

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Estructura poblacional, caracterización morfológica y análisis trófico de *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) en el Río de la Plata y su Frente Marítimo

Alejandro D'Anatro

Orientador: Dr. E. P. Lessa

Co-Orientadores: Dr. Mauricio Lima y Dr. Omar Defeo

Tribunal:

Dra. Graciela García

Dr. Marcelo Loureiro

Dr. Walter Norbis

Para mis padres, como siempre...

Agradecimientos

A mi familia por entenderme siempre y a los amigos que siempre están.

A mis tutores, especialmente a Enrique Lessa, por hacer posible el desarrollo de esta tesis y a los miembros del tribunal por aceptar ser parte del mismo.

A todos mis compañeros del piso 6 por lo fraternal del día a día.

A Carla Rivera y Matías Feijoo por darme una mano en las salidas al campo y en el laboratorio; a Daniel Naya y Valentina Franco por el asesoramiento en los análisis del Capítulo 4.

A la CSIC y a la ANII por el apoyo económico, fundamental no solo para realizar las tareas de la tesis, sino para asegurar mi permanencia en Uruguay.

Índice temático	página
Resumen	6
Capítulo 1.- Introducción General.....	7
Capítulo 2.- Variación genotípica y fenotípica en <i>M. furnieri</i> : poniendo a prueba los roles relativos de la deriva genética y de la selección natural en la divergencia poblacional	
- Introducción.....	15
- Materiales y métodos.....	17
- Resultados.....	22
- Discusión.....	26
Capítulo 3.- Análisis de la diferenciación ecológica en <i>M. furnieri</i> inferida por medio de isótopos estables y atributos del sistema digestivo	
- Introducción.....	41
- Materiales y métodos.....	44
- Resultados.....	50
- Discusión.....	55
Capítulo 4.- Efectos ambientales y de la historia de vida sobre la estructura genética de <i>M. furnieri</i>	
- Introducción.....	73
- Materiales y métodos.....	74
- Resultados.....	81
- Discusión.....	86
Capítulo 5.- Discusión general y Conclusiones.....	96
Bibliografía	101

Índice de figuras y tablas

página

Figura 1.-.....	33
Figura 2.-.....	34
Figura 3.-.....	35
Figura 4.-.....	36
Figura 5.-.....	37
Figura 6a.-.....	38
Figura 6b.-.....	39
Figura 7.-.....	65
Figura 8.-.....	66
Figura 9.-.....	67
Figura 10.-.....	68
Figura 11.-.....	69
Tabla I.-.....	40
Tabla II.-.....	40
Tabla III.-.....	70
Tabla IV.-.....	70
Tabla V.-.....	71
Tabla VI.-.....	72
Tabla VII.-.....	91
Tabla VIII.-.....	91
Tabla IX.-.....	92-93
Tabla X.-.....	94-95

Resumen

Los ambientes marinos proveen de excelentes casos de estudio para poner a prueba el rol de los factores ecológicos como promotores de la diferenciación poblacional, dado que típicamente permiten una amplia dispersión de los organismos que los habitan con un bajo costo energético. Dentro de éstos, los estuarios constituyen uno de los sistemas más interesantes para llevar a cabo estudios de diferenciación poblacional, debido a la diferenciación ecológica de estos ambientes comparados con aguas oceánicas, la co-ocurrencia de especies entre ambos medios y la aparente ausencia de barreras geográficas entre ellos. La corvina rubia, *Micropogonias furnieri*, representa un buen modelo para estudiar posibles eventos de diferenciación ecológica entre ambos ambientes, dado que es frecuente encontrarla habitando en zonas estuarinas a lo largo de su amplia distribución. El objetivo general de esta tesis fue analizar y caracterizar la variación intra- e interpoblacional en *M. furnieri* en el Río de La Plata, su frente oceánico y lagunas asociadas, y establecer su relación con factores ecológicos. Se trabajó según la hipótesis de que el Río de La Plata y la Laguna de Rocha sustentan poblaciones diferenciadas de *M. furnieri* respecto a su frente oceánico, cuya identidad es mantenida al menos en parte por selección natural, por lo que exhiben un limitado flujo genético con las poblaciones adyacentes. Con este fin se analizó la estructura poblacional de la corvina rubia en estas localidades mediante técnicas de morfometría geométrica, once loci de microsatélites, isótopos estables y el análisis de algunos atributos del aparato digestivo. Si bien el patrón de variación fue complejo y dependió en parte de los rasgos analizados, los resultados apoyan la idea de que el Río de La Plata y la Laguna de Rocha sustentan unidades independientes de corvina rubia, donde procesos guiados por selección natural parecen tener un papel importante en la diferenciación poblacional. Análisis enfocados específicamente sobre la base genética de las posibles diferencias adaptativas encontradas parecen ser además necesarios para comprender la transición entre las unidades y oceánicas estuarinas.

Capítulo 1.- Introducción general

Los ambientes marinos proveen de excelentes casos de estudio para poner a prueba el rol de los factores ecológicos como promotores de la diferenciación poblacional, dado que típicamente permiten una amplia dispersión de los organismos que los habitan con un costo energético generalmente menor que los ambientes terrestres (Wolf et al. 2008). Aunado a esto, las regiones costeras marinas han sido consideradas áreas altamente dinámicas desde el punto de vista de la biogeografía histórica (Beheregaray et al. 2002). Dentro de estas últimas, los estuarios constituyen uno de los sistemas más interesantes para llevar a cabo estudios de diferenciación poblacional, dada la diferenciación ecológica de estos ambientes comparados con aguas oceánicas, la co-ocurrencia de especies entre ambos medios y la aparente ausencia de barreras geográficas entre ellos.

La corvina rubia *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) representa un buen modelo para estudiar posibles eventos de diferenciación ecológica entre ambos ambientes, dado que es frecuente encontrarla habitando en zonas estuarinas a lo largo de su amplia distribución en el Océano Atlántico; su límite septentrional alcanza hasta el Golfo de México (20°N), llegando en el hemisferio sur hasta el golfo de San Matías en la Argentina (41°S) (Isaac, 1988; Vazzoler, 1991). Su hábitat comprende fondos arenosos y fangosos sobre la plataforma continental, con hábitos demersales obligatorios (Vazzoler, 1975, Álvarez & Pomares, 1997). Su alimentación está basada principalmente en invertebrados bentónicos, tales como poliquetos, moluscos bivalvos, crustáceos (camarones, cangrejos, langostinos) y

ofiuroideos, consumiendo también en menor proporción moluscos gasterópodos, anfibios y peces pequeños (Puig 1986, Cotrina 1986). Es una especie eurihalina y euriérmica, distribuyéndose dentro de salinidades comprendidas entre 0,3 - 35 y en temperaturas de 10,7° C a 31,6° C (Vazzoler 1991, Acha et al. 1999). La reproducción en estos peces es ovulípara, con huevos pelágicos de aproximadamente 1 mm de diámetro (Vazzoler 1996). La corvina rubia es uno de los principales recursos pesqueros del Uruguay (DINARA 2003), siendo explotada comercialmente también en países como Venezuela, Guyanas, Brasil y Argentina (Haimovici et al. 1989, Vazzoller 1991, Álvarez & Pomares 1997).

Como la mayoría de los Sciaenidae, *M. furnieri* se acerca a la costa durante el período reproductivo. En Uruguay lo hace a fines de primavera y durante el verano (López de León, 1984; Acuña et al., 1992), llegando a incursionar dentro de lagunas costeras y en la desembocadura de algunos ríos. Estos ambientes constituyen áreas de desove, reclutamiento y cría de juveniles en general; citándose en Uruguay el Río de La Plata y la Laguna de Rocha como zonas con estas características (Vizziano et al. 2002, Jaureguizar et al. 2008 y referencias allí mencionadas). En esta última localidad, fue reportada una reducción de aproximadamente 11-12 cm en la talla de primera madurez en comparación con los individuos presentes en el Río de la Plata y su frente oceánico, los cuales alcanzan la madurez sexual aproximadamente a 30 cm (Vizziano et al. 2002). Un fenómeno similar ha sido reportado para la Laguna de los Patos (Castello 1986; Haimovici & Gatto 1996). Ross (1988) propone que esta estrategia (i.e. tamaño asintótico reducido y madurez sexual en estadios tempranos del desarrollo) es

también adoptada por *Micropogonias undulatus* Linnaeus 1766 que habita estuarios y es comúnmente adoptada por individuos que sufren una alta tasa de mortalidad.

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar este desplazamiento de caracteres fenotípicos (veáse Ratner & Lande 2001, por una discusión detallada), con un énfasis especial en la presión impuesta por la pesca. En particular, la pesca comercial está enfocada en la presas de mayor tamaño; de esta manera los individuos predispuestos genéticamente a madurar en estadios tardíos del ciclo de vida son seleccionados en contra. Por tanto, la pesca estaría actuando como una fuerza selectiva que favorecería a los individuos predispuestos a madurar en estadios tempranos del desarrollo y/o a tamaños menores (Browman 2000, Ernande et al. 2003, Stockwell et al. 2003, Hutchings 2004, Olsen et al. 2004, Sthenseth & Rouyer 2008).

Una pequeña flota pesquera artesanal opera en la Laguna de Rocha (Santana & Fabiano 1999), siendo *M. furnieri* mayormente capturada de manera incidental en esfuerzos pesqueros enfocados en otros recursos (e.g. *Brevoortia aurea*, *Odonthestes argentinensis*, *Penaeus paulensis*) (Saona et al. 2003). A primera vista, la pesquería que se desarrolla dentro de esta laguna tendría un bajo impacto en la población de corvinas rubias que habitan en ella, pero esto no ha sido evaluado hasta el momento. Cabe mencionar también que otros factores naturales, diferentes de la presión impuesta por la pesca, podrían favorecer la maduración a menor edad o a tamaños menores en esta especie, o que simplemente sea un desplazamiento fenotípico plástico en esta especie.

Analizando la estructura de tallas, Cotrina (1986) propuso la existencia de dos poblaciones de corvina rubia: una en el estuario del Río de La Plata hasta la latitud 38°S, y la otra en la localidad El Rincón, Argentina (40°S); aunque este autor menciona que esta diferenciación puede deberse simplemente a un uso más exhaustivo del recurso pesquero en el Río de la Plata. Un patrón de diferenciación poblacional similar es reportado por Figueroa y Días de Azarola (1991). Por otro lado, Galli (2002) analizando caracteres merísticos y morfológicos, encuentra evidencia de diferenciación entre las corvinas rubias del Río de la Plata y las muestreadas en aguas oceánicas uruguayas. En contraste a esos estudios morfológicos, Maggioni et al. (1994) analizando la variación en varios loci de alozimas, encuentran altos niveles de flujo génico entre poblaciones enmarcadas desde Río Grande (33°S, Brasil) hasta El Rincón, concluyendo que esta región sustenta una única población panmítica de corvina rubia. Pereira (1990), empleando el mismo tipo de marcadores moleculares, también propone altos niveles de flujo génico entre el Río de La Plata y su frente oceánico para esta especie. Pereira et al. (2009), empleando ADN mitocondrial (ADNm) como marcador molecular, encuentran niveles moderados de flujo genético entre el Río de la Plata y su frente oceánico, proponiendo que existen dos unidades genéticamente diferenciadas entre estos dos ambientes. En un estudio más reciente, D'Anatro et al. (2011) corroboran esta diferenciación empleando varios loci de microsatélites y sugirieron además que la diferenciación morfológica de los individuos de la Laguna de Rocha es acompañada por una moderada diferenciación genética. De la misma manera, varios stocks han sido propuestos mediante análisis morfométricos o de estructura de la población para las costas oceánicas de Brasil (e.g. Vazzoler 1971,

Haimovici & Gatto 1996), que luego no fueron recobrados en posteriores análisis moleculares empleando alozimas (Levy et al. 1998) o solo fueron parcialmente reflejados en estudios empleando ADNm (Puchnik-Legat & Levy 2006)

A modo de resumen, varios análisis morfológicos proponen la existencia de una población diferenciada de corvina rubia en el Río de la Plata en comparación a individuos obtenidos en aguas oceánicas de Uruguay, Brasil o Argentina. En contraposición, los estudios alozímicos no logran recobrar este patrón ni tampoco la estructura poblacional propuesta por varios estudios morfológicos a lo largo de la costa oceánica de Brasil. Estudios genéticos basados en ADNm apoyan la diferenciación de los individuos del Río de la Plata con respecto a los muestreados a lo largo de su frente oceánico y también sugieren que hay estructuración en las poblaciones de *M. furnieri* en las costas oceánicas de Brasil, aunque el patrón de variación que proponen para esta última región difiere un poco del sugerido por los estudios morfológicos. Finalmente, los resultados obtenidos empleando microsatélites también apoyan el status de los individuos del Río de la Plata como una unidad diferenciada de las demás analizadas y también proponen que los individuos de la Laguna de Rocha presentan una moderada diferenciación genética con respecto a sus contrapartes oceánicas y del Río de la Plata.

Como deducción principal de los resultados anteriormente detallados se desprende que tanto estudios morfológicos como moleculares plantean la idea de que el Río de la Plata sustenta un población diferenciada de corvina rubia y que en menor medida análisis genéticos más recientes (i.e. D'Anatro et al. 2011) sugieren una moderada

diferenciación de los individuos de la Laguna de Rocha. Este escenario de diferenciación poblacional dentro de una reducida escala geográfica y en ausencia de barreras físicas, bosqueja la hipótesis de que tal diferenciación no es guiada solo por deriva genética y que posiblemente algunos procesos selectivos estén también guiando la divergencia entre poblaciones. Según Schluter (1998, 2000, 2001), basado en la hipótesis de la "especiación ecológica", las presiones selectivas divergentes conducen a la acumulación de diferencias, causando el aislamiento reproductivo entre poblaciones en distintos ambientes, dada la existencia de mecanismos ecológicos de selección en contra de los fenotipos intermedios. Una adecuada caracterización fenotípica, así como alguna estimación del posible uso diferencial de recursos, parecen ser necesarios para tratar de dilucidar cuales son las principales fuerzas involucradas en la divergencia entre esas poblaciones de corvina rubia. Además, un estudio más detallado de la estructura genética poblacional de esta especie y su relación con otros factores ambientales o fenotípicos, así como estimaciones de sus patrones de movimiento a corto plazo, podrían también ayudar a descubrir los principales agentes involucrados en el proceso de diferenciación.

El objetivo general de esta tesis fue analizar y caracterizar la variación intra- e interpoblacional en *M. furnieri* en el Río de la Plata, su frente oceánico y lagunas costeras asociadas y establecer su relación con factores ecológicos.

La hipótesis de trabajo afirma que el Río de la Plata y la Laguna de Rocha sustentan poblaciones diferenciadas de *M. furnieri* respecto a su frente oceánico, cuya identidad

es mantenida al menos en parte por selección natural, por lo que exhiben un limitado flujo genético con las poblaciones adyacentes.

Las predicciones de esta hipótesis son:

La diferenciación molecular de los ejemplares del Río de la Plata y de la Laguna de Rocha estaría acompañada por desplazamientos de caracteres morfológicos.

Los desplazamientos en los caracteres morfológicos estarían influenciados al menos en parte por selección natural divergente entre los diferentes ambientes.

El patrón de diferenciación encontrado entre los diferentes ambientes estaría asociado a parámetros ambientales distintivos y podría verse reflejado a su vez en aspectos tróficos.

Los objetivos específicos fueron:

Analizar la variación espacial intra- e inter-poblacional mediante el empleo de microsatélites y de técnicas de morfometría geométrica, estudiando el nivel de diferenciación de las poblaciones del Río de la Plata, su frente oceánico y lagunas costeras asociadas.

Analizar los roles relativos de la deriva genética y de la selección natural en la divergencia poblacional.

Analizar diferencias tróficas entre las poblaciones estudiadas por medio de isótopos estables, así como los patrones de movimiento a corto plazo de estas poblaciones.

Analizar la variación en rasgos del aparato digestivo entre las poblaciones estudiadas

Establecer correspondencias entre la diferenciación genética y morfológica con aspectos tróficos, parámetros ambientales y el uso del espacio.

Capítulo 2.- Variación genotípica y fenotípica en *M. furnieri*: poniendo a prueba los roles relativos de la deriva genética y de la selección natural en la divergencia poblacional

Introducción

Conocer como covarían los patrones de variación morfológica y molecular en las poblaciones naturales es importante para comprender el efecto de las fuerzas subyacentes involucradas en los procesos de diferenciación poblacional. Los niveles de divergencia entre poblaciones son frecuentemente evaluados mediante técnicas que emplean variación asumida como neutral, tanto a nivel molecular (e.g. Wlasiuk et al. 2003) como a nivel morfológico (e.g. D'Anatro & Lessa 2006). Evidentemente, no todos los procesos que conducen a la diferenciación poblacional son gobernados por deriva genética o “deriva morfológica” (i.e. cambios morfológicos que no afectan la eficacia darwiniana de los individuos), pero el empleo de marcadores neutrales provee frecuentemente de una buena línea de base para analizar la naturaleza de los procesos de diferenciación poblacional, dada la dificultad que generalmente representa identificar los loci directamente involucrados en tal diferenciación.

Anteriormente se mencionó que el patrón de diferenciación poblacional en *M. furnieri* está representado por dos principales características: 1) una reducción en la talla de primera madurez de los individuos de la Laguna de Rocha acompañada de una

diferenciación genética moderada respecto los individuos que habitan en el Río de la Plata o el Océano Atlántico, y 2) una diferenciación genética mas marcada y también asociada, pero de una manera más leve, a cambios fenotípicos de los individuos del Río de la Plata al compararlos con individuos de localidades oceánicas (e. g. La Paloma) o lacustres (e. g. Laguna de Rocha)

La morfometría geométrica (Bookstein, 1991) es utilizada frecuentemente para evaluar la variación en la forma de diversas estructuras anatómicas. En esta técnica, la forma de una determinada estructura es representada mediante la posición relativa de marcos anatómicos (“landmarks”), i.e., puntos considerados homólogos entre todos los individuos analizados. La relación espacial inherente a la configuración de estos marcos anatómicos provee de una descripción más detallada de los patrones generados por los procesos de morfogénesis que el empleo tradicional de las medidas lineales (Rohlf 2000). Debido a esto, el análisis de la variación morfológica empleando morfometría geométrica representaría una buena aproximación para cuantificar los posibles cambios fenotípicos que acompañarían las diferenciaciones genéticas antes reportadas para esta especie.

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar los niveles de variación fenotípica en varias poblaciones de corvina rubia *M. furnieri* mediante técnicas de morfometría geométrica. Se explora la hipótesis de que la diferenciación genética encontrada en previos estudios en esta especie es acompañada por divergencia morfológica. En particular, se investiga si la reducción en el tamaño de los individuos de la Laguna de Rocha es acompañada de otros desplazamientos fenotípicos y si la diferenciación

genética de los individuos del Río de la Plata es también reflejada por caracteres morfológicos en forma más detallada. Adicionalmente, se examina la hipótesis de que la deriva genética es una explicación suficiente para los patrones de varianza y covarianza fenotípica dentro y entre poblaciones (Ackermann & Cheverud 2002)

Materiales y métodos

Análisis de la estructura poblacional

Las corvinas rubias fueron obtenidas mediante pescadores artesanales y a partir de una campaña de muestreo del B/I Aldebarán (DINARA - MGAP), durante los períodos comprendidos entre noviembre 2008 – marzo 2009 y noviembre 2009 – marzo 2010. Los 225 individuos analizados (Laguna de Rocha, n = 76; La Paloma, n = 13; San Luis, n = 61; Montevideo, n = 51; Laguna de Castillos, n = 8 Villa Gesell, n =16; Fig. 1) fueron clasificados como adultos según su longitud estándar y/o por inspección gonadal (Isaac, 1988; Vizziano et al., 2002).

Diecinueve marcos anatómicos, asumidos como homólogos entre todos los individuos analizados, fueron elegidos a lo largo del flanco izquierdo de cada espécimen (Fig. 2). Se obtuvieron imágenes mediante una cámara digital Nikon Coolpix 3100, ubicando a cada individuo en forma paralela al plano focal. A partir de esas imágenes se obtuvieron las coordenadas x e y de cada marco anatómico, empleando el programa TpsDig v 2.16. Para evitar sesgos en los datos debido al posible arqueado de los individuos, tres marcos anatómicos (1, 11 y 16) fueron alineados utilizando la opción

“unbend specimens” del programa TpsUtil v. 1.46. La configuración obtenida de esos marcos anatómicos fue superpuesta entre todos los individuos de manera que la desviación de esos marcos fuera minimizada empleando el método “Procrustes”. Se empleó la aproximación “*thin plate spline*” y de componentes uniformes para proyectar los individuos desde un espacio tangente no-lineal a uno tangente lineal. Detalles adicionales sobre estos métodos pueden encontrarse en Bookstein (1991), Monteiro y dos Reis (2000) y referencias allí mencionadas. Se empleó el programa TpsRegr v. 1.37 para realizar los análisis. Los programas TpsDig, TpsUtil y TpsRegr fueron obtenidos en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (Rohlf, F.).

Se realizó un análisis discriminante (AD) sobre la matriz de “partial warps” y componentes uniformes, obtenida a partir de los análisis morfométricos. Se efectuaron un total de 10^4 permutaciones entre individuos a modo de prueba no paramétrica del lambda de Wilks y de las distancias de Mahalanobis entre grupos, empleando el programa PAD (Dujardin, J. <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/pad/index.html>) y la corrección de Bonferroni (1936) para comparaciones múltiples. Se utilizó el tamaño del centroide como una medida general del tamaño de los individuos (Monteiro & dos Reis 2000). Para analizar la influencia del tamaño en la discriminación encontrada, se realizaron correlaciones de Pearson entre el tamaño del centroide y las raíces discriminantes.

Contrastando los patrones de variación morfológica y molecular

Se emplearon estimaciones de la diferenciación genética entre las diferentes poblaciones derivadas del análisis de 11 loci de microsatélites. Siete de éstos fueron empleados en previos análisis genético poblacionales incluyendo 145 corvinas rubias (D'Anatro et al. en prensa). En esta instancia, se agregaron individuos provenientes de Villa Gesell (n=20, Argentina) así como el análisis adicional de otros cuatro loci de microsatélites (Soc428, Soc429, Soc442 y Soc443F; O'Malley et al. 2003), llegando a un total de 165 individuos analizados. Esos cuatro nuevos loci fueron marcados con fluróforos y los productos de PCR fueron analizados en Macrogen (Corea) empleando GS400HD como estándar de tamaño molecular. Fueron seguidos los protocolos descritos en D'Anatro et al. (2011) para la amplificación de los siete loci de microsatélites, comunes entre el presente trabajo y el anteriormente mencionado en los análisis de individuos provenientes de Villa Gesell. La extracción de ADN, condiciones de PCR, análisis de desequilibrio de ligamiento y apartamientos del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-Weq) fueron llevados a cabo siguiendo los procedimientos empleados en D'Anatro et al. (2011).

Debido a que muchos de los microsatélites empleados en D'Anatro et al. (2011) se apartaron del H-Weq, se calcularon los F_{ST} de Weir (1996) y se implementó además una corrección para la presencia de alelos nulos, mediante el programa FreeNA (Chapuis & Estoup 2007). Véase D'Anatro et al. (2011) por una fundamentación más detallada sobre el uso de estos índices en este caso. Por otra parte, dado que la generalmente alta heterocigosidad de los loci de microsatélites puede introducir

sesgos en la estimación de los valores de F_{ST} , también se calcularon los valores D_{est} propuestos por Jost (2008) empleando el programa SMOGD v. 1.2.5 (Crawford 2010) entre pares de poblaciones. A modo de corroboración adicional del patrón de estructura poblacional sugerido por los índices de fijación, se realizó un análisis de la subdivisión poblacional y agrupamiento de los individuos, implementado con el programa Structure v. 2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003, Falush et al. 2007, Hubisz et al. 2009) el cual emplea algoritmos de Monte Carlo basados en Cadenas de Markov (métodos "MCMC"). Fueron consideradas de 1 a 7 poblaciones potenciales (desde $K=1$ a $K=7$), empleando un vez más las condiciones detalladas en D'Anatro et al. (2011)

Siguiendo las recomendaciones de Jackson (1995) y Peres-Neto & Jackson (2001), se exploró un ajuste de tipo "Procrustes" para analizar la correlación estadística entre las distancias, genéticas, morfológicas y geográficas obtenidas. Se obtuvieron estimaciones de las distancias geográficas lineales entre pares de poblaciones mediante el software GoogleTM Earth. Para este fin se utilizó el programa ProTest (Jackson 1995) con 9^4 permutaciones. La elección de este tipo de análisis está basada en que puede llegar a tener un mejor desempeño que la prueba de Mantel (1967) al analizar tales correlaciones (Peres-Neto & Jackson 2001). Un escalamiento multidimensional (MDS) fue primariamente llevado a cabo sobre cada una de las matrices a ser comparadas. Posteriormente, fue implementado el ajuste Procusteano entre las dos primeras dimensiones del MDS obtenidas para cada matriz analizada. Un ProTest parcial fue realizado entre las matrices de distancias morfológicas y genéticas,

dejando fijo el posible efecto de las distancias geográficas entre pares de poblaciones (véase Peres-Neto & Jackson 2001 por más detalles sobre este procedimiento).

Divergencia guiada por selección natural vs divergencia neutral

Ackerman y Cheverud (2002) desarrollaron una prueba para analizar el efecto de los procesos selectivos sobre caracteres morfológicos que puede rechazar la hipótesis de que la deriva genética es responsable del proceso de diferenciación, aún en ausencia de una hipótesis adaptativa específica. Si el patrón de cambio de la estructura en estudio es gobernado por la deriva genética, la varianza y covarianza genética de los rasgos entre poblaciones debe ser proporcional a esos mismos valores dentro de las poblaciones (Lande 1979). Contrariamente, si los patrones de varianza y covarianza genética de los rasgos entre poblaciones difieren del patrón de esos mismos valores dentro de las poblaciones, la hipótesis de que la acción de la deriva genética es suficiente para explicar la divergencia encontrada entre poblaciones puede ser rechazada. Debido a la dificultad de obtener las matrices de varianza/covarianza genética (V/CV) en poblaciones naturales (matriz **G**), Ackerman y Cheverud (2002) proponen el uso de las matrices de V/CV fenotípicas entre y dentro de las poblaciones (matriz **P**) en su lugar. Debido a que la matriz **P** es el resultado de la interacción entre efectos genéticos y ambientales, este método asume la forma de la matriz fenotípica de V/CV no es influenciada por factores ambientales – e.g., plasticidad fenotípica, efecto maternal o cualquier otra clase de causa de origen no genético – de manera diferencial entre las poblaciones estudiadas (Ackerman & Cheverud 2002, Marroig & Cheverud 2004). La matriz de V/CV de las poblaciones agrupadas (matriz **W**) es

reducida a sus componentes principales (PCs), y esos PCs son entonces ordenados según su varianza (eigenvalores).

Se calculó la varianza entre poblaciones (Matriz **B**) a lo largo de esos ejes de componentes principales, y se efectuó una regresión lineal entre esos valores logaritmizados y los de los eigenvalores de la matriz **W**. Si la diferenciación fue producida por deriva genética, se espera un valor de la pendiente de regresión cercano a 1,0. Pendientes mayores indican un exceso de varianza entre poblaciones, generalmente producto de los primeros PCs, relativo a la cantidad de variación esperada solo bajo un régimen de deriva genética (Ackerman & Cheverud 2002, Marroig & Cheverud 2004). Empleando la prueba de esfericidad de Bartlett, se calculó la correlación entre las medias poblacionales a lo largo de los cinco primeros PCs (n-1 poblaciones, Marroig & Cheverud 2004). Dado que esos PCs deberían ser independientes, correlaciones significativas podrían reflejar el efecto selección correlacionada, i.e. selección sobre la combinación óptima de algunos caracteres (ver Ackerman & Cheverud 2002, Marroig & Cheverud 2004, Harmon & Gibson 2006 por más detalles acerca de esta metodología). En resumen, se puso a prueba la hipótesis de que el cambio morfológico entre las diferentes poblaciones de *M. furnieri* es guiada por deriva genética según dos metodologías: comparando las matrices fenotípicas de V/CV y examinando la correlación de los PCs de variación morfológica dentro y entre poblaciones.

Resultados

Estructura poblacional según los resultados morfológicos obtenidos

En la Fig. 3 se presentan los resultados obtenidos en el AD realizado sobre la matriz de “partial warps” y componentes uniformes. El 72% de la varianza del sistema fue explicado por las dos primeras raíces del AD y por esa razón solo éstas fueron empleadas en la representación gráfica. El análisis mostró una leve diferenciación entre las localidades analizadas. A pesar de ello, la matriz de clasificación del DFA asignó correctamente 75% o más de los individuos analizados a sus localidades de procedencia (Tabla I). Las mayores distancias de Mahalanobis fueron entre los individuos de la Laguna de Castillos y los de La Paloma, y entre los primeros y los individuos de Montevideo (Tabla I). Todas las comparaciones de la Tabla I fueron estadísticamente significativas luego aplicar la corrección de Bonferroni. El AD mostró que casi todos los individuos de la Laguna de Rocha y de la Laguna de Castillos presentaron valores positivos a lo largo de la Raíz 1. El corrimiento relativo de los marcos anatómicos respecto de la configuración consenso (Fig. 4) asociados a estos valores positivos a lo largo del Factor 1 involucraron principalmente un desplazamiento superior de los marcos 18 y 19; un desplazamiento posterior de los marcos 4, 5, 6, 7, 8 y 13, y por último, un desplazamiento anterior de los marcos 1, 3, 14, 15 y 16 (Fig. 4A). Todos esos cambios morfológicos sugieren que los individuos de la laguna de Rocha y Laguna de Castillos tienen un cuerpo con perfil más alto, un pedúnculo caudal más corto y un cabeza más grande que los otros analizados. Los individuos de Montevideo, San Luis y Villa Gesell presentaron valores negativos a lo largo del Factor 1 y por lo tanto características morfológicas opuestas (Fig. 4B). El

Factor 2 del AD separó principalmente a los individuos de Villa Gesell y San Luis de los de Montevideo. El desplazamiento de los marcos anatómicos relacionado a los valores positivos del Factor 2 involucró principalmente un corrimiento relativo posterior de los marcos 1, 2, 3, 16, 17 y 19, desplazamiento anterior de los marcos 9, 10, 11, 12 y 13, y por último, un desplazamiento ventral del marco 5 (Fig. 4C). Todos esos cambios resultan en individuos con cabeza y hocico relativamente cortos. Los individuos con valores negativos sobre este mismo eje, principalmente aquellos de Montevideo y algunos de la Laguna de Rocha, presentaron características morfológicas opuestas (Fig. 4D). No se encontró evidencia de una correlación significativa entre el tamaño del centroide y ninguno de los Raíces (Raíz 1 vs. tamaño del centroide, $r = 0,100$ $p = 0,134$; Raíz 2 vs. tamaño del centroide, $r = -0,113$, $p = 0,849$) lo que sugiere que el tamaño de los individuos no influenció la diferenciación poblacional antes descrita.

Patrones de variación molecular y morfológica

El análisis de desequilibrio de ligamiento mostró que todos los loci de microsatélites analizados fueron independientes ($p < 0,05$) y exceptuando Soc442 en Montevideo y Soc443F en Laguna de Rocha; todos los nuevos loci analizados estuvieron en H-Weq. Nuevamente, varios de los loci de los empleados en D'Anatro et al. (2011) sufrieron apartamientos del H-Weq en la localidad de Villa Gesell. Los valores pareados de F_{ST} de Weir fueron similares a los obtenidos con el programa FreeNA y siguieron el mismo patrón de variación que los F_{ST} de Jost, como lo sugiere el test de Mantel (1967), implementado con el programa zt (Bonnet & Van de Peer 2001) empleando 10^6 permutaciones al azar ($r > 0,65$; $p < 0,05$ en todas las posibles comparaciones). Debido

a estos resultados, durante el resto del trabajo se hará referencia solamente a los valores de F_{ST} de Weir. Estos valores son acordes con las estimaciones de F_{ST} reportadas en D'Anatro et al. (2011). Los resultados obtenidos con el programa Structure (Fig. 5) también reflejaron los resultados obtenidos en el último trabajo citado. De esta manera, la inclusión de nuevos individuos de la localidad de Villa Gesell de nuevos loci apoyan la diferenciación de la población de corvina rubia del Río de la Plata y también reafirman los bajos niveles de diferenciación genética de los individuos de la Laguna de Rocha.

Los mejores resultados con el MDS fueron logrados considerando solamente dos dimensiones, con valores de estrés menor a 0,002 en todos los casos. Los análisis realizados con ProTest no mostraron evidencia de correlación, ni entre las distancias morfológicas y geográficas ($m^2 = 0,716$; $p = 0,488$), ni entre las distancias genéticas y geográficas ($m^2 = 0,587$; $p = 0,236$) y tampoco entre las distancias morfológicas y genéticas ($m^2 = 0,771$; $p = 0,614$). Los resultados del ProTest parcial tampoco mostraron evidencia de correlación entre las distancias genéticas y morfológicas ($m^2 = 0,906$, $p = 0,769$). Las pruebas de Mantel y de Mantel parcial tampoco detectaron evidencia de correlación entre esos grupos de datos (resultados no mostrados).

Divergencia poblacional por deriva vs variación adaptativa

La aproximación empleada realizando regresiones propone que los cambios morfológicos encontrados no pueden ser explicados solamente por efecto de la deriva genética y que algunos procesos selectivos estarían probablemente involucrados en la

diferenciación poblacional, con varios ejes por fuera del intervalo de confianza al 95% de la regresión (Fig. 6a: $r = 0,430$; $p = 0,011$). Excluyendo PC1, un componente comúnmente considerado como descriptor del tamaño, los resultados no difirieron significativamente (Fig. 6b: $r = 0,409$; $p = 0,018$). La correlación entre la media poblacional de los PCs no evidenció el efecto de selección correlacionada ($\chi^2 = 18,307$; $p = 0,430$). Los ejes por encima de la línea de regresión, posiblemente bajo el efecto de selección divergente, involucraron aspectos de la forma y posición de la boca, forma del opérculo (e.g. PC3 y 5) y la forma del pedúnculo caudal (e.g. PC3, 5, 7 y 25). Los ejes por debajo de la línea de regresión, posiblemente bajo el efecto de la selección estabilizadora, también involucraron aspectos de la forma de la boca, preopérculo (e.g. PC2 y 4), forma de los ojos (e.g. PC2), base de las aletas dorsal, pectoral, pélvica y anal (e.g. PC4) y base de la pectoral (e.g. PC2).

Discusión

Patrón general de la variación molecular y morfológica

La estructura poblacional de *M. furnieri* fue evaluada por medio de morfometría geométrica y mediante el análisis de varios loci de microsatélites a lo largo de varias localidades en Uruguay y Argentina. Todas las poblaciones analizadas mostraron diferencias estadísticas significativas entre sus centroides. A su vez, el AD asignó una fracción importante de individuos a sus localidades de origen. Cabe destacar, sin embargo, que la diferenciación morfológica entre las localidades estudiadas no fue de gran magnitud (Fig. 3). Algunas de las localidades analizadas difirieron tanto en

caracteres genéticos como morfológicos, aunque ambos grupos de marcadores no se encontraron correlacionados entre sí, ni con la distancia geográfica entre poblaciones. Aunado a esto, parte de la variación morfológica encontrada entre las poblaciones no puede ser explicada solamente como resultado del efecto de la deriva genética y que la selección divergente y la estabilizadora podrían estar jugando un papel importante sobre la diferenciación poblacional.

Diferenciación morfológica entre las localidades analizadas

Los resultados genéticos y morfológicos obtenidos en este trabajo sugieren que los individuos de Montevideo (estuario del Río de la Plata) representan una unidad diferente a los individuos presentes en su frente oceánico, lo cual concuerda con trabajos previos (e.g. Cotrina 1986, Figueroa & Díaz de Astarloa 1991, Galli 2002, Macchi et al. 2003, Berois et al. 2004, Pereira et al. 2009). Los individuos de la Laguna de Rocha también se diferenciaron, pero de una manera más moderada, de los de Montevideo, San Luis y Villa Gesell. A pesar de esta congruencia parcial entre el patrón de diferenciación propuesto por marcadores genéticos y morfológicos, el esquema de variación difiere dependiendo el grupo de marcadores considerado. Estos resultados, junto con el hecho de la reducción en la talla de primera madurez en las corvinas rubias de la Laguna de Rocha mencionada por Vizziano et al. (2003), plantean que tal vez las fuerzas evolutivas estén actuando diferencialmente sobre las poblaciones de *M. furneri*.

Deriva genética vs. selección natural en la diferenciación poblacional de M. furneri

Siguiendo a Ackerman y Cheverud (2002) y Marroig y Cheverud (2004) se compararon los patrones de varianza y correlación de los ejes de componentes principales de variación morfológica dentro y entre poblaciones, con el fin de poner a prueba la hipótesis de diferenciación poblacional mediada por deriva genética. Los resultados obtenidos a partir de esos análisis sugieren que parte de la variación morfológica entre poblaciones de corvina rubia no puede ser explicada solo por deriva genética, y que ambas, selección divergente y estabilizadora, pueden estar actuando en la diferenciación poblacional. Sin embargo, hay varias cuestiones a tener en cuenta al realizar esas interpretaciones. Como fue mencionado anteriormente, la matriz **P** es un buen sustituto de la matriz **G**. Meta-análisis de matrices **P** y **G** indican que generalmente existe proporcionalidad entre ellas (e.g. Cheverud 1988), pero el uso de la matriz **P** en lugar de la **G** puede ser problemático si la primera no refleja en forma precisa los patrones subyacentes de varianza y covarianza (Willis et al. 1991). Este problema puede surgir, por ejemplo, si las poblaciones están sometidas a efectos ambientales diferentes. Por otro lado, el flujo génico entre poblaciones también puede afectar a la matriz **G**. El supuesto de ausencia de flujo génico puede ser relajado asumiendo un modelo de migración de islas (Wright 1931) con una matriz de $V/CV: [1/(2N_e m)]$ **G**, donde N_e representa el tamaño efectivo poblacional y m la tasa de migración entre poblaciones (Lofsvold 1988 y referencias allí mencionadas). En este contexto, se encontraron niveles moderados de flujo génico entre las localidades analizadas (véase también D'Anatro et al. 2011). El posible efecto de esos niveles de flujo génico entre poblaciones no fue evaluado en este trabajo y merece futuros estudios al respecto.

Considerando todos estos factores, pueden hacerse inferencias sobre las posibles fuerzas involucradas en la diferenciación morfológica entre las poblaciones de corvina rubia estudiadas. El perfil corporal general de los individuos de la Laguna de Rocha y la Laguna de Castillos recuerda el típico patrón morfológico léntico (i.e. perfil corporal alto, pedúnculo caudal corto, y cabeza más grande, comparado con individuos de la misma especie que no habitan lagos) encontrado en peces que habitan ambientes lacustres (e.g. Langerhans et al. 2003). El análisis de la variación morfológica entre y dentro de las poblaciones sugiere que algunos de esos desplazamientos morfológicos (e.g. forma del pedúnculo caudal, forma y posición de la boca, forma del opérculo) pueden estar bajo influencia de selección divergente. Por otro lado, respuestas plásticas a los mismos factores ambientales también podrían explicar el patrón encontrado y por tanto deben ser también consideradas.

El Factor 2 del AD separa principalmente a los individuos de Montevideo de los de Villa Gesell. Esta diferenciación morfológica puede ser también debida al efecto de la selección natural divergente (e.g. huesos de la cabeza y boca). Contrariamente a esto, algunos rasgos parecen estar bajo la influencia de la selección estabilizadora (e.g. base de las aletas impares). Además, el tamaño corporal en general parecería estar solamente bajo la influencia del efecto de la deriva genética (ver PC1 en la Fig. 6a); por lo tanto, la reducción en el tamaño de los individuos de la Laguna de Rocha no parece representar una respuesta adaptativa a factores ambientales. Como fue mencionado anteriormente, en la Laguna de Los Patos se registra un fenómeno similar de reducción de tallas en *M. furnieri*, pero no se cuenta con estudios detallados, ni morfológicos ni genéticos, de los individuos de esta laguna. Andrade-Tubino et al. (2009) analizando las

pendientes de las relaciones largo-peso en diferentes clases de tamaño de corvina rubia a lo largo de la costa Atlántica meridional del Brasil, sugiere que el crecimiento somático en esta especie es fundamentalmente isométrico. Considerando todos esos resultados, podría suponerse que las corvinas rubias que habitan esas lagunas costeras, con una menor talla de primera madurez pero con aproximadamente la misma forma corporal, pueden representar un caso de pedomorfosis en los ambientes antes referidos; naturalmente, esta hipótesis merece de ser evaluada de una manera más exhaustiva. Un caso similar de reducción de talla de primera madurez fue propuesto para *Sciaenops ocellatus* Linnaeus 1766 en “Mosquito Lagoon” (Florida, USA). *Sciaenops ocellatus* aparentemente completa su ciclo de vida dentro de esta laguna (Johnson & Funicelli 1991), aunque no hay evidencia de diferenciación genética entre los individuos que habitan dentro de ella y los que habitan en aguas oceánicas (Seyoum et al. 2000, pero véase también la opinión de Gold & Richardson 1994)

Como fue esbozado anteriormente, el estudio de la reducción en la talla de primera madurez en peces se ha tornado un tema recurrente en la investigación en pesquerías, dado el posible efecto que se le atribuye a las presiones impuestas por la pesca selectiva sobre este fenómeno. En contraste a la pequeña flota artesanal que opera en la Laguna de Rocha antes mencionada, flotas de pesca artesanales e industriales operan extensivamente en el Río de la Plata, en donde *M. furnieri* es uno de los recursos ícticos más importantes (DINARA, 2003). Dado que esta especie es fuertemente explotada, se podría esperar que el tamaño esté bajo la influencia de la selección divergente si la corvina rubia es impactada de manera diferente por el efecto de la pesca a lo largo de las diferentes poblaciones mencionadas para esta especie. Por

otra parte, la selección estabilizadora puede tener un efecto importante si la pesca opera de una manera homogénea a lo largo de todas las poblaciones. El análisis sobre el efecto de la selección realizado en este trabajo sugiere que el tamaño corporal no se encuentra bajo la influencia de la selección natural divergente o estabilizadora (Fig. 6a). Evidentemente, estudios adicionales son necesarios para examinar de una manera más completa los factores genéticos y plásticos de esta reducción del tamaño corporal en *M. furneri*.

Variación genética y morfológica entre poblaciones de corvina rubia en relación a algunos de los cambios ambientales ocurridos durante el Holoceno

La región geográfica donde se encuentra la Laguna de Rocha se vio afectada por recurrentes cambios en el nivel del mar desde el Cuaternario temprano. Transgresiones del nivel del mar de +5m han sido documentadas unos 5.000 años antes del presente (aap.), y regresiones de -120m por debajo del nivel actual hace unos 35.000 aap. (Sprechmann 1978, García-Rodríguez et al. 2001, 2002). Por estas razones se supone que este sistema léntico como tal tiene un origen geológico reciente. Modelos regionales de la variación en el nivel del mar sugieren que el nivel del mar actual promedio fue transgredido por primera vez hace aproximadamente unos 7.000 aap.; el nivel máximo fue alcanzado hace unos 6.000-5.000 aap., y entonces comenzó la fase regresiva (Martin & Suguio, 1992). Para las costas de Brasil, se registraron dos eventos de inmersión/emersión, hace aproximadamente 4.000–3.900 y 2.800–2.700 aap., respectivamente (Martin & Suguio 1992), que no fueron registrados en las costas este de Argentina (Cavalotto et al. 2004). Trabajos realizados en las lagunas costeras

del este uruguayo concuerdan con el modelo de fluctuaciones del mar holocénicas propuesto para las costas oceánicas del Brasil (García-Rodríguez 2004, Bracco et al. 2005, del Puerto et al. 2006). El Río de la Plata también ha sufrido el efecto de importantes fluctuaciones del nivel del mar, especialmente entre 18.000 y 3.000 años aa. (Cavalloto 2002, 2003, et al. 2004). Dado que ambos ambientes (i.e. Laguna de Rocha y Río de la Plata) tienen un origen geológico reciente, la presencia de *M. furnieri* en ambos sistemas debería de ser un fenómeno también reciente, resultando en una moderada diferenciación genética entre las poblaciones analizadas. La aparente ausencia de barreras geográficas entre los ambientes analizados, junto al reciente origen geológico de estos sistemas, apoyan también la idea de que otras fuerzas evolutivas además de la deriva génica deben de estar cumpliendo un papel importante en la diferenciación morfológica en esta especie.

Beheregaray & Levy (2000), Beheregaray & Sunnucks (2001) y Beheregaray et al. (2002) proponen que la diferenciación poblacional en el género *Odonthestes*, abarcando un área de estudio similar a la comprendida en este trabajo, puede ser el resultado de la colonización del estuario del Río de la Plata y la posterior diferenciación de las poblaciones en respuesta a los ecológicamente disímiles regímenes estuarino y oceánico. Los resultados obtenidos en este estudio también apoyan el rol de la selección divergente, al menos hasta cierto grado, como explicación plausible de la diferenciación poblacional encontrada en *M. furnieri*.

En resumen, la divergencia adaptativa parece cumplir un papel importante en la diferenciación poblacional entre corvinas rubias que habitan diferentes localidades con

origen geológico reciente. Estudios adicionales son necesarios para dilucidar de manera más detallada los diversos factores involucrados en la diferenciación poblacional encontrada en esta especie.

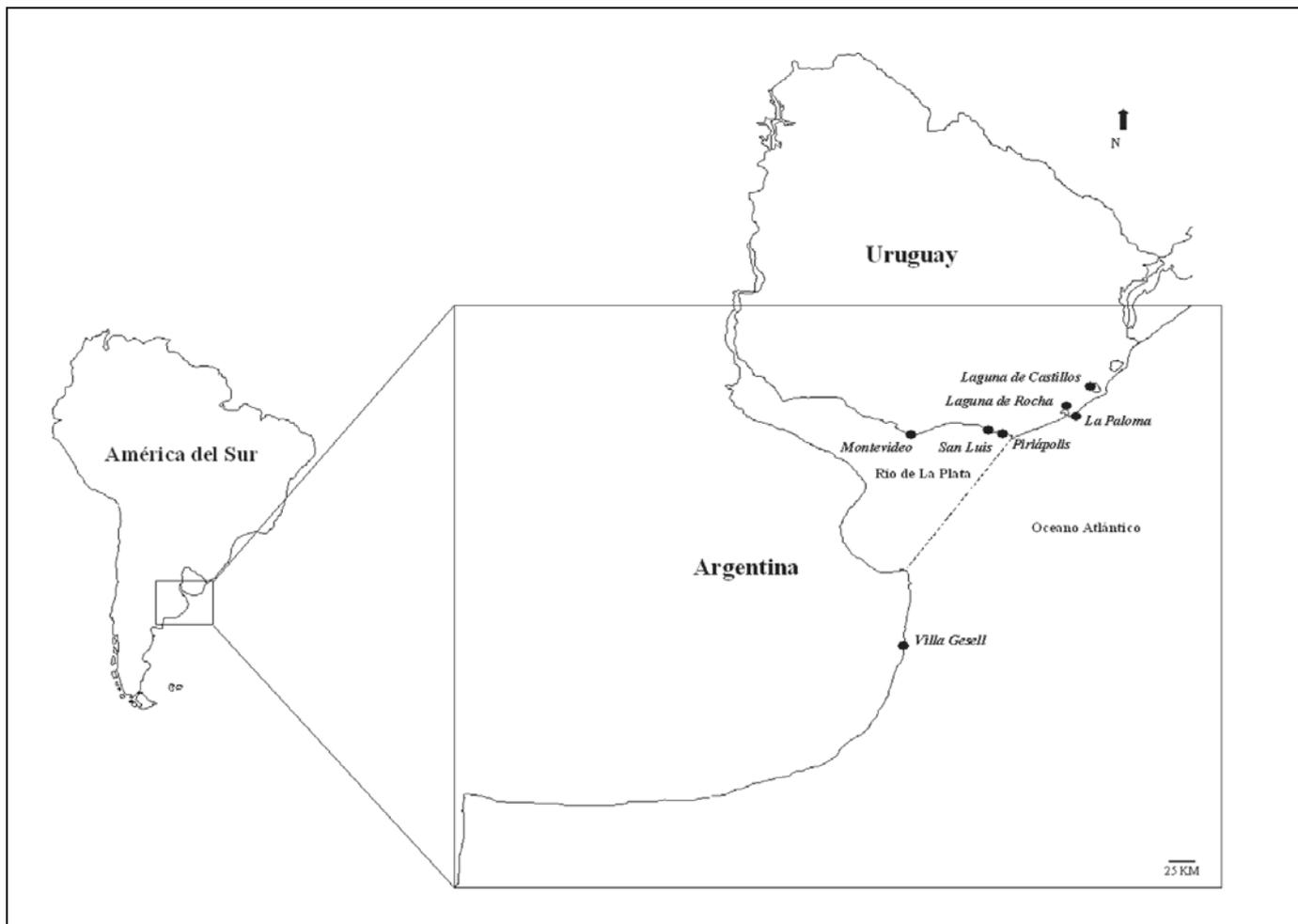


Figura 1. Localidades analizadas para *M. furnieri*. Coordenadas geográficas aproximadas: Laguna de Castillos 34° 18' S, 53° 55' O; Laguna de Rocha 34° 37' S, 54° 15' O; La Paloma 34° 39,5' S 54° 08,5' O; San Luis 34° 47' 7.33" S, 55° 33' 46.16" O; Montevideo 34° 38'S 56° 16' O and Villa Gesell 37° 14'S 56° 44'O. La línea punteada indica el límite aproximado entre el Río de la Plata y el Océano Atlántico.

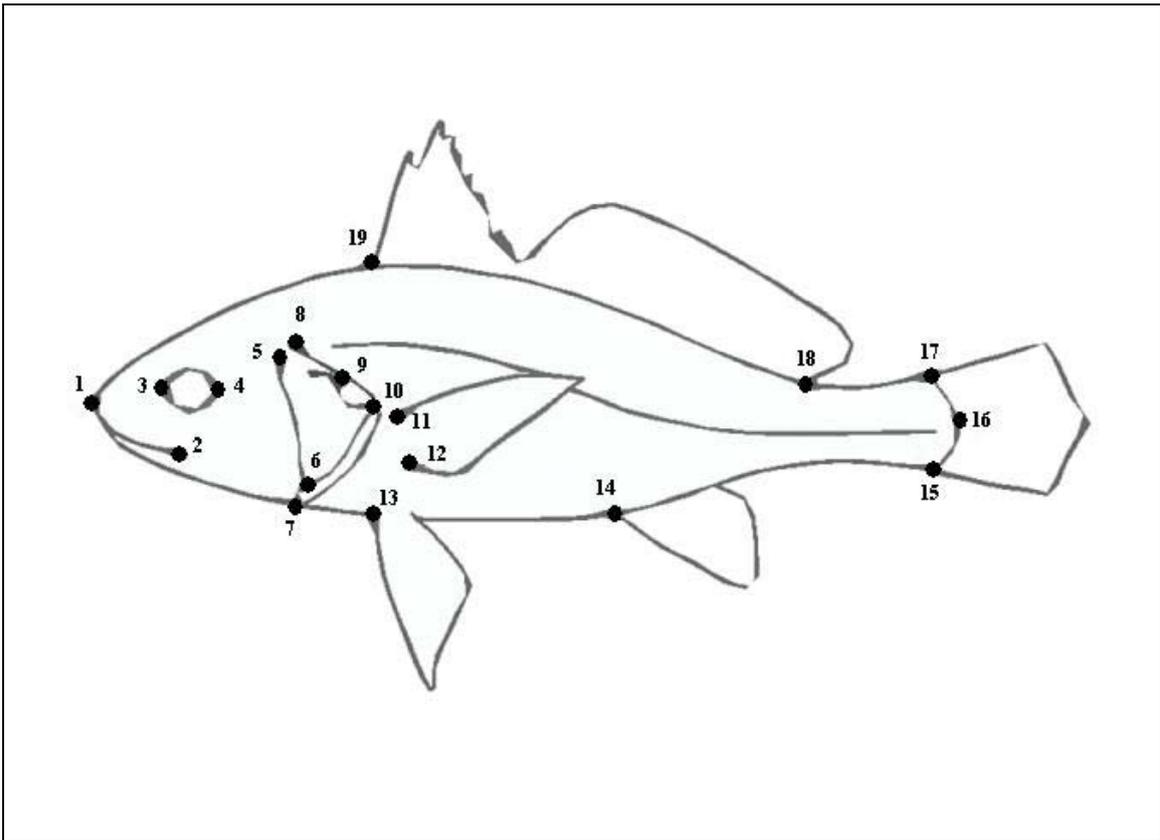


Figura 2. Los 19 marcos anatómicos utilizados en los análisis de morfometría geométrica: 1- punta del hocico, 2- unión de la boca, 3 – margen anterior del ojo, 4 - margen posterior del ojo, 5 – parte superior de la unión entre el preoperculo y el opérculo, 6 – punta lateral del proceso preopercular, 7- punta ventral del proceso preopercular, 8 – inserción de la membrana opercular en la cabeza, 9 – punta dorsal del proceso opercular, 10 – punta ventral del proceso opercular, 11 – unión dorsal de la inserción de la aleta pectoral en el cuerpo, 12 – unión ventral de la inserción de la aleta pectoral en el cuerpo, 13 – origen de la aleta pélvica, 14 – origen de la aleta anal, 15 – origen ventral de la aleta caudal, 16 – fin del pedúnculo caudal, 17 - origen dorsal de la aleta caudal, 18 – fin de la base de la aleta dorsal y 19 – origen de la base de la aleta dorsal.

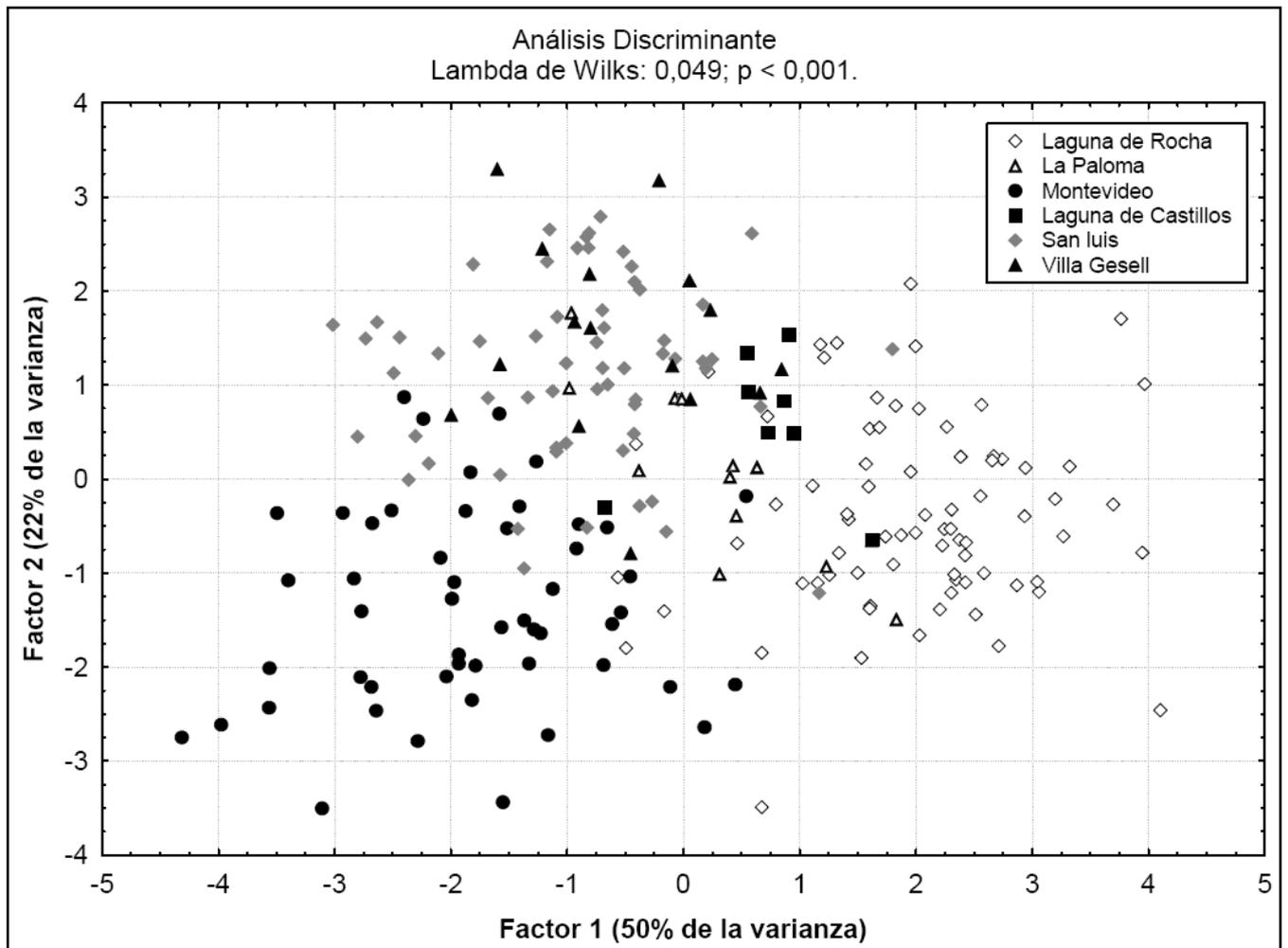


Figura 3. Diagrama de dispersión de los dos primeros Factores del AD realizado sobre la matriz “partial warps” y componentes uniforme obtenida a partir de los análisis de morfometría geométrica realizados en *M. furnieri*. Se presenta también el valor del lambda de Wilks y su significancia estadística luego de 10^4 pseudoréplicas de bootstrap.

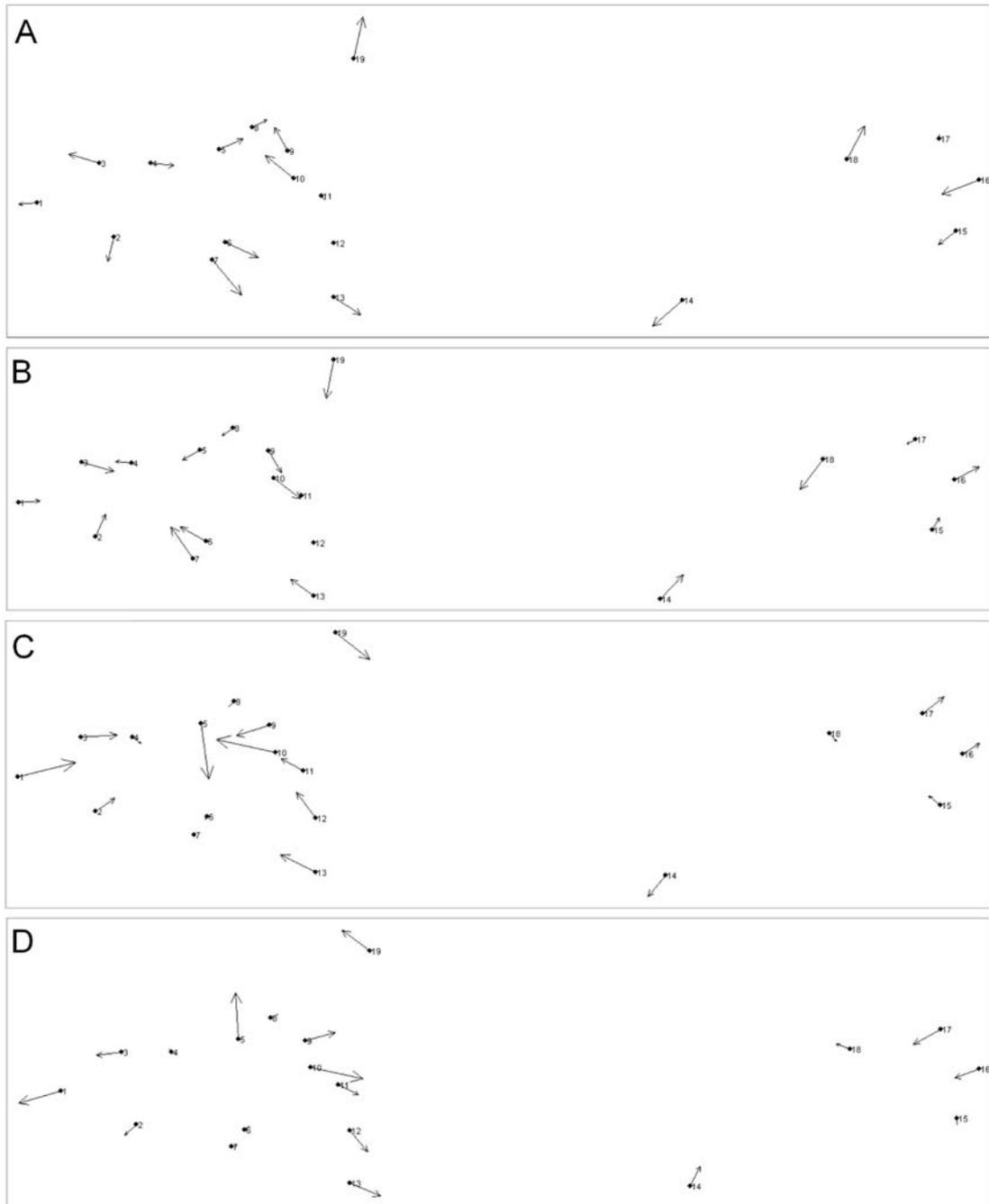


Figura 4. Configuración consenso y desplazamiento relativo de los marcos anatómicos obtenidos a partir de los análisis de morfometría geométrica realizados en *M. furnieri*. A) deformación asociada a los valores negativos del Factor 1, B) deformación asociada a los valores positivos del Factor 1, C) deformación asociada a los valores negativos del Factor 2 and D) deformación asociada a los valores positivos del Factor 2. La magnitud de las flechas está multiplicada diez veces para una mejor representación gráfica.

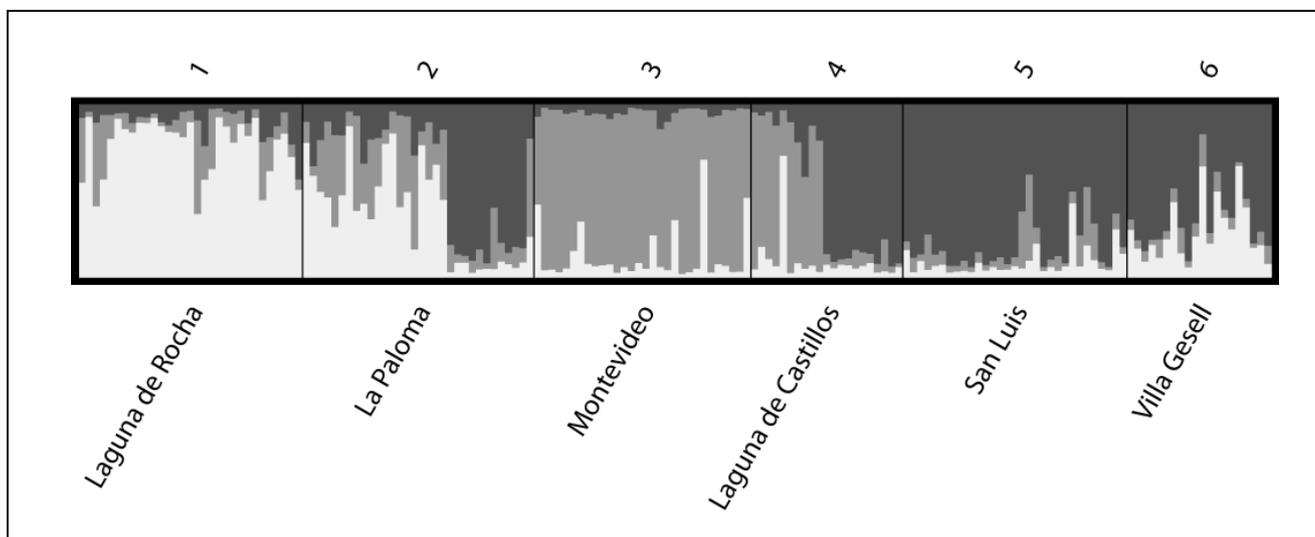


Figura 5. Gráfico obtenido con el programa Distruct a partir de las matrices de membresía obtenidas con Structure y promediadas en CLUMPP. Cada individuo es representado por una línea dividida en tres segmentos que corresponden a los porcentajes de membresía a cada un de los tres diferentes grupos inferidos ($K3 > 0,99$; la probabilidad para los otros K ensayados es despreciable). Cada tonalidad representa grupos diferentes y los segmentos negros separan a los individuos de diferentes localidades.

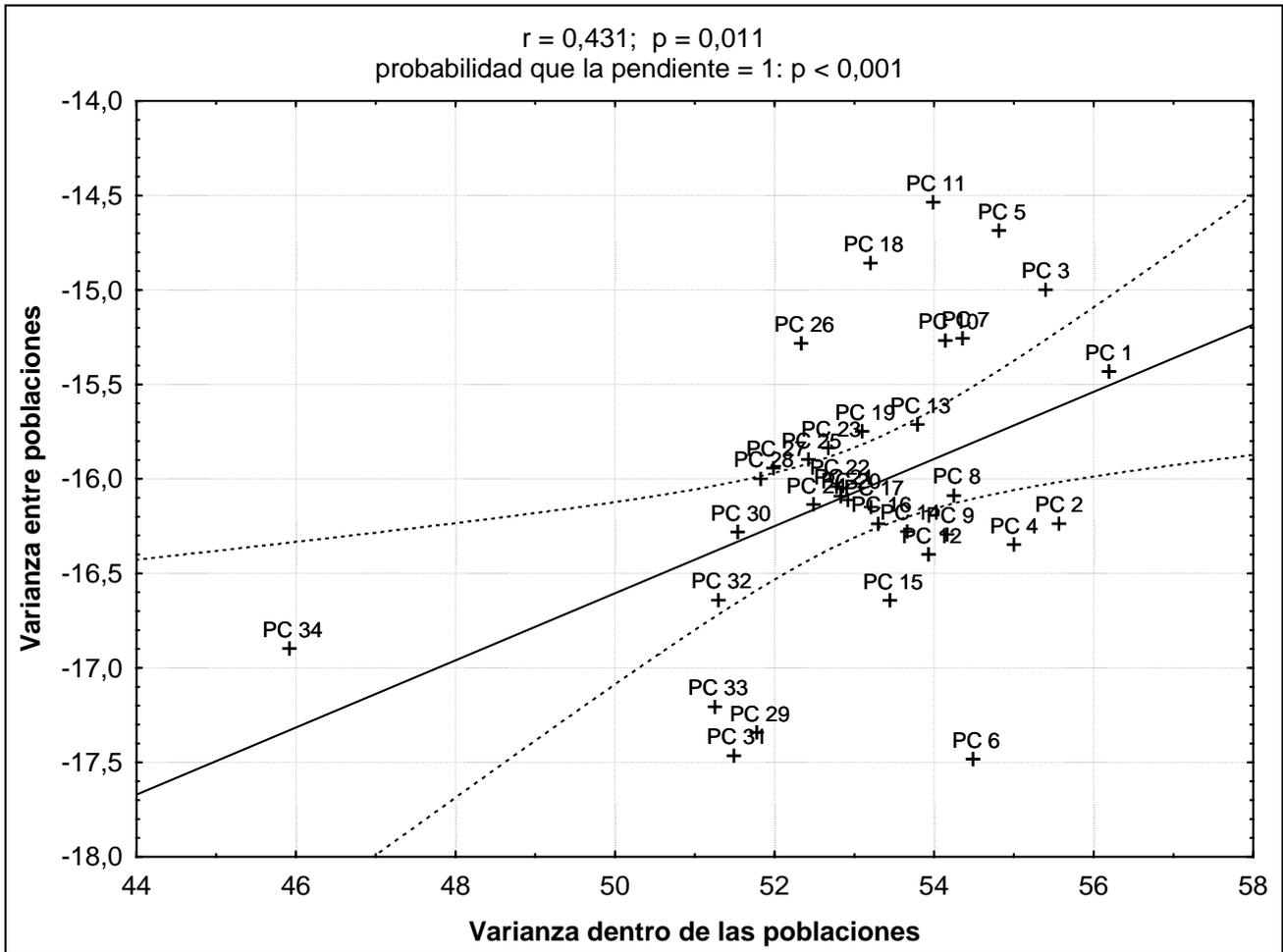


Figura 6a. Relación entre la varianza de los PCs dentro y entre poblaciones. La línea solida indica el mejor ajuste y las líneas punteadas el intervalo de confianza al 95%.

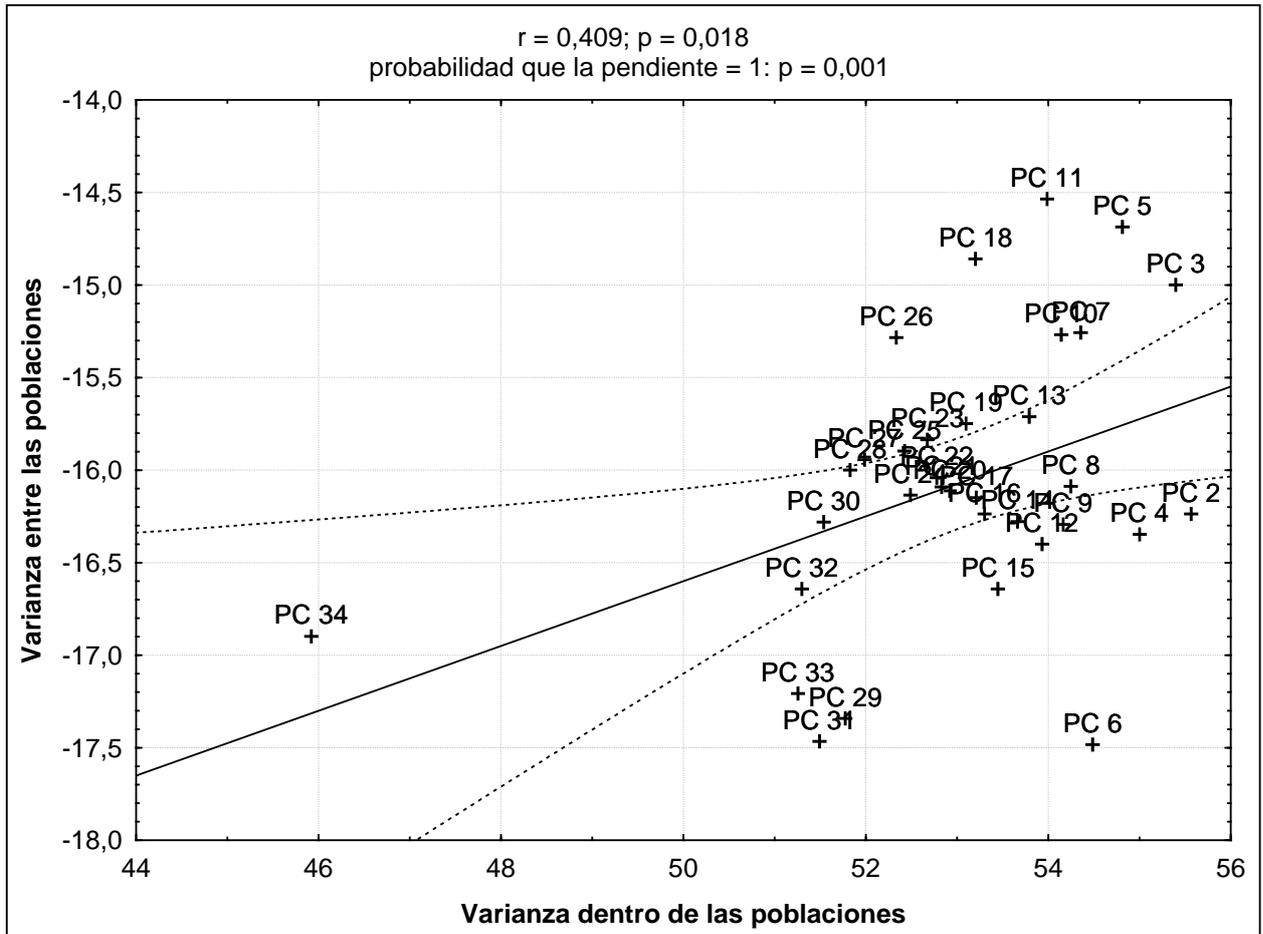


Figura 6b. Relación entre la varianza de los PCs dentro y entre poblaciones, excluyendo el PC1. La línea sólida indica el mejor ajuste y las líneas punteadas el intervalo de confianza al 95%.

Tabla I. Porcentaje de individuos correctamente asignados en la matriz de clasificación del AD y distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones. Todas las distancias fueron estadísticamente significativas (10^4 pseudoréplicas de “bootstrap”) luego de ser aplicada la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p < 0,05$)

	% de individuos correctamente clasificados	Distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones				
		Laguna de Rocha	La Paloma	Montevideo	Laguna de Castillos	San Luis
Laguna de Rocha	84,210	0				
La Paloma	76,920	3,590	0			
Montevideo	82,350	3,920	3,990	0		
Laguna de Castillos	75,000	3,720	4,290	4,470	0	
San Luis	80,330	3,280	3,690	2,800	3,870	0
Villa Gesell	87,500	3,710	3,720	3,650	3,980	2,570

Tabla II. F_{ST} de Weir entre pares de poblaciones.

Localidad	Laguna de Rocha	La Paloma	Montevideo	Laguna de Castillos	San Luis
Laguna de Rocha	0				
La Paloma	0,040	0			
Montevideo	0,119	0,112	0		
Laguna de Castillos	0,061	0,043	0,112	0	
San Luis	0,102	0,063	0,193	0,053	0
Villa Gesell	0,093	0,074	0,228	0,097	0,064

Capítulo 3.- Diferenciación ecológica en *M. furnieri* inferida por medio de isótopos estables y atributos del sistema digestivo

Introducción

Los capítulos anteriores sugirieron que varias fuentes de evidencia independientes muestran un patrón de diferenciación poblacional complejo en *M. furneri*, probablemente influenciado por factores ecológicos. Dadas las contrastantes características ambientales de las localidades entre las cuales se ha encontrado divergencia poblacional en esta especie, es plausible suponer que el uso diferencial de recursos entre ambientes pueda ser una de las fuerzas involucradas en el proceso de diferenciación de las poblaciones. Por ejemplo, los individuos de la Laguna de Rocha, además de presentar una reducción en el tamaño de primera madurez, tienen una forma diferente respecto de los demás individuos analizados (Capítulo 2) lo cual por otro lado está acompañado a su vez de una leve diferenciación genética. Un fenómeno similar ocurre al considerar a los individuos del Río de la Plata, y en este caso la diferenciación genética es aún de mayor magnitud. En este sentido, explorar posibles diferencias entre las poblaciones de corvina rubia en sus hábitos tróficos, así como en la morfología del aparato digestivo, puede ofrecer pistas acerca de la naturaleza de la diferenciación genética y morfológica encontrada, así como sobre el papel de las presiones ecológicas sobre tal diferenciación.

Durante las últimas décadas, los isótopos estables de ^{13}C and ^{15}N ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) han sido usados ampliamente para inferir las fuentes primarias de carbono y estimar la posición

trófica en tramas tróficas complejas (ver Post 2002). Junto a esto, los mismos isótopos han probado ser también útiles para diferenciar entre ecotipos de una misma especie (e.g. Harrod et al. 2005, Lowther & Goldsworthy, en prensa) y para inferir el movimiento de los individuos a corto plazo (e.g. Ciancio et al. 2008). El uso de esta técnica para trazar patrones de movimiento en poblaciones naturales se basa en el hecho de que el perfil isotópico en los tejidos de un animal refleja también el perfil isotópico de la trama trófica en donde se encuentra (Hobson 1999). Los perfiles isotópicos pueden ser diferentes entre ambientes debido a varios procesos biogeoquímicos, y esas señales isotópicas van siendo transferidas entre los diferentes consumidores presentes en esas tramas tróficas (DeNiro & Epstein 1978). Por esta razón, individuos que se mueven entre tramas tróficas isotópicamente disímiles pueden retener información sobre sus fuentes de alimentación previas por un período que depende de la tasa de recambio del elemento en el tejido considerado (Hobson 1999). Por otro lado, el análisis de ^{13}C and ^{15}N para diferenciar entre el uso de ambientes con diferente salinidad – como puede ser el caso de *M. furnieri* – se basa en la existencia de diferencias predecibles en las características isotópicas a lo largo de gradientes de salinidad (Harrod et al. 2005 y referencias allí mencionadas). Por ejemplo, peces que se alimentan en diferentes lugares a lo largo de un gradiente de salinidad podrían presentar valores contrastantes de ^{13}C debido al detrimento relativo de ^{13}C en los ambientes dulceacuícolas (Harrod et al. 2005). El empleo de $\delta^{15}\text{N}$ puede también proveer información sobre las fuentes de alimento, dado que el agua dulce no contaminada presenta valores más bajos de ^{15}N que el agua marina, pero esta técnica tiene menor resolución que el uso de $\delta^{13}\text{C}$ con el mismo propósito (Harrod et al. 2005).

Como se ha mencionado, diferentes ecotipos pueden exhibir diferencias en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en relación al uso diferencial de recursos. Por otra parte, es también esperable que organismos que viven en diferentes ambientes puedan ajustar su actividad metabólica a las condiciones prevalecientes (Wikelski et al. 2003). Dado que el sistema digestivo representa el vínculo funcional entre el organismo y su ambiente para la obtención de energía destinada a la supervivencia, crecimiento y reproducción (Karasov 1990, Secor 2001), cabe esperar que los individuos ajusten los diferentes atributos de tal sistema ante cambios cuantitativos y/o cualitativos en la dieta con la intención de maximizar la obtención de energía a partir del alimento. Por esas razones, puede suponerse que si el uso diferencial de recursos alimenticios promueve, al menos en parte, la divergencia poblacional en *M. furnieri*, podrían encontrarse diferencias en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y en algunos rasgos del aparato digestivo entre las corvinas rubias que habitan diferentes ambientes.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) caracterizar la variación en los perfiles isotópicos de ^{13}C and ^{15}N en varias poblaciones de *M. furnieri*, 2) realizar inferencias acerca de los movimientos a corto plazo en esta especie, empleando esos mismos isótopos como marcadores moleculares, y 3) analizar la variación en varios rasgos del sistema digestivo en las mismas poblaciones. En particular, se investigó si la identidad genética y los cambios en la morfología externa de las corvinas rubias del Río de la Plata y la Laguna de Rocha son acompañados también por cambios en el perfil isotópico y en los atributos del sistema digestivo en los individuos de esas localidades.

Materiales y métodos

Área de estudio y obtención de las muestras

Las corvinas rubias fueron obtenidas de pescadores artesanales y a partir de una campaña de muestreo del B/l Aldebarán (DINARA - MGAP), durante noviembre de 2009 (Laguna de Rocha, n = 10; La Paloma, n = 7; Piriápolis, n =7; Montevideo, n = 10, Laguna de Castillos, n = 8 y Villa Gesell n = 20; Figura 1) y marzo de 2010 (Piriápolis, n =5; Montevideo, n = 8). Los 75 individuos analizados fueron clasificados como adultos según su longitud estándar y/o por inspección gonadal (Isaac, 1988; Vizziano et al. 2002).

Con la finalidad de obtener estimaciones isotópicas de la variación estacional (primavera-verano) entre distintos ambientes (ver más abajo), se obtuvieron algunas estimaciones pelágicas de la línea de base de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ empleando bivalvos de las mismas áreas de muestreo. Dependiendo de su disponibilidad, dos especies de mejillones fueron analizadas durante noviembre de 2009 (Piriápolis, *Mytilus edulis platensis*, n = 5; Montevideo, *Brachidontes rodriguezii*, n=5) y marzo de 2010 (Piriápolis, *Mytilus edulis platensis* n = 5; Montevideo, *Brachidontes rodriguezii*, n = 5).

Análisis de isótopos estables y C:N

Una vez obtenidos los ejemplares de *M. furnieri*, una pequeña porción de tejido muscular fue retirada del flanco derecho o izquierdo de cada pez. Estas muestras fueron entonces transportadas en hielo hasta el laboratorio, secadas en una estufa a 55 °C durante 48 horas y posteriormente pulverizadas. Los lípidos no fueron removidos debido a que, probablemente, el bajo contenido lipídico del músculo esquelético de esta especie no altere la proporción de ¹³C, y porque además la mayoría de los protocolos de laboratorio empleados para remover los lípidos pueden afectar de manera adversa la integridad de ¹⁵N (Grey et al. 2002).

Para realizar los análisis de isótopos estables de ¹³C y ¹⁵N, las muestras fueron pesadas (0,5 - 0,8 mg) y encapsuladas antes de ser incineradas en un analizador elemental Flash EA 112 unido a un espectrómetro de masas Finnigan MAT DELTAplus XL. Según los valores obtenidos con el estándar de laboratorio (leucina), la precisión de las estimaciones fue aproximadamente de 0.1‰ para el ¹³C y de 0.3‰ para el ¹⁵N.

La proporción de isótopos en la muestra fue expresada como valores de δ en ‰ de la siguiente manera: $\delta X = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1] \times 1000$; en donde X es ¹³C o ¹⁵N, y R es la relación correspondiente entre ¹³C: ¹²C o ¹⁵N: ¹⁴N (Post 2002). Los estándares empleados en los análisis fueron Vienna Peedee belemnite para C y N₂ atmosférico para N. Todos los análisis isotópicos antes detallados fueron realizados en el “Centro de Aplicaciones de Tecnología Nuclear en Agricultura Sostenible” (CATNAS), Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Las muestras de músculo obtenidas a partir de los bivalvos analizados fueron transportadas también en hielo hasta el laboratorio y posteriormente analizadas siguiendo los mismos protocolos anteriormente detallados.

Análisis estadístico de los datos isotópicos y de C:N

Todas las variables derivadas de los análisis de isótopos estables y C:N fueron heterocedásticas y se apartaron de una distribución normal (pruebas de Levene y Kolmogorov - Smirnov, respectivamente; $p < 0.05$). Por tal razón, los datos fueron transformados a logaritmos para estabilizar la varianza y aproximar los datos a una distribución normal.

Para evaluar la diferenciación poblacional en *M. furnieri*, se realizó un Análisis Discriminante (AD) sobre la matriz de datos isotópicos y de C:N (e.g. Harrod 2005), empleando los resultados obtenidos al analizar las muestras de corvina rubia colectadas durante el 2009. La correlación entre el largo estándar (SL) de las corvinas rubias y los valores isotópicos y de C:N fue analizada mediante correlaciones de Pearson.

Para evaluar el grado de correlación entre las distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones (derivadas del análisis de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C:N a partir de las muestras de corvina rubia colectadas durante el 2009), y las distancias geográficas (estimadas también en este caso con el programa Google™ Earth) entre las mismas localidades se empleó el programa ProTest, siguiendo los mismos procedimientos descritos en el

Capítulo 2. Se utilizó el mismo análisis para estudiar la relación entre las distancias isotópicas y de C:N de Mahalanobis, las distancias genéticas obtenidas en el capítulo anterior (i.e. los F_{ST} de Weir obtenidos del análisis de 11 loci de microsatélites) y las distancias morfológicas también obtenidas en el capítulo anterior.

Para los análisis de isótopos estables se emplearon corvinas rubias de la localidad de Piriápolis en lugar de la localidad de San Luis, como en el capítulo anterior. Dada la proximidad geográfica entre estas dos regiones (ver Fig. 1), se consideró que ambas localidades representan la misma unidad.

Para estimar los patrones de movimiento a corto plazo de los individuos de *M. furnieri* que posiblemente cumplen su ciclo de vida dentro del estuario – relacionados, por ejemplo, a migraciones tróficas – fueron colectados individuos al comienzo y al final de la época reproductiva. La localidad de Piriápolis fue incluida en este esquema para poder comparar el perfil isotópico de los individuos de Río de la Plata con el de los individuos de la primera región mencionada. Los individuos de la localidad de San Luis presentaron unos de los grados más altos de diferenciación genética con respecto a los de Montevideo (Tabla II). Piriápolis fue incluida dentro de este diseño debido a la alta proximidad geográfica de esta localidad con San Luis y a la mayor disponibilidad de individuos de *M. furnieri* a lo largo del período de estudio, aunado esto también a la mayor posibilidad de obtener mejillones en esta zona para las estimaciones de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (ver abajo).

La significancia estadística de la diferencia entre $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los individuos colectados en ambas localidades y a diferentes épocas del año fue evaluada usando análisis factoriales de varianza (ANOVA de dos vías).

Análisis estadístico de las estimaciones de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$

Se obtuvieron estimaciones pelágicas de los valores de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ para las localidades de Montevideo y Piriápolis (Noviembre 2009 - Marzo 2010), a modo de experimento control de las variaciones estacionales y/o espaciales en esos valores isotópicos. Se utilizaron ANOVAs de dos vías para evaluar el grado de diferenciación entre localidades y a diferentes épocas del año. Las comparaciones post-hoc fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey HSD.

Análisis de laboratorio de los atributos del sistema digestivo

El largo estándar (SL) de los peces se midió con una regla plástica ($\pm 0,1$ cm) y posteriormente se removieron el estómago, intestino, hígado y la grasa visceral. El estómago y el intestino fueron disecados y sus respectivos largos fueron medidos también con una regla plástica ($\pm 0,05$ cm). Estos últimos dos órganos fueron entonces lavados con agua corriente, secados con toallas de papel y pesados ($\pm 0,01$ g); el número de ciegos pilóricos (PC) fue determinado en esta etapa. El peso del hígado fue también obtenido en esta etapa (WL, $\pm 0,01$ g) así como el peso eviscerado de los individuos (EBW, $\pm 0,1$ g)

Análisis de la diferencia entre poblaciones en los rasgos del aparato digestivo

Antes de realizar todas las pruebas estadísticas relacionadas con los análisis de los rasgos del sistema digestivo, todos los datos fueron estudiados para ver si cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad, empleando las pruebas de Kolmogorov - Smirnov y Levene, respectivamente ($p < 0.05$). En algunos casos, los datos fueron transformados a logaritmos para aproximarse a dichos supuestos.

El efecto del tamaño corporal sobre el largo intestinal (LI) fue removido empleando la corrección sugerida por Wagner et al. (2009), una modificación del método propuesto por Kramer & Bryant (1995). El intercepto de la relación linealizada: $\log(\text{LI})$ vs. $\log(\text{tamaño corporal})$, representa el coeficiente de la relación de la función potencial, el cual representa el componente independiente del tamaño de la trayectoria de crecimiento de LI (Wagner et al. 2009). Además, si las pendientes son homogéneas entre los diferentes grupos, tal intercepto sirve como un índice estandarizado por el tamaño del largo intestinal (ILI) que puede servir para comparar entre diferentes individuos o grupos (Wagner et al. 2009). La correlación entre ILI y la posición trófica en *M. furnieri* fue realizada usando $\delta^{15}\text{N}$ en forma directa como proxy del nivel trófico. También se analizó la correlación entre ILI y los valores de $\delta^{13}\text{C}$. Dado que el largo del estómago también varía con el tamaño corporal, se construyó un índice de manera similar (STLI) para evaluar la diferencia en largo estomacal entre las diferentes localidades. Las diferencias entre grupos en el número de PC, ILI y STLI fueron evaluadas mediante pruebas de ANOVA.

Para evaluar las diferencias entre localidades en base a la masa de los órganos del aparato digestivo analizados, se efectuó un Análisis Discriminante libre del efecto tamaño corporal (SFDA), según dos Reis et al. (1990). Este método consiste en remover el efecto de la variación intra-grupo realizando una regresión lineal simple de cada carácter por separado con el primer Componente Principal (PC1) extraído de la matriz total de datos – un estimador multivariado del tamaño – y luego realizar un análisis discriminante sobre los residuales así obtenidos (Strauss 1985, dos Reis et al. 1990). Para corroborar si la discriminación entre poblaciones obtenida es efectivamente independiente del tamaño, se calcularon correlaciones de Pearson entre los Factores del SFDA y PC1 antes mencionado. Se estudiaron las correlaciones entre las distancias de Mahalanobis entre los centroides de pares de poblaciones (obtenidas a partir de la matriz de rasgos del digestivo empleada para el SFDA) y las demás distancias pareadas generadas a lo largo de este trabajo (geográficas, morfológicas, genéticas, isotópicas y de C:N), empleando análisis de ProTest y ProTest parciales.

Resultados

*Análisis isotópicos y de C:N de los tejidos *M. furnieri**

Los valores descriptivos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en *M. furnieri* por población se presentan en la Fig. 7. Las pruebas de Pearson revelaron correlaciones positivas entre $\delta^{15}\text{N}$ y SL y entre $\delta^{13}\text{C}$ y SL ($r = 0,818$ y $r = 0,645$, respectivamente; $p < 0,05$ en ambos casos). No hubo una correlación significativa entre C:N y SL ($r = -0,064$, $p > 0,05$).

El AD efectuado sobre los datos transformados a logaritmos derivados de los análisis isotópicos y de C:N no mostró una separación clara entre todas las localidades analizadas (Fig. 8). Sin embargo, los individuos de las lagunas costeras, especialmente los de la Laguna de Castillos, se separaron claramente del resto a lo largo del Factor 1, el cual explica el 99,18 de la varianza. La variable con más influencia sobre el Factor 1 fue $\delta^{15}\text{N}$. Los factores restantes no discriminaron entre las localidades analizadas. El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue mayor a 42,85% en todos los casos (Tabla III). Las mayores Distancias de Mahalanobis fueron entre los individuos de la Laguna de Castillos y los demás analizados, seguidas en magnitud por las comparaciones que involucran a los individuos de la Laguna de Rocha y las otras localidades (Tabla III). Excluyendo a los individuos de las lagunas costeras, o agrupando a los individuos según su procedencia (i.e. estuario, laguna u océano), el patrón de discriminación general entre poblaciones no cambió sustancialmente (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos con ProTest mostraron una correlación marginalmente significativa entre las distancias de Mahalanobis obtenidas a partir del análisis de isótopos y C:N y las distancias genéticas entre pares de poblaciones ($m^2 = 0,405$; $p = 0,065$), lo cual se hizo más evidente cuando se fijó el efecto de la distancia geográfica entre pares de poblaciones (ProTest parcial: $m^2 = 0,173$; $p = 0,012$). También se encontró evidencia de correlación positiva, nuevamente con probabilidad marginal, entre las distancias isotópicas y de C:N y las distancias morfológicas calculadas en el capítulo anterior ($m^2 = 0,353$; $p = 0,095$), lo cual se tornó más evidente cuando se fijó el efecto de la separación geográfica entre localidades (ProTest parcial: $m^2 = 0,298$; $p =$

0,025). Contrariamente, no se encontró evidencia de correlación entre las distancias isotópicas y de C:N y las distancias geográficas entre pares de poblaciones ($m^2=0,837$; $p = 0,792$).

El ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{15}\text{N}$ de las corvinas rubias, ni entre localidades ni entre las diferentes estaciones ($p > 0,05$).

Análisis de las estimaciones de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$

El ANOVA factorial presentó diferencias significativas en las estimaciones de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre localidades y entre épocas del año, pero la interacción entre ambos efectos no fue significativa, para $p < 0,05$. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ presentan diferencias significativas entre localidades durante la misma estación de muestreo, entre localidades a diferentes estaciones de muestreo, así como también entre localidades a diferentes estaciones de muestreo. Los valores de nitrógeno presentan un comportamiento similar, con la excepción de que no existen diferencias significativas entre localidades para la misma estación de muestreo. Los resultados obtenidos en todas las comparaciones post-hoc se muestran en la Tabla IV.

Análisis de los atributos del sistema digestivo en relación a los perfiles isotópicos

Los valores de los estadísticos descriptivos de los rasgos del aparato digestivo analizados en *M. furnieri* se presentan en la Tabla V. Como en ambos casos hubo homogeneidad de pendientes entre todos los grupos analizados (datos no mostrados),

se emplearon las pendientes de las funciones linealizadas: Log(IL) vs. Log(EBW) y Log(STL) vs. Log(EBW) obtenidas a partir del análisis de todos los individuos. El escalamiento del largo intestinal con la masa corporal fue: $\text{IL} \propto \text{masa corporal}^{0.357}$ y el escalamiento del largo estomacal con la masa corporal fue: $\text{STL} \propto \text{masa corporal}^{0.4026}$. El índice ILI fue obtenido siguiendo la relación: $\text{ILI} = \log(\text{IL}) - \log(\text{EBW})^{0.357}$ (Wagner et al. 2009); el índice STLI fue obtenido empleando una aproximación similar. La relación entre los valores de ILI y la posición trófica ($\delta^{15}\text{N}$) y entre ILI y $\delta^{13}\text{C}$ se detallan en las Figs. 9 y 10 respectivamente. El largo intestinal estuvo relacionado directamente con la posición trófica (Fig. 9) y con los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 10), lo que estaría reflejando posibles diferencias en la dieta entre las diferentes corvinas rubias analizadas que se manifiestan a ambos niveles. Las posiciones tróficas más bajas fueron ocupadas por individuos de la Laguna de Castillos y de La Laguna de Rocha, en ese orden, pero no se encontraron diferencias significativas en los valores de ILI según las pruebas de ANOVA realizadas ($p > 0,05$). La prueba de ANOVA tampoco encontró diferencias significativas en STLI o PC entre los grupos ($p > 0,05$). Se obtuvieron los mismos resultados con las pruebas de ANOVA sobre ILI, STLI y PC cuando los individuos eran agrupados según el ambiente de donde provenían (i.e. océano, estuario o laguna) y se analizaban las diferencias entre esos grupos (datos no mostrados).

Diferencia en la masa de los órganos del sistema digestivo entre localidades

Los resultados del SFDA presentan a los individuos de la laguna de Castillos, y en menor medida a los de la Laguna de Rocha, separados del resto (Fig. 11). Para este

caso, el Factor 1 expresó el 96,65% de la varianza y separó a los individuos de las lagunas costeras antes mencionadas de los demás; las variables peso intestinal (IW) y LW aportaron en mayor grado a la discriminación según este Factor. El Factor 2 explicó el 0,03% de la varianza y separó a la mayoría de los individuos de Montevideo de los otros analizados; la variable con más influencia sobre este Factor fue el peso estomacal (SW). El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue muy bajo para las localidades de La Paloma y Piriápolis (14,30% y 16,67%, respectivamente), los porcentajes restantes estuvieron todos por encima de 79.90% (Tabla VI). Nuevamente, las distancias de Mahalanobis de mayor magnitud fueron entre las corvinas rubias de Laguna de Castillos y las demás estudiadas, seguidas de las comparaciones que involucraron a los individuos de la Laguna de Rocha (Tabla VI). En este caso, aunque los individuos de Montevideo solo aparecieron claramente discriminados respecto a los de las lagunas costeras, las distancias de Mahalanobis fueron estadísticamente significativas en todas las comparaciones que involucraron esta localidad (Tabla VI). Los resultados obtenidos con ProTest no revelaron correlaciones significativas entre la distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones obtenidas a partir de la matriz de rasgos del aparato digestivo y ninguna de las distancias derivadas de los demás análisis realizados hasta el momento, incluidas las geográficas ($p > 0,05$). Los ProTest parciales, fijando el efecto de la distancia geográfica entre poblaciones, tampoco encontraron evidencia de correlación significativa en las mismas comparaciones entre matrices de distancias ($p > 0,05$).

Agrupando a los individuos según el hábitat de donde proceden (i.e. estuario, laguna u océano) tampoco se logró discriminar a los individuos del Río de la Plata o del océano

Atlántico de los demás, pero nuevamente los de Laguna de Rocha y Laguna de Castillos estuvieron separados del resto (datos no mostrados).

El patrón de discriminación a lo largo de los Factores 1 y 2 no estuvo influenciado por el efecto de las diferencias en el tamaño de los atributos analizados (PC1 vs Factor 1, $r < 0,001$; PC1 vs Factor 2, $r < 0,001$; ambas correlaciones no fueron estadísticamente significativas, $p > 0,05$).

Discusión

Los análisis realizados empleando isótopos estables y C:N indican que los individuos de la Laguna de Castillos y de la Laguna de Rocha son los más diferenciados del resto y también entre sí. Por el contrario, los individuos colectados en el Río de la Plata o en el resto de las localidades analizadas no difirieron significativamente en los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ o C:N, sugiriendo que *M. furnieri* se mueve libremente entre aguas oceánicas y estuarinas. Los análisis realizados para evaluar la variabilidad isotópica espacial y estacional entre algunas de las localidades (i.e. ANOVA factorial) también apoyan estos resultados. Por el contrario, un buen candidato a presentar respuestas plásticas por adaptación fisiológica entre distintos ambientes como es el largo intestinal, no presentó diferencias entre los individuos de las diferentes localidades analizadas. Sin embargo, el SFDA realizado sobre la matriz de datos producida por el análisis de algunos órganos del aparato digestivo, separó los individuos de las lagunas costeras de las demás localidades y también entre sí y propone a la masa del intestino como una de las variables más influyentes en tal discriminación.

Estructura poblacional en la corvina rubia derivada del análisis de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C:N

Los resultados obtenidos con el AD realizado sobre la matriz derivada del análisis de isótopos y C:N no mostraron el mismo patrón de diferenciación poblacional sugerido por los análisis genéticos (e.g. Pereira et al. 2009; D'Anatro et al. 2011) o los análisis morfológicos realizados en el capítulo anterior. A pesar de esto, los resultados con ProTest plantean la existencia de una correlación general, considerando tanto las distancias genéticas como las morfológicas, con las distancias de Mahalanobis entre grupos inferidas a partir del análisis de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C:N. La mayor concordancia en la diferenciación entre poblaciones se encuentra al focalizarse en los individuos de la Laguna de Rocha, en los cuales las moderadas diferenciaciones genética y morfológica que presentan respecto a las demás localidades (discutidas en el capítulo anterior) son acompañadas por diferencias en los valores isotópicos y de C:N además de diferencias en la morfología de algunos atributos del aparato digestivo. Todos estos datos son acordes a lo propuesto por los resultados obtenidos en el capítulo anterior, que apoyan la idea de que parte de la diferenciación fenotípica entre algunos de los diferentes ambientes analizados para *M. furnieri* puede ser producto de la acción de la selección divergente (ver más adelante).

Corvinas rubias de las lagunas costeras: diferenciación respecto a sus valores isotópicos

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ registrados sugieren que los individuos de las lagunas costeras se alimentan de diferentes fuentes de carbono respecto a los que habitan en el estuario

del Río de La Plata o en el Océano Atlántico. El AD también segrega a los individuos de las lagunas costeras de las otras analizadas. En el caso de la Laguna de Rocha, concuerda con los resultados genéticos (D'Anatro et al. 2011) y los morfológicos presentados en el capítulo anterior. Por el contrario, los individuos de la Laguna de Castillos no presentaron diferencias genéticas ni morfológicas que los discriminaran significativamente de alguna de las demás localidades analizadas, a pesar que fueron los más diferenciados del resto en los análisis isotópicos y de C:N. Los individuos de esta última laguna mencionada presentaron la posición trófica más baja entre todas las corvinas rubias analizadas y también presentaron un detrimento en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ respecto a los demás (Fig. 7). Por otra parte, las corvinas rubias de la Laguna de Castillos presentaron la desviación estándar más grande en los valores de $\delta^{13}\text{C}$, sugiriendo que estos individuos se alimentan empleando una gama más variada de fuentes de carbono respecto a los individuos analizados en otras localidades (Fig. 7). Las corvinas rubias de la Laguna de Rocha presentaron las mismas tendencias que las de Laguna de Castillos, pero con una posición trófica un tanto mayor y valores más altos de $\delta^{13}\text{C}$. Por tanto, la leve diferenciación genética de los individuos de la Laguna de Rocha está acompañada también por una diferenciación en los valores isotópicos y de C:N, lo cual también involucra una disminución en el nivel trófico, estimado según $\delta^{15}\text{N}$. Esta divergencia también está asociada a variación en la forma externa de los individuos, en parte guiada por selección divergente (Capítulo 2). Considerando los resultados en conjunto, la hipótesis de que la adaptación a factores ambientales locales juega un papel importante en la diferenciación poblacional de *M. furnieri*, parece una alternativa plausible.

En este trabajo no se obtuvieron estimaciones de línea de base para $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{15}\text{N}$ en las lagunas costeras analizadas. De todos modos es razonable asumir que existen diferencias en el uso sostenido de recursos entre ambientes, dada la marcada diferencia ecológica que presentan estas lagunas con respecto a los demás localidades analizadas (i.e. estuario del Río de la Plata y Océano Atlántico) y las diferencias entre estos ambientes en los valores isotópicos y de C:N. Habiendo dicho esto, se realizarán inferencias acerca de la posible naturaleza de las diferencias isotópicas encontradas en las corvinas rubias de las lagunas costeras.

Las tramas tróficas en lagos y lagunas pueden dividirse primariamente en redes pelágicas y litorales, siendo las últimas mencionadas comúnmente más influenciadas por fuentes de carbono alóctonas (e.g. ^{13}C de origen terrestre) que las primeras (véase Post 2002 y referencias allí mencionadas). Tal vez las corvinas rubias que habitan en las lagunas costeras son parte dinámica de ambas tramas tróficas, y por ende, presentan una mayor varianza en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$. Aunado a esto, D'Anatro et al. (2011) así como los resultados genéticos obtenidos en el capítulos anterior, muestran altos niveles de flujo genético entre la localidad de Laguna de Castillos y las demás analizadas, lo cual puede también explicar la alta varianza local en los valores de $\delta^{13}\text{C}$. Naturalmente, esas estimaciones de flujo genético reflejan el promedio de eventos demográficos históricos y el patrón de movimiento de *M. furnieri* puede ser diferente en la actualidad. El caso de Laguna de Rocha es algo diferente, ya que las corvinas rubias de esta localidad están más diferenciadas genética y morfológicamente.

Rodríguez-Graña et al. (2008) realizaron un estudio detallado de la trama trófica de la Laguna de Rocha. Esta laguna está conectada al Océano Atlántico a través de un barra arenosa, la cual crea dos zonas de bien delimitadas: la zona sur, con clara influencia oceánica y la zona norte, con una marcada preponderancia de un régimen dulceacuícola. A pesar de esta marcada zonificación, Rodríguez-Graña et al. (2008) plantean que los ensambles biológicos y los patrones tróficos son esencialmente los mismos en las zonas norte y sur de la Laguna de Rocha, sugiriendo por tanto que las especies que habitan la laguna hacen un uso extensivo de la misma, incluida *M. furnieri*. La zona norte de la laguna, de características dulceacuícolas, puede proveer al sistema de potenciales presas para *M. furnieri*, que junto con las habituales de origen oceánico, explicarían la alta varianza en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrada para esta especie en esta localidad.

No se cuenta con los mismos antecedentes de estudio para interpretar los resultados isotópicos obtenidos con las corvinas rubias de la Laguna de Castillos, pero puede suponerse que ocurren fenómenos similares que en la laguna de Rocha; aunque en este caso habría que tener en cuenta que la influencia oceánica sobre esta laguna, de existir, sería de una magnitud más moderada que en la anterior dado que la comunicación con el océano es a través del Arroyo Valizas, una vía mucho menos directa que la barra arenosa de la Laguna de Rocha.

Finalmente, todos estos resultados estarían también influidos por el tamaño corporal de los organismos analizados, dado que las corvinas rubias de las lagunas costeras son de un tamaño generalmente menor a las colectadas en los otros ambientes, y por

ejemplo, han sido descriptos cambios en la posición trófica de *M. furnieri* relacionados a la talla de los individuos (e.g. Penchaszadeh et al. 2005).

Un trabajo reciente empleando $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (Botto et al. 2011) plantea que, como es de esperarse, el estuario del Río de la Plata recibe una gran cantidad de nutrientes alóctonos, adicionales a la producción primaria. Estas diferentes fuentes carbono tal vez se ven moderadamente reflejadas en la varianza de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ para *M. furnieri* del estuario del Río de la Plata (Fig. 7), aunque de una manera menos evidente que en el caso de los individuos de las lagunas costeras. La aproximada homogeneidad en los valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C:N entre los individuos del Río y de la Plata y el Océano Atlántico sugiere que, o bien esas fuentes de energía alóctona en el estuario son usadas en menor medida por los individuos que se reproducen en el estuario, o bien son empleadas de manera uniforme por las corvinas rubias del estuario y su frente oceánico. Los resultados presentados en la Fig. 7 apoyarían la primera hipótesis.

Patrones de movimiento a corto plazo en M. furnieri inferidos por medio del análisis de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$

Los isótopos estables han sido ampliamente utilizados para trazar los patrones de movimiento en diferentes animales (ver Hobson 1999, Rubenstein & Hobson 2004 por una revisión detallada sobre el tema), pero esta técnica puede presentar varios problemas que deben de ser tenidos en cuenta al interpretar los resultados obtenidos. Por ejemplo, individuos que habitan en diferentes ambientes pueden presentar gran variabilidad en los valores isotópicos (e.g. Farmer et al. 2004, Wunder et al. 2005) o

estos valores pueden depender específicamente de la edad, tamaño o sexo de los individuos (e.g. Lott 2003, este trabajo). Teniendo en cuenta estas limitaciones, pueden hacerse inferencias acerca de las tasas de movimiento entre localidades y entre diferentes estaciones sugeridas en *M. furnieri* por los análisis isotópicos realizados. Como fuera mencionado anteriormente, los individuos colectados tanto en aguas del Río de la Plata como del Océano Atlántico no difieren en sus valores isotópicos ni de C:N, así como tampoco entre distintos momentos dentro de su período reproductivo (noviembre-marzo), como lo indican los resultados obtenidos con el ANOVA factorial.

Las estimaciones de línea de base de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ revelaron diferencias significativas para estos valores entre sitios (i.e. Piriápolis y Montevideo) y también entre sitios al comienzo y al final de la temporada reproductiva (Tabla IV). Cabe resaltar que tales estimaciones fueron realizadas en base a dos especies diferentes de bivalvos, y que este hecho puede introducir sesgos en los valores isotópicos inferidos para cada ambiente, debido, por ejemplo a diferencias no evaluadas en la tasa de recambio de ^{13}C y/o ^{15}N en el músculo entre las especies utilizadas. Los resultados que se presentan en la Tabla IV parecen sugerir que el hecho de utilizar especies diferentes de bivalvos no afecta demasiado la inferencia de los valores isotópicos de línea de base, al menos para $\delta^{15}\text{N}$. Considerando por lo tanto esas estimaciones de línea de base como confiables, puede inferirse que las corvinas rubias se mueven libremente entre ambos ambientes durante la temporada reproductiva, dado que la tasa de recambio de los isótopos empleados en los análisis para un tejido como el músculo esquelético, es del orden de varias semanas (Hobson & Clark 1993).

Norbis & Verocai (2005), analizando la morfología de los otolitos, proponen la existencia de dos unidades de corvina rubia que hacen uso del estuario del Río de la Plata con fines reproductivos en diferentes momentos del año, con individuos de mayor porte reproduciéndose al comienzo de la temporada reproductiva e individuos de talla menos haciéndolo a fines o mediados de la misma. Como estos mismos autores mencionan, esta estrategia puede estar determinada por la estructura poblacional de la especie, teniendo en cuenta la variabilidad ambiental del estuario del Río de la Plata durante la época reproductiva de la corvina rubia. Los resultados aquí obtenidos sugieren que los individuos colectados al principio y/o al final del período reproductivo comparten las mismas áreas de alimentación. Esto indicaría por tanto que la diferencias en la época reproductiva entre las corvinas de pequeño y mayor porte puede ser el resultado de una conducta relacionada con la edad, el tamaño y la migración de los individuos y que no está relacionada a diferentes estrategias de alimentación de los dos grupos.

Atributos del sistema digestivo y posición trófica en M. furnieri

La teoría de digestibilidad óptima sugiere un vínculo directo entre las características del sistema digestivo la calidad del alimento (Sibly, 1981). Dado que existen especializaciones individuales a diferentes tipos de alimentos, es concebible que exista también variación individual en las características del aparato digestivo (Olsson et al. 2007). El SFDA efectuado sobre la matriz de algunos rasgos del sistema digestivo segregó principalmente a los individuos de las lagunas costeras de las restantes,

teniendo las masas del intestino y del hígado como las variables más influyentes. Nuevamente, los individuos que presentan una mayor identidad fueron los colectados en la Laguna de Castillos. Estos resultados son de similar magnitud que los obtenidos al analizar la matriz de datos isotópicos y de C:N. Inversamente, el largo estomacal o intestinal (expresados como los índices STLI e ILI, respectivamente) no presentó diferencias entre las corvinas rubias de los diferentes ambientes, como fue revelado por los análisis de ANOVA. Sin embargo, el largo intestinal mostró una correlación significativa con los valores de $\delta^{15}\text{N}$, usados como proxy de la posición trófica (Fig. 9). Organismos que ocupan niveles tróficos bajos generalmente presentan intestinos más largos que las que ocupan niveles más altos, con la finalidad de maximizar la obtención de energía a partir del alimento ingerido (Sibly 1981). Este no parece ser el caso de *M. furnieri* en las lagunas costeras. Tal vez estos ambientes lacustres provean de una fuente no definida de alimento de alta calidad energética, y por tanto no se encontraron diferencias en largo intestinal de los individuos entre los diferentes sitios, a pesar de las grandes diferencias en $\delta^{15}\text{N}$. Además, como fue antes mencionado, los ambientes dulceacuícolas no contaminados presentan valores de ^{15}N generalmente más bajos que los ambientes marinos; esto también podría ser parte de la explicación del patrón encontrado.

Rodríguez-Graña et al. (2008) plantean que la posición trófica de *M. furnieri* en la Laguna de Rocha varía durante las estaciones del año pero no entre sitios. Análisis del contenido estomacal de las corvinas rubias de esta laguna en ese trabajo revelan la existencia de bivalvos, invertebrados bentónicos, pequeños peces, así como restos vegetales. Mendoza-Carranza & Vieira (2008), analizando la dieta de *M. furnieri* en

varias localidades a lo largo de la costa de Brasil (incluyendo el estuario de la Laguna de los Patos), describen a *M. furnieri* como una especie generalista-oportunista con un amplio nicho trófico, lo que le permite adaptar su estrategia alimenticia a una gran diversidad de ambientes. Esos resultados son congruentes con los obtenidos aquí, que sugieren una buena capacidad plástica del sistema digestivo en respuesta al ambiente, así como diferentes posiciones tróficas y gran varianza en las fuentes de carbono.

Como se describió en el capítulo anterior, fluctuaciones holocénicas del nivel del mar afectaron la costa oceánica del Uruguay así como el Río de la Plata, lo que hace que el área de estudio que se consideró para analizar las diferentes poblaciones de *M. furnieri* tenga un origen geológico reciente. Considerando los resultados del Capítulo 2, parte de la diferenciación genética entre poblaciones está acompañada por desplazamientos morfológicos que pueden ser efecto de la acción de la selección divergente. El uso diferencial de recursos de los individuos de las lagunas costeras, así como la respuesta fisiológica adaptativa del sistema digestivo a las distintas presiones ecológicas impuestas por cada ambiente, parecen estar en línea con la hipótesis de que parte de la divergencia entre poblaciones es debido al efecto de la selección natural divergente.

Experimentos adicionales, por ejemplo del tipo jardín común, podrían ayudar a desentrañar los componentes plástico y genético de los cambios morfológicos encontrados en este capítulo. Técnicas que analizan la composición química de los otolitos (e.g. Rooker et al. 2001, Rooker et al. 2003) así como otras que emplean ácidos grasos (e.g. Grahl-Nielsen & Mjaavatten 1992, Joensen & Grahl-Nielsen 2001, véase

también Smith et al. 1996), han probado ser también de gran utilidad para delimitar unidades en peces, y podrían aportar nueva evidencia para mejorar la comprensión del patrón poblacional encontrado en esta especie.

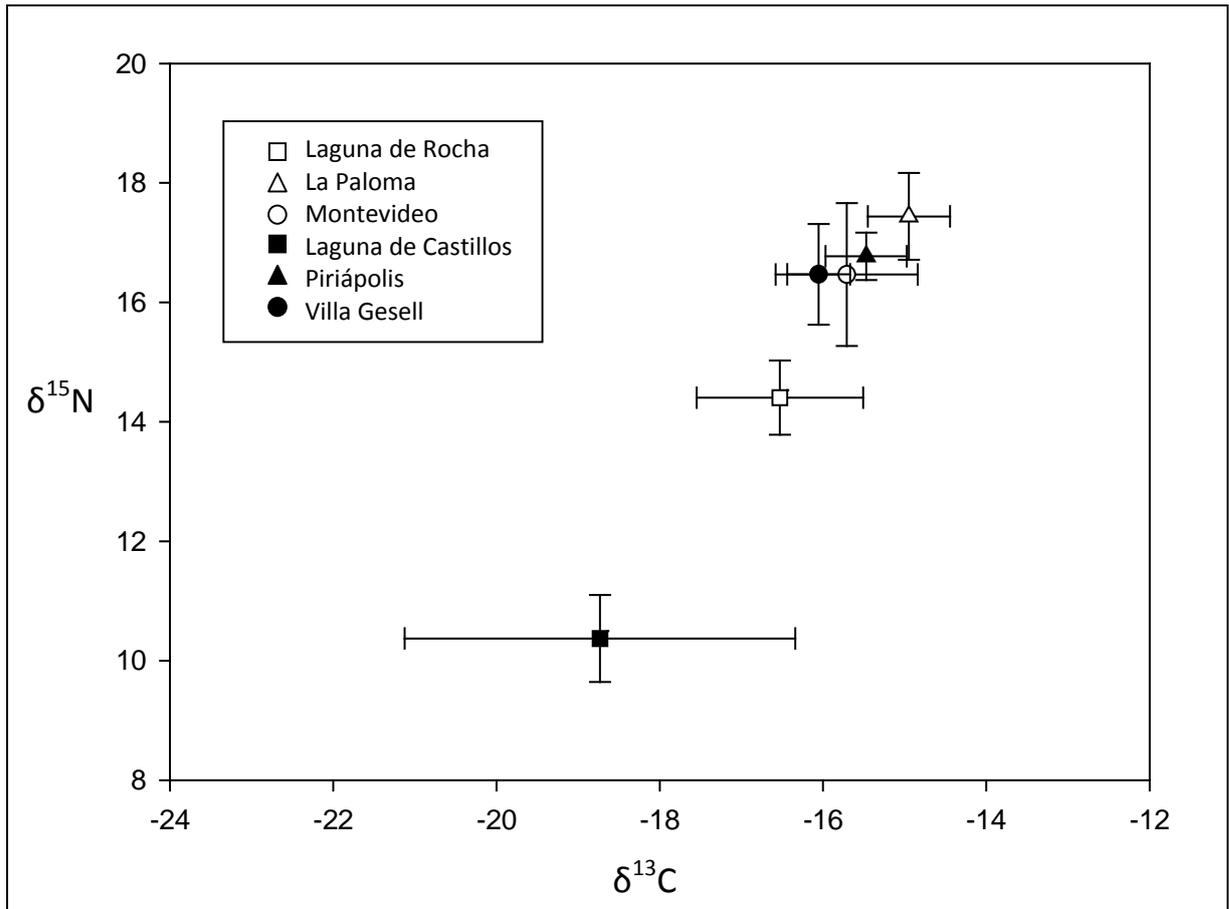


Figura 7. Valores promedio (\pm desvío estándar) para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ por población.

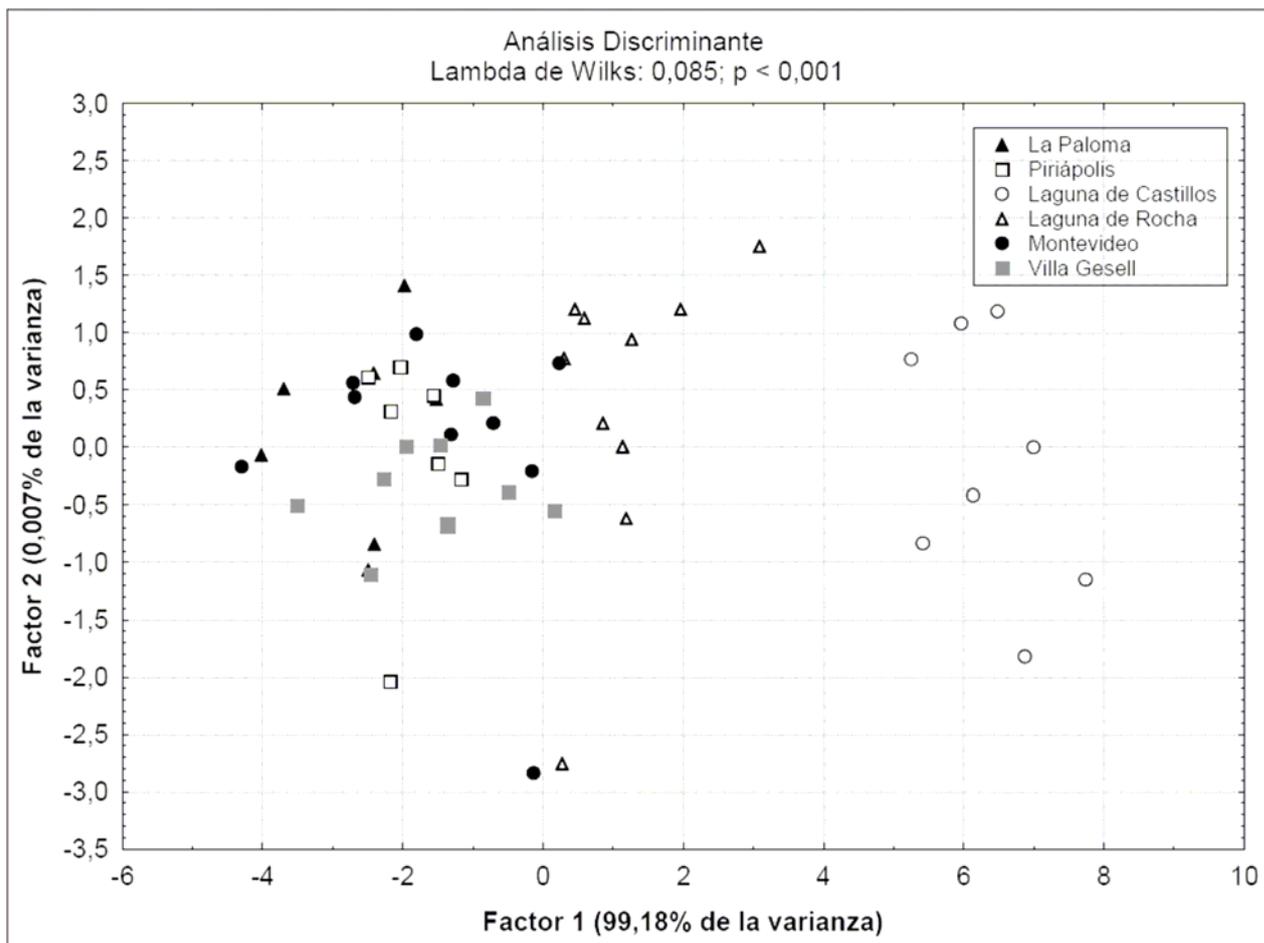


Figura 8. Diagrama de dispersión de los dos primeros Factores del AD realizado sobre la matriz derivada del análisis de isótopos y C:N en *M. furnieri*. Se presenta también el valor del lambda de Wilks y su significancia estadística.

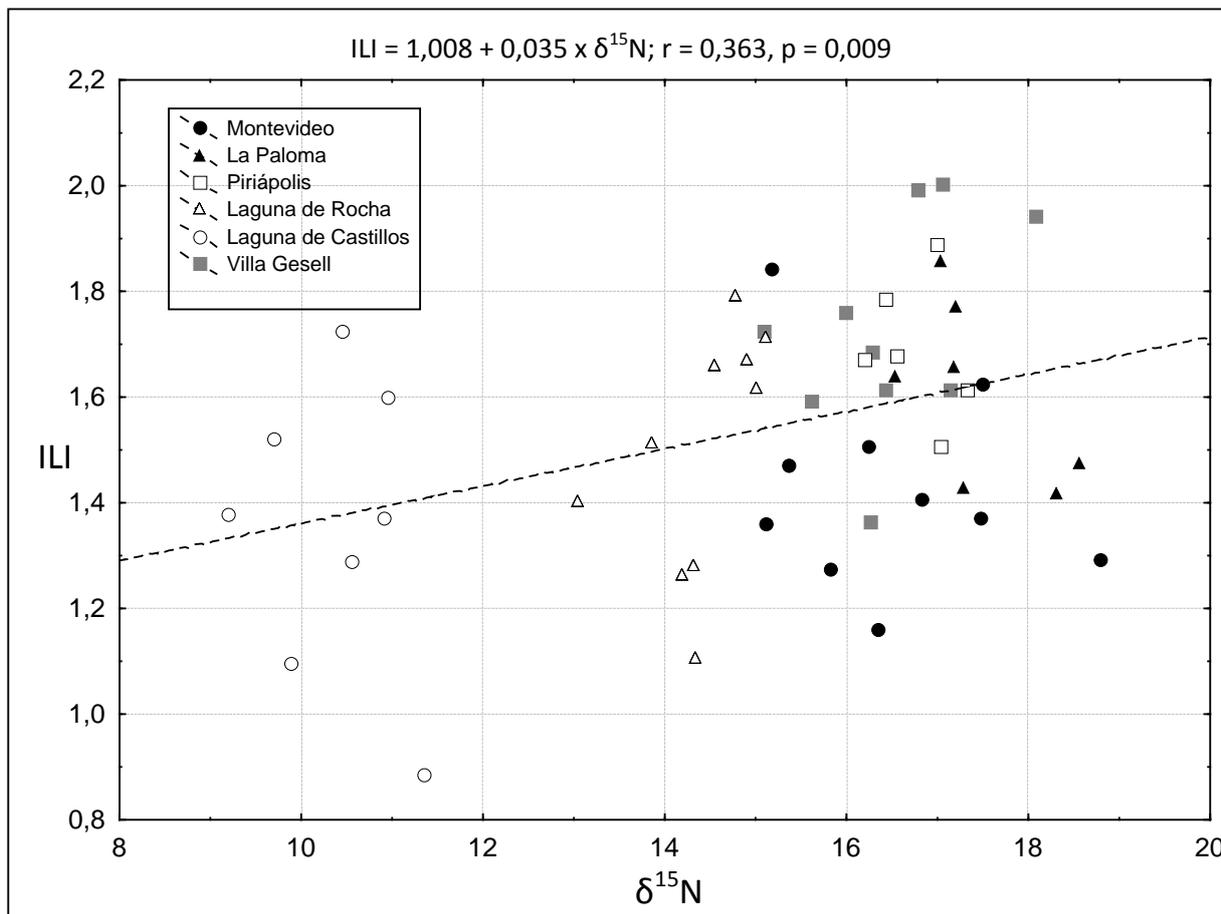


Figura 9. Correlación entre el largo intestinal, expresado como ILI (ver texto) y la posición trófica, expresada como $\delta^{15}\text{N}$. Se presenta además la ecuación de regresión, el coeficiente de ajuste y su valor de significancia estadística.

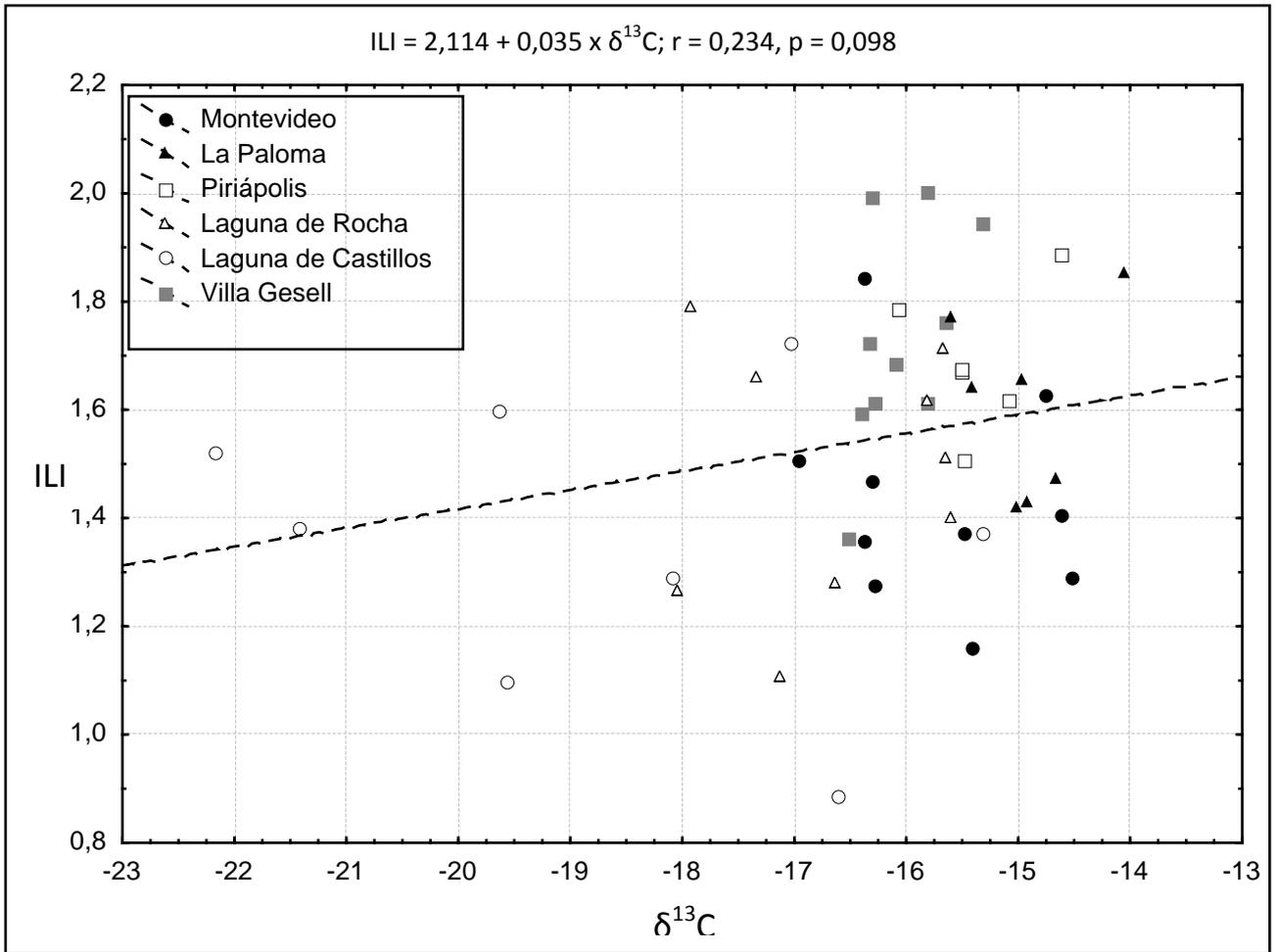


Figura 10. Correlación entre el largo intestinal, expresado como ILI (ver texto) y los valores de $\delta^{13}C$. Se presenta además la ecuación de regresión, el coeficiente de ajuste y su valor de significancia estadística.

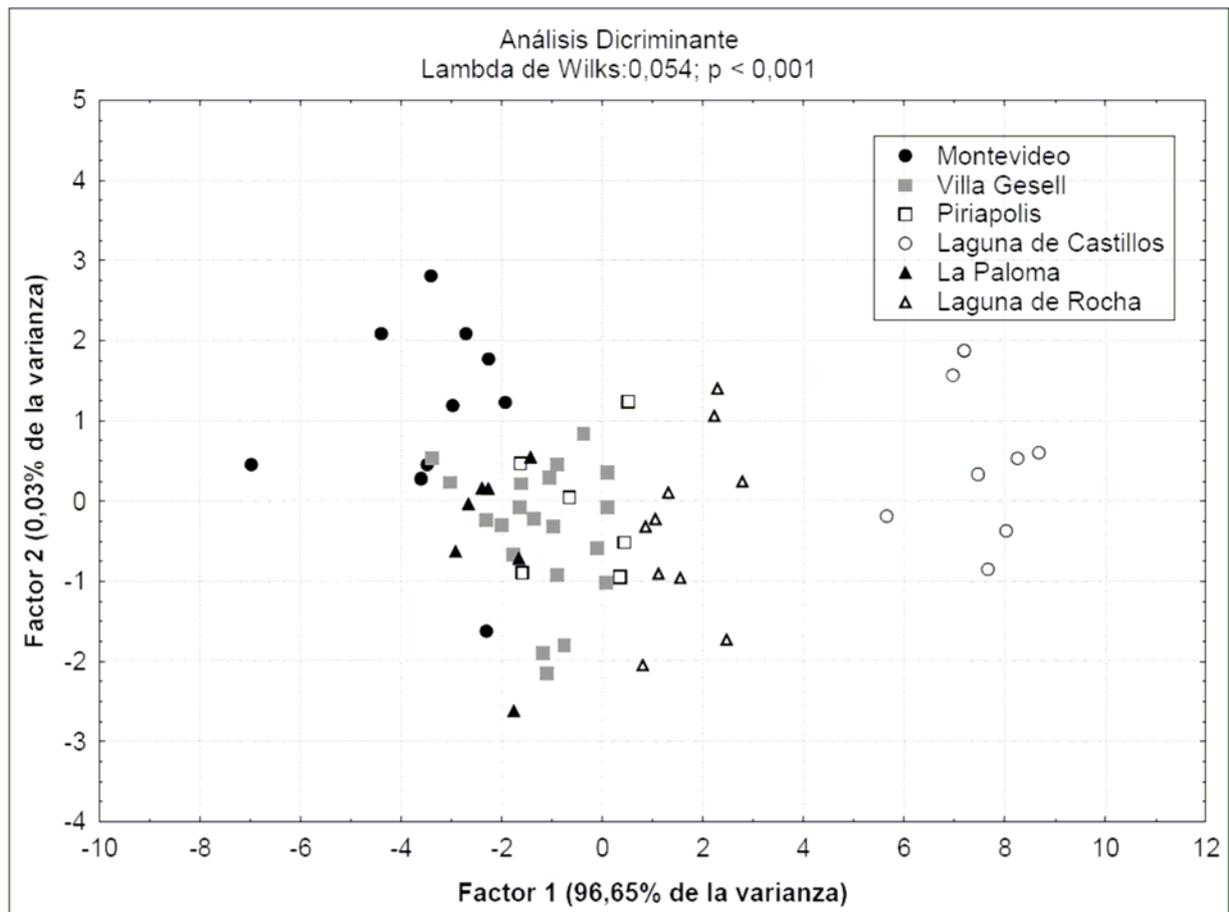


Figura 11. Diagrama de dispersión de los dos primeros Factores del AD realizado sobre la matriz derivada del análisis de algunos rasgos del aparato digestivo en *M. furnieri* (ver texto). Se presenta también el valor del lambda de Wilks' y su significancia estadística.

Tabla III. Porcentaje de individuos correctamente asignados en la matriz de clasificación del AD y distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones, inferidos partir de de la matriz de isótopos estables y C:N. Las distancias que fueron estadísticamente significativas luego de ser aplicada la corrección de Bonferroni se muestran en negrita ($p < 0,05$)

	% de individuos correctamente clasificados	Distancias al cuadrado de Mahalanobis entre pares de poblaciones				
		Laguna de Rocha	La Paloma	Montevideo	Laguna de Castillos	Piriápolis
Laguna de Rocha	90,000	-				
La Paloma	42,857	14,234	-			
Montevideo	50,000	6,866	1,401	-		
Laguna de Castillos	100,000	27,848	81,187	61,510	-	
Piriápolis	<0,001	9,133	0,641	0,192	67,743	-
Villa Gesell	50,000	7,681	1,518	0,177	62,695	0,248

Tabla IV. Valor de la significancia estadística de las pruebas post hoc de Tukey HSD, realizadas entre las estimaciones isotópicas de línea de base entre las diferentes localidades y épocas del año. Las comparaciones considerando $\delta^{13}\text{C}$ se presentan por encima de la diagonal y por debajo las comparaciones efectuadas utilizando $\delta^{15}\text{N}$. En negrita se resaltan los valores estadísticamente significativos para $p < 0,05$

Localidad y época de muestreo	1	2	3	4
1) Piriápolis - Noviembre 2009	-	0,290	0,013	< 0,001
2) Piriápolis - Marzo 2010	0,690	-	0,357	< 0,001
3) Montevideo - Noviembre 2009	0,202	0,026	-	0,013
4) Montevideo - Marzo 2010	0,491	0,986	0,013	-

Tabla V. Valores descriptivos de los rasgos del aparato digestivo analizados en *M. furnieri*. Valores referentes a las masas y a los largos son proporcionados en g y cm, respectivamente. (N= número de individuos analizados por localidad, Media= media aritmética, D. S. = desvío estándar. Ver el texto por el significado de los acrónimos).

Variable	Localidades muestreadas																	
	Laguna de Rocha			La Paloma			Montevideo			Laguna de Castillos			Piriápolis			Villa Gesell		
	N	Media	D. S.	N	Media	D. S.	N	Media	D. S.	N	Media	D. S.	N	Media	D. S.	N	Media	D. S.
LS	10	32,339	6,210	7	44,760	3,956	10	46,700	2,946	8	22,438	2,040	6	39,083	1,845	20	41,735	5,429
LEST	10	6,540	1,227	7	8,571	2,524	10	8,350	1,842	8	2,888	0,747	6	6,567	1,469	20	7,375	2,599
LI	10	42,490	5,737	7	66,429	12,604	10	58,900	13,974	8	22,938	5,919	6	62,833	9,827	20	56,378	22,702
PC	10	9,400	0,966	7	8,429	1,134	10	8,800	0,919	8	9,250	0,707	6	8,833	0,753	20	8,900	1,071
SW	10	3,823	2,927	7	8,086	4,577	10	6,390	3,828	8	0,850	0,462	6	4,446	1,283	20	6,710	4,126
IW	10	10,732	9,106	7	24,729	5,407	10	29,698	11,590	8	2,638	1,171	6	14,002	3,332	20	20,397	10,886
LW	10	7,917	4,790	7	15,400	7,126	10	26,377	7,994	8	1,898	0,777	6	12,253	3,069	20	18,832	18,812
EWB	10	603,860	362,934	7	1370,086	199,987	10	1577,480	308,499	8	148,025	56,159	6	938,450	130,487	20	1094,095	404,661

Tabla VI. Porcentaje de individuos correctamente asignados en la matriz de clasificación del AD y distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones, inferidos partir de de la matriz de algunos de los rasgos del aparato digestivo. Las distancias que fueron estadísticamente significativas, luego de ser aplicada la corrección de Bonferroni, se muestran en negrita ($p < 0,05$). *El bajo porcentaje de clasificación correcta para los individuos de La Paloma y Piriápolis se debe a que la mayoría de las corvinas rubias de estas localidades fueron reclasificadas por este análisis como pertenecientes a la localidad de Villa Gesell (datos no mostrados).

	% de individuos correctamente clasificados	Distancias al cuadrado de Mahalanobis entre pares de poblaciones				
		Laguna de Rocha	La Paloma	Montevideo	Laguna de Castillos	Piriápolis
Laguna de Rocha	100					
La Paloma	14,286*	15,201				
Montevideo	80,000	27,622	4,143			
Laguna de Castillos	100	35,029	93,876	119,177		
Piriápolis	16,667*	4,407	3,936	10,346	63,516	
Villa Gesell	90,000	8,366	1,093	6,855	76,461	0,904

Capítulo 4.- Efectos ambientales y de la historia de vida sobre la estructura genética de *M. furnieri*

Introducción

A pesar de la gran capacidad de dispersión que presenta *M. furnieri* y de las escasas barreras geográficas existentes entre los ambientes que habitan, el efecto del flujo génico en la estructuración de sus poblaciones depende de su interrelación con la mutación, la deriva genética y la selección natural. La estructura geográfica de las poblaciones de una especie puede estar afectada por diversos factores ecológicos y por lo tanto el potencial de dispersión de los individuos no siempre predice la cantidad de intercambio genético entre sus poblaciones (Avice 1998). Conocer cómo estos factores ecológicos afectan la dinámica poblacional, ya sea en la actualidad o históricamente, es importante para poder desentrañar el rol relativo de los diferentes mecanismos evolutivos actuando sobre las poblaciones naturales. A pesar de algunos trabajos recientes (e.g. Bekkevold et al. 2005, Gaggiotti et al. 2008, Jørgensen et al. 2008), para la mayoría de las especies marinas, incluyendo los peces, se desconoce de manera general cuales son los mecanismos que afectan su estructura poblacional (Jørgensen et al. 2005). En este sentido, surge la genética del paisaje (Manel et al. 2003) como un área de estudio que intenta explicar la estructura poblacional de una especie combinando aspectos de la ecología del paisaje. La meta principal de esta rama de la biología evolutiva es describir y explicar cómo los atributos del paisaje afectan los niveles de variación genética tanto en plantas como en animales (Balkenhol et al. 2009). Tales atributos pueden ser divididos primariamente en factores

cuantitativos (e.g. temperatura, humedad) y cualitativos (e.g. barreras geográficas); los paisajes marinos se caracterizan por factores cuantitativos como la salinidad y la temperatura y por factores cualitativos tales como los representados por las corrientes y otros atributos oceanográficos (Jørgensen et al. 2005). Las investigaciones en el área de la genética del paisaje involucran como un primer paso describir los patrones de variación genética y posteriormente relacionar estadísticamente dicho patrón con variables ambientales (Manel et al. 2003, Balkenhol et al. 2009). La identificación de caracteres bajo efecto de la selección natural es evidentemente el primer paso a tomar antes de separar el efecto de la selección de otros procesos demográficos, para luego tratar de estimar la importancia relativa de los factores ambientales y de la historia de vida en la estructura de las poblaciones (Gaggiotti et al. 2009).

En este capítulo se procuró detectar posibles loci bajo el efecto de la selección natural e identificar factores potencialmente involucrados en la estructura genética encontrada. Se evaluaron específicamente los papeles relativos de la selección natural, la deriva genética y también el efecto del marco impuesto por algunos factores cuantitativos del paisaje marino sobre la estructura poblacional de *M. furnieri*. Se analizó, en forma complementaria a los análisis presentados en los capítulos anteriores, el papel de la cohesión fenotípica y de algunos aspectos relacionados a la historia de vida sobre la estructura genética de las poblaciones de corvina rubia.

Materiales y métodos

Variables ambientales, fenotípicas y de historia de vida analizadas

Parámetros fisicoquímicos

A partir de los datos presentados en Guerrero et al. (2010) se obtuvieron estimaciones puntuales de los valores promedio de salinidad y temperatura de fondo para el período de tiempo comprendido entre los años 1911 y 2003 para las localidades de Montevideo, San Luis, La Paloma y Villa Gesell durante el período cálido (noviembre - marzo) bajo condiciones de caudal normal del Río de la Plata (Tabla VII). No se consideró la profundidad como parámetro, dada la escasa variabilidad que presenta esta medida entre las diferentes localidades analizadas. La elección de tomar las estimaciones durante el período cálido radica en el hecho de que tal período concuerda con la temporada reproductiva de *M. furnieri* en estas localidades. Para las variables consideradas, se calculó el valor absoluto de la diferencia promedio de cada una de las localidades respecto a todas las restantes, transformándolas de esta manera en una medida de conectividad (Gaggiotti et al. 2009). Dado que las lagunas costeras no constituyen ecosistemas directamente comparables al estuario del Río de la Plata y su frente oceánico en cuanto a parámetros físico-químicos, no se consideraron estos parámetros para la Laguna de Rocha y para la Laguna de Castillos (ver más adelante).

Distancias geográficas

La misma matriz de distancias lineales geográficas aproximadas entre pares de poblaciones, empleada en los capítulos anteriores, fue utilizada nuevamente en esta ocasión, para evaluar el efecto del grado de conectividad geográfica sobre la matriz de

flujo genético. Para cada localidad, se calculó el promedio de las distancias entre todas las comparaciones posibles con el resto de las localidades analizadas.

Cohesión fenotípica

El grado de cohesión fenotípica de los individuos provenientes de las diferentes localidades de muestreo se estimó mediante las distancias morfológicas de Mahalanobis obtenidas en el Capítulo 2 a partir de los análisis de morfometría geométrica. Estas distancias fueron transformadas de la misma manera que las distancias geográficas. No se emplearon las distancias de Mahalanobis obtenidas a partir del análisis del digestivo de manera de simplificar el modelo (ver más adelante) y a que solo consideran el análisis de unos pocos rasgos.

Historia de vida

Dado que los perfiles isotópicos y de C:N reflejan la dieta de *M. furnieri* por localidad, se emplearon las distancias isotópicas y de C:N de Mahalanobis obtenidas en el Capítulo 3 como “proxy” de las posibles preferencias alimenticias que pudiesen estar influenciando la estructura genética de esta especie. Nuevamente, se empleó la misma transformación que en los dos casos anteriormente descritos.

Métodos estadísticos empleados

Microsatélites analizados y escaneo genómico en busca de posibles loci candidatos a estar bajo la influencia de la selección natural

Los análisis se realizaron sobre la misma matriz de datos de once microsatélites, derivada de D'Anatro et al. (2011) más los cuatro loci reportados en el Capítulo 2. Esta matriz de microsatélites fue analizada en busca de loci candidatos a estar bajo la acción de la selección natural. La lógica subyacente en la mayoría de los métodos propuestos para realizar este tipo de análisis se basa en que los loci bajo selección direccional deberían presentar valores más altos de F_{ST} , mientras que los loci candidatos a estar bajo el efecto de la selección purificadora deberían de resultar en estimaciones menores de F_{ST} que los loci neutrales. Por ejemplo, Beaumont & Nichols (1996) proponen obtener la distribución de F_{ST} entre loci como una función de la heterocigocidad entre poblaciones realizando simulaciones mediante un modelo de islas infinitas y luego identificando a los loci fuera de rango ("outlier loci") como aquellos que se encuentra en la colas de la distribución (revisado en Excoffier et al. 2009). Por otra parte, métodos Bayesianos más recientes (Beaumont & Balding 2004, Foll & Gaggiotti 2008) para detectar los loci fuera de rango, asumen que las frecuencias alélicas siguen una distribución de Dirichlet, considerando que los F_{ST} son una función de componentes población-específicos compartidos entre todos los loci, y de componentes loci-específicos compartidos entre todas las poblaciones. En estos métodos bayesianos se considera que un locus se aparta de la neutralidad cuando el componente locus-específico es suficiente para explicar el patrón de diferenciación (revisado en Excoffier et al. 2009). Excoffier et al. (2009) plantean que métodos basados en modelos de islas infinitas (o finitas), o en la distribución de Dirichlet,

podrían no ser apropiados para detectar loci bajo selección si los modelos poblacionales con más complejos que lo asumido; i.e. diferentes muestras son tomadas de la misma población, algunas de las muestras comparten un ancestro en común más reciente entre sí que con las demás, algunas de las poblaciones contribuyen al pool de migrantes de manera diferencial o si existe una estructura poblacional jerárquica (véase también Hermisson 2009).

Por las razones anteriormente planteadas, y porque además permite utilizar modelos que tienen en cuenta el patrón mutacional, se utilizó el método de Excoffier et al. (2009) implementado en el programa Arlequin v. 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005). Éste es una modificación del propuesto por Beaumont y Nichols (1996) que permite el empleo de un modelo poblacional jerárquico explícito (Slatkin & Voelm 1991), en el cual las muestras referentes a cada población son asignadas a diferentes grupos definidos a priori y que permite diferentes tasas de migración entre demes dentro del mismo grupo y entre grupos, teniendo en cuenta de esta manera la posibilidad de escenarios de diferenciación más complejos que el proporcionado. Para obtener los intervalos de confianza, se realizaron 2×10^5 simulaciones, considerando seis grupos diferentes y simulando 100 demes dentro de cada uno. Se empleó un modelo mutacional de a pasos (SMM, Otha & Kimura 1973, Michalakis & Excoffier 1996) para calcular los valores de F_{ST} .

Correlación entre las variables ambientales, fenotípicas y de historia de vida

El efecto de estas variables sobre la estructura genética de *M. furnieri* fue analizado mediante el método bayesiano jerárquico implementado en el programa GESTE v 2.0 (Foll & Gaggiotti 2006). Este método estima valores individuales de F_{ST} para cada población empleando el método propuesto por Balding & Nichols (1995) y luego los relaciona con las variables ambientales consideradas mediante modelos lineales generalizados. Este método calcula la probabilidad a posteriori de cada modelo empleando MCMC de salto reversible (“reversible jump MCMC”) y permite no solo estimar el relacionamiento de cada variable sobre la estructura genética, sino también evaluar la correlación de la combinación e interacción de las variables sobre la matriz de flujo genético (Foll & Gaggiotti 2006). Las condiciones de corrida para todos los análisis realizados con GESTE fueron las siguientes: 10 corridas piloto de 2×10^3 iteraciones para obtener los parámetros de la distribución propuesta, además de un periodo adicional de “burn-in” compuesto por 5×10^5 iteraciones, seguidos de ciclos de 2×10^4 iteraciones para la realización de las estimaciones (“sample size”) con un intervalo de 50 iteraciones entre cada muestreo (“thinning interval”). La combinación de n factores y su interacción lleva a obtener 2^n modelos de regresión alternativas y el método implementado en GESTE asigna probabilidades a posteriori para cada uno de ellos; el modelo con el mayor valor de probabilidad es uno de los que mejor explica la estructura de los datos (Gaggiotti et al. 2009). El efecto específico que cada factor tiene sobre la estructura genética de las poblaciones es inferido a partir de las estimaciones de los coeficientes de regresión del modelo con el mayor valor de probabilidad a posteriori (Foll & Gaggiotti 2006, Gaggiotti et al. 2009). Cuando se consideran muchas variables a la vez, por más que GESTE asigne el mayor valor de probabilidad al modelo que mejor explica los datos, un porcentaje menor de la

probabilidad es siempre asignado a los demás modelos, aunque éstos no expliquen el patrón de diferenciación genética encontrado de manera completa (Gaggiotti et al. 2009). Por esta razón se simplificó el número de variables empleadas en general en cuanto a su calidad y grado de información y se empleó la estrategia de estudio que se detalla a continuación. Por un lado, se analizó el efecto de la cohesión fenotípica, historia de vida y la distancia geográfica entre pares de poblaciones para el grupo entero de datos genéticos. Por otro lado, se analizó el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la estructura genética de las localidades muestreadas a lo largo del Río de la Plata y el Océano Atlántico, excluyendo en este caso a los individuos de las lagunas costeras.

Basándose en los resultados obtenidos con Arlequin en busca de loci candidatos a estar bajo el efecto de la selección natural, se realizó la siguiente estrategia de análisis en GESTE: 1) análisis para cada uno de los escenarios descritos antes, empleando solo los loci neutrales y 2) análisis empleando la matriz de loci neutrales más uno de los loci candidatos a estar bajo el efecto de la selección. Si los resultados de GESTE indican el efecto significativo de una variable sobre la estructura genética incluyendo el locus candidato a estar bajo selección, y este efecto desaparece cuando solo se analizan los loci neutrales, se considera la posibilidad que el loci en cuestión este fuera del rango esperado para uno neutral posiblemente debido a la influencia de la variable considerada. Por otro lado, si la correlación entre la variable y la estructura genética no depende de la inclusión o exclusión del locus fuera de rango, se podría asumir que la variable tiene un efecto a un nivel genómico más amplio, y por lo tanto, no es una variable selectiva. Sin embargo, esta metodología no excluye que la selección esté

actuando sobre el locus fuera de rango identificado en Arlequin, debido a, por ejemplo, un factor no considerado en el análisis. Una estrategia general de trabajo similar a la planteada en este capítulo fue empleada en Gaggiotti et al. (2009).

Resultados

Escaneo genómico en busca de loci bajo selección

Los resultados obtenidos con Arlequin siguiendo el método de Excoffier et al. (2009) sugieren que los loci Soc049, Soc085, Soc429 y Soc443 están por fuera del rango esperado por neutralidad (Tabla VIII). Como este método suele resultar en falsos positivos, se consideró un nivel de significancia estadística de $p < 0,01$ (e.g. Foll & Gaggiotti 2008). Soc049 y Soc085 mostraron valores de F_{ST} más altos de lo esperado – lo que representa una posible evidencia de selección direccional – y que Soc429 y Soc443 presentaron valores de F_{ST} menores a lo esperado por divergencia debido solamente a procesos de deriva genética, lo cual puede indicar el efecto de selección estabilizadora. Cabe mencionar que en el caso de Soc049 el valor de F_{ST} no difiere substancialmente del valor promedio, aunque es altamente significativo (Tabla VIII). Finalmente, aunque esta metodología es ampliamente utilizada para detectar loci bajo el efecto de la selección natural, es importante resaltar que otros factores diferentes a procesos selectivos guiados por diferencias ambientales pueden producir tal escenario. Por ejemplo, mutaciones neutrales que surgen en la onda expansiva de una población en expansión pueden emular el efecto de la selección al aumentar la frecuencia de una variante neutral en la población colonizada (“gene surfing”) o también

incompatibilidades pre- o post-cigóticas intrínsecas entre grupos de genes, independientes del ambiente, pueden reducir el nivel de flujo genético entre poblaciones (véase Bierne et al. 2011 por una explicación detallada).

Correlación entre la estructura genética y la conectividad geográfica, la cohesión fenotípica y la historia de vida en M. furnieri

En la Tabla IX se presentan los valores de probabilidad a obtenidos al analizar el efecto de la conectividad geográfica, la cohesión fenotípica y la historia de vida en la estructura genética de *M. furnieri*. No existió una correlación significativa entre ninguna de las variables empleadas y la estructura genética encontrada de *M. furnieri*, siendo siempre el modelo nulo la mejor explicación para el comportamiento de los datos. Estos resultados no variaron al considerarse solo los loci neutrales según el análisis implementado en Arlequín o en cambio la matriz de loci neutrales más uno de los loci fuera de rango según el análisis antes mencionado (Tabla IX). Sin embargo, los segundos mejores modelos en varios de los análisis presentan valores de probabilidad a posteriori muy similares al modelo con el mejor ajuste, que mayormente implican a las variables que involucran aspectos de la cohesión fenotípica (G2), de historia de vida (G3) y en menor medida el grado de conectividad geográfica entre poblaciones (G1). Teniendo en cuenta esto, la inclusión de los loci fuera de rango, tanto con valores por arriba o por debajo de lo esperado por deriva, modifica levemente los resultados (Tabla IX). El caso más patente lo conforma el análisis realizado sobre la matriz de loci neutrales mas Soc429, en donde el segundo modelo más probable solo difiere en 0,001 (constante, G3) respecto al modelo más probable (modelo nulo). Los valores de

σ^2 representan la cantidad de variación no explicada por la regresión (Foll & Gaggiotti 2006). Estos valores son bajos entre todos los modelos ensayados y además no varían sustancialmente con la inclusión de alguno de los loci fuera de rango (Tabla IX); esto puede interpretarse también como una medida de la influencia de un locus sobre el ajuste de los datos y por tanto ninguno de los loci posiblemente bajo selección alteran el ajuste de los datos cuando son considerados. Dado que los resultados no mostraron evidencia clara en ninguno de los casos de correlación entre alguno de los factores analizados y la estructura genética, no se ensayaron escenarios más complejos con interacción de variables, como en la siguiente sección.

Correlación entre la estructura genética y las variables ambientales para los individuos oceánicos y del Río de la Plata

El análisis realizado con GESTE evidenció correlación entre las variables salinidad (H1) y temperatura de fondo (H2) y la estructura genética de las poblaciones de corvina rubia sin considerar a las lagunas costeras (Tabla X). El modelo que mejor explicó la estructura poblacional es aquel que involucra no solo el efecto de la salinidad y la temperatura en la estructura genética, sino también la interacción entre ambas variables. Nuevamente, los resultados fueron consistentes entre los análisis que consideran solo los loci neutrales o los realizados con la matriz de microsatélites neutrales más alguno de los evidenciados por fuera del rango esperado por deriva (Tabla X). Para este caso también los segundos modelos más probables presentaron valores de probabilidad a posteriori muy cercanos al modelo de mayor ajuste (aunque ahora la diferencia es levemente más notoria); en todas las combinaciones posibles de

la matriz de alelos nulos más uno de los loci fuera de rango el modelo nulo fue siempre el segundo más probable (Tabla X). Una vez más, los valores de σ^2 son bajos y similares en todos los modelos empleados y no se ven alterados en forma notoria cuando se incluye a alguno de los loci fuera de rango (Tabla X). Estos resultados también reflejan el hecho de que en este caso solo se analizan cuatro localidades, lo cual dificulta que el modelo tenga un buen ajuste estadístico aún si existe un buen grado de correlación entre las variables ambientales y la estructura genética de las poblaciones.

Teniendo en cuenta lo anterior, puede evaluarse el efecto específico de cada factor sobre la estructura genética a partir de los coeficientes de regresión (α) del modelo con mejor ajuste (Tabla X). Para los resultados usando solamente los loci neutrales, los valores modales de α para las regresiones con H1 y H2 son negativos, lo que indica que a medida que aumenta la diferenciación genética entre localidades disminuyen la diferencia en salinidad y temperatura entre localidades, aunque se debería de tener en cuenta que el valor de α para H1 es muy cercano a cero. Al agregar Soc049, el valor de α para H1 se torna positivo y de una mayor magnitud, indicando en este caso que a medida que aumenta la salinidad entre localidades también aumenta la diferenciación genética; el valor de α para H2 también se mantiene negativo en este caso, lo cual es congruente con el hecho de que localidades que presentan valores significativos de diferenciación genética no difieren en su temperatura promedio (Tabla VII). Este resultado es acorde con lo sugerido por el análisis empleando el método de Excoffier et al. (2009) que propone que Soc049 puede estar bajo la influencia de la selección direccional. Para el caso de Soc085, también posiblemente bajo el efecto de la selección divergente, los valores de α para H1 y H2 no difieren sustancialmente de los

obtenidos con la matriz de loci neutrales más algunos de los loci bajo selección estabilizadora, aunque son relativamente menores en magnitud (Tabla X). Esto puede deberse a que, a pesar del valor de F_{ST} que presenta este locus, quedó por fuera del rango esperado por deriva solo con probabilidad marginal (Tabla VII).

La inclusión a la matriz de microsatélites neutrales de cualquiera de los demás loci por fuera del rango esperado por deriva (todos posiblemente bajo selección estabilizadora) produce valores de α positivos en todos los casos, pero de una menor magnitud, lo cual también es congruente con la hipótesis de que estén bajo el efecto de la selección estabilizadora. Con la excepción de la matriz de loci neutrales más Soc443, los valores de α para H2 siempre fueron mayores que los de α para H1, lo cual es también acorde con el hecho de que las localidades analizadas son bastante homogéneas en cuanto a sus valores de temperatura promedio (Tabla VII). El inesperado comportamiento de Soc443 podría deberse a un factor no evaluado completamente en este estudio, como podría ser el efecto de una tasa de mutación diferente a los demás loci evaluados (véase un caso similar en Gaggiotti et al. 2009)

Los valores de α para la interacción H1xH2 en todos los modelos ensayados son siempre negativos y de una mayor magnitud que los coeficientes de correlación para las variables por separado (Tabla X), lo que indica que la salinidad manifiesta su efecto por sobre todo en localidades de baja temperatura (o viceversa), lo que es coherente con los valores presentados en la Tabla VII.

Por último y en forma general, todos los resultados obtenidos en esta sección deben ser interpretados con precaución debido a que los valores de probabilidad a posteriori son similares entre varios de los posibles modelos, incluyendo el de mejor ajuste.

Discusión

En este capítulo se analizó el comportamiento de los loci de microsatélites empleados hasta el momento en los estudios genético-poblacionales y de correlación en busca de loci bajo selección, bajo la hipótesis de valores esperados por deriva genética bajo un modelo poblacional jerárquico y un modelo mutacional de tipo SMM, implementado en el programa Arlequin (Excoffier et al. 2005). A partir de los resultados obtenidos de esta manera, se analizó el efecto de algunos factores ambientales, fenotípicos y de historia de vida sobre la estructura genética, mediante un enfoque bayesiano efectuado con el programa GESTE (Foll & Gaggiotti 2006). El primero de los análisis realizados sugiere que algunos de los loci se encuentran bajo el efecto de la selección, tanto direccional como estabilizadora, lo cual concuerda con los resultados morfológicos obtenidos en el Capítulo 2 empleando el método de análisis de los patrones de varianza y covarianza fenotípica dentro y entre poblaciones propuesto por Ackermann y Cheverud (2002). Los análisis implementados en GESTE sugieren que factores ambientales como la salinidad y en menor grado la temperatura tienen un papel relativamente importante en la estructura genética de las poblaciones de corvina rubia. En esta sección se discuten estos resultados en relación a los obtenidos en los capítulos anteriores y al conocimiento biológico de de la especie.

Correlación entre la estructura genética y la conectividad geográfica, la cohesión fenotípica y la historia de vida en M. furnieri

Los resultados obtenidos son consistentes con los mostrados por lo análisis con ProTest, que no sugieren correlación entre la diferenciación genética y la morfológica o entre las distancias geográficas y las genéticas (Capítulo 2). Por otro lado, el análisis efectuado con ProTest, sugiere una correlación significativa entre los valores de F_{ST} de Weir y las distancias isotópicas entre poblaciones, lo que no concuerda con los resultados obtenidos con GESTE al evaluar el mismo grupo de datos. La diferencia entre los dos resultados puede ser debida a que la aproximación empleada por GESTE usa la matriz entera de frecuencia alélica de microsatélites (mayor cantidad de información), mientras que el análisis con ProTest fue realizado en base a distancias genéticas entre pares de poblaciones, entre otras diferencias que presentan ambas metodologías. Por ejemplo, al menos considerando el test de Mantel, de naturaleza similar a ProTest, se considera que este es más proclive a cometer error de tipo-1 que los análisis multivariados no lineales como GESTE, aunque este último presente tal vez menos poder estadístico (Balkenholl et al. 2009, Cushman & Landguth 2010). Por otra parte, si se consideran los segundos modelos más probables de la Tabla IX, varios de ellos involucran a la transformación de las distancias isotópicas como explicativa de la estructura geográfica encontrada, los que puede representar un grado de convergencia entre las aproximaciones efectuadas con ProTest y GESTE. Evaluar cuál factor o combinación de ellos, es responsable de la diferencia entre los resultados de ambos análisis, va más allá de los objetivos de este trabajo, pero estas diferencias ilustran el hecho de la necesidad de realizar aproximaciones complementarias cuando

se trata de analizar el efecto de variables ambientales o de otra índole sobre la estructura genética de las poblaciones naturales.

Correlación entre la estructura genética y variables ambientales en las poblaciones de corvina rubia del Río de la Plata y su frente oceánico

Los resultados obtenidos con el análisis bayesiano implementado en GESTE muestran un cierto grado de correlación entre la estructura genética de las poblaciones del Río de la Plata y su frente oceánico con la salinidad y temperatura de fondo de estas localidades. Estos resultados son evidentes analizando cualquier combinación de loci (Tabla X), pero son más patentes con la inclusión de Soc049, sobre todo para el efecto de la salinidad. Este locus parece estar bajo el efecto de la selección direccional, ya sea directamente o por ligamiento a otro gen directamente seleccionado (“hitchhiking effect”), lo que no puede saberse debido a que se desconoce la ubicación en el genoma de Soc049.

Jaureguizar et al. (2008 y referencias allí mencionadas) muestran una correlación entre las variables ambientales y las diferentes clases de edad de *M. furnieri*, en la cual los individuos juveniles o grávidos se encuentran en la zona interna del Río de la Plata (aguas con menor salinidad, mayor temperatura y menor profundidad) y los especímenes en reposo reproductivo en la zona externa del estuario (aguas con mayor salinidad, menor temperatura y mayores profundidades), lo cual plantea la hipótesis de que estos organismos se reproducen dentro del estuario. Los resultados obtenidos hasta el momento (Capítulo 2, D’Anatro et al. 2011) plantean que los mayores niveles

de divergencia genética, y en menor medida morfológica, se dan entre individuos del Río de la Plata y su frente oceánico, ambientes entre los cuales existe una marcada diferencia de salinidad y temperatura. Si bien el grupo de loci neutrales presenta el mismo patrón – lo cual indicaría la acción de un mecanismo no adaptativo para explicar la divergencia – no sería difícil considerar la hipótesis de que la adaptación a distintos niveles de salinidad estén tomando parte en la diferenciación entre poblaciones y de ahí el comportamiento fuera de rango de Soc049. La temperatura también explica parte de esta diferenciación, pero dado que las estimaciones puntuales empleadas para los análisis con GESTE no presentan un patrón tan estructurado como la salinidad entre el Río de la Plata y su frente oceánico (al menos en este grupo de datos) los resultados no son tan fácilmente interpretables. Tal vez el hecho de que localidades con mayor grado de diferenciación genética como Montevideo y La Paloma presenten valores similares de temperatura promedio (Tabla VII), puede explicar el fenómeno de la correlación positiva entre esta variable y la estructura genética, lo cual ya fue mencionado anteriormente. Respuestas adaptativas a diferentes zonas de desove y cría con diferencias en sus valores de salinidad fueron también sugeridas para el arenque atlántico (*Clupea harengus* Linnaeus 1758, Bekkevold et al. 2005, Gaggiotti et al. 2009), lo cual parece indicar que la salinidad puede ser un factor selectivo importante cuando hay fidelidad de sitio en la reproducción.

Finalmente, los resultados obtenidos mediante las metodologías empleadas en este capítulo deben de ser tomados como hipótesis dentro del marco de trabajo de trabajos experimentales empíricos (sensu Gaggiotti et al. 2009). En este sentido,

trabajos como el de Boutet et al. (2006) que estudian la respuesta adaptativa en la expresión de genes directamente relacionados con la regulación osmótica, parece ser el camino a seguir. Por otro lado aumentar el número de microsatélites con el fin de hallar mas loci candidatos a estar bajo el efecto, directo o indirecto, de la selección natural, puede ayudar a resolver de una manera más detallada la estructura poblacional de *M. furnieri*, principalmente para el caso de las corvinas rubias de la Laguna de Rocha.

Tabla VII. Valores promedio de salinidad y temperatura de fondo para las cuatro localidades analizadas en el Río de la Plata y su frente oceánico, estimados durante el período comprendido entre los años 1911-2003. Entre paréntesis se presenta el desvío estándar. Tomado de Guerrero et al. (2010).

	Salinidad de fondo	Temperatura de fondo (°C)
La Paloma	31,46 ($\pm 1,33$)	18,30 ($\pm 3,50$)
Montevideo	19,65 ($\pm 0,09$)	18,90 ($\pm 0,60$)
San Luis	27,13 ($\pm 7,14$)	20,40 ($\pm 3,00$)
Villa Gesell	32,51 ($\pm 0,86$)	16,40 ($\pm 2,90$)

Tabla VIII. Valores de F_{ST} por locus y sus valores de probabilidad asociados obtenidos con el método de Excoffier et al. (2009) implementado en el programa Arlequin. En negrita se presentan los loci fueran del rango esperado por deriva, considerando $p < 0,01$.

Locus	F_{ST}	valor de p
Soc201	0,1367	0,25280
Soc252	0,0770	0,43382
Soc204	0,1312	0,27380
Soc243	0,2190	0,06030
Soc049	0,1440	0,00019
Soc050	0,0376	0,16907
Soc085	0,3296	0,01026
Soc428	0,0700	0,37794
Soc429	0,0003	0,00071
Soc442	0,0324	0,03489
Soc443	0,0098	0,00003

Tabla IX. Valores de probabilidad a posteriori obtenidos al analizar el efecto de la conectividad geográfica (G1), la cohesión fenotípica (G2) y la historia de vida (G3) y algunas de sus posibles interacciones sobre la estructura genética de todas las poblaciones de *M. furnieri* detalladas en la Fig. 1. Se presentan también los parámetros de la regresión para el modelo con mayor ajuste (HPDI: intervalo a posteriori de alta densidad).

Modelo analizado	Probabilidad a posteriori	Parámetros de la regresión para el modelo con el mejor ajuste		
Loci neutrales		Moda	95% HPDI	Factor
constante (nulo)	0,136	α : -0,721	(-7,74 ; 4,65)	constante
G1	0,126	σ^2 1,47 x 10 ³	(545,0 ; 5,27 x 10 ³)	
G2	0,127			
G2, G1	0,118			
G3	0,129			
G3, G1	0,121			
G3, G2	0,130			
G3, G2, G1	0,113			
Loci neutrales + Soc049		Moda	95% HPDI	Factor
constante (nulo)	0,137	α : -1,84	(-7,50 ; 4,98)	constante
G1	0,126	σ^2 1,48 x 10 ³	(522,0 ; 5,22 x 10 ³)	
G2	0,127			
G2, G1	0,117			
G3	0,130			
G3, G1	0,124			
G3, G2	0,123			
G3, G2, G1	0,117			
Loci neutrales + Soc085		Moda	95% HPDI	Factor
constante (nulo)	0,136	α : -1,89	(-7,77 ; 4,87)	constante
G1	0,125	σ^2 1,55 x 10 ³	(576,0 ; 5,09 x 10 ³)	
G2	0,130			
G2, G1	0,123			
G3	0,128			
G3, G1	0,123			
G3, G2	0,121			
G3, G2, G1	0,114			
Loci neutrales + Soc429		Moda	95% HPDI	Factor
constante (nulo)	0,134	α : -2,02	(-8,12 ; 4,46)	constante
G1	0,131	σ^2 1,51 x 10 ³	(542,0 ; 5,26 x 10 ³)	
G2	0,124			
G2, G1	0,123			
G3	0,133			
G3, G1	0,128			
G3, G2	0,112			
G3, G2, G1	0,115			
Loci neutrales + Soc443		Moda	95% HPDI	Factor
constante (nulo)	0,137	α : -1,68	(-7,94 ; 4,40)	constante
G1	0,125	σ^2 1,50 x 10 ³	(539,0 ; 5,37 x 10 ³)	
G2	0,125			
G2, G1	0,125			
G3	0,128			
G3, G1	0,123			
G3, G2	0,118			
G3, G2, G1	0,118			

Tabla X. Valores de probabilidad a posteriori obtenidos al analizar el efecto de la salinidad (H1) y la temperatura (H2) y sus posibles interacciones sobre la estructura genética de las poblaciones de *M. furnieri* del Río de la Plata y su frente oceánico. Se presentan también los parámetros de la regresión para el modelo con mayor ajuste (HPDI: intervalo a posteriori de alta densidad).

Modelo analizado	Probabilidad a posteriori	Parámetros de la regresión para el modelo con el mejor ajuste		
Loci neutrales		moda	95% HPDI	factor
constante (nulo)	0,202	α_0 : -1,150	(-7,70 ; 4,88)	constante
H1	0,195	α_1 : -0,078	(-5,88 ; 6,07)	H1
H2	0,196	α_2 : -0,680	(-6,36 ; 5,93)	H2
H2, H1	0,192	α_3 : -1,4	(-7,21 ; 4,81)	H1xH2
H1xH2, H2, H1	0,215	σ^2 1,30 x 10 ³	(331,0 ; 5,53 x 10 ³)	
Loci neutrales + Soc049		moda	95% HPDI	
constante (nulo)	0,206	α_0 : -1,510	(-7,31 ; 5,17)	constante
H1	0,194	α_1 : 0,618	(-6,22 ; 5,84)	H1
H2	0,197	α_2 : -0,371	(-5,84 ; 6,23)	H2
H2, H1	0,189	α_3 : -1,580	(-7,16 ; 4,92)	H1xH2
H1xH2, H2, H1	0,214	σ^2 1,22 x 10 ³	(379,0 ; 5,66 x 10 ³)	
Loci neutrales + Soc085		moda	95% HPDI	
constante (nulo)	0,195	α_0 : -1,41	(-7,59 ; 4,83)	constante
H1	0,201	α_1 : 0,125	(-5,81 ; 6,10)	H1
H2	0,195	α_2 : 0,172	(-5,85 ; 6,31)	H2
H2, H1	0,191	α_3 : -1,150	(-7,38 ; 5,03)	H1xH2
H1xH2, H2, H1	0,218	σ^2 1,49 x 10 ³	(341,0 ; 5,43 x 10 ³)	
Loci neutrales + Soc429		moda	95% HPDI	
constante (nulo)	0,206	α_0 : -0,868	(-7,53 ; 4,65)	constante
H1	0,198	α_1 : 0,203	(-5,72 ; 6,18)	H1
H2	0,195	α_2 : 0,224	(-5,99 ; 6,07)	H2
H2, H1	0,187	α_3 : -1,740	(-7,47 ; 5,24)	H1xH2
H1xH2, H2, H1	0,215	σ^2 1,40 x 10 ³	(331,0 ; 5,69 x 10 ³)	
Loci neutrales + Soc443		moda	95% HPDI	
constante (nulo)	0,203	α_0 : -0,482	(-7,17 ; 5,31)	constante
H1	0,195	α_1 : 0,443	(-5,65 ; 6,28)	H1
H2	0,194	α_2 : 0,250	(-6,01 ; 6,01)	H2
H2, H1	0,188	α_3 : -1,040	(-7,05 ; 5,13)	H1xH2
H1xH2, H2, H1	0,220	σ^2 1,32 x 10 ³	(401,0 ; 5,54 x 10 ³)	

Capítulo 5.- Discusión general y conclusiones

En este estudio se caracterizó la estructura poblacional en *M. furnieri* a lo largo del Río de la Plata y su frente oceánico, mediante el empleo de microsatélites, morfometría geométrica, isótopos estables de carbono y nitrógeno y análisis de atributos del sistema digestivo. El patrón de diferenciación poblacional depende muchas veces del marcador utilizado, pero generalmente los individuos de las localidades de Montevideo y Laguna de Rocha se diferencian respecto a los demás analizados. Se analizaron los roles relativos de la deriva y la selección natural sobre la estructura poblacional encontrada mediante análisis del fenotipo en el Capítulo 2, así como también se evaluó si la diferenciación poblacional hallada se correlacionaba con un uso diferencial de recursos mediante el análisis de isótopos estables y de atributos del aparato digestivo en el Capítulo 3. Por último, en el Capítulo 4 se realizaron análisis complementarios para indagar el grado de correlación entre el patrón de diferenciación sugerido por los diferentes marcadores empleados para analizar la estructura poblacional, así como también el efecto de algunos factores ambientales sobre la estructura de las poblaciones de corvina rubia del Río de la Plata y su frente oceánico. También en ese capítulo se analizó el papel de la deriva y de la selección natural en la estructura genética poblacional.

Los principales resultados sugieren que los individuos del Río de la Plata y los de Laguna de Rocha presentan una mayor identidad poblacional, tanto en los estudios genéticos como morfológicos. Los análisis de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C:N junto al examen de algunos rasgos del aparato digestivo plantean que, al menos para los individuos de la

Laguna de Rocha, las diferencias genéticas y morfológicas mencionadas en el párrafo anterior están acompañadas por un uso diferencial de recursos tróficos. Considerando a los individuos oceánicos y del estuario del Río de la Plata, la diferenciación poblacional entre ambas aéreas está correlacionada de manera moderada con factores ambientales como la salinidad y temperatura; esta correlación depende también en cierta medida de si los loci considerados en los análisis son estrictamente neutrales o son candidatos a estar bajo un régimen selectivo. Todas las fuentes de evidencia estudiadas en general apoyan la idea de que posiblemente fuerzas selectivas están actuando sobre la divergencia poblacional de *M. furnieri*. De esta manera, los resultados obtenidos sustentan en forma general las predicciones de la hipótesis de trabajo planteada en el Capítulo 1.

Considerando principalmente los análisis genéticos y morfológicos, el patrón de diferenciación poblacional encontrado es acorde a otros estudios que también sugieren grados significativos de diferenciación poblacional en especies de peces marinos ampliamente distribuidos y con grandes tamaños poblacionales efectivos (e.g. Bekkevold et al. 2005; Olsen et al. 2008, André et al. 2011). Estos resultados no se ajustan al punto de vista clásico de que los grandes tamaños poblacionales de los peces marinos junto al alto flujo genético entre las poblaciones limitan la adaptación a condiciones locales y por tanto no favorecen los procesos de especiación, formando de esa manera parte del acúmulo de evidencia empírica que resulta en un cambio de paradigma en la visión tradicional en pesquerías (véase Hauser & Carvalho 2008 por un revisión sobre el tema).

Por otro lado, existe una importante cantidad de estudios que apuntan hacia la pesca comercial como una fuerza selectiva que favorecería algunos rasgos de la historia de vida de los organismos, produciendo cambios evolutivos en especies de peces con grandes tamaños poblacionales y grandes potenciales de dispersión en breves lapsos de tiempo (ver Capítulo 1). *Micropogonias furnieri* presenta un importante grado de estructuración poblacional dentro de una zona geográfica reducida, – considerando la gran área de distribución que ocupa a lo largo de Océano Atlántico – que involucra a la vez cambios genéticos y fenotípicos de una importante magnitud al compararse a casos similares en otros sciénidos (véase D’Anatro et al. 2011). Este fenómeno parece ser el resultado de procesos de divergencia por efecto de la deriva genética y la selección natural, lo que refuerza la importancia de evaluar el papel relativo de cada una de estas fuerzas durante los procesos de diferenciación poblacional y reafirma el cambio de paradigma en la visión de las pesquerías planteado en Hauser y Carvalho (2008).

Implicancias de estos resultados en las políticas de manejo de M. furnieri

Una unidad evolutiva significativa (ESU) puede ser definida de manera amplia como una población o grupo de ellas, que merece prioridades de conservación dada su alta identidad (Allendorf 2007). Dependiendo del criterio seleccionado (e.g. Waples 1991; Moritz 1994, 2002) y la escala considerada, el mismo sistema puede ser clasificado como una ESU o como una unidad de manejo (MU) o “stock”, práctica común en pesquerías. *Micropogonias furnieri* del Río de la Plata presenta variación en la frecuencia de varios loci de microsatélites, pero no es monofilética recíproca respecto

a las poblaciones del Atlántico según haplotipos del ADNm (Pereira et al. 2009). Por estas razones en este trabajo se propone considerar a las corvinas rubias del Río de La Plata como una MU diferente de las del frente oceánico. Para el caso de las corvinas de la Laguna de Rocha, aunque el grado de diferenciación genética es algo menor según los microsatélites y no se dispone de información acerca del grado de variabilidad en su ADNm, podría aplicarse el mismo razonamiento y considerarlas una unidad de manejo dado que aunada a la variación en los loci de microsatélites antes mencionada presenta un fenotipo diferente de las demás poblaciones analizadas. Estas consideraciones son especialmente relevantes dado que *M. furnieri* es uno de los recursos ícticos de mayor importancia en el Río de la Plata y su frente oceánico (DINARA 2003). Por ejemplo, análisis demográficos evaluando el grado de explotación de este recurso en aguas uruguayas han llegado a diferentes conclusiones dependiendo si consideraban solo un stock (Arena & Rey 2003) o dos (Vasconcellos & Haimovici 2006). Los datos genéticos y morfológicos parecen apoyar el segundo escenario, pero evidentemente el patrón poblacional es complejo y merece estudios adicionales. La inclusión de 'tendencias evolutivas' dentro de los planes y modelos de manejo de las poblaciones de corvina rubia (Ernande et al., 2003; Stenseth & Rouyer, 2008) también podría ser un factor importante a tener en cuenta para lograr una explotación sostenible del recurso.

En resumen, el Río de la Plata y su frente oceánico con las lagunas costeras asociadas han ofrecido un escenario para la diferenciación poblacional de *M. furnieri*, así como potencialmente para otras especies (e.g. Beheregaray & Sunnucks 2001). La adaptación a condiciones locales parece haber jugado un papel importante en la

diferenciación poblacional, pero respuestas plásticas a las presiones ambientales también pueden estar formando parte del proceso. Son necesarios estudios adicionales aumentando el rango geográfico del análisis así como incluyendo más escalas temporales para dilucidar en forma más detallada la estructura poblacional de esta especie. El análisis de los presuntos genes involucrados en los procesos de especiación ha sido una de las principales metas de los estudios en biología evolutiva (Nosil & Schluter 2011), lo cual es ahora más viable de llevar a cabo gracias a los avances tecnológicos recientes (e.g. Bouck & Vision 2007). En este sentido, estudios enfocados específicamente sobre la base genética de las posibles diferencias adaptativas encontradas (e.g. Boutet et al. 2006) parecen ser también ineludibles para comprender la transición entre las unidades y oceánicas estuarinas.

Bibliografía

Acha, E., Mianzán, H., Lasta C. & Guerrero, R. (1999). Estuarine spawning of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae), in the Río de La Plata, Argentina. *Marine Fresh Res* 50, 7-65.

Ackermann, R. & Cheverud, J. (2002). Discerning evolutionary processes in patterns of tamarin (genus *Saguinus*) craniofacial variation. *Am J Phys Anthropol* 117, 260–271.

Acuña, A., Verocai, J. & Marquéz, J. (1992). Aspectos biológicos de *Micropogonias furnieri* (Desmarest 1823) durante dos zafras en una pesquería artesanal al oeste de Montevideo. *Rev de Biol Mar* 27, 113-132.

Allendorf, F. (2007). Units of conservation. En: Conservation and the genetics of populations. Allendorf, F. & Luikart, G. (Eds.). Wiley-Blackwell.

Alvárez, R. & Pomares, O. (1997). Aspectos biológicos del roncadador *Micropogonias furnieri* en el golfo de Venezuela. *Zoot Trop* 15, 191-208.

Andrade-tubino, M., Fiore-Correia, L. & Vianna, M. 2009. Morphometrics and length structure of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) in Guanabara bay, state of Río de Janeiro, Brazil. *B Inst Pesca, São Paulo*, 35: 239 – 246.

André, C., Larsson, L., Laikre, L., Bekkevold, D., Brigham, J., Carvalho, G., Dahlgren, T., Hutchinson, W., Mariani, S., Mudde, K., Ruzzante, D. & Ryman, N. (2011). Detecting population structure in a high gene-flow species, Atlantic herring (*Clupea harengus*): direct, simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. *Heredity* 106, 270–280.

Arena, G. & Rey, M. (2003). Captura máxima sostenible de la Corvina (*Micropogonias furnieri*) explotada en el Río de la Plata y la zona común de pesca (período 1986-2002). Informe Técnico, DINARA.

Avise, J. (1998). Conservation Genetics in the marine realm. *J Hered* 89, 377-382.

Balding, D. & Nichols, R. (1995). A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica* 96, 3–12.

Balkenhol, N., Waits, L. & Dezzani, R. (2009). Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* 32, 818–830.

Beaumont, M. & Balding, D. (2004). Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol Ecol* 13, 969–980.

Beaumont, M. & Nichols, R. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc R Soc Lond B* 263, 1619–1626.

Beheregaray, L. & Levy, J. (2000). Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae), evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. *Copeia* 2000, 441-447.

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

Beheregaray, L., Sunnucks, P. & Briscoe, D. (2002). A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil, the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc R Soc B* 269, 65-73.

Bekkevold, D., Andre, C., Dahlgren, T., Clausen, L., Torstensen, E., Mosegaard, H., Carvalho, G., Christensen, T., Norlinder, E. & Ruzzante, D. (2005). Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *Evolution* 59, 2656–2668.

Berois, N., Bolatto, C., Brauer, M. & Barros, C. (2004). Gametogenesis, histological gonadal cycle and in vitro fertilization in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823). *J App Ichth* 20, 169-175.

Bierne, N., Welch, J., Loire, E., Bonhomme, F. & David, P. (2011). The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology* 20, 2044–2072.

Bonnet, E. & Van de Peer, Y. (2001). zt: A Software Tool for Simple and Partial Mantel Tests. *J Stat Soft* 7, 1-12.

Bonferroni, C. E. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilit. *Publi del R Istit Sup Sci Econ Commerc Firenz* 8, 3–62.

Bookstein, F.L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press.

Botto, F., Gaitán, E., Mianzan, H., Acha, M., Giberto, D., Schiariti, A. & Iribarne, O. (2011). Origin of resources and trophic pathways in a large SW Atlantic estuary: An evaluation using stable isotopes. *Est Coast and Shelf Sci* 92, 70-77.

Bouck, A. & Vision, T. (2007). The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol Ecol* 16, 907-924.

Boutet I., Long K, C., Bonhomme, F. (2006). A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene* 379, 40-50.

Bracco, R., Inda, H., del Puerto, L., Castiñeira, C., Sprechmann, P. & García-Rodríguez, F. (2005). Relationships between Holocene sea-level variations, trophic development, and climatic change in Negra Lagoon, Southern Uruguay. *J of Paleolimnology* 33: 253–263.

Browman, H. (2000). 'Evolution' of fisheries science. *Mar Ecol Prog Ser*, Theme Section. 208, 299-313.

Castello, J. (1986). Distribución, crecimiento y maduración sexual de la corvina juvenil (*Micropogonias furnieri*) en el estuario de la "Lagoa dos Patos", Brasil. *Physis* 44, 21-36.

Castellano, S. & Balletto, E. (2002). Is the partial Mantel test inadequate? *Evolution* 56, 1871-1873.

Cavallotto, J. (2002). Evolución holocena de la llanura costera del margen sur del Río de la Plata. *Rev de la Asoc Geol Arg* 57, 376-388.

Cavallotto, J. (2003). Late Cenozoic sea level highstands in the coastal plain of the la Plata river. *GI2S Coast, Research Publication* 4, 57-59.

Cavallotto, J., Violante, R. & Parker, G. (2004). Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata River (Argentina). *Quat Inter* 114, 155-165.

Chapuis, M. & Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol Biol and Evol* 24, 621-631.

Cheverud, J. (1988). A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution* 42, 958-968.

Cotrina, C. (1986). Estudios biológicos sobre peces costeros con datos de dos campañas de investigación realizadas en 1981. II. La corvina rubia (*Micropogonias furnieri*). *Publ Com Téc Mix Fr Mar* 1, 8-14.

Ciancio, J., Pascual, M., Botto, F., Frere, E. & Iribarne, O. (2008). Trophic relationships of exotic anadromous salmonids in the southern Patagonian Shelf as inferred from stable isotopes. *Limnol Oceanogr* 53, 788-798.

Crawford, N. (2010). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Mol Ecol Res* 10, 556-557.

Cushman, S. & Landguth, E. (2010). Spurious correlations and inference in landscape genetics *Mol Ecol* 19, 3592–3602.

D'Anatro, A. & Lessa, E. (2006). Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae). *Mamm Biol* 71, 288-298.

D'Anatro, A., Pereira, A. & Lessa, E. (2011). Genetic structure of the white croaker, *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) along Uruguayan coasts: contrasting marine, estuarine, and lacustrine populations. *Env Biol Fish* 91:407-420.

del Puerto, L., García-Rodríguez, F., Inda, H., Bracco, R., Castiñeira, C. & Adams, J. B. (2006). Paleolimnological evidence of Holocene climatic changes in Lake Blanca, southern Uruguay. *J of Paleolimnology* 36:151–163.

DeNiro, M. & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42, 495-506.

dos Reis, S., Pessôa, L. & Strauss, R. (1990). Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Rev Brasil Genet* 13, 509-520.

DINARA (2003). Informe sectorial pesquero 2001-2002. Montevideo: DINARA.

Ernande, B., Dieckmann, U. & Heino, M. (2003). Adaptive changes in harvested populations, plasticity and evolution of age and size at maturation. *Proc R Soc B* 271, 415 – 423.

Excoffier, L., Hofer, T. & Foll, M. (2009). Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103, 285–298.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47–50.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data, linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data, dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7, 574–578.

Farmer, A., R. Rye, G. Landis, C. Bern, C. Kester, & Ridley, I. (2003). Tracing the pathways of Neotropical migratory shorebirds using stable isotopes: a pilot study. *Isot Environ Health Stud* 39, 169–177.

Figuroa, D. & Díaz de Astarloa J. (1991). Análisis de los caracteres morfométricos y merísticos de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) entre los 33°S y 40°S (Pisces, Sciaenidae). *Atlántica* 13, 8-14.

Foll, M. & Gaggiotti, O. (2006). Identifying the Environmental Factors That Determine the Genetic Structure of Populations. *Genetics* 174, 875–891.

Foll, M. & Gaggiotti, O. (2008). A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 180, 977–993.

Gaggiotti, O., Bekkevold, D., Jørgensen, H., Foll, M., Andre, C., Ruzzante, D. & Carvalho, G. (2009). Disentangling the effects of evolutionary, demographic and environmental

factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case of study. *Evolution* 63, 2939–2951.

Galli, O. (2001). Estudio comparado de los caracteres morfométricos y merísticos de la corvina (*Micropogonias furnieri*) en aguas uruguayas. En: El Río de La Plata. Investigación para la gestión de su ambiente, los recursos pesqueros y la pesquería en el frente salino. Vizziano, D., Puig, P., Mesones, C. & Nagy, G. (Eds.). ECOPLATA.

García-Rodríguez, F., Del Puerto, L., Castiñeira, C., Inda, H., Bracco, R., Sprechmann, P. & Scharf, B. (2001). Preliminary paleolimnological study of Rocha Lagoon, SE Uruguay. *Limnologica* 31, 221-228.

García-Rodríguez, F., Castiñeira, C., Scharf, B. & Sprechmann, P. (2002). The relationship between trophic states and sea level variation in the Rocha Lagoon, Uruguay. *Neues Jb Geol Paläontol Monatsh* 1, 27-47.

García-Rodríguez, F., Metzeltin, P., Sprechmann, R., Trettin, R., Stams, G. & Beltrán – Morales, L. (2004). Upper Pleistocene and Holocene paleosalinity and trophic state changes in relation to sea level variation in Rocha Lagoon, southern Uruguay. *J Paleolimn* 32, 117–135.

Gold, J. & Richardson L. (1994). Genetic distinctness of red drum (*Sciaenops ocellatus*) from Mosquito Lagoon, east-central Florida. *Fish Bull* 92, 58-66.

Grey, J., Thackeray, S., Jones, R. & Shine, A. (2002). Ferox trout (*Salmo trutta*) as 'Russian dolls': complementary gut content and stable isotope analyses of the Loch Ness foodweb. *Freshwat Biol* 47, 1235–1243.

Grahl-Nielsen, O. & Mjaavatten, O. (1992). Discrimination of Striped Bass Stocks: A New Method Based on Chemometry of the Fatty Acid Profile in Heart. *Tissue Trans Am Fish Soc* 121, 307-314.

Guerrero, R., Piola, A., Molinari, G., Osiroff, A. & Jáuregui, S. (2010). Climatología de temperatura y salinidad del Río de La Plata y su Frente Marítimo. Argentina-Uruguay. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP 95p.

Haimovici, M. & Gatto, R. (1996). Variaciones estacionales en la estructura poblacional del efectivo pesquero de corvina blanca *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) en el extremo sur de Brasil. *Atlântica* 18, 179-203.

Haimovici, M., Pereira, S. & Vieira, P. (1989). La pesca demersal en el sur de Brasil en período 1975-1985. *Fr Mar*, 5(A): 151-163.

Hammer, Ø., Harper, D. & Ryan, P. (2001). PAST, Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeo Electr* 4, 9 pp.

Harmon, L. & Gibson, R. (2006). Multivariate phenotypic evolution among island and mainland populations of the ornate day gecko, *Phelsuma ornata*. *Evolution* 60, 2622–2632.

Harrod, C., Grey, J., McCarthy, T. & Morrissey, M. (2005). Stable isotope analyses provide new insights into ecological plasticity in a mixohaline population of European eel. *Oecologia* 144, 673–683.

Hauser, L. & Carvalho, G. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9, 333-362.

Hermisson, J. (2009). Who believes in whole-genome scans for selection? *Heredity* 103, 283–284.

Hobson, K. (1999). Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120, 314-326.

Hobson, K. & Clark, R. (1993). Turnover of ^{13}C in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *Auk* 110, 638-641.

Hauser, L. & Carvalho, G. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9, 333–362.

Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resources* 9, 1322–1332

Hutchings, J. (2004). The cod that got away. *Nature* 428, 499-500.

Isaac, V. (1988). Synopsis of biological data on the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). In: *FAO Fisheries Synopsis*. 35p. FAO.

Jackson, D. (1995). PROTEST, A PROcrustean randomization TEST of community environment concordance. *Ecoscience* 2, 297-303.

Jaureguizar, J., Militelli, M. & Guerrero, R. (2008). Distribution of *Micropogonias furnieri* at different maturity stages along an estuarine gradient and in relation to environmental factors. *J Mar Biol Assoc UK* 88, 175–181.

Joensen, H. & Grahl-Nielsen, O.(2001). Discrimination among species and stocks of redfish (*Sebastes viviparus*, *S. marinus*, *S. viviparus*), cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*) by chemometry of the fatty acid profile in selected tissues. *CM* 2001/J:22. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/2001/J/J2201.pdf>.

Johnson, D. & Funicelli, N. (1991). Spawning of red drum in Mosquito Lagoon, east central Florida. *Estuaries* 14, 74–79.

Jørgensen, H., Hansen, M., Bekkevold, D., Ruzzante, D. & Loeschcke, V. (2005). Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol Ecol* 14, 3219–3234.

Jørgensen, H., Pertoldi, C., Hansen, M., Ruzzante, D. & Loeschcke, V. (2008). Genetic and environmental correlates of morphological variation in a marine fish: the case of BalticSea herring (*Clupea harengus*). *Can J Fish Aquat Sci* 65, 389–400.

Jost, L. (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17, 4015-4026.

Karasow, W. 1990. Digestion in birds: chemical and physiological determinants and ecological implications. *Stud Avian Biol* 13, 391-415.

Kramer, D. & Bryant, M. (1995) Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet – the long and short of a convoluted tissue. *Env Biol Fish* 42, 129–141.

Lande, R. (1979). Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain, body size allometry. *Evolution* 33, 402–416.

Langerhans, R., Layman, C., Langerhans, A. & Dewitt, T. (2003). Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biol J Linn Soc* 80, 689– 698.

Lofsvold, D. (1988). Quantitative genetics of morphological differentiation in *Peromyscus*. II. Analysis of selection and drift. *Evolution* 42, 54-67.

Levy, J., Maggioni, M. & Conceição, M. (1998). Close genetic similarity among populations of the white croaker *Micropogonias furnieri* in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies. *Fish Res* 39, 87–94.

López de León, E. (1984). Introducción a la citología e histología de ovario de *Micropogonias furnieri*. Tesis de Licenciatura en Oceanografía Biológica. Facultad de Humanidades y Ciencias, U. de la R., Uruguay.

Lott, C., Meehan, T. & Heath, J. (2003). Estimating the latitudinal origins of migratory birds using hydrogen and sulfur stable isotopes in feathers: influence of marine prey base. *Oecologia* 134, 505–510.

Lowther, A. & Goldsworthy, S. Detecting alternate foraging ecotypes in Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) colonies using stable isotope analysis. *Mar Mamm Sci*, en prensa, DOI: 10.1111/j.1748-7692.2010.00425.x

Macchi, G., Eduardo, M., Acha, E. & Militelli & M. (2003). Seasonal egg production of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Fish Bull* 101, 332-342.

Maggioni, R., Pereira, A., Jerez, B., Marins, L., Conceição, M. & Levy, J. (1994). Estudio preliminar de la estructura genética de la corvina *Micropogonias furnieri* entre Rio Grande (Brasil) y el Rincón (Argentina). *Fr Mar* 15, 127–131.

Manel, S., Schwartz, M., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TREE* 18, 189-197.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Canc Res* 27, 209–220.

Marroig, G. & Cheverud, J. (2004). Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of neotropical monkeys? *Am Nat* 163, 417-428.

Martin, L. & Suguio, K. (1992). Variation of coastal dynamics during the last 7000 years recorded in beachridge plains associated with river mouths: Example from the Central Brazilian Coast. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 99, 119–140.

Mendoza-Carranza, M. & Vieira, J. (2008). Whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) feeding strategies across four southern Brazilian estuaries. *Aquat Ecol* 42, 83-93.

Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142, 1061–1064.

Monteiro, L. & dos Reis, S. (2000). *Principios de Morfometria Geometrica*. Holos.

Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *TREE* 9, 373–375.

Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst Biol* 51, 238–254.

Norbis, W. & Verocai, J. (2005). Presence of two whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri* Pisces: Sciaenidae) groups in the Río de La Plata spawning coastal area as consequence of reproductive migration. *Fish Res* 74, 131-141.

Nosil, P. & Schluter, D. (2011). The genes underlying the process of speciation. *TREE* 26, 160-167.

O’Malley, K., Abbey, C., Ross, K. & Gold, J. (2003). Microsatellite DNA markers for kinship analysis and genetic mapping in red drum, *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae, Teleostei). *Mol Ecol Notes* 3, 155-158.

Olsen, E., Heino, M., Lilly, G., Morgan, M., Brattey, J., Ernande, B. & Dieckmann, U. (2004). Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature* 428, 932–935.

Olsen, E., Knutsen, H., Gjøvsæter, J., Jorde, P., Knutsen, J., Stenseth, N. (2008). Small-scale biocomplexity in coastal Atlantic cod supporting a Darwinian perspective on fisheries management. *Evol App* 1, 524–533.

Olsson, J., Quevedo, M., Colson, C. & Svanbäck, R. (2007). Gut length plasticity in perch: into the bowels of resource polymorphisms. *Biol J Linn Soc* 90, 517–523.

Ohta, T. & Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genome Res* 22, 201–204.

Penchaszadeh, P., Arrighetti, F., Cledón, M., Livore, J., Botto, F. & Iribarne, O. (2005). Bivalve contribution to shallow sandy bottom food web off Mar del Plata (Argentina): Inference from stomach content and stable isotopes analysis. *J Shellfish Res* 25, 51-54.

Pereira, A. (1990). Estudio de la variación genética en la corvina blanca *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) del Río de la Plata y su frente oceánico. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Uruguay.

Pereira, A., Márquez, A., Marin, M. & Marin, Y. (2009). Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *J Fish Biol* 75, 321-331.

Peres-Neto, P. & Jackson, D. (2001). How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* 129, 169–178.

Post, D. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83,703–718.

Pritchard, J., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus data. *Genetics* 155, 945–959.

Puchnik-Legat, A. & Levy, J. (2006). Genetic structure of Brazilian populations of white mouth croakers *Micropogonias furnieri* (Perciformes, Sciaenidae). *Braz Arch Biol Technol* 49, 429–439.

Puig, P. (1986). Análisis de contenidos estomacales de corvina blanca (*Micropogon opercularis*) (Sciaenidae, Perciformes). *Verano 1984. Publ Com Tec Mix Fr Marit* 1, 333–340.

Ratner, S. & Lande, R. (2001). Demographic and evolutionary responses to selective harvesting in populations with discrete generations. *Ecology* 82, 3093-3104.

Raufaste, N. & Rousset, F. (2001). Are partial Mantel tests adequate? *Evolution* 55, 1703–1705.

Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Conde, D., Sellanes, J. & Urrutia, R. (2008). Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Mar Ecol Progr Ser* 362, 69-83.

Rohlf, F. J. (2000). On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix* 11, 8–24.

Rooker, J., Secor, D., Vincent, , Zdanowicz, V. & Itoh, T. (2001). Discrimination of northern bluefin tuna from nursery areas in the Pacific Ocean using otolith chemistry *Mar Ecol Prog Ser* 218, 275–282.

Rooker, J., Secor, D., Zdanowicz, V., De Metrio, G. & Orsi Relini, A. (2003). Identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) stocks from putative nurseries using otolith chemistry. *Fish Oceanogr* 12, 1–10.

Rooker, J., Secor, D., Zdanowicz, V. & Itoh, T. (2001). Discrimination of northern bluefin tuna from nursery areas in the Pacific Ocean using otolith chemistry. *Mar Ecol Prog Ser* 218, 275–282.

Ross, S. (1988). Age, growth and mortality of the atlantic croaker in north Carolina, with comments on populations dynamics. *Trans Am Fish Soc* 117, 461–473.

Rubenstein, D. & Hobson, K. (2004). From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *TREE* 19, 256-263.

Rousset, F. (2002). Partial Mantel tests, replay to Castellano and Balleto. *Evolution* 56, 1874–1875.

Santana, O. & Fabiano G. (1999). Medidas y mecanismos de administración de los recursos de las lagunas costeras del litoral atlántico del Uruguay (Lagunas José Ignacio, Garzón, de Rocha y de Castillos). En: Plan de Investigación Pesquera. Rey, M., Amestoy, F. & Arena, G. (Eds.). INAPE – PNUD URU/92/003.

Saona, G., Forni, F. Vizziano, D. & Norbis, W. (2003). Structure by size, sex and maturity stage of the white croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823; Teleostei, Sciaenidae) in the bycatch of the artisanal fishery at Rocha Lagoon, Uruguay. *Cien Mar* 29, 315-324.

Schluter, D. (1998). Ecological causes of speciation. En: *Endless forms: species and Speciation*. Howard, D. & Barlechor, S. (Eds.). Oxford University Press.

- Schluter, D. (2000). The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *TREE* 16, 372-380.
- Secor, S. (2001). Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. *Comp Bioch and Physiol Part A* 128, 565-577.
- Seyoum, S., Tringali, M., Bert, T., McElroy, D. & Stokes, R. (2000). An analysis of genetic population structure in red drum, *Sciaenops ocellatus*, based on mtDNA sequences. *Fish Bull* 98, 127-138.
- Sibly, R. (1981). Strategies of digestion and defecation. En: Townsend, C. & Calow, P. (Eds.) *Physiological Ecology: an Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell Scientific Publications.
- Slatkin, M. & Voelm, L. (1991). F_{ST} in a hierarchical island model. *Genetics* 127, 627–629.
- Smith, R., Hobson, K., Koopman, H. & Lavigne, D. (1996). Distinguishing between populations of fresh and salt water harbour seals (*Phoca vitulina*) using stable isotope analysis ratios and fatty acid profiles. *Can J Fish Aquat Sci* 53, 272-279.
- Smouse, P., Long, J. & Sokal R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Sys Zool* 35, 627–632.
- Sprechmann, P. (1978). The paleoecology and paleogeography of the Uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. *Zitteliana* 4, 3–72.
- Stenseth, N. & Rouyer, T. (2008). Destabilized fish stocks. *Nature* 452, 825–826.
- Stokes, K. & Law, R. (2000). Fishing as an evolutionary force. *Mar Ecol Progr Ser* 208, 307–309.

Stockwell, C., Hendry, A. & Kinnison M. (2003). Contemporary evolution meets conservation biology. *TREE* 18, 94-101.

Strauss, R. (1985). Static allometry and variation in body form in the South American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). *Syst Zool* 34. 381-396.

Streelman, J. & Kocher, T. (2002). Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiol Genom* 9, 1–4.

Vasconcellos, M. & Haimovici, M. (2006). Status of white croaker *Micropogonias furnieri* exploited in southern Brazil according to alternative hypothesis of stock discreteness. *Fish Res* 80, 196–202.

Vazzoler, A., (1971). Diversificação fisiológica e morfológica de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) ao sul de Cabo Frío, Brasil. *Bol do Inst Ocean* 20, 1-70.

Vazzoler, A., (1975). Distribuição da fauna de peixes demersais e ecologia dos Sciaenidae da plataforma continental brasileira, entre as latitudes 29°21'S (Torres) e 33°41'(Chui). *Bol do Inst Ocean* 24, 85-169.

Vazzoler, A. (1991). Síntese de conhecimentos sobre a biologia da corvina, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil. *Atlântica* 13, 55-74.

Vazzoler, A. (1996). Biología da reprodução de peixes teleosteos: Teoría e práctica. EDUEM.

Vizziano, D., Forni, F., Saona, G. & Norbis W. (2002). Reproduction of *Micropogonias furnieri* in a shallow temperate coastal lagoon in southern Atlantic. *J Fish Biol* 61, 196-206.

Wagner, C., McIntyre, P., Buels, K., Gilbert, D. & Michel, E. (2009). Diet predicts intestine length in Lake Tanganyika's cichlid fishes. *Funct Ecol* 23, 1122-1131.

Waples, R. (1991). Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of "species" under the endangered species. *Act Mar Fish Rev* 53, 11-22.

Wikelski, M., Spinney, L., Schelsky, W., Scheuerlein, A. & Gwinner, E. (2003). Slow pace of life in tropical sedentary birds: a common-garden experiment on four stonechat populations from different latitudes. *Proc R Soc Lond B* 270, 2383–2388.

Weir, B. (1996). *Genetic data analysis II*. Sinauer Associates: Sunderland (MA).

Willis, J., Coyne, J. & Kirkpatrick, M. (1991). Can one predict the evolution of quantitative characters without genetics? *Evolution* 45, 441-444.

Wlasiuk, G., Garza, J. & Lessa E. (2003). Genetic and geographic differentiation differentiation in the Río Negro Tuco-Tucos (*Ctenomys rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution*, 57, 913–926.

Wolf, J., Harrod, C., Brunner, S., Salazar, S., Trillmich, F. & Tautz, D (2008). Tracing early stages of species differentiation: Ecological, morphological and genetic divergence of Galápagos sea lion populations. *BMC Evolutionary Biology*, 8:150 doi:10.1186/1471-2148-8-150.

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

Wunder, M., Kester, C., Knopf, F. & Rye, R. (2005). A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin. *Oecologia* 144: 607–617.