los individuos (36.7) con posteriores reversiones en clados menos inclusivos, número promedio de radios de la aleta dorsal de los machos entre 23.4 y 23.5 (49.N), origen de la aleta dorsal de los machos en promedio entre las vértebras 8 y 9 (59.5), origen de la aleta dorsal de las hembras en promedio entre las vértebras 10 y 11 (60.5) órganos de contacto en la aleta pectoral de los machos sin base ósea (71.1) con una posterior reversión en *A. gymnoventris*. Según Costa (2002), varios grupos dentro de la

familia Rivulidae también compartirían esta condición. Sin embargo, la misma no fue observada en los grupos externos utilizados en este análisis ni en otros taxa de Cynolebiatina.

Costa (2002), planteó 4 sinapomorfias para este grupo: 1) posición de origen de la aleta dorsal de los machos entre las vértebras 7 y 10, 2) cartílago del basihyal entre 55 y 60% del largo total de ese elemento, 3) basihyal con bordes lateralmente expandidos y 4) hembras con hileras verticales de puntos oscuros. La primera coincide en líneas generales con una de las sinapomorfias propuestas en este trabajo, la diferencia radica en los métodos de codificación utilizados en uno y otro trabajo. En cuanto a la segunda, he encontrado que el estado es compartido con *M. prognathus* y *M. wolterstorffi*. Esta discrepancia podría estar dada por el bajo número de ejemplares analizados por Costa (2002) (1 individuo de la primera y 4 de la segunda) y la consecuente interpretación equívoca del estado del carácter. En cuanto a la tercera, ese estado del carácter no fue utilizado en este trabajo dada la gran variabilidad intraespecífica observada, no sólo en las especies de *Austrolebias* sino también en una especie de *Megalebias*. El mismo hecho ocurrió con la cuarta sinapomorfia, la pigmentación del cuerpo de las hembras presentó gran variabilidad intraespecífica lo que no permitió una asignación inequívoca de los estados del carácter.

En cuanto a las relaciones de parentesco dentro de *Austrolebias*, este trabajo logró definir tres grupos intragenéricos.

A. vazferreirai + *A. cinereus*

El patrón de pigmentación reticulado del cuerpo de los machos (82.1) y un promedio de 20 radios en la aleta dorsal de la hembra son las sinapomorfias que define este grupo (50.L). Costa (2002), mencionó el tipo de pigmentación reticulado en *A. robustus* (*A. vazferreirai* no fue utilizada en ese estudio), la cual apareció como hermana de *A. cinereus* en su trabajo. Por tanto es muy probable que las tres especies sean las componentes de este

clado. Este grupo más *A. nioni* también fue obtenido en los análisis moleculares (García *et al.*, 2001, 2002)

(*A. viarius* (((*A. melanoorus*(*A.sp3*(*A. bellottii* + *A. vandenbergi*)))(*A. arachan*((*A. charrua* + *A. adloffii*) + *A. sp1*)))))) ((*A. alexandri* + *A. nigripinnis*) (*A. gymnoventris* + *A. luteoflamulatus*) (*A. affinis* + *A. cyaenus* + *A. duraznensis*)))

Este grupo estaría definido por una única sinapomorfía, origen de la aleta dorsal de la hembra a la altura de la vertebra 10 (60.4) con algunas reversiones en algunos taxa. Sin embargo, este grupo fue propuesto por Costa (2002) en base a otra sinapomorfía, zona distal de la aleta anal azul o verde brillante. Este carácter no fue analizado en este trabajo, por lo que podría entonces considerarse como otra sinapomorfía para el clado. Contrariamente a las hipótesis morfológicas, los análisis realizados por García *et al.* (2002) ubican a *A. nigripinnis* como la especie más basal de este grupo.

(*A. gymnoventris* + *A. luteoflamulatus*) (((*A. alexandri* + *A. nigripinnis*) ((*A. affinis* + *A. duraznensis*) + *A. cyaenus*)))

Un número de radios promedio de la aleta anal en los machos de 22.8 (51.D) es la única sinapomorfía de este clado. La presencia de 7 a 8 branquiespinas en el ceratobranquial 1 (22.1) es una condición compartida con *Rivulus* sp y *C. melanotaenia*, de acuerdo a la topología obtenida esta condición sería entonces una reversión. Por otra parte, la presencia del proceso ventral del posttemporal en 40 a 49% de los individuos (36.5) es compartida con *A. arachan*, especie del grupo hermano de este clado. Además, el origen de la aleta dorsal de los machos al nivel de la vértebra 7 (59.2) es compartida con *A. adloffii*, especie del grupo hermano de este clado.

A. gymnoventris + A. luteoflamulatus

No se encontraron caracteres derivados exclusivos para este clado. Un número reducido de radios de la aleta anal de los machos (promedio = 21.2-21.4) (51.A) es un carácter que no lo presenta ninguna otra especie de Cynolebiatina, sin embargo este aparece como sinapomorfía para Rivulidae, por tanto es considerado una reversión. Un hueso basyhal con hasta 45% de cartilago (26.0) es una condición compartida con varias especies de *Austrolebias*, *Megalebias* y *C. microphthalmus*; la ausencia o reducción del proceso dorsal del interopérculo (35.1) es compartida con *M. wolterstorffi*; la ausencia de manchas en el flanco de las hembras es compartida con varias especies de los grupos externos, *Megalebias* y *Austrolebias*, por tanto las condiciones son consideradas homoplásicas. La hermandad de estas dos especies también está apoyada por los análisis realizados por García *et al.* (2002).

(A. alexandri + A. nigripinnis) ((A. affinis + A. duraznensis) + A. cyaeus)

Dos sinapomorfías definen este clado: la presencia de manchas oscuras en el pedúnculo caudal dispuestas irregularmente (76.2) y un número promedio de radios de la aleta caudal de 24.6 a 24.8 (48.7).

A. alexandri + A. nigripinnis

Este grupo está definido por la presencia de una mancha oscura en la porción anterior de la aleta dorsal de los juveniles (80.1). En los adultos de *A. alexandri* esta mancha permanece, mientras que en *A. nigripinnis* la misma desaparece dado el oscurecimiento general de esa aleta en esta especie. La misma mancha es mencionada por Costa (2002) para los adultos de *A. ibicuensis* (especie no utilizada en este estudio); es posible entonces que este clado esté compuesto también por esta última.

(A. affinis + A. duraznensis) + A. cyaenus

La presencia del proceso ventral del posttemporal en 60 a 69% de los individuos (36.3) es la única sinapomorfia que define este clado. *Austrolebias affinis* + *A. cyaenus* + *A. periodicus* fueron propuestas como grupo monofilético por Costa (2002). En ese trabajo el autor no utilizó *A. duraznensis* mientras que en mi trabajo no utilicé *A. periodicus*. La condición propuesta por ese autor como sinapomorfia para el clado, cuerpo marrón oscuro a negro con bandas verticales marrones no fue encontrada en las especies analizadas en mi trabajo. Sin embargo, de acuerdo a la características mencionadas por Costa (2000) para *A. periodicus*, es muy probable que las cuatro especies compongan un grupo monofilético. Este grupo monofilético también ha sido postulado por García *et al.* (2002), no así la relación entre los taxa que lo componen.

A. affinis + A. duraznensis

La única condición que define a estas especies como hermanas es el número promedio de radios de la aleta dorsal en las hembras (17.1-17.5) (50.E). Esta condición es compartida con uno de los grupos externos *C. melanotaenia*, por tanto es considerada una homoplasia.

(A. viarius ((A. melanoorus(A. sp3(A. bellottii + A. vandenbergi)))(A. arachan((A. charrua + A. adloffii) + A. sp1))))

Este grupo está definido por dos sinapomorfias: radios anteriores de la aleta anal de las hembras alargados (57.2), aletas pélvicas unidas entre si en la mayoría de los individuos (58.1). La primera ya fue propuesta por Costa (2002), el cual también menciona la presencia de 4 a 6 órganos de contacto en las escamas del flanco. En este trabajo no se pudo comprobar la presencia de esta última condición.

(A. melanoorus (A. sp3 (A. bellottii + A. vandenbergi)))(A. arachan ((A. charrua + A. adloffii) + A. sp1))

Este grupo quedó definido por una sinapomorfía, borde inferior de la aleta pectoral de los machos negro (78.1). La misma también ya fue mencionada por Costa (2002). El mismo autor mencionó la presencia de aletas pélvicas unidas entre sí como característica de este grupo. Sin embargo como fue mencionado anteriormente esta también es una característica de la especie hermana *A. viarius*.

A. melanoorus (A. sp3 (A. bellottii + A. vandenbergi))

Este grupo está definido por dos sinapomorfías: número promedio de radios de la aleta dorsal de los machos 24.8-24.9 (49.Q) y papila urogenital de los machos unida al primer radio de la aleta anal (61.1), condición que sufrió una reversión en *A. vandenbergi*. Esta última sinapomorfía fue también mencionada por Costa (2002).

A. sp3 (A. bellottii + A. vandenbergi)

Este clado está definido por dos sinapomorfías, huesos pélvicas tocándose en su borde interno (43.1) y promedio de radios de la aleta anal de los machos entre 29.8 y 30 (51.Q). Cabe destacar que *A. sp3* corresponde a poblaciones previamente incluidas en la variación de *A. bellottii*. El carácter que separa *A. sp3* de las otras dos, es la ausencia de manchas en el flanco de machos y hembras. Sin embargo, no se pudieron establecer caracteres derivados exclusivos para *A. bellottii* + *A. vandenbergi*, la presencia de manchas en el flanco de los machos en estas especies es un carácter que también lo presentan otras especies de *Austrolebias*, por tanto es considerado una homoplasia.

A. arachan ((A. charrua + A. adloffii) + A. sp1)

No se encontraron caracteres morfológicos derivados para este clado. Sin embargo, el mismo es postulado por los análisis de secuencias mitocondriales (García, en prep.)

(*A. charrua* + *A. adloffii*) + *A. sp1*

Este grupo quedó definido por tres sinapomorfias: presencia de dos manchas verticalmente alineadas en el pedúnculo caudal (76.1), número promedio de radios de la aleta caudal 21.1-21.6 (48.0) y número promedio de radios de la aleta dorsal de los machos 21.6-21.8 (49.K). El primer carácter también fue postulado por Costa (2001, 2002) para definir este grupo. Además ese autor incluyó dos especies más en el mismo, *A. nigrofasciatus* y *A. minuano*. En este trabajo no se contó con material de las mismas. Otra sinapomorfia definida por Costa (2001, 2002) fue el patrón de coloración de los machos, cuerpo con bandas verticales gris claras y gris oscuras dispuestas alternativamente. Sin embargo, en este trabajo se considera que esta característica es compartida por *A. melanoorus* y *A. alexandri*, considerada entonces una homoplasia. La hipótesis de hermandad entre *A. charrua* y *A. adloffii* no estuvo apoyada por ningún carácter derivado exclusivo y como fue mencionado en el capítulo I, los resultados de García *et al.* (2002) no son coincidentes con esta relación entre los taxa.

Megalebias* + *Cynolebias

La hipótesis de hermandad entre estos dos taxa está apoyada por 10 sinapomorfias.

Una de ellas, la presencia del proceso del esfenótico robusto (20.1), ya había sido mencionada por Costa (1998a) como sinapomorfia para este clado.

En cuanto a la presencia de denticulos sobre las branquiespinas del ceratobranquial 1 (24.1), Costa (1998, 2001) mencionó su presencia en varias especies de *Cynolebias*. En este trabajo se encontraron también en dos especies de *Megalebias*, de acuerdo a la topología

obtenida este estado del carácter sería entonces una sinapomorfía para este clado con reversión en *M. elongatus* y *M. cheradophilus*.

El tamaño del basihiyal reducido (28.1) fue planteado como sinapomorfía para *Megalebias* (Costa, 2002), en este trabajo también solamente se encontró esta condición en tres especies de ese grupo. Sin embargo, la topología obtenida sugiere que esta sería la condición derivada para todo el clado y su ausencia una reversión en *M. prognathus* y *C. microphthalmus*.

La presencia del proceso ventral del posttemporal en 80 a 89% de los individuos es una sinapomorfía para el clado (36.1).

La presencia de un promedio de 30 radios en la aleta caudal (59.G) sería otra sinapomorfía para este clado.

Una aleta dorsal posteriormente posicionada ya había sido planteada como sinapomorfía para este clado por Costa (1998a). Sin embargo, el mismo autor (Costa, 2002) consideró que el estado en el mismo sería entre las vértebras 13 y 14, condición que además sería plesiomórfica dentro de los Rivulidae. En este trabajo se ha encontrado que el origen de esta aleta a la altura de la vértebra 14 en las hembras (60.B) y a la altura de la vértebra 13 en los machos (59.@) son dos sinapomorfía para este grupo.

Si bien la presencia de más de 40 escamas en la línea lateral (62.2) ha sido mencionada para varias especies de este grupo (Costa, 2002), es la primera vez que se plantea esta condición como derivada para este grupo, con reversión en *M. wolterstorffi*.

La porción anteroventral de la serie de neuromastos infraorbitales fuertemente expandida ventralmente (69.1) es una condición previamente planteada por Costa (2002) como sinapomorfía para *Cynolebias*, en este trabajo también se encontró esta condición presente en *Megalebias*.

Dentro de la subtribu Cynolebiatina la presencia de 12 a 15 radios en la aleta pectoral (53.1) es una condición única presentada por este clado. Sin embargo, la misma también está presente en varios de los grupos externos y de acuerdo a Costa (2002) también se encuentra en *A. carvalhoi*, especie no disponible para este trabajo. Por tanto este carácter es considerado homoplásico.

Finalmente, la presencia de 5 o más vértebras sosteniendo el esqueleto caudal (47.1) es mencionada por primera vez como sinapomorfia para este grupo.

Megalebias (exluyendo a *M. cheradophilus*)

La monofilia de este género fue confirmada en base a cuatro sinapomorfias: serie exterior de dientes en las mandíbulas de similar desarrollo o longitud (1.1), mandíbulas alargadas (2.1), presencia del radial pectoral dorsal en 10 a 19% de los individuos (42.8) y 23 a 32 neuromastos en la serie supraorbital (67.3). Estas condiciones ya fueron propuestas como sinapomorfias para este grupo (Costa, 2002). Además, el mismo autor planteó 4 condiciones más como sinapomórficas para el grupo: 1) hueso urohial alargado y con proceso anterior dorsal dirigido anteriormente, 2) brazo posterior del paraesfenoides ensanchado, 3) escamas de la porción anterior de la superficie dorsal de la cabeza ausentes y 4) pigmentación del cuerpo de la hembra consistiendo de marcas oscuras coalescentes formando un patrón reticulado. En cuanto al primer carácter, la condición de urohial alargado es considerada en este trabajo como plesiomórfica dentro de Rivulidae, y la dirección del proceso anterodorsal del mismo hueso solamente fue observada en un individuo de *M. prognathus*. Los restantes caracteres, no fueron utilizados en este trabajo dada la gran variabilidad intraespecífica observada en las especies analizadas.

La definición previa de *Megalebias* (Costa 1998, 2002) incluía a *M. cheradophilus* como especie más basal y se sostenía en 8 sinapomorfias. Para el mismo todas las especies de

este género presentan un hueso basihyal corto, en este trabajo he comprobado que tanto *M. wolterstorffi* como *M. prognathus* presentan la condición larga de este hueso, y es considerado un carácter homoplásico. La ausencia de dientes en el segundo faringobranquial es considerada en este trabajo como homoplásica (ver adelante). La expansión anterior del esfenótico y la forma del lacrimal fueron consideradas condiciones muy variables como para ser codificadas sin ambigüedades. La ausencia de escamas en la zona inmediatamente superior a la aleta anal fue solamente encontrada en una especie de este grupo y es considerado carácter no informativo. La presencia de órganos de contacto en la aleta pectoral fue encontrada también en especies de otros grupos por lo que es interpretada como una homoplasia. En tanto que el número elevado de escamas en la serie lateral es considerado en este trabajo como sinapomorfia para *Megalebias* + *Cynolebias*.

M. prognathus + *M. elongatus*

Este grupo quedó definido por cuatro sinapomorfias: proceso anterior del brazo alveolar de la maxila reducido (3.1), superficie de articulación del lacrimal con el etmoides lateral (17.1) y brazo anterior del ceratohyal expandido (21.1) y más de 14 vértebras abdominales (45.1). Costa (2002) propuso a *M. elongatus* como especie hermana de *M. monstruosus* (especie no incluida en este trabajo) y ambas hermanas de *M. prognathus*. Además, las sinapomorfias planteadas por ese autor para todo el grupo coinciden en parte con las de este trabajo (3.1) y 21.1). Queda por establecer si las otras dos sinapomorfias planteadas en mi trabajo también están presentes en *M. monstruosus*.

M. cheradophilus + *C. microphthlamus*

Este grupo no estuvo apoyado por ningún carácter derivado exclusivo. La ausencia de dientes en el segundo faringobranquial (25.1) es compartida con *N. whitei* y de acuerdo a

Costa (2001, 2002) también con *S. myersi* y *M. wolterstorffi*. Sin embargo, en esta última he comprobado la presencia de estos elementos; por tanto sería una condición homoplásica. También un hueso basihyal con menos de 45% de cartílago (26.0) y la presencia de órganos de contacto con base ósea en la aleta anal (73.1) son condiciones compartidas con varias especies de *Austrolebias* y *Megalebias*, y por tanto consideradas homoplásicas. Por último, la presencia de manchas oscuras en la cabeza, compartida con *Cynopoecilus melanotaenia*, sería una reversión.

Varios nodos de este análisis no son congruentes con las hipótesis generadas con secuencias mitocondriales (García *et al.*, 2002). Las diferencias principales radican en los nodos más profundos; en ese trabajo se considera a *Austrolebias* parafilético con relación a *Megalebias*; las diferencias entre los análisis podrían tener dos razones. En el caso de los análisis moleculares, las secuencias utilizadas no serían las más adecuadas para interpretar las relaciones a esos niveles ya que el soporte de esos nodos fue bajo (García, 2002). Las secuencias mitocondriales presentan altas tasas de sustitución y por tanto saturación de cambios en las mismas, sobre todo en la tercera posición del codón (Bremer, 1996). La utilización de secuencias de ADN nuclear más conservadas, podrían ser más precisas en dilucidar relaciones basales entre los taxa, además de proveer una buena contrastación independiente de las hipótesis generadas por el ADN mitocondrial (Murphy *et al.*, 1999b). Además, los análisis moleculares no han incluido hasta el momento ninguna especie de *Cynolebias*.

Por otra parte, las especies de *Cynolebias* y *Megalebias* se caracterizan por presentar gran tamaño y un aparato mandibular robusto que les permite alimentarse de especies de peces anuales más pequeños. Estas características redundan en algunas de las sinapomorfias planteadas en este trabajo a nivel de estructuras tróficas y de locomoción (20.1, 24.1, 27.1, 57.1, 59.G, 69.2). ¿Están estas características asociadas a un origen filogenético común o son

el resultado de un fenómeno de convergencia causado por evolución adaptativa? Existen numerosos ejemplos similitud fenotípica en grupos distantemente relacionados (Futuyma, 1986). Wiens *et al.* (2003) han planteado tres criterios explícitos necesarios para apoyar la existencia de convergencia: a) fuerte soporte morfológico para el clado que une los taxa que comparten un ambiente selectivo similar, b) evidencia de que los caracteres que unen el clado están asociados con el ambiente selectivo compartido y c) evidencia filogenética de que las especies en cuestión no forman un grupo monofilético debido a un fuerte soporte por clados contradictorios de dos o más conjuntos de caracteres moleculares. Si utilizamos estos criterios en el caso de *Megalebias* y *Cynolebias*, la sospecha de una similitud por convergencia tiene una posibilidad cierta.

Cabe destacar que todas las filogenias de *Cynolebiatina* disponibles presentan en general bajos valores de soporte de los nodos (Costa, 2002; García et al, 2002; esta tesis). Sumado a esto está la poca cantidad de sinapomorfias que presentan los diferentes grupos supuestamente monofiléticos en los análisis morfológicos. Esto estaría revelando una alta cantidad de homoplasias en este grupo de peces. ¿Está este fenómeno relacionado con el tipo de ambiente que habitan los peces anuales; donde las características ambientales (biológicas, físicas y químicas) de los charcos temporales restringen la evolución morfológica, o donde las altas tasas de mutación debidas las altas tasas metabólicas propias de organismos que tienen que realizar todo su ciclo biológico en muy poco tiempo ocasionan procesos de saturación en el genoma?

CAPÍTULO III

BIOGEOGRAFÍA DE LA SUBTRIBU CYNOLEBIATINA

Introducción

Las investigaciones en biogeografía histórica intentan descubrir patrones de distribución espacial exhibidas por los organismos vivos y explorar los posibles mecanismos que han producido esos patrones (Lydeard *et al.*, 1995). Una de las aproximaciones a la biogeografía histórica es la biogeografía cladista. Para obtener una hipótesis inicial acerca de las relaciones históricas de diferentes áreas, los taxa de una cladograma de organismos son reemplazados por sus áreas de distribución, resultando en un cladograma de áreas (Morrone & Crisci, 1995).

El hábitat fragmentado y la escasa vagilidad de los peces anuales determinan distribuciones restringidas y altos niveles de endemismos, por tanto son un grupo de organismos muy interesante en el estudio de los patrones biogeográficos. En este contexto varias hipótesis han sido formuladas utilizando este grupo de peces; tanto a escala temporal muy amplia y a nivel continental (Huber, 1998) sino también a escalas temporales más cercanas al presente y a nivel regional (Costa, 1995, 2003; García *et al.* 2000, 2002; Parenti, 1981; Murphy *et al.*, 1999ab).

En esta sección del trabajo se analizarán los patrones de distribución de las especies de *Cynolebiatina* en un contexto cladista.

Materiales y Métodos

La hipótesis filogenética obtenida en el capítulo anterior será la utilizada para sustituir los taxa por sus áreas de distribución, consideradas como estados alternativos de un carácter.

La consideración de las áreas de distribución de los taxa como áreas de endemismo sigue los criterios de Linder (2001): tener al menos dos especies endémicas, existir congruencia entre los rangos de distribución de las especies endémicas de cada área, ser su área menos amplia que la totalidad del área de estudio y ser mutuamente excluyentes.

La distribución de las especies no utilizadas en este trabajo se obtuvo de datos bibliográficos explicitados en el texto.

Resultados

La especies de la tribu Cynolebiatina se distribuyen en tres grandes áreas geográficas: la cuenca media y baja del Plata (*Megalebias* y *Austrolebias*), los sistemas costeros Atlántico y Los Patos-Merín (*Megalebias*, *Austrolebias* y "*Megalebias cheradophilus*") y la cuenca del Río Jaguaribe (pequeña cuenca costera del nordeste de Brasil, donde se encuentra *C. microphthalmus*) (fig. 42). Además hay que agregar a esta distribución, la cuenca del Río San Francisco, en la misma región que la anterior, donde están las restantes especies de *Cynolebias* (Costa, 2001, 2003) (fig. 42).

Las relaciones entre las diferentes áreas se presentan en cladograma de la figura 43.



Figura 42. Areas de distribución geográfica de la subtribu Cynolebiatina; **A.** *A. Austrolebias* y *Megalebias*, **B.** *C. microphthalmus*, **C.** *Cynolebias*.

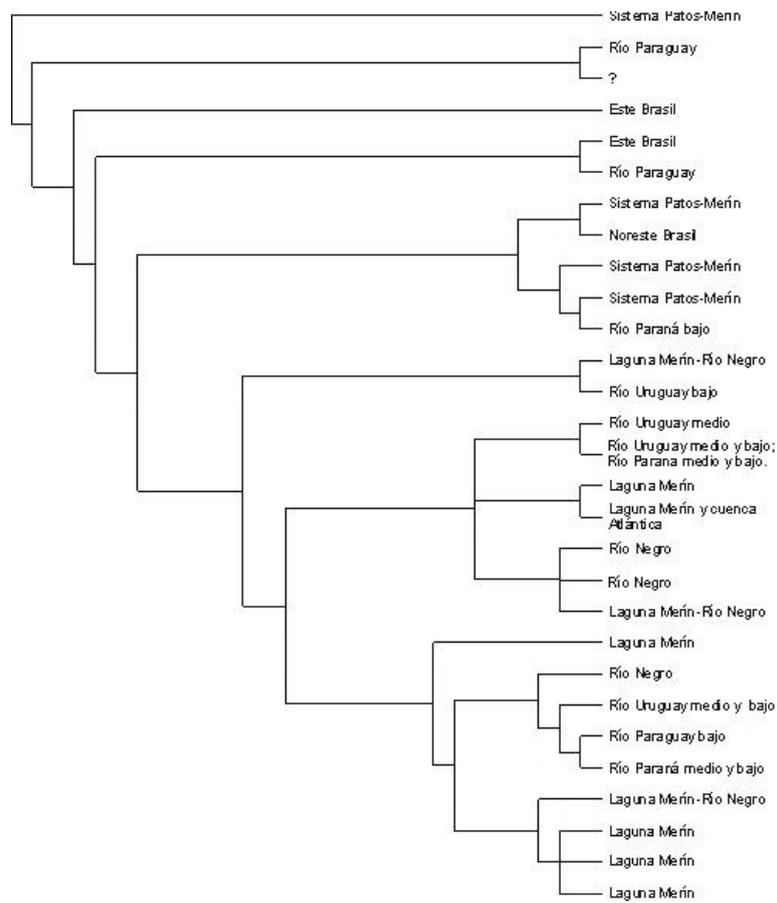


Figura 43. Cladograma de áreas basado en la distribución de los miembros de la subtribu Cynolebiatina.

La cuenca del Plata

Esta cuenca puede dividirse en cinco regiones.

1) La zona del chaco Paraguayo y Argentino donde se encuentra *A. vandenbergi* (Braga, 1999) (fig. 45). También se distribuyen dos especies no utilizadas en este trabajo: *M. monstruosus*, hipotetizada como especie hermana de *M. elongatus* (Costa 2002) (fig. 47) y *A. patriciae* (fig. 44) especie no incluida hasta el momento en ningún análisis, que por sus características generales estaría relacionada al grupo de *A. affinis* (Huber, 1995).

2) La cuenca alta y media del Río Uruguay hasta la desembocadura del Río Negro, donde se encuentran cuatro especies endémicas (fig. 44): *A. carvalhoi* Myers, 1947, (Costa, 1998b), *A. alexandri*, *A. ibicuensis* postulada por Costa (2002) como hermana de la anterior; *A. periodicus*, propuesta por el mismo autor como emparentada con *A. affinis* y *A. cyaenus*. También en esta zona aparecen *A. nigripinnis* y *A. sp3*, las cuales también se encuentran en la siguiente zona (figs. 44,45).

3) La zona más baja del Río Uruguay donde existe una sola especie endémica, *A. cinereus* (fig. 46), además de encontrarse poblaciones de *A. sp3* y *A. nigripinnis* (figs 44,45).

4) La parte baja de la cuenca del río Paraná, donde están *A. nigripinnis*, *A. bellottii*, *A. sp3* y *M. elongatus* (figs. 44,45,47); de acuerdo a Calviño (2003) también se encuentra en esta zona *A. robustus* (fig. 46).

5) En la cuenca del Río Negro encontramos cuatro especies endémicas: *A. duraznensis*, restringida a la cuenca del Río Yí (fig. 44), *A. melanoorus* y *A. affinis* restringidas a la cuenca del Río Tacuarembó (figs. 45,46) y de acuerdo a Berkenkamp *et al.* (1997), *A. nioni*, de la cual solo se conoce una localidad en la cuenca del Río Negro.

Austrolebias arachan y *A. vazferreirai* se distribuyen en esta zona, aunque también en la parte alta de la cuenca del Río Tacuarí perteneciente al sistema de la Laguna Merín (figs. 45,46).



Figura 44. Distribución geográfica de especies de *Austrolebias*; cuadrados negros = *A. patriciae*, estrellas de cinco puntas negras = *A. nigripinnis*, estrella de cinco puntas blanca = *A. periodicus*, cuadrados blancos = *A. cyaeus*, rombos negros = *A. affinis*, rombos blancos = *A. duraznensis*, círculo negro = *A. ibibuensis*, círculos blancos = *A. alexandri*, estralla de cuatro puntas blanca = *A. gymnoventris*, estrellas de cuatro puntas negras = *A. luteoflamulatus*.

Los sistemas costeros, Atlántico y Los Patos-Merín

En referencia estricta al sistema Patos-Merín; en la región Norte de esta zona se encuentra *A. adloffii* y *M. wolterstorffi* (figs. 2,47); en la región central, *A. cyaeus* (Amato, 1987), *A. nigrofasciatus* y *A. minuano* (Costa & Cheffe, 2001) (figs. 44,2); en la zona sur encontramos a *A. spl*, *A. charrua*, *A. luteoflamulatus*, *A. gymnoventris*, *A. arachan*, *A. vazferreirai*, *A. cyaeus*, *M. wolterstorffi*, *M. prognathus* y *M. cheradophilus* (figs. 2,44,45,46,47).

En los sistemas costeros de la cuenca Atlántica aparecen también, *A. luteoflamulatus* y *M. cheradophilus* (figs. 44,47), y una especie endémica de la cuenca de la Laguna Castillos, *A. viarius* (fig. 45).

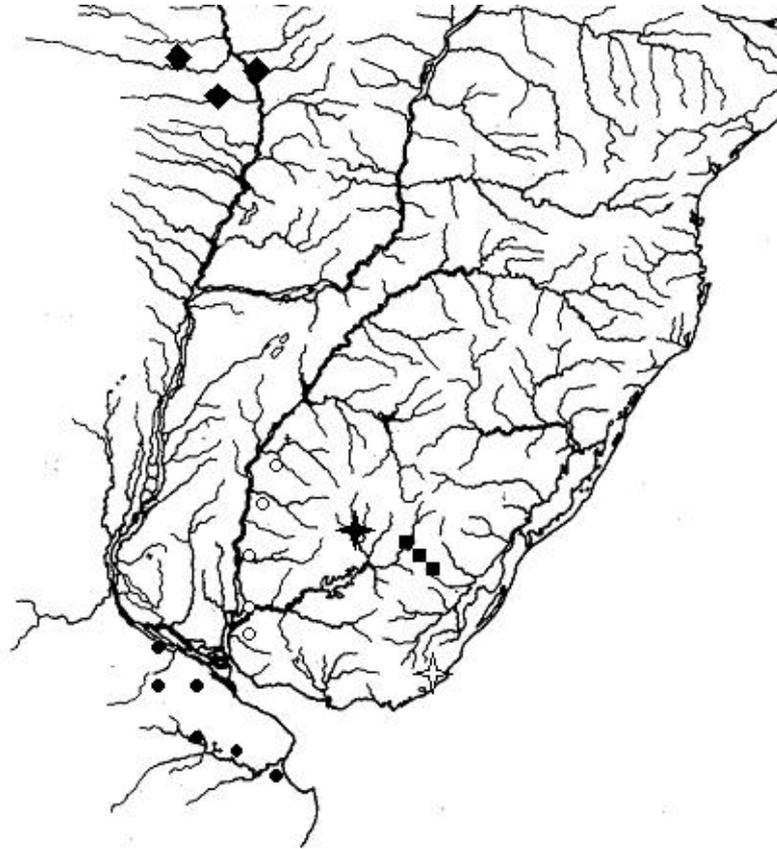


Figura 45. Distribución geográfica de especies de *Austrolebias*; rombos negros = *A. vandenbergi*, círculos negros = *A. bellottii*, círculos blancos = *A. sp3*, estrella negra = *A. melanoorus*, cuadrados negros = *A. arachan*, estralla blanca = *A. viarius*.

También se encuentra en toda esta área (desde la cuenca Atlántica hasta las inmediaciones de Porto Alegre) *Cynopoecilus melanotaenia*, especie del grupo hermano de *Cynolebiatini*, *Cynopoecilini*; ambos de la subfamilia *Cynolebiatinae*.

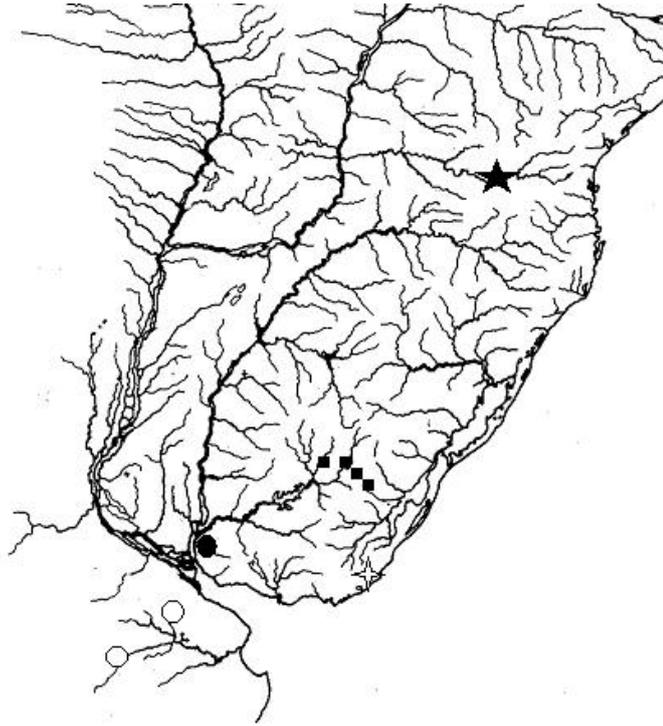


Figura 46. Distribución geográfica de especies de *Austrolebias*; cuadrados negros = *A. vazferreirai*, círculo negro = *A. cinereus*, círculos blancos = *A. robustus*; estrella negra = *A. carvalhoi*.

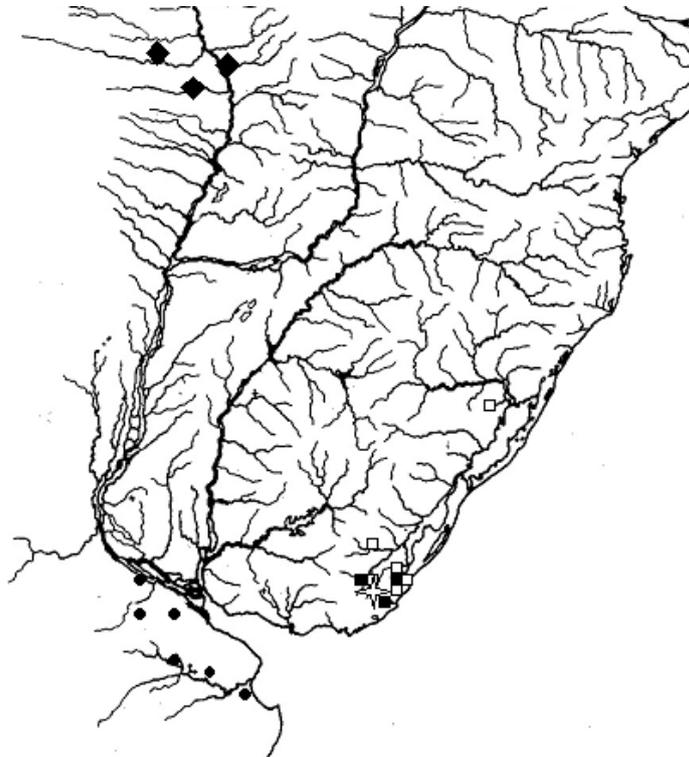


Figura 47. Distribución geográfica de especies de *Megalebias*; rombos negros = *M. monstruosus*, círculos negros = *M. elongatus*, cuadrados blancos = *M. wolterstorffi*, cuadrados negros = *M. prognathus*, estrella blanca = *M. cheradophilus*.

Discusión

De esta distribución y el patrón filogenético obtenido en este trabajo surge la problemática de la distribución actual del clado *Cynolebias* + “*M. cheradophilus*”. Esta sería un relictos de una distribución pasada, con eventos de extinción que habrían provocado la distribución disjunta observada. Sin embargo, recordemos que este clado está sostenido por una sola sinapomorfia (una reversión) y el valor de Bootstrap del nodo es menor a 50%. La ubicación de *M. cheradophilus* como la especie más basal de *Megalebias* por parte de Costa (2002) tendría un sostén biogeográfico más robusto: *Cynolebias* en el nordeste brasileño y *Megalebias* restringido a la cuenca del Plata y el sistema Patos-Merín, con un evento vicariante que habría separado ambos clados. Este evento podría haber ocurrido durante el terciario (aprox. 80 millones de años atrás) cuando las zonas altas de los ríos Paraná y Paraguay revertieron la dirección de flujo de sus aguas, de norte a sur (Huber, 1998). Previamente a ese evento, debió ocurrir la separación de *Megalebias* + *Cynolebias* de *Austrolebias*. La distribución de *Austrolebias* y *Megalebias* es simpátrica en la mayoría de las áreas que habitan actualmente; la antigüedad de la separación de ambas taxa oscurece los posibles orígenes de esta divergencia. Sin embargo, hay que destacar que varias de las sinapomorfias que definen al clado *Megalebias* + *Cynolebias* están relacionadas con aspectos tróficos ya mencionados. Estas características (distribución y anatomía) sugieren que la separación de los ancestros de estos clados podría haberse debido a un evento de especiación simpátrica mediada por mecanismos ecológicos, lo cual cada vez es más aceptado para muchos taxa incluidos los peces (Schluter, 1998; McCune & Lovejoy, 1998).

Estos patrones de distribución sugieren un origen muy anterior al planteado por García *et al.* (2000, 2002). Estos autores planteaban que la separación de Cynolebiatina (*Cynolebias* en ese trabajo) de otros taxa de Rivulidae debería haber ocurrido aproximadamente entre 7 y

13 millones de años atrás. Otras evidencias en cuanto a este tema son contradictorias. Por un lado, Parenti (1981) propuso a este grupo como derivado dentro de los Rivulidae, por tanto un origen relativamente reciente sería congruente con esta hipótesis. Sin embargo, en un análisis filogenético de esta familia basado en secuencias mitocondriales Murphy *et al.* (1999b) propusieron a este clado como basal dentro de la familia, apoyando entonces un origen más antiguo del mismo. Como es claramente explicitado por estos autores, estas hipótesis deben ser contrastadas con datos moleculares independientes como pueden ser los de secuencias del genoma nuclear. Un patrón de distribución similar ocurre en el grupo externo *Simpsonichthys*; en este género la mayoría de las especies tienen una distribución similar a *Cynolebias*, con la excepción de *S. chacoensis*, la cual se encuentra distribuida en la cuenca del Río Paraguay. Una relación entre ambos sistemas no evidente del análisis de la distribución de otros grupos de peces. En varios casos la distribución de especies Characiformes y Siluriformes sugieren una conexión entre la cuenca del Río Paraguay y la cuenca alta del Río Amazonas (Vari, 1989; Reis, 1998). De acuerdo a esos autores estos patrones se habrán originado antes del inicio del levantamiento de los Andes.

Por otra parte, en la mayoría de los diferentes clados propuestos por este trabajo, la distribución de los diferentes taxa que los componen sugiere patrones claros de diferenciación alopatrica. Sin embargo, existen varios casos que se apartan de esta generalidad.

Uno de esos casos es el grupo *M. wolterstorffi* (*M. elongatus* + *M. prognathus*). Este grupo presenta un patrón de distribución complejo. Ambos grupos pudieron haberse diferenciado en alopatría y luego ocurrió una dispersión de los ancestros de *M. prognathus* hacia la cuenca de la Laguna Merin. Una alternativa es la dispersión desde el Norte de la cuenca de la Laguna de los Patos hacia la Laguna Merin de *M. wolterstorffi*, única especie de este género en esa localidad nortea. Los eventos de transgresiones y regresiones marinas en

esta zona pueden haber jugado un papel importante en la distribución y especiación de este grupo generando barreras temporales y los consecuentes eventos vicariantes.

Por otra parte, *Austrolebias nigripinnis* es simpátrica con *A. alexandri* en parte de su distribución; este patrón sugiere la existencia de un evento de especiación *in situ*. La especiación ecológica es una de las causas postuladas para la especiación simpátrica (Schluter, 1998; McCune & Lovejoy, 1998). Sin embargo, a primera vista ambas especies no parecen tener diferencias a nivel ecológico, las diferencias entre una y otra taxa radican básicamente en los patrones de pigmentación de los machos. La otra fuerza evolutiva invocada en este contexto simpátrico es la selección sexual (Johnson & Gullberg, 1998).

A primera vista un patrón similar ocurre en el clado *A. luteoflamulatus* y *A. gymnoventris*. Sin embargo, un examen más cercano de los dos taxa denota que ambos taxa no son simpátricos. *Austrolebias gymnoventris* presenta una distribución relictual restringida a zonas altas de la cuenca, mientras que *A. luteoflamulatus* está presente en las zonas bajas de la misma.

En cuanto a las características y relación de las diferentes áreas geográficas y de acuerdo a los criterios explicitados previamente, podemos afirmar que la zona alta del río Paraná, la zona baja de la misma, la zona media de la cuenca del Río Uruguay, la zona media de la cuenca del Río Negro y el sistema Los Patos-Merín son áreas de endemismos. Esta asignación coincide en general con García *et al.* (2000). Sin embargo, en ese trabajo se consideraba toda la cuenca del Río Negro como área de endemismo. La distribución actual de *A. arachan* y *A. vazferreirai*, deja a la parte alta de la mencionada cuenca fuera del criterio de área de endemismo. Lo más llamativo es que *A. arachan* sería la especie hermana del grupo “adloffii”, lo que sugiere una relación biogeográfica entre esta parte de la cuenca del Río Negro y del sistema Los Patos-Merín. La presencia de ambas especies en las dos cuencas sugiere un origen antiguo de las mismas. El clado a que pertenece *A. vazferreirai* es el más

basal dentro de *Austrolebias* y *A. arachan* sería la especie más basal del grupo “adloffii”. Sin embargo, la vicarianza en este caso está descartada ya que el sistema de cuchillas que separan una y otra cuenca es de origen Precámbrico (600 millones de años atrás). Esto plantea dos hipótesis alternativas: la existencia temporal de algún corredor entre las dos cuencas, o la de algún mecanismo de dispersión “externo” como podría ser el transporte de los huevos por intermedio de las aves (Santamaría & Klassen, 2002). Sin embargo, las distribuciones retringidas de otras especies de peces anuales van en contra de esta última hipótesis. La primera hipótesis es más coherente con los patrones de distribución de otras especies de peces neotropicales. En varios grupos de Siluriformes de las familias Pimelodidae y Loricariidae se observan patrones similares, es decir que especies presentes en la región costera Atlántica tienen sus parientes más cercanos en la cuenca del Río Uruguay (Reis & Schaefer, 1998; Lucena et al, 1992). Incluso, el patrón de distribución de algunos géneros de Hypoptopomatinae (Loricariidae) sugiere algún evento de conexión entre cuencas en la zona más alta de la última cuenca mencionada (Reis & Schaefer, 1998). Es posible entonces pensar que estos eventos de comunicación entre cuencas (o captura de cuencas) ha ocurrido en más de una zona geográfica.

La presencia de *M. prognathus* en la cuenca de la Laguna Merín también la relaciona con la cuenca baja del Paraná, donde se encuentra el taxon hermano *M. elongatus*. La relación entre ambos sistemas está ampliamente documentada, incluso los patrones de distribución observados por Vari (1988) para los Characiformes curimatidos ha llevado a ese autor a reconocer una sola región biogeográfica que abarca ambos sistemas.

El sistema de la Los Patos-Merín es el área que presenta mayor número de endemismos en la zona sur de la distribución de Cynolebiatina. La posible relación de este sistema tanto con la cuenca del Río Negro, como con la cuenca del Paraná hace que los eventos de transgresiones y regresiones marinas no solamente hayan tenido un efecto local en

la diversificación del grupo sino que también un efecto regional al relacionar este sistema con los otros. La diversificación de los peces anuales en esta zona parece haberse originado a lo largo de diferentes eventos de cambios en el nivel del mar, lo que propicia la existencia de especies con diferentes “edades” en la zona. El alto número de endemismos encontrados aquí plantea la necesidad de considerar a esta zona como una región biogeográfica independiente.

La presencia de *Cynopocilus* en este sistema, es también bastante significativa. Los taxa relacionados a este género, *Leptolebias* y *Campellolebias* tienen una distribución más norteña que el sistema Los Patos-Merín, aunque también costera; lo que sugiere la existencia en el pasado de algún corredor conectando varios sistema costeros, sobretudo en períodos interglaciales de bajos niveles del mar (Huber, 1998). Este patrón también se observa en otros taxa de peces como por ejemplo el género de Characiformes *Oligosarcus* (Menezes, 1988) y los géneros de Siluriformes *Otothyris* (Garavello et al, 1998) y *Otocinclus* (Schaefer, 1997).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis, de manera general se han confirmado las hipótesis planteadas para cada objetivo. El análisis de la variabilidad morfológica de las poblaciones del grupo “adloffii” ha mostrado que al menos gran parte de la variabilidad morfológica intraespecífica reportada previamente para las mismas en la planicie costera del este de Uruguay corresponde a variación interespecífica asociada a dos taxa diferentes, distribuidos primariamente de manera alopátrica. Ambos taxa difirieron entre sí, en mayor o menor medida, en la mayoría de los caracteres analizados: diseño, merísticos y morfométricos. La gran diferencia observada en los niveles de discriminación a nivel de diseño entre machos y hembras, donde los machos presentaron caracteres distintivos claros, mientras que las hembras no, sugiere que la selección sexual estaría actuando de manera importante en la diferenciación de estos taxa. Por lo que una de las líneas de investigación que resultará muy interesante abordar en este grupo refiere a la experimentación en el laboratorio acerca de las preferencias de las hembras sobre los caracteres de los machos. En este contexto se están dando los primeros pasos al estar en desarrollo el estudio del comportamiento reproductivo en *A. spl* y *A. charrua*. Sin embargo, como se ha discutido, aparentemente los dos taxa de este grupo encontrados en los humedales del Este de Uruguay no serían especies hermanas. Una hipótesis robusta acerca de las relaciones de parentesco entre todas las especies del grupo “adloffii” es imprescindible para entender los procesos de diferenciación en el mismo. El abordaje molecular en este grupo donde los eventos de especiación parecen tener un origen reciente es de primordial importancia. La hibridación a través de la introgresión se ha planteado como posible en la zona estudiada, la identificación de dos taxa en la misma es entonces una consecuencia importante sobre este aspecto. Es posible ahora afinar el abordaje de ese tema al tener una idea más clara de los posibles actores de ese evento de hibridación. También la

experimentación en el laboratorio en este aspecto, por ej. cruzamientos y segregación de caracteres morfológicos y moleculares, es una de las posibilidades interesantes a desarrollar.

Otro aspecto que no debe ser excluido de futuras investigaciones refiere a la distribución geográfica de estos taxa. Como fue planteado ambos parecen estar distribuidos alopátricamente. Sin embargo, es posible que este patrón sea un artefacto de muestreo. La exploración exhaustiva de la zona baja del Río Cebollatí podría determinar un contacto entre ambos taxa y por tanto la existencia de factores ecológicos actuando sobre la definición de los límites entre ambos, así como también la existencia en esa zona de eventos de hibridación.

En cuanto a la filogenia de *Cynolebiatina*, se ha apoyado la monofilia de la misma. Sin embargo las relaciones de parentesco entre los géneros que la componen difieren de hipótesis previas. Básicamente la diferencia radicó en la ubicación de *Megalebias* dentro del grupo. Las diferencias con estudios anteriores se pueden deber a varios factores. En relación a otros análisis morfológicos, el mayor número de caracteres utilizados en este trabajo puede ser un factor importante. En relación a los análisis con caracteres moleculares en primer término están los taxa utilizados, en estos no han sido incluidos al momento todos los géneros propuestos para *Cynolebiatina* (p. ej. *Cynolebias*). También quedó planteada la posibilidad de que procesos de convergencia adaptativa experimentados por *Cynolebias* y *Megalebias* sean la base de las diferencias con los estudios moleculares. En este sentido entonces también se deben continuar las investigaciones: ampliando el número especies en un mismo análisis, ampliando el número de caracteres morfológicos, utilizando secuencias de genes más conservados e independientes de los anteriores, combinando ambos tipos de caracteres en un solo análisis y estudiando la correlación entre caracteres morfológicos entre si y con aspectos ecológicos (tróficos) de los peces anuales.

Desde el punto de vista metodológico, se ha visto que dos metodologías relativamente recientes de codificación de caracteres con variabilidad intraespecífica (polimorfismos y

caracteres merísticos) son de utilidad para resolver relaciones de parentesco sobre todo a nivel específico. Dada la sensibilidad de los mismos sería interesante explorar la posibilidad de utilizar estas metodologías complementando a los análisis filogeográficos.

La distribución de las especies de este grupo también resultó en algunos patrones interesantes. Por un lado la alta cantidad de endemismos en la zona sur de la cuenca de la Laguna Merín resalta la importancia de esta zona como generadora de especies y por tanto la importancia en la generación de políticas de conservación, no solamente de las especies que ahí habitan sino también de los procesos que las habrían generado. Es importante entonces realizar investigaciones a nivel de la biología de la conservación con el fin de establecer zonas y poblaciones de alta prioridad de conservación. Por otro lado se observó una estrecha relación entre la cuenca alta del Río Negro y la cuenca alta del Río Tacuarí, con especies en común para ambas. Este patrón podría estar apuntando a fenómenos geomorfológicos locales como también a la existencia de mecanismos de dispersión desconocidos hasta ahora en los peces anuales (transporte por aves). El desarrollo de trabajos de filogeografía en las especies comunes a ambas zonas puede arrojar luz sobre este patrón de distribución tan particular.

Referencias bibliográficas

- Ahl, E., 1922. Die gattung *Cynolebias* Steindachner. *Blätter für Aquarien und Terrarienkunde* 33:1-5.
- Ahl, E., 1924. Ueber einige neue Fische aus Süd Amerika. *Zoologischer Anzeiger* 108: 304-310.
- Almeida, M. T. & F. A. Bisby, 1984. A simple method for establishing taxonomic characters from measurement data. *Taxon* 33: 405-409.
- Amato, L. H., 1986. Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876, de Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Mont.* 11(162): 1-27.
- Amato, L., 1987. Descripción de *Cynolebias cyaenus* n. sp., nuevo pez anual del Estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Mont.* 11(163): 1-11.
- Arnold, M. L., 1992. Natutal hybridization as an evolutionary process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 237-261
- Beheregaray, L. B., P. Sunnucks & D. A. Briscoe, 2001. A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc. R. Soc. Lond.* 269:65-73.
- Belote, D. F. & W. J. E. M. Costa, 2002. Reproductive behavior patterns in the neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. *Boletim do Museu Nacional, Nova Série Rio de Janeiro-Brasil* 489:1-10.
- Berkenkamp, H. O., V. Etzel, J. J. Reichert & H. Salvia, 1994. Ein neuer Fächerfisch aus Uruguay. *Cynolebias vazferreirai* sp. n.. *Das Aquarium* 306:11-19.

- Berkenkamp, H. O., J. J. Reichert & F. Prieto, 1997. Ein neuer Fächerfisch aus dem Bezirk Tacuarembó, Nordost-Uruguay. *Cynolebias nioni* spec. nov. (Cyprinodontiformes – Rivulidae) *Aquaristik aktuell* 3:30-34.
- Bernatchez, L. & J. J. Dodson, 1991. Phylogenetic structure in mitochondrial DNA of the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and its relation to Pleistocene glaciations. *Evolution* 45:1016-1035.
- Bookstein, F. L., 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. New York: Cambridge University Press.
- Braga, L., 1999. Primeros registros para Argentina de tres especies de la familia Rivulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Physis* 57 (132-133): 11-15.
- Brooks, D. R. & D. A. McLennan, 1991. Phylogeny, ecology, and behavior. A research program in comparative biology. Chicago: University of Chicago Press.
- Calviño, P. A., 2003. Redescubriendo *Austrolebias robustus*. *Boletín del Killiclub Argentino* suplemento N° 1: 1-15.
- Cardozo, V., 1999. Tasa Metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). Tesis de Maestría. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Carvalho, G. R. & L. Hauser, 1999. Molecular markers and the species concept: New techniques to resolve old disputes? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:379-382.
- Castello, H. P. & R. P. López, 1974. *Cynolebias alexandri*, a new species of annual killifish from Argentina, with notes on *C. bellottii*. *Trop. Fish Hobby*. 23(9): 34-42.
- Costa, W. E. J. M., 1989. Redescricao do genero *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), com a descricao de uma nova especie da bacia do Rio Tocantins. *Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Ser. Zoologia* 2(9): 181-190.
- Costa, W. E. J. M., 1990. Analise filogenetica da familia Rivulidae (Cyprinodontiformes,

- Aplocheiloidei). *Rev. Brasil. Biol.* 50(1):65-82.
- Costa, W. J. E. M., 1995. Pearl Killifishes. The Cynolebiatinae. Systematics and biogeography of a neotropical annual fish subfamily (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Neptune: T. F. H. Publications.
- Costa, W. J. E. M., 1996. Phylogenetic and biogeographic analysis of the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Comp. Biol.* 1:129-140.
- Costa, W. J. E. M., 1998. Revision of the neotropical annual fish genus *Plesiolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 8:313-334.
- Costa, W. E. J. M., 1998a. Phylogeny and classification of rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in Rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *J. Comp. Biol.* 3(1): 33-94.
- Costa, W. E. J. M., 1998b. Rediscovery and redescription of *Cynolebias carvalhoi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 9(3): 305-310.
- Costa, W. E. J. M., 1999. *Cynolebias periodicus*, a new annual fish from the rio Ibicuí drainage, southern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 10(4):297-302.
- Costa, W. E. J. M., 2001. The neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 12(4): 333-383.
- Costa, W. E. J. M., 2002. Monophyly and phylogenetic relationships of the neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia* 2002(4): 916-927.
- Costa, W. J. E. M., 2003. The *Simpsonichthys flavicaudatus* species group

- (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiantinae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 14(1): 31-60.
- Costa, W. E. J. M. & M. M. Cheffe 2001. Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna Dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (Ahl) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Ser Zoologia* 14(2): 179-200.
- Dingerkus, G. & L. D. Uhler (1977) Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing flesh. *Stain Technol.* 52: 229-232.
- Dowling, T. E. & C. L. Secor, 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 593-619.
- Errea, A. & E. Danulat, 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes.* 61:261- 268.
- Felsestein, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. *Amer. Nat.* 125:1-15.
- Futuyma, D. J., 1986. Evolutionary Biology. Second Edition. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Garavello, J. C., H. A. Britski & S. A. Schaefer, 1998. Systematics of the genus *Otothyris* Myers 1927, with comments on geographic distribution (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae). *American Museum Novitates* 3222.
- García, G., 1996. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas y de los eventos de cladogénesis en el género *Cynolebias* Steindachner 1876, en base a datos cromosómicos y de ADN mitocondrial. Tesis de Doctorado. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo..
- García, G., E. Scvortzoff, M. C. Maspoli & R. Vaz-Ferreira R, 1993. Analysis of karyotypic

- evolution in natural populations of *Cynolebias* (Pisces: Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Cytologia* 58:85-94.
- García, G., E. Sevortzoff & A. Hernández, 1995. Karyotypic heterogeneity in South American killifishes of the genus *Cynolebias* (Pisces, Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Cytologia*, 60: 103-110.
- García, G., G. Wlasiuk & E. Lessa, 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 129: 93-110.
- García, G., A. I. Lalanne, G. Aguirre & M. Cappetta, 2001. Chromosome evolution in the annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis. *Chromosome Research* 9: 437-448.
- García, G., F. Alvarez-Valin & N. Gomez, 2002. Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76:49-59.
- García-Rodríguez, F., C. Castiñeira, B. Scharf & P. Sprechmann, 2002. The relationship between trophic state and sea level variation in the Rocha Lagoon, Uruguay. *N. Jb. Geol. Paläont. Mh* 2002(1): 27- 47.
- García-Rodríguez, F. & A. Witkowiak, 2003. Inferring sea level variation from relative percentages of *Pseudopodosira kosugii* in Rocha Lagoon, SE Uruguay. *Diatom Research* 18(1): 49-59.
- Gillespie, J. H., 2001. Is the population size of a species relevant to its evolution? *Evolution* 55(11): 2161-2169.
- Hall, D. W., M. Kirkpatrick & B. West, 2000. Runaway sexual selection when female preferences are directly selected. *Evolution* 54(6): 1862-1869.
- Hewitt, G. M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and

- speciation. *Biol. Journ. Linn. Soc.* 58:247-276.
- Hrbek, T. & A. Larson, 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* 53(4): 1200-1216.
- Huber, J. H., 1995. Synthetic description of four new annual rivulin cyprinodonts from Paraguay. *Freshwater and Marine Aquarium* 18(11): 104-124.
- Huber, J. H., 1998. Comparison of Old World and New World Tropical Cyprinodonts. Société Française d'Ichtyologie. Paris: Museum National d' Histoire Naturelle.
- Huston, M. A., 1994. Biological Diversity. The coexistence of species on changing landscapes. Cambridge University Press, Cambridge.
- James, F. & Ch. McCulloch, 1990. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 129-166.
- Johnson, P. A. & U. Gullberg, 1998. Theory and Models of Sympatric Speciation. En "Endless forms. Species and speciation" (Howard D. J, & S. H. Berlocher, eds). Oxford University Press, New York.
- Kitching, I. J., P. L. Forey, C. J. Humphries & D. M. Williams, 1998. Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis. Oxford: Oxford University Press.
- Lande, R., 1981. Models of speciation by sexual selection on phylogenetic traits. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 78, 3721-3725.
- Lambeck, K., T. M. Esat & E. K. Potter, 2002. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature* 419:199-206.
- Lehman, N., A. Eisenhauer, K. Hansen, L. D. Mech & R. O. Patterson, 1991. Introgression of Coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. *Evolution* 45:104-119.
- Linder, H. P., 2001. On areas of endemism, with an example from African Restionaceae. *Syst.*

- Biol.* 50(6): 892-912.
- Loureiro, M., 1996. Osteology, morphology and female choice in species of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). MSc. Thesis dissertation, University of Richmond, VA.
- Loureiro, M., 1999. Variación morfológica en *Cynolebias adloffii* y *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2a. época) (Actas V Jornadas de Zoología del Uruguay)* 11, 27.
- Loureiro, M., 2001. Análisis filogenético de las especies del género *Cynolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae), un estudio preliminar. VI Jornadas de Zoología del Uruguay.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 1996. External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 1996 (4): 1016-1022.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 1998. Osteological analysis of the killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Morph.* 238:245-262.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 2000. Ornamentación del corion en los huecos de especies de *Austrolebias* y *Simpsonichthys* (Rivulidae: Cynolebiatinae). *FACENA* 16: 85-91.
- Loureiro, M. & G. García, en prensa. *Cynolebias reicherti*, a new annual fish species (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merín basin. *Acta Zoológica Lilloana*.
- Loureiro, M., M. Azpelicueta y G. García, en prensa. *Austrolebias arachan* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a new species of annual fish from northeastern Uruguay. *Revue Suisse de Zoologie*.
- Loureiro, M., & A. D'Anatro, en revisión. Geographic variation in the annual killifish *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Enviado a *Journal of Fish Biology*.

- Lucena, C. A. S., L. R. Malabarba & R. E. Reis, 1992. Resurrection of the Neotropical pimelodid catfish *Parapimelodus nigribarbis* (Boulenger), with a phylogenetic diagnosis of the genus *Parapimelodus* (Teleostei: Siluriformes). *Copeia* 1992(1): 138-146.
- Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L., & Wesselingh, F. (1998). The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In *Phylogeny and classification of neotropical fishes*, (Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S., eds.) pp 13-48. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Lydeard, C., M. C. Wooten & A. Meyer, 1995. Molecules, morphology, and area cladograms: a cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). *Syst Biol* 44(2): 221-236.
- Maddison, W. P., M. J. Donoghue & D. R. Maddison, 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Syst. Zool.* 33:83-103.
- Menezes, N. A., 1988. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from Central and southern South America. *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*, W. R. Heyer & P. E. Vanzolini (eds.), Academia Brasileira de Ciências 295-304.
- McCune, A. R. & N. R. Lovejoy, 1998. The relative rate of sympatric and allopatric speciation in fishes: test using DNA sequence divergence between sister species. En "Endless forms. Species and speciation" (Howard D. J, & S. H. Berlocher, eds). Oxford University Press, New York.
- Monteiro, L. R. & S.F. dos Reis, 2000. Principios de morfometria geométrica. Holos: Ribeirão Preto.
- Morrone, J. J. & J. V. Crisci, 1995. Historical biogeography: introduction to methods. *Annu.*

- Rev. Ecol. Syst.* 26:373-401.
- Murphy, W. J. & G. E. Collier, 1997. A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): The role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.* 14:790-799.
- Murphy, R. W. & K. D. Doyle, 1998. Phylogenetics and polymorphic characters in genealogical estimation. *Syst Biol.* 47(4): 37-761.
- Murphy, W. J., T. N. P. Nguyen, E. B. Taylor, & G. E. Collier, 1999a. Mitochondrial DNA Phylogeny of West African Aplocheiloid Killifishes (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(3): 343-350.
- Murphy, W. J., J. E. Thomerson & G. E. Collier, 1999b. Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(2): 289-301.
- Myers, G. S., 1942. Studies on South American fresh-water fishes. I. *Stanford Ichthyological Bull.* 2:89-114.
- Myers, G. S., 1947. The Amazon and its fishes: Part 4. The fish in its environment. *Aquarium J.* 18(7): 8-19.
- Parenti, L. R., 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 168 (4): 341-557.
- Redenbach, Z & E. B. Taylor, 2002. Evidence for historical introgression along a contact zone between two species of charr (Pisces: Salmonidae) in northwestern North America. *Evolution* 56 (5): 1021-1035.
- Regan, C. T., 1912. A revision of the Poeciliid fishes of the genera *Rivulus*, *Pterolebias*, and *Cynolebias*. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 8(10): 494-508.
- Reichert, J., 1994. Láminas y datos complementarios sobre las especies del género

- Cynolebias* Steindachner 1876, halladas y descritas para Uruguay, hasta el año 1986. *Acuariología -Comunicaciones Ictiológicas*, 2(6), 1-38.
- Reis, R. E., 1998. Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of available data. In *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena Z. M., Lucena, C. A. S., eds.), pp. 351-362. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Reis, R. E. & S. A. Schaefer, 1998. New cascudinhos from southern Brazil: systematics, endemism, and relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *American Museum Novitates*, 3254.
- Rohlf, F. J. & D. Slice, 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39(1):40-59.
- Santamaría, L. & M. Klaassen, 2002. Waterbird-mediated dispersal of aquatic organisms: an introduction. *Acta Oecológica*, 23: 115-119.
- Schaefer, S. A., 1997. The Neotropical cascudinhos: systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 148:1-120.
- Schaefer, S. A., 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena Z. M., Lucena, C. A. S., eds.), pp. 375-400. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Schluter, D., 1998. Ecological causes of speciation. En "Endless forms. Species and speciation" (Howard D. J, & S. H. Berlocher, eds). Oxford University Press, New York.
- Simpson, B. R. C., 1979. The phenology of annual killifishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44: 243-261.

- Sprechmann, P., 1978. The paleoecology and paleogeography of the uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. *Zitteliana* 4, 3-72.
- Steindachner, F., 1876. Ichthyologische Beiträge V. Teil 3. Über einige Meeresfische von den Küsten Brasiliens. *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Abt. 1, Math.-Naturwiss. Cl.* 74:173-175.
- Swiderski, D. L., M. L. Zelditch & W. L. Fink, 1998. Why morphometrics is not special: coding quantitative data for phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 47(3): 508-519.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thiele, K., 1993. The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics* 9:27-304.
- Vari, R. P., 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*, W. R. Heyer & P. E. Vanzolini (eds.), Academia Brasileira de Ciências 343-377.
- Vari, R. P., 1989. Systematics of the Neotropical characiform genus *Psectrogaster* Eigenmann and Eigenmann (Pisces: Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology* 481.
- Vari, R. P. & L. R. Malabarba, 1998. Neotropical ichthyology: an overview. En *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena Z. M., Lucena, C. A. S., eds.), pp. 1-11. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra & S. Scaglia, 1964a. Ecoetología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner 1876. *Arch. Soc. Biol. Montev.* 26: 44-49.
- Vaz-Ferreira, R., B. Sierra & S. Scaglia, 1964b. Tres especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876 (Teleostomi, Cyprinodontidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montev.* 8(102):

- Vaz-Ferreira, R. y B. Sierra, 1973. Caracteres etológicos, genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Bol. Soc. Zool. Uruguay*, 2: 22-35.
- Vaz-Ferreira, R. y A. R. Melgarejo, 1984. La distribución de las especies del género *Cynolebias* Steindachner 1876, en el Uruguay, con notas sobre *C. alexandri* Castello y Lopez, 1974. *Bol. Soc. Zool., Uruguay*, 2:41-46.
- Whitlock, M. C., 2000. Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* 54(6):1855-1861.
- Wiens, J. J., 1995. Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Syst. Biol.*, 44 (4): 482-500.
- Wiens, J. J., 2000. Coding morphological variation within species and higher taxa for phylogenetic analysis. En: *Phylogenetic analysis of morphological data* (Edited by J. J. Wiens), pp 115-145. Washington D.C: Smithsonian Institution Press.
- Wiens, J. J., 2001. Character analysis in morphological phylogenetics: problems and solutions. *Syst Biol.* 50(5):689-699.
- Wiens, J. J. & M. R. Servedio, 1997. Accuracy of phylogenetic analysis including and excluding polymorphic characters. *Syst. Biol.* 46(2):332-345.
- Wiens, J. J., P. T. Chippindale & D. M. Hillis, 2003. When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Syst. Biol.* 52(4): 501-514.
- Wildekamp, R. H., 1995. A world of killies. Atlas of the oviparous cyprinidontiform fishes of the world, Volume II. American Killifish Association.
- Wiley, E. O., 1981. *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics*. New York: John Wiley.
- Wourms, J.P., 1972a. The developmental biology of the annual fishes. pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology* 182,169-200.

Wourms, J. P., 1972b. The developmental biology of annual fishes. III pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.*, 182: 389-414.

Apéndices

Apéndice I. Lista de las especies utilizadas en este trabajo. Los lotes pertenecen a las colecciones de: Facultad de Ciencias, Montevideo (ZVC-P); Museo de Ciencia y Tecnología, Universidad Pontificia de Porto Alegre (MCP); Academy of Sciences of Philadelphia (ANSP); Museum of Zoology, University of Michigan (UMMZ); Muséum d'histoire naturelle de Genève (MHNG); C&S = ejemplares transparentados.

Austrolebias adloffii Ahl: ANSP 168844 6 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Canoas, ZVC-P 724, 25 ej., (8 C&S), Brasil, Río Grande do Sul, Niteroi, charco cercano al pueblo; ZVC-P 747, 25 ej., Brasil, Río Grande do Sul, charco cercano al Río Gravataí; ZVC-P 854, 16 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Niteroi, charco cercano al Río Gravataí; ZVC-P 855, 13 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Niteroi, Villa Río Branco; MCP 10288, 12 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Canoas, Río dos Sinos; MCP 15040, 2 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Río Gravataí; MCP 10933, 20 ej., Brasil, Río Grande do Sul, Alvorada, Río, Río Gravataí; UMMZ 168844, 4 ej., Brasil, Canoas; UMMZ 181681, 16 ej., Brasil, cercanías de Porto Alegre; UMMZ 181682, 22 ej. (2C&S), Brasil, cercanías de Porto Alegre.

Austrolebias affinis Amato: ZVC-P 4300 4 ej. ZVC-P 4301 6 ej., Uruguay, Tacuarembó, bañado A° Tres Cruces, ZVC-P 4302 10 ej., Uruguay, Tacuarembó, Ruta 26 km 256.2, ZVC-P 4305 4 ej., Uruguay, Tacuarembó, Río Tacuarembó y Ruta 26, ZVC-P 4306 6 ej., Uruguay, Tacuarembó, Río Tacuarembó y Ruta 26, 4307 10 ej., 4308 10 ej., Uruguay, Tacuarembó, A° Caraguatá y Ruta 26.

Austrolebias alexandri Castello & López: ZVC-P 2760 2 ej. (2C&S), Uruguay, Artigas, Bella Unión.

Austrolebias arachan Loureiro et al: ZVC-P 4336 (holotipo), 1 ej., ZVC-P 4574, 14 ej. (2 C&S), Uruguay, Cerro Largo, Ruta 7 y A° Chuy, ZVC-P 4314, 3 ej., ZVC-P 4317, 8 ej. (4 C&S), ZVC-P 4332, 15 ej., ZVC-P 4333, 19 ej. (8 C&S), Uruguay, Cerro Largo, Melo, camino al aeropuerto, ZVC-P 4329, 4 ej. (4 C&S), ZVC-P 4331, 21 ej. (3 C&S), MHNG 2641.88, 6 ej., Uruguay, Cerro Largo, Ruta 26 y Río Negro, ZVC-P 4335, 6 ej., Uruguay, Tacuarembó, Ruta 26 km 331, ZVC-P 4528, 6 ej. (2 C&S), Uruguay, Cerro Largo, Parque Municipal, Melo.

Austrolebias bellottii Steindachner: UMMZ 181683 3 ej. (3C&S)., Argentina, cercanías

de Buenos Aires, ZVC-P 708 10 ej., Argentina, Buenos Aires, Camino de la Costa, ZVC-P 712 1 ej., Argentina, Buenos Aires, Villa Elisa, ZVC-P 715 1ej., Argentina, Buenos Aires, Punta Lara, ZVC-P 716 3 ej., Argentina, Buenos Aires, Maschiwitz, ZVC-P 876, 61 ej. (19 C&S), Uruguay, Colonia, Carmelo, ZVC-P 954 5 ej., Argentina, Buenos Aires, camino Villa Elisa-Punta Lara.

Austrolebias charrua Costa & Cheffe: ZVC-P 3882 11 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 13 km 243, ZVC-P 3883 16 ej. (4C&S), ZVC-P 3884 6 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 13 y Ruta 16, ZVC-P 3885 4 ej., ZVC-P 3948 15 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 16 km 35, ZVC-P 3886 16 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 14 km 489.5, ZVC-P 3911 15 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 15 km 173, ZVC-P 3947 15 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 14 km 504, ZVC-P 3944 20 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Aduana del Chuy.

Austrolebias cinereus Amato: ZVC-P 658 6 ej., ZVC-P 797 14 ej., Uruguay, Colonia.

Austrolebias cyaenus Amato: ZVC-P 4310 6 ej., ZVC-P 4311 4 ej., Uruguay, Cerro Largo, Ruta 26 y Río Negro, ZVC-P 4313 10 ej., Uruguay, Melo.

Austrolebias duraznensis García et al: ZVC-P 4303 8 ej., Uruguay, Durazno, Sarandí del Yí.

Austrolebias luteoflamulatus Vaz-Ferreira et al: ZVC-P 4077 20 ej. (4C&S), ZVC-P 4101, Uruguay, 20 ej. (4C&S), Rocha, Ruta 10 km 225, ZVC-P 4085 9 ej. (2C&S), ZVC-P 4100 9 ej. (2C&S), ZVC-P 4104 7 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, camino a Puerto de los Botes, ZVC-P 4078 14 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 9 km 205, ZVC-P 784 6 ej. (2C&S), ZVC-P 786 11 ej. (2C&S), ZVC-P 893 6 ej., ZVC-P 902 8 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 10 y A° Valizas, ZVC-P 4082 20 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 9 km 228.5, ZVC-P 4107 13 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 10 Palmeras Gemelas, ZVC-P 4114 7 ej. (2C&S), ZVC-P 4112 8 ej. (2C&S), Uruguay, Treinta y Tres, Ruta 18 km 369.5, ZVC-P 4083 10 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, La Coronilla, ZVC-P 3942 9 ej. (1C&S), ZVC-P 4089 10 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 19 y A° San Luis, ZVC-P 4249 6 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 9 km 272, ZVC-P 4116 11 ej. (2C&S), Uruguay, Ruta 19 y A° San Miguel, ZVC-P 4115 20 ej. (4C&S), Uruguay, Ruta 14 km 269.2, ZVC-P 4248 4 ej., Uruguay, Treinta y Tres, Ruta 91.

Austrolebias gymnoventris Amato: ZVC-P 4318 2 ej., ZVC-P 4319 2 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 13 y A° India Muerta..

Austrolebias melanoorus Amato: ZVC-P 4320 16 ej., ZVC-P 4322, 10 ej. (2 C&S),

- Uruguay, Tacuarembó, Bañado A° Tres Cruces, ZVC-P 4323, 10 ej. (2 C&S), ZVC-P 4325 2 ej., Uruguay, Tacuarembó, Ruta 26 y Río Tacuarembó.
- Austrolebias nigripinnis* Regan: UMMZ 207493 30ej., UMMZ 207494 4ej., Paraguay, Misiones, Río Parana cerca de Ayolas, ZVC-P 718 3 ej., Argentina, Buenos Aires, Maschiwitz, ZVC-P 848 6 ej., Uruguay, Colonia, Nueva Palmira.
- Austrolebias vandenbergi* Huber: ANSP 175281, 3 ej., ANSP 175282 16 ej., ANSP 175283 3 ej., ANSP 175284 4 ej., ANSP 175285 7 ej., ANSP 175286 10 ej., ANSP 175287 9 ej., ANSP 175288 5 ej., ANSP 175289 20 ej., ANSP 175290 25 ej., ANSP 175291 20 ej., Paraguay, Boquerón, UMMZ 201174 12 ej., Paraguay, Boquerón, 419 km NW de Villa Hayes, UMMZ 207504 4 ej., Paraguay, Misiones 2 km ENE de Ayolas.
- Austrolebias vazferreirai* Berkenkamp: ZVC-P 4289 1 ej., Uruguay, Tacuarembó, Ruta 26 km 331, ZVC-P 4290 4 ej. (2C&S), ZVC-P 4295 6 ej. (2C&S), Uruguay, Tacuarembó, Ruta 26 y A° Caraguatá, ZVC-P 4291 4 ej. (2C&S), ZVC-P 4292 4 ej. (2C&S), ZVC-P 4296 1 ej., ZVC-P 4297 1 ej., ZVC-P 4298 2 ej., Uruguay, Cerro Largo, Melo, ZVC-P 4293 1 ej., ZVC-P 4294 3 ej., Uruguay, Ruta 26 y Río Negro.
- Austrolebias viarius* Vaz-Ferreira et al: ZVC-P 525, 50 ej. (8 C&S), Uruguay, Rocha, Palmeras gemelas, ZVC-P 596, 14 ej. (2 C&S) Uruguay, Rocha, Ruta 10 y A° Valizas.
- Austrolebias* sp1: ZVC-P 4362, 1 ej., ZVC-P 4363, 18 ej. (9 C&S), Uruguay, Treinta y Tres, 300 m al este de Ruta 18, 1 km al norte de la ciudad de Vergara, ZVC-P 4365, 5 ej. (2C&S), Uruguay, Treinta y Tres, Ruta 18 y Río Tacuarí, ZVC-P 4366, 5 ej., Uruguay, Cerro Largo, ruta hacia el Balneario Laguna Merín, ZVC-P 4367, 5 ej., Uruguay, Cerro Largo, Ruta 26, 5 km W de Río Branco, ZVC-P 4370, 10 ej., Uruguay, Treinta y Tres, Ruta 91, 29 km N de General Martínez.
- Cynolebias microphthalmus* Costa: ZVC-P 955 1 ej. (1C&S), Brasil, Ceará, ZVC-P 2769 1 ej. (1C&S), Brasil, Rio Grande del Norte, Mossoró.
- Cynopoecilus melanotaenia* Regan: ZVC-P 528 6 ej. (2C&S), Brasil, Rio Grande do Sul, ZVC-P 739 1 ej., Brasil, Rio Grande do Sul, Río Guaíba, ZVC-P 3695 1 ej., Rio Grande do Sul, Niteroi, Villa Rio Branco, ZVC-P 3946 2 ej., Uruguay, Treinta y Tres, Arrozal Treinta y Tres, ZVC-P 4066 1 ej., Uruguay, Rocha.
- Megalebias cheradophilus* Vaz-Ferreira et al: ZVC-P 518 1 ej., ZVC-P 4283 1 ej., Uruguay, Rocha, A° Valizas, ZVC-P 2584 1 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 16 Paso del bañado, ZVC-P 4282 3 ej. (1C&S), ZVC-P 4287 5 ej. (3C&S), Uruguay, Rocha, Ruta

9 km 260, ZVC-P 4285 2 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 13 a 1 km de Ruta 16, ZVC-P 4288 3 ej. (1C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 9 km 261.

Megalebias elongatus: Material no ingresado (10 ej.) de Argentina, Buenos Aires, Villa Elisa.

Megalebias prognathus Amato: ZVC-P 4273 1 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 9 km 272, ZVC-P 4274 3 ej. (2C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 14 km 504, ZVC-P 4275 2 ej. (1C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 19 y A° San Miguel.

Megalebias wolterstorffi Ahl: UMMZ 181684 25 ej., UMMZ 181685 15 ej. (3C&S), Brasil, Río Grande do Sul, cercanías de Porto Alegre, ZVC-P 853 3 ej. (1C&S), Brasil, Rio Grande do Sul, San Leopoldo, ZVC-P 901 1 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 19 y A° San Miguel, ZVC-P 3694 4 ej. (2C&S), Brasil, Rio Grande do Sul, Niteroi, ZVC-P 4277 8 ej. (4C&S), Uruguay, Rocha, Ruta 13 y A° India Muerta, ZVC-P 4278 2 ej., Uruguay, Rocha, Ruta 14 km 504.

Nematolebias whitei Carvalho: Material no ingresado proveniente del mercado acuarista (55 ej.)

Papiliolebias bitteri Costa: ANSP 170422 19 ej., ANSP 170423 2 ej., ANSP 173087 6 ej., ANSP 175271 1 ej., ANSP 175272 9 ej., ANSP 175273 2 ej., ZVC-P 2766 20 ej. (5C&S), Paraguay, Nueva Asunción, Americo Picco.

Rivulus sp Regan: ZVC-P 2770 6 ej. (3C&S), Brasil, Pará, Santarem.

Simpsonichthys chacoensis Amato: Material no ingresado proveniente del mercado acuarista (2 ej.), ANSP 170272 3 ej., ANSP 170273 2 ej.,

Simpsonichthys constanciae Myers: Material no ingresado proveniente del mercado acuarista (46 ej.).

Apéndice II. Codificación del carácter 48 (número de radios de la aleta caudal) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 38 (*M. elongatus*) y el mínimo 18 (*A. sp1*).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	6	27.7	14	@
<i>P. bitteri</i>	10	24.9	8	8
<i>C. melan</i>	22	28	15	A
<i>N. whitei</i>	18	28.7	16	B
<i>S. consta</i>	18	22.4	2	2
<i>S. chacoe</i>	8	23.9	5	5
<i>C. microp</i>	2	31	22	H
<i>M. wolter</i>	21	30.7	21	G
<i>M. progna</i>	10	32.5	25	K
<i>M. cherad</i>	37	30.6	21	G
<i>M. elonga</i>	7	35.1	31	Q
<i>A. vazferr</i>	24	29	17	C
<i>A. cinerer</i>	29	28.4	16	B
<i>A. bellotti</i>	30	22.9	3	3
<i>A. vanden</i>	7	25.4	9	9
<i>A. sp3</i>	21	23.9	5	5
<i>A. melano</i>	12	27.3	13	>
<i>A. adloffii</i>	58	21.6	0	0
<i>A. arachan</i>	21	23.1	4	4
<i>A. viarius</i>	46	23.8	5	5
<i>A. charrua</i>	95	23.5	4	4
<i>A. sp1</i>	36	21.5	0	0
<i>A. luteof</i>	46	23.2	4	4
<i>A. gymno</i>	11	21.8	1	1
<i>A. nigrip</i>	93	23.2	4	4
<i>A. alexan</i>	35	24.6	7	7
<i>A. affinis</i>	50	25.2	8	8
<i>A. cyaenus</i>	20	26.8	12	=
<i>A. durazn</i>	32	24.8	7	7

Apéndice III. Codificación del carácter 49 (número de radios de la aleta dorsal de los machos) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 31 (*A. vandenbergi*) y el mínimo 7 (*Rivulus* sp).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	6	8.3	0	0
<i>P. bitteri</i>	10	12.4	8	8
<i>C. melan</i>	15	17.5	17	C
<i>N. whitei</i>	30	16.2	15	A
<i>S. consta</i>	30	17.9	18	D
<i>S. chaco</i>	5	24.0	29	O
<i>C. microp</i>	1	17.0	16	B
<i>M. wolter</i>	12	19.8	22	H
<i>M. progna</i>	9	18.2	19	E
<i>M. cherad</i>	20	21.1	24	J
<i>M. elonga</i>	3	17.3	17	C
<i>A. vazferr</i>	14	23.6	29	O
<i>A. cinerer</i>	17	23.8	29	O
<i>A. bellotti</i>	52	24.9	31	Q
<i>A. vanden</i>	20	24.5	30	P
<i>A. sp3</i>	11	24.1	29	O
<i>A. melano</i>	12	24.8	31	Q
<i>A. adloffii</i>	18	21.8	25	K
<i>A. arachan</i>	44	23.6	29	O
<i>A. viarius</i>	100	22.2	26	L
<i>A. charrua</i>	37	22.7	27	M
<i>A. sp1</i>	57	21.6	25	K
<i>A. luteof</i>	21	23.6	29	O
<i>A. gymno</i>	5	22.4	26	L
<i>A. nigrip</i>	37	23.4	28	N
<i>A. alexan</i>	15	22.9	27	M
<i>A. affinis</i>	25	23.6	29	O
<i>A. cyaenus</i>	10	23.0	27	M
<i>A. durazn</i>	32	23.5	28	N

Apéndice IV. Codificación del carácter 50 (número de radios de la aleta dorsal de las hembras) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 26 (*A. bellottii*) y el mínimo 7 (*Rivulus* sp).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	6	8.33	0	0
<i>P. bitteri</i>	10	12.4	9	9
<i>C. melan</i>	8	17.5	20	E
<i>N. whitei</i>	25	12.9	10	:
<i>S. consta</i>	15	16.0	17	B
<i>S. chaco</i>	10	16.0	17	B
<i>C. microp</i>	1	17.0	19	D
<i>M. wolter</i>	8	17.8	21	F
<i>M. progna</i>	9	18.22	22	H
<i>M. cherad</i>	17	17.7	21	F
<i>M. elonga</i>	4	16.2	18	C
<i>A. vazferr</i>	7	21.1	26	K
<i>A. cinerer</i>	11	20.0	26	K
<i>A. bellotti</i>	56	21.4	29	N
<i>A. vanden</i>	10	22.2	31	P
<i>A. sp3</i>	13	19.0	24	I
<i>A. melano</i>	9	17.5	20	E
<i>A. adloffii</i>	19	20.4	27	L
<i>A. arachan</i>	36	17.7	21	F
<i>A. viarius</i>	100	17.8	21	F
<i>A. charrua</i>	39	198.9	24	I
<i>A. sp1</i>	67	16.9	19	D
<i>A. luteof</i>	24	17.8	21	F
<i>A. gymno</i>	6	18.0	22	G
<i>A. nigrip</i>	33	17.7	21	F
<i>A. alexan</i>	20	18.6	23	H
<i>A. affinis</i>	24	17.4	20	E
<i>A. cyaenus</i>	10	18.0	22	G
<i>A. durazn</i>	29	17.1	20	E

Apéndice V. Codificación del carácter 51 (número de radios de la aleta anal de los machos) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 33 (*A. bellottii*) y el mínimo 12 (*Rivulus* sp).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	6	12.8	0	0
<i>P. bitteri</i>	10	18.6	10	:
<i>C. melan</i>	15	23.5	19	E
<i>N. whitei</i>	30	21.0	15	A
<i>S. consta</i>	30	24.1	20	F
<i>S. chaco</i>	10	24.0	20	F
<i>C. microp</i>	1	19.0	11	<
<i>M. wolter</i>	13	25.3	23	I
<i>M. proгна</i>	10	23.8	20	F
<i>M. cherad</i>	20	21.7	16	B
<i>M. elonga</i>	3	23.3	19	E
<i>A. vazferr</i>	13	25.2	22	H
<i>A. cinerer</i>	18	25.3	23	I
<i>A. bellotti</i>	64	30.0	31	Q
<i>A. vanden</i>	10	29.0	29	O
<i>A. sp3</i>	12	29.8	31	Q
<i>A. melano</i>	12	26.8	25	K
<i>A. adloffii</i>	18	24.9	22	H
<i>A. arachan</i>	44	24.0	20	F
<i>A. viarius</i>	100	24.1	20	F
<i>A. charrua</i>	34	25.9	24	J
<i>A. sp1</i>	57	23.5	19	E
<i>A. luteof</i>	21	21.4	15	A
<i>A. gymno</i>	5	21.2	15	A
<i>A. nigrip</i>	36	22.3	17	C
<i>A. alexan</i>	15	23.5	19	E
<i>A. affinis</i>	26	23.2	19	E
<i>A. cyaenus</i>	9	22.8	18	D
<i>A. durazn</i>	32	23.4	19	E

Apéndice VI. Codificación del carácter 52 (número de radios de la aleta anal de las hembras) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 33 (*A. bellottii*) y el mínimo 12 (*Rivulus* sp).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	6	12.8	0	0
<i>P. bitteri</i>	10	18.6	11	;
<i>C. melan</i>	8	22.75	20	E
<i>N. whitei</i>	25	18.4	11	;
<i>S. consta</i>	15	23.13	20	E
<i>S. chaco</i>	10	22.0	18	C
<i>C. microp</i>	1	17.0	8	8
<i>M. wolter</i>	8	24.0	22	H
<i>M. proгна</i>	10	23.8	22	G
<i>M. cherad</i>	16	19.0	12	<
<i>M. elonga</i>	2	20.5	15	@
<i>A. vazferr</i>	11	23.8	22	G
<i>A. cinerer</i>	11	23.0	20	E
<i>A. bellotti</i>	26	28.5	31	P
<i>A. vanden</i>	10	28.0	30	O
<i>A. sp3</i>	13	26.3	27	L
<i>A. melano</i>	9	22.1	18	C
<i>A. adloffii</i>	19	23.9	22	G
<i>A. arachan</i>	36	19.5	13	=
<i>A. viarius</i>	100	20.4	15	@
<i>A. charrua</i>	36	22.53	19	D
<i>A. sp1</i>	67	19.76	14	>
<i>A. luteof</i>	24	17.7	10	:
<i>A. gymno</i>	6	16.8	8	8
<i>A. nigrip</i>	33	18.8	12	<
<i>A. alexan</i>	20	20.1	14	>
<i>A. affinis</i>	24	19.7	14	>
<i>A. cyaenus</i>	10	20.4	15	@
<i>A. durazn</i>	29	18.72	12	<

Apéndice VII. Codificación del carácter 59 (posición de la aleta dorsal de los machos en relación a las vértebras) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 22 (*Rivulus* sp) y el mínimo 5 (*A. nigripinnis*).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	3	20.0	31	Q
<i>P. bitteri</i>	10	13.8	17	C
<i>C. melan</i>	14	11.0	11	<
<i>N. whitei</i>	9	12.2	13	>
<i>S. consta</i>	9	9.7	8	8
<i>S. chaco</i>	1	8.0	4	4
<i>C. microp</i>	1	15.0	20	F
<i>M. wolter</i>	13	12.6	14	@
<i>M. progn</i>	3	15.0	20	F
<i>M. cherad</i>	20	12.0	13	>
<i>M. elonga</i>	3	16.0	22	H
<i>A. vazferr</i>	13	9.1	6	6
<i>A. cinerer</i>	17	8.7	5	5
<i>A. bellotti</i>	16	7.8	3	3
<i>A. vanden</i>	10	9	6	6
<i>A. sp3</i>	9	8.8	6	6
<i>A. melano</i>	7	8.4	5	5
<i>A. adloff</i>	11	7.2	2	2
<i>A. arachan</i>	12	7.7	3	3
<i>A. viarius</i>	20	8.2	4	4
<i>A. charrua</i>	54	8.1	4	4
<i>A. sp1</i>	16	7.8	3	3
<i>A. luteof</i>	21	7.0	2	2
<i>A. gymno</i>	5	6.4	0	0
<i>A. nigrip</i>	48	6.6	1	1
<i>A. alexan</i>	15	7.4	2	2
<i>A. affinis</i>	26	7.4	2	2
<i>A. cyaenus</i>	10	7.4	2	2
<i>A. durazn</i>	15	7.1	2	2

Apéndice VIII. Codificación del carácter 60 (posición de la aleta dorsal de las hembras en relación a las vértebras) de acuerdo al método “gap weighting”; TH = valor re-escalado de la media de acuerdo a la ecuación 1; el valor máximo de este carácter fue 22 (*Rivulus* sp) y el mínimo 8 (*A. bellottii*, *A. alexandri*, *A. adloffii*, *A. sp1*).

Especie	N	Media	TH	Cod.
<i>Rivulus</i> sp	3	20.0	31	Q
<i>P. bitteri</i>	10	13.8	14	@
<i>C. melan</i>	8	11.2	7	7
<i>N. whitei</i>	9	13.7	14	@
<i>S. consta</i>	9	10.4	5	5
<i>S. chaco</i>	1	12.0	9	9
<i>C. microp</i>	1	15.0	17	C
<i>M. wolter</i>	8	14.7	16	B
<i>M. progn</i>	4	16.5	21	G
<i>M. cherad</i>	14	14.3	21	A
<i>M. elonga</i>	4	14.5	16	B
<i>A. vazferr</i>	11	10.6	5	5
<i>A. cinerer</i>	10	10.6	5	5
<i>A. bellotti</i>	11	9.3	2	2
<i>A. vanden</i>	5	11.4	7	7
<i>A. sp3</i>	8	10.5	5	5
<i>A. melano</i>	6	10.6	5	5
<i>A. adloffii</i>	11	8.8	0	0
<i>A. arachan</i>	7	10.4	5	5
<i>A. viarius</i>	24	10.3	4	4
<i>A. charrua</i>	48	10.2	4	4
<i>A. sp1</i>	19	9.6	2	2
<i>A. luteof</i>	22	10.7	5	5
<i>A. gymno</i>	6	9.1	1	1
<i>A. nigrip</i>	42	9.7	3	3
<i>A. alexan</i>	20	9.5	2	2
<i>A. affinis</i>	23	10.1	4	4
<i>A. cyaenus</i>	10	10.2	4	4
<i>A. durazn</i>	15	10.4	5	5

Apéndice IX. Matriz de caracteres utilizados en el análisis filogenético codificando los caracteres polimórficos por el método de “frequency bins” y los caracteres continuos con el método “gap weighting”.

<i>P. bitteri</i>	00000	00000	00000	01000	01000	00000	01000	10010	09010	00000	00000	8 892:	<1000	00C@0	01000	00000	00010	00000	000
<i>Rivulus</i> sp	00000	00100	00000	00000	00000	01000	00000	00010	00000	00000	10000	@000	01000	00QQ0	00000	00000	00000	00000	000
<i>C. melanotaenia</i>	00000	00000	01100	01010	00000	01010	01011	00110	00111	00002	10120	ACF3E	F1111	00<70	00000	01000	00000	01000	000
<i>N. whitei</i>	00000	01001	01101	11000	00100	02031	00011	01100	00111	00002	10170	BA:3A	<1111	00>@0	01000	01100	20010	00000	100
<i>S. constanciae</i>	00000	01100	00001	01101	01100	02020	01011	00111	04111	10102	00150	2 DC3F	F0111	00850	01000	01100	00010	00000	000
<i>S. chacoensis</i>	00000	01000	01001	01000	01100	02020	00011	00111	09111	11102	00000	5 OC3F	D0111	104 90	01000	01100	00010	00000	100
<i>C. microphthalmus</i>	00000	01110	10110	01010	01000	02131	00011	01111	00101	11192	20001	HBE2<	81101	00FC0	23100	04110	22100	01000	000
<i>M. wolterstorffi</i>	11001	11020	10100	01010	01010	11120	12111	00111	11111	11182	20291	GHG3I	H110 0	00@B0	12000	03111	00000	00010	000
<i>M. prognathus</i>	11010	01020	10110	01010	11011	03130	10011	00111	00111	11192	21171	KEI3F	J110 0	00FG0	23100	13111	02000	00010	000
<i>M. elongatus</i>	11110	01020	10100	01010	11011	03030	00111	00111	08111	11172	21291	QCD3E	A1100	00HB0	24110	14111	22100	00010	000
<i>M. cheradophilus</i>	00000	01020	10100	01010	01010	02031	00111	10111	09111	11192	20191	GJG3B	=1200	00>A0	23000	12011	22100	01010	000
<i>A. vazferreirai</i>	00000	01020	10100	01010	01000	02030	00011	10111	08211	11192	10150	COL3H	H0100	00650	02000	02101	22111	00010	010
<i>A. cinereus</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02020	10011	10111	07111	11192	10120	BOL3I	F0100	00550	02000	02101	12011	00010	010
<i>A. alexandri</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	12011	10111	05111	11172	00170	7MI3E	@0100	00220	01000	01001	10010	20011	002
<i>A. nigripinnis</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	12011	10111	05111	11152	00130	4NG3C	=0100	00130	01000	01001	10010	00011	100
<i>A. bellottii</i>	00000	01010	10100	01001	01000	02030	12011	10111	08111	11131	10170	5*2J4Q	M0100	12651	02000	02101	10011	00110	100
<i>A. duraznensis</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	12011	10111	04111	11142	10180	7NF3E	=0100	00250	01000	01001	10010	20010	100
<i>A. melanoorus</i>	00000	01010	10100	11000	02000	02030	13011	10111	09111	11162	10150	>QJ3K	D0100	11551	02000	02101	10010	00110	002
<i>A. gymnoventris</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	02011	10111	16111	11192	00160	1LH3A	80100	00010	01001	01001	00000	00010	000
<i>A. cyaeus</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	12011	10111	02111	11162	10160	=MH3D	A0100	00240	01000	01001	10010	20010	100
<i>A. affinis</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	12011	10111	03111	11152	10170	8OF3E	@0100	00240	01000	01001	10010	20010	100
<i>A. viarius</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02030	12011	10111	08111	11192	10160	5LG3F	A0100	11440	02000	02101	11011	00010	000
<i>A. luteoflamulatus</i>	00000	01010	10100	01010	01000	01020	02011	10111	15111	11192	10160	4OG3A	:0100	00250	01000	01001	22100	00010	001
<i>A. adloffii</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02020	12011	10111	09111	11192	10290	0KM3H	H0100	12200	01000	02101	10000	10110	002
<i>A. charrua</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02020	12011	10111	07111	11192	10160	4MJ3J	E0100	11440	02000	02101	10011	10110	002
<i>A. arachan</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02020	12011	10111	07111	11192	10100	0KE3E	@0100	11310	01000	02101	10000	10110	002
<i>A. vandenbergi</i>	00000	01010	10100	01001	01000	04030	23011	10111	09111	11191	20000	9PQ4O	P0100	12670	03100	02101	10011	00110	100
<i>A. sp1</i>	00000	01010	10100	01010	01000	02020	12011	10111	05111	11192	10100	4OG3F	>0100	11310	01000	02101	11000	00110	000
<i>A. sp3</i>	00000	01010	10100	01001	01000	02030	12011	10111	09111	11161	10140	3QO4Q	Q0100	12321	02000	02101	10000	00110	100
