

TRABAJO FINAL DE GRADO
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio de las bases genéticas de la forma corporal en peces del género *Xiphophorus*: una aproximación mediante morfometría geométrica

Manuel Vitola Tassino

Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Tutor:

Dr. Mateo García Olazábal

Co-tutor:

Dr. Alejandro D'Anatro

Tribunal:

Dr. Enrique Lessa

Dr. Marcelo Loureiro

Montevideo, Uruguay
Abril, 2023

Agradecimientos

A mis tutores, Mateo y Alejandro, por el tiempo dedicado, acompañamiento y apoyo en esta etapa final de carrera.

Al tribunal, Marcelo y Enrique, por sus sugerencias y correcciones.

A mi familia, por estar siempre, por el incondicional amor y constante contención. Por alentarme siempre a estudiar tanto en la etapa universitaria como en toda mi vida.

A mi madre, por ser docente, tutora, consejera y fuente de inspiración en toda mi carrera.

A mis amigos y amigas de la facultad, compañía y apoyo en todos estos años y por hacer de la carrera y la facultad espacios más que disfrutables.

A mis amigos de siempre, por estar y acompañarme en todos los demás aspectos de la vida.

A Rafa, compañera de estudio y distracciones. Por ayudarme a armar las imágenes de este trabajo, y por estar siempre y en todas.

A la Facultad de Ciencias, la Universidad de la República y sus docentes, por brindar infraestructura y conocimiento y permitir que pudiera acceder de forma gratuita a una formación de excelente nivel y culminar mi formación terciaria.

¡Gracias!

Índice

1. Introducción	4
1.1. Morfometría	6
1.2. El género <i>Xiphophorus</i>	8
1.3. Hibridación y melanoma	11
1.4. Hibridación y región de determinación sexual	13
2. Materiales y métodos	17
2.1. Descripción del sistema	17
2.2. Método morfométrico	20
2.3. Análisis estadístico	24
3. Resultados	26
3.1. Control	26
3.2. Comparación de la forma de las especies parentales	27
3.3. Comparación de los sexos dentro de cada especie parental	27
3.4. Análisis de la variación morfológica entre las tres principales cepas utilizadas: <i>X. helleri</i> , <i>X. maculatus</i> e híbridos <i>G407</i>	28
3.5. Análisis de Componentes Principales	29
3.6. Exploración de la variación de formas y visualización de patrones de formas	31
3.7. Evaluación de la correlación del oncogén <i>Xmrk</i> y la forma corporal	34
3.8. Análisis de las distancias morfológicas entre las tres principales cepas utilizadas	36
4. Discusión	37
5. Bibliografía	44

1. Introducción

Los peces exhiben una enorme variedad morfológica asociada a una amplia diversidad ecológica, estados fisiológicos y condiciones ambientales como resultado de cambios genéticos, divergencia y/o plasticidad fenotípica (Gatz, 1979; Motta et al., 1995; Eklöv & Svanbäck, 2006). Numerosos procesos biológicos pueden producir esa variedad de formas entre los individuos, como diferencias en el desarrollo ontogenético, adaptación a factores geográficos locales o diversificación evolutiva a largo plazo, e inclusive enfermedades o heridas que modifiquen partes del cuerpo (Zelditch et al., 2004). Las diferencias en la forma pueden indicar diversos roles funcionales desempeñados por las mismas partes, diferentes respuestas a las mismas presiones selectivas –o diferencias en las presiones selectivas en sí mismas–, así como diferentes procesos de crecimiento y morfogénesis (Zelditch et al., 2004). Por lo general, a medida que los peces se mueven a través de su ontogenia, hay tendencias alométricas en la forma (Hood & Heins, 2000; Svanbäck & Eklöv, 2002). Estas tendencias alométricas pueden seguir diferentes patrones, pero a menudo se muestra que se relacionan con la profundidad del cuerpo y la robustez de un individuo (Hood & Heins, 2000; Jacquemin et al., 2013). Estos cambios con la ontogenia pueden observarse con el dimorfismo sexual que, a medida que los individuos alcanzan la madurez sexual, las hembras tienden a adoptar una forma corporal más profunda en comparación con los machos (Jacquemin & Pyron, 2016). Además del tamaño corporal y el sexo, la dieta y la utilización de los recursos afectan la morfología, por lo que elementos dietéticos particulares pueden inducir cambios morfológicos dentro o entre poblaciones (Wainwright & Reilly, 1994). También, se ha informado que la temperatura ambiental, así como las condiciones hidrológicas, afecta la forma del cuerpo de los peces (Dugas, et al., 2016; Jacquemin & Pyron, 2016; Rocamontes-Morales et al., 2021). En definitiva, la morfología del cuerpo o partes del mismo en los peces es algo complejo, y está determinada por múltiples factores.

Por otra parte, la forma y el tamaño del cuerpo son dos de los factores más importantes en la estructuración del nicho ecológico y el funcionamiento de la comunidad en los peces que habitan aguas continentales (Douglas, 1987). Los enfoques ecomorfológicos asumen que la morfología limita –o por el contrario habilita– la capacidad de los organismos para llevar a cabo actividades importantes en su vida diaria (Wainwright, 1991). La variación morfológica entre individuos o entre especies puede estar relacionada causalmente con la variación en el desempeño y, en última instancia, con la variación en el uso de los recursos (Wainwright, 1994). Además, el tamaño y la forma corporal pueden influir tanto en el riesgo de depredación (Johnsson, 1993) como en la capacidad competitiva (Fausch, 1988) al

incidir en la capacidad de desplazamiento o alimentación. De esta manera la morfología condiciona los entornos que pueden utilizar los organismos (Chan, 2001). En algunos casos, pequeños cambios en la morfología o en el tamaño pueden conducir a funciones novedosas, mientras que en otros casos, los cambios en la forma pueden ocurrir sin consecuencias en el desempeño (Koehl, 1996). La aplicación del enfoque ecomorfológico a la ictiología ha proporcionado importantes aportes al estudio y la comprensión, tanto de la relación entre la forma y el rol ecológico, como de la diversidad biológica de este grupo (Motta et al., 1995).

Para comprender el impacto de los cambios en los hábitats durante el último siglo son fundamentales las relaciones entre especies y medio ambiente (Ross et al., 1985), en particular cómo la morfología de los organismos puede desempeñar un papel en el rol funcional de un individuo en un ecosistema. Estas relaciones a mayor escala entre la morfología y el medio ambiente pueden mejorar la previsibilidad y la comprensión de los atributos potenciales a nivel de ensamblaje y ecosistema (Gatz, 1979; Winston, 1995). En definitiva, la forma corporal es una característica que condiciona un amplio espectro de aspectos de la vida de un pez, por lo que el estudio de la variación morfológica en estos organismos, así como en vertebrados en general, es un abordaje que aporta a muy diversas áreas de la biología.

En general, la evolución morfológica puede implicar cambios genéticos, y algunos de estos cambios individuales tienen un gran efecto sobre el fenotipo o la aptitud de los organismos (Orr, 2005). La variación fenotípica que se observa entre poblaciones naturales puede ser reflejo de la adaptación genética a las presiones selectivas (Schluter, 2000) o respuestas plásticas a las condiciones ambientales locales (eg. Berven et al., 1979; James, 1983). La mayoría de las veces, sin embargo, probablemente refleja una combinación de influencias tanto genéticas como ambientales, que pueden interactuar en una variedad de formas complejas (Conover & Schultz, 1995). Existen varios ejemplos de trabajos que intentan correlacionar directamente el genoma de los individuos con sus caracteres fenotípicos. Por ejemplo, Peichel y colaboradores (2001) mapearon el genoma del pez espinoso de tres espinas, *Gasterosteus aculeatus*, y a partir de allí analizaron la base genética de cambios recientes en múltiples caracteres que influyen en la forma corporal de los individuos. Estos autores hallaron que las alteraciones sustanciales en la longitud de la columna vertebral, el número de placas de armadura y el número de branquiespinas están controladas por factores genéticos que se asignan a regiones cromosómicas independientes (Peichel et al., 2001). Además, los loci de rasgos cuantitativos (QTL) del espinoso de tres espinas están asociados con varias categorías fenotípicas prominentes, como la forma del cuerpo (39 %), la alimentación (36 %) y los rasgos de defensa (15 %), y son distribuidos a través de múltiples cromosomas (Peichel & Marques, 2017). Otro estudio

(Sharpe et al., 2008), realizado en el mismo modelo reveló que la variación en la forma del cuerpo del espinoso tenía un fuerte componente genético, afectada por la interacción con el entorno de cría. A su vez, Kautt y colaboradores (2020) informan que tanto la forma del cuerpo y de las mandíbulas faríngeas de cíclidos tienen bases poligénicas. A partir de un mapeo de QTL se identificaron siete loci ubicados en distintas cromosomas para la forma del cuerpo. Según los estudios citados anteriormente, se podría decir que la forma corporal es un carácter que suele ser poligénico y distribuido en varias regiones del genoma.

1.1. Morfometría

Los rasgos morfológicos y su análisis han sido durante mucho tiempo un foco de la biología evolutiva del desarrollo (Minelli, 2003; Raff, 2012), cumpliendo un rol importante en muchos tipos de estudios biológicos (Zelditch et al., 2004). Existen cada vez más estudios cuantificando la forma de organismos biológicos, logrando avances decisivos mediante estos enfoques e integrando estos análisis con métodos de biología evolutiva, genética, filogenética y biología del desarrollo (Klingenberg, 2002). Como resultado, se obtiene un conjunto robusto y flexible de herramientas analíticas que permiten ilustrar y explicar las diferencias de formas analizadas matemáticamente, así como visualizar, interpretar y comunicar los resultados obtenidos (Zelditch et al., 2004). Asimismo, los estudios cuantitativos de la forma pueden caracterizar los efectos genéticos y del desarrollo y descubrir su importancia relativa en la determinación de la forma de los organismos (Klingenberg, 2010).

La morfometría geométrica se define como el estudio de la variación y covariación de la forma (Bookstein, 1997). Esta técnica juega un rol importante en muchos tipos de estudios biológicos, tanto filogenéticos, de anatomía comparada, evolutivos, morfo-funcionales como ecológicos, entre otros tantos. En 1977, Kendall define el concepto fundamental sobre el que se basa la morfometría geométrica: "*Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, tamaño y orientación de un objeto*" (Kendall, 1977). Esta definición puede parecer algo abstracta, pero sustenta el método de morfometría geométrica en sus orígenes: analizar la forma independientemente de aquellos componentes que no definen la geometría intrínseca del objeto.

En sus inicios, la morfometría se centró en la descripción de la estructura observada: e.g. células, tejidos, organismos, estructuras (Toro Ibacache et al., 2010). Las comparaciones entre grupos se basaron en el análisis de las diferencias de sus

dimensiones lineales (e.g. largo, ancho, alto) y la forma era considerada una cualidad de la estructura, la cual podía ser descrita pero no podía ser analizada cuantitativamente (Toro Ibacache et al., 2010). Sin embargo, muchos rasgos morfológicos pueden cuantificarse eficazmente mediante mediciones únicas del tamaño de una parte (Beldade et al., 2002; Young et al., 2010). Otros rasgos son intrínsecamente más complejos y no pueden caracterizarse solamente por su tamaño. Para estos rasgos, los análisis también deben considerar información sobre la forma, en tanto la forma del objeto en estudio no se describe en términos de sus dimensiones, sino de la relación espacial entre sus partes (Klingenberg, 2010).

Desde la década del 1980, el estudio de la forma a través de la morfometría se ha convertido en una disciplina cuantitativa rigurosa (Adams et al., 2013). En este contexto, la aplicación de la estadística multivariada al estudio de la covariación de la forma dio un gran paso con el uso de datos multidimensionales para cuantificar y analizar las formas de las estructuras anatómicas, y se desarrollaron enfoques y procedimientos para capturar la geometría de las estructuras morfológicas de interés, con capacidad para retener esta información a lo largo de los análisis (Corti, 1993). El avance clave de la morfometría geométrica es la utilización de la información completa de la geometría de la estructura capturada, no solo como medidas de longitud, sino como contornos completos (Langlade et al., 2005; Klingenberg, 2016), la disposición de puntos anatómicos de referencia (o "*landmarks*") (Dryden et al., 2016) o superficies de los especímenes (McPeck et al., 2008). La morfometría geométrica basada en puntos fijos anatómicos es el método más utilizado en la actualidad (Toro Ibacache et al., 2010). En esta técnica, la forma de los individuos es representada por la posición relativa de los puntos de referencia, que son considerados homólogos entre los individuos (Bookstein, 1991). Proporciona una herramienta valiosa en el repertorio de la biología cuantitativa para el estudio de la variación de forma y la identificación de sus causas, y permite realizar interpretaciones de alto significado biológico, de las diferencias entre individuos o poblaciones (Adams et al., 2013; Toro Ibacache et al., 2010). Cada punto fijo de referencia corresponde a una coordenada cartesiana (x, y, z) que describen su posición en el "espacio de forma" (Bookstein, 1991). Los conjuntos de coordenadas corresponden a los datos primarios que luego son sometidos a análisis (Toro Ibacache et al., 2010). Los análisis posteriores no se realizan sobre los puntos fijos de referencia, sino sobre la configuración completa de los mismos, definida por una matriz de k filas (cantidad de puntos anatómicos de referencia) por m columnas (coordenadas) (Zelditch et al., 2004). A partir de esta matriz, los procedimientos geométricos y estadísticos posteriores que llevan al análisis de la forma libre del efecto del tamaño, rotación y traslación se dan en etapas sucesivas y en distintos "espacios geométricos", que permiten la obtención de los elementos que, finalmente, diferencian una forma de otra: las distancias

de Procrustes y los componentes de la forma (Klingenberg, 2016; Toro Ibacache et al., 2010).

La variación de forma es inherentemente multidimensional y en consecuencia, los análisis deben utilizar métodos multivariados que consideren simultáneamente la co-variación de todas las coordenadas de los puntos de referencia (Klingenberg & Monteiro, 2005). Hay una variedad de métodos multivariados disponibles para responder preguntas específicas derivadas de los análisis de morfometría geométrica (Dryden et al., 2016). Por ejemplo, el Análisis de Componentes Principales se puede utilizar para examinar los patrones principales de variación en los datos (Langlade et al., 2005) o el análisis de Variantes Canónicas puede proporcionar una mejor separación de los grupos conocidos (Weinberg et al., 2009). La morfometría geométrica se diferencia de otras aplicaciones de la estadística multivariante en que la mayoría de los resultados de los análisis pueden visualizarse como cambios de forma e interpretarse anatómicamente. Cada forma posible corresponde a un punto en el espacio de forma y, a la inversa, cada dirección en el espacio de forma corresponde a un cambio de forma específico, que puede mostrarse gráficamente mediante cambios relativos de puntos de referencia, deformaciones de diagramas de contorno, o modelos tridimensionales de superficie (Klingenberg & Monteiro, 2005). Las interpretaciones de los cambios de forma deben tener en cuenta que los desplazamientos de los puntos de referencia son inherentemente relativos entre sí (Klingenberg, 2010).

La morfometría geométrica como disciplina, gracias a las características de los datos primarios y la aplicación de estadística multivariada, es una poderosa herramienta para la evaluación objetiva de las variaciones de forma (Toro Ibacache et al., 2010) y presenta una amplia aplicabilidad a estudios en distintas disciplinas biológicas.

1.2. El género *Xiphophorus*

El género *Xiphophorus*, (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) comprende más de veinte especies de peces de agua dulce. La etimología *Xiphophorus* se deriva del griego y significa “portador de la daga” en referencia al gonopodio modificado en forma de daga de los machos adultos. Según diferentes estudios filogenéticos, el género está formado por tres grupos: *swordtails* del norte, *swordtails* del sur y *platyfishes* (e.g., Meyer et al., 2006; Kang et al., 2013).

Este género habita cursos de agua y estanques de la cuenca Atlántica de América Central, desde el noreste de México hasta Guatemala y Honduras (Kallman & Kazianis,

2006). Si hablamos de la distribución de las especies empleadas para este trabajo, *X. maculatus* está restringido a la planicie costera del Golfo y se extiende tierra adentro (Kallman & Kazianis, 2006). En general, *X. maculatus* es el pez más común en la planicie costera (Gordon, 1947). En su amplio rango desde Veracruz hasta Guatemala, *X. maculatus* se encuentra constantemente en las tierras bajas en pequeños arroyos y masas de agua pequeñas, estancadas, de poca corriente y vegetación sumergida a lo largo de la orilla aproximadamente hasta una altitud de 100 m, independientemente de la cubierta forestal (Kallman & Kazianis, 2006). Por otro lado, *X. hellerii*, está ampliamente distribuida desde el sureste de México hasta el noreste de Honduras, habitando cuatro de las cinco regiones hidrológicas de la vertiente del Golfo de México; habita en una amplia gama de ambientes, incluidos ríos costeros y arroyos de montaña, a una altura de hasta 1500 m (Kallman & Kazianis, 2006; Rocamontes-Morales et al., 2021). La dispersión de la especie es limitada ya que típicamente vive en pequeños charcos con movimiento de agua lento que quedan aislados durante la estación seca (Rocamontes-Morales et al., 2021).

El género *Xiphophorus* presenta una alta variedad en la forma y el tamaño del cuerpo, así como de patrones de pigmentación y adaptaciones a los distintos hábitats donde se encuentran (Kallman & Kazianis, 2006). Con respecto a la biología de estos organismos, la mayoría de las especies de *Xiphophorus* son fáciles de reproducir en el laboratorio, son vivíparos y cada hembra produce de 20 a 50 crías aproximadamente cada cuatro semanas, dependiendo de la especie y la edad de la hembra. Los alevines son relativamente grandes y la mayoría de ellos alcanzan la edad adulta (Meierjohann & Scharl, 2006). Presentan fecundación interna mediante, una estructura derivada de la aleta anal modificada de los machos, el gonopodio (Meyer et al., 1994). Presentan variación en su tamaño corporal; en las especies utilizadas para este estudio, el tamaño del cuerpo varía entre 2 a 3 cm de largo en *Xiphophorus maculatus* y hasta 8 a 10 cm en *Xiphophorus hellerii* (Meierjohann & Scharl, 2006) (Figura 1).

Xiphophorus maculatus es una especie bastante pequeña -el tamaño del cuerpo varía entre 2 a 3 cm de largo- y con un gran número de patrones de color (Gordon & Gordon, 1954; Kallman, 1975). En cuanto a la pigmentación, es el vertebrado más variable que se conoce. Por otro lado, *X. hellerii*, es un pez bastante grande -hasta 8 a 10 cm-, algo alargado y con una espada larga en la aleta caudal.

Los machos de las especies de *swordtails* fueron citados por Darwin (1871) como un ejemplo de ornamentación sexual extrema, ya que todas son sexualmente dimórficas. Los machos sexualmente maduros tienen una “espada” (un alargamiento de los radios ventrales de la aleta caudal) y un gonopodio completamente desarrollado; las hembras sexualmente maduras se distinguen por la presencia de una mancha oscura que rodea los órganos reproductivos (Rocamontes-Morales et al., 2021). La longitud total del cuerpo, la presencia

de una llamativa elongación en forma de espada de la aleta caudal y una línea lateral muy marcada en los machos, son los caracteres que establecen el marcado dimorfismo sexual característico de la especie *X. hellerii*. La longitud total del cuerpo del macho en esta especie es menor (6-8 cm) con respecto a la de la hembra cuya longitud puede ir más allá de los 9 cm; la coloración de los individuos varía de acuerdo al hábitat (Alderton, 2012), aunque son muy comunes las variedades verdes (color de las formas salvajes) y otras como las rojas, oro, negras y albinas (Axelrod & Wischnat, 1991). Las hembras, además de carecer de la prolongación en su aleta caudal (aleta caudal redondeada), son menos coloridas que los machos (Alderton, 2012). Algunas especies carecen de espadas, otras exhiben espadas pequeñas y otras presentan espadas incluso más largas que la longitud de su cuerpo (Meyer et al., 1994).

La hibridación natural es común entre las especies de *Xiphophorus* (Jones et al., 2012; Meyer et al., 1994; Rosenthal et al., 2003), lo que a veces resulta en la formación de nuevas especies (Jones et al., 2012; Kang et al., 2013; Meyer et al., 2006). Sin embargo, *X. hellerii* y *X. maculatus* divergieron hace unos 3 millones de años y no hibridizan naturalmente, a pesar de ser especies simpátricas (Kallman & Kazianis, 2006).

Las especies de *Xiphophorus* son modelos de estudio bien establecidos para distintos campos de la biología, como la ecología del comportamiento, la fisiología, la biología ambiental y de conservación, la biología evolutiva, la genética y el estudio de la determinación del sexo, además de la investigación del cáncer (Meierjohann & Schartl, 2006).

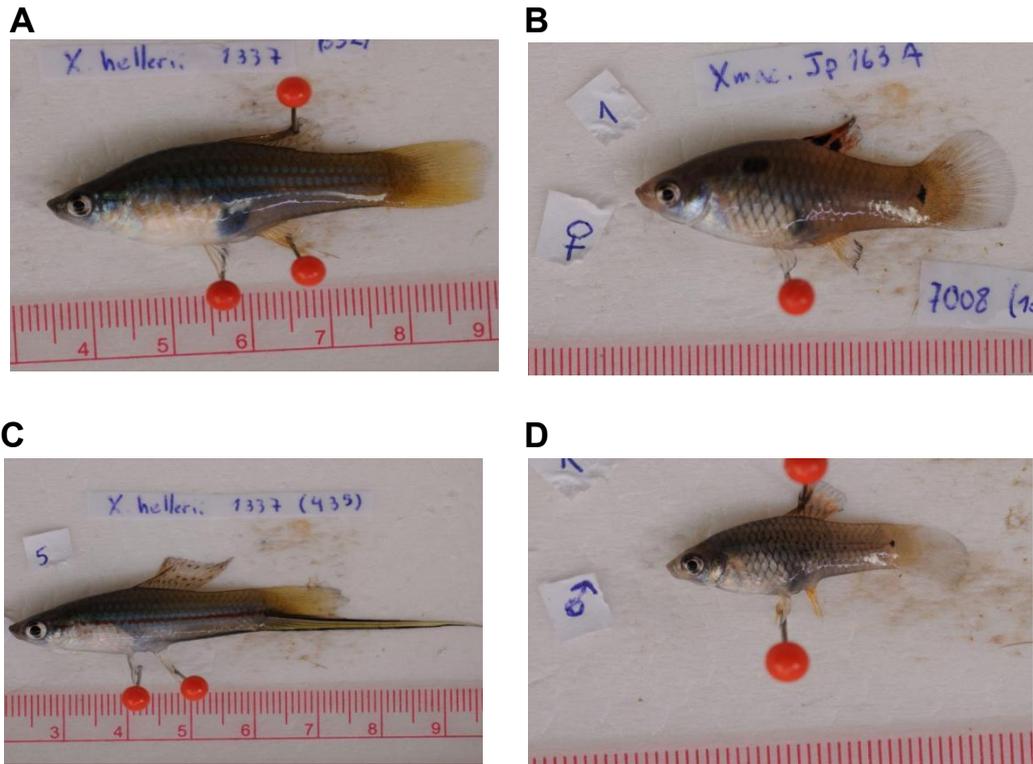


Figura 1: Ejemplares de las especies parentales utilizadas en este estudio. (A) Hembra de *X. hellerii*; (B) Hembra de *X. maculatus*; (C) Macho de *X. hellerii*; (D) Macho de *X. maculatus*.

1.3. Hibridación y melanoma

Xiphophorus es uno de los primeros modelos animales utilizados para el estudio de la base genética del cáncer (Gordon, 1931). La mezcla de genomas de diferentes especies por hibridación puede alterar las interacciones genéticas específicas que se adaptaron y fijaron dentro de la población de cada especie. Cuando tal mezcla predispone a los híbridos a anomalías y enfermedades que disminuyen la aptitud general de los híbridos, se denomina incompatibilidad híbrida (Lu et al., 2020). A fines de la década de 1920, Myron Gordon, Georg Haeussler y Kurt Kosswig, han encontrado de forma independiente que varios cruces interespecíficos entre *Xiphophorus maculatus* y *Xiphophorus hellerii*, dan como resultado individuos híbridos que desarrollan melanoma de forma espontánea (e.g. Gordon, 1927, 1931). Los tumores se desarrollan a partir de manchas de pigmento compuestas por melanóforos, células que contienen abundantes gránulos de melanina (Schartl et al., 1995). Desde su establecimiento, este sistema modelo se ha estudiado

intensamente para evaluar las contribuciones genéticas subyacentes a la etiología del tumor.

Más adelante, Anders argumentó que esta tumorogénesis espontánea se debe a la segregación de dos loci de *X. maculatus*. Uno se denominó *Tu* -por “tumor”- y el otro *R* -por “regulador”-; sin embargo, el primer locus es regulado por el segundo, que suprime la acción de *Tu* (Ahuja & Anders, 1976; Anders, 1991). Estos conceptos llevaron a lo que ahora conocemos como oncogenes y supresores de tumores (Knudson, 1971; Todaro & Huebner, 1972). A fines de la década de 1980, se demostró que el gen *Tu* codifica una copia duplicada mutante de *egfr* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), proteína transmembrana que juega un papel influyente en el inicio de la señalización que dirige el comportamiento de las células epiteliales y los tumores de origen celular epitelial (revisado en Herbst, 2004). Esta mutación de *egfr* se denominó quinasa reguladora del melanoma *Xiphophorus* (*Xmrk*) (Adam et al., 1993; Wittbrodt et al., 1989). El oncogén *Xmrk* está estrechamente ligado al locus de determinación sexual (*SD*), y controla la proliferación de melanocitos. Además, este modelo nos ofrece un modelo natural de melanoma en el que el efecto oncogénico de *Xmrk* puede eliminarse por completo mediante un locus regulador que debe haber coevolucionado con *Xmrk* (Schartl, 2014). El gen *EGFR* es uno de los principales oncogenes de muchos cánceres humanos (Thomas & Weihua, 2019). Es preproliferativo y es un activador corriente arriba de la señalización de *BRAF* y *NRAS*, que son los oncogenes impulsores en más del 50% de todos los melanomas humanos (Gutiérrez-Castañeda et al., 2020).

Es recién en el año 2020 que Yuan Lu y colaboradores (2020) hallaron e identificaron que *rab3d* es el único gen expresado ubicado en el locus determinante de la tumorogénesis (*R*) en el cromosoma 5 en el genoma de *Xiphophorus*, y concluyendo así una búsqueda del locus hipotético *R* que estuvo en curso durante más de cinco décadas. Otro estudio (Powell et al., 2020), donde se identificó un melanoma fenotípicamente similar en híbridos naturales formados entre las especies *Xiphophorus birchmanni* y *Xiphophorus malinche*, reveló que *cd97* (o *adgre5*) es el gen ubicado en el locus *R*. *X. birchmanni* y *X. malinche* están estrechamente relacionados e hibridan en la naturaleza.

Mediante experimentos de hibridación entre individuos con ambos loci, con peces de otra población o de una especie que carece de *Tu* y *R*, es posible sustituir el cromosoma portador de *R* por un cromosoma libre de *R* del compañero de cruce (Schartl et al., 1995). La liberación del control por *R* da como resultado diferentes grados de sobreexpresión de *Tu*, hiperpigmentación y desarrollo de melanoma (Meierjohann & Schartl, 2006; Schartl et al., 1995) (Figura 2). Cuando ambos loci (*Tu* y *R*) están presentes, el fenotipo observado

es una mancha de pigmentación negra benigna (Meierjohann & Schartl, 2006; Schartl, 2008). Ambos loci se encuentran en diferentes grupos de ligamiento (Schartl et al., 1995).

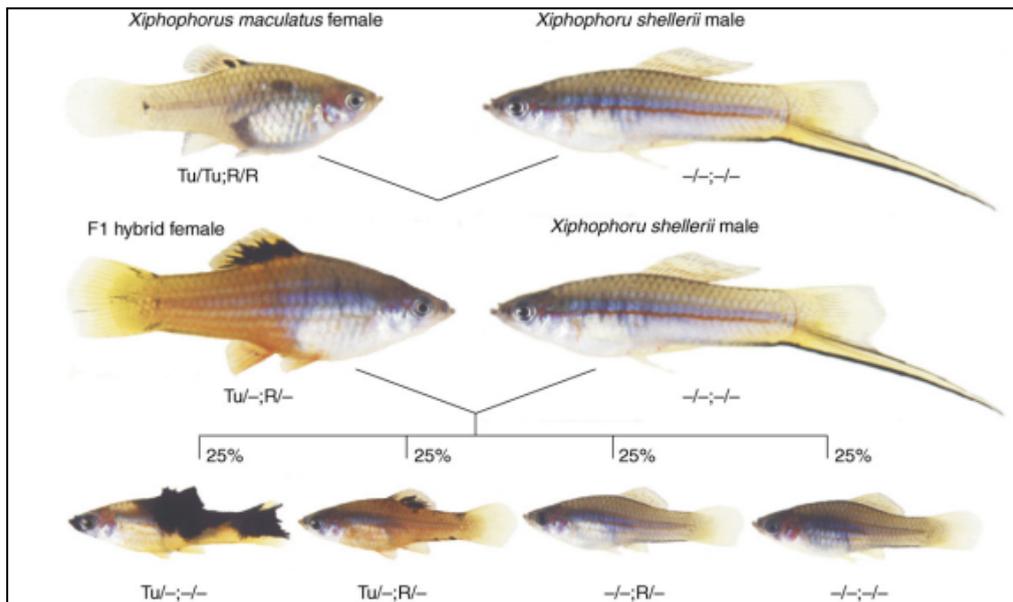


Figura 2. Experimento de cruce que conduce a la formación espontánea de melanoma en *Xiphophorus*. Las hembras de *X. maculatus* que contienen los alelos *Tu* y *R* se cruzan con machos *X. hellerii* que carecen de *Tu* y *R*. La descendencia F1 es heterocigótica para *Tu* y *R*, lo que da como resultado manchas de pigmento no malignas en las aletas. El cruce de estos individuos con un macho de *X. hellerii* (retrocruza) da lugar a una descendencia de la cual el 25% desarrolla melanoma, causado por la presencia de un alelo *Tu* en ausencia de *R*; otro 25% desarrolla manchas de pigmento no malignas y el 50% son peces sanos sin cambios en la pigmentación. Figura extraída de Meierjohann & Schartl, 2006.

1.4. Hibridación y región de determinación sexual

En un experimento evolutivo realizado durante más de 30 años, Franchini y colaboradores (2018) realizaron cruzamientos a largo plazo entre especies del género *Xiphophorus* mediante el apareamiento de una hembra de *X. maculatus* (genotipo $2N = 48; XX$) con un macho *X. hellerii* (genotipo $2N = 48; ZZ$) (Figura 3). El principal hallazgo de este experimento fue la generación espontánea de un nuevo cromosoma sexual. El fragmento del cromosoma 21 que determina el sexo en estos individuos, cambió para ubicarse en el cromosoma 2.

Xiphophorus maculatus exhibe un patrón de pigmentación en su aleta dorsal (dorsal manchada, *Sd*), mientras que *X. hellerii* no exhibe este rasgo. En el híbrido F1, el patrón de pigmentación se expande y la pigmentación de melanina cubre toda la aleta dorsal debido a la hiperplasia de melanocitos (Patton et al., 2011; Walter & Kazianis 2001). El

retrocruzamiento del híbrido F1 con el progenitor *X. hellerii* conduce a tres fenotipos distintos entre la progenie del retrocruzamiento (BC) que siguen las distribuciones mendelianas: el 25% de los híbridos exhiben un patrón de hiperplasia de pigmentación como se observa en el híbrido F1, el 25% exhibe un patrón nodular de melanoma -invasivo-, y el 50% restante de la progenie no muestra un patrón de pigmentación negra. Después de 100 generaciones de retrocruzas, se encontró en la parte central del cromosoma 2 un gran bloque de polimorfismos maternos retenidos (204 Polimorfismos Simples de Nucleótidos o SNPs) que abarcan aproximadamente 10 Mb, que pertenecían originalmente al cromosoma 21 (de aquí en adelante, "*Mac1*"). Esta región contiene algunos loci conocidos, por ejemplo: (i) el locus que define la identidad del gonosoma y por ende el fenotipo sexual de los individuos -el locus determinante del sexo- *SD* (Kallman, 1984); (ii) el locus *Tu*, responsable de la formación de melanoma espontáneo en ciertos híbridos interespecíficos del género, al que se le asigna el oncogén *Xmrk* (Gordon 1927; Meierjohann & Schartl, 2006; Schartl, 2008); (iii) también encontramos el locus *P*, donde se aloja el gen que afecta el receptor tipo 4 para las hormonas de melanocortina (*Mc4r*), que controla el inicio de la madurez sexual en los machos y hembras, así como la talla adulta en machos -y como consecuencia también controla la variación del comportamiento reproductivo- y fecundidad en hembras (Kallman y Borkoski, 1977; Lampert et al., 2010; Schreibam et al., 1994; Volff et al., 2013); (iv) y por último, el locus del patrón de color rojo-amarillo, *Dr*, responsable de diferentes rojos, patrones marrones, naranjas y amarillos (Kallman, 1975) que se deben a altas concentraciones celulares locales de pigmento en el iris, el cuerpo y las aletas. En otras palabras, estos híbridos, después de 100 generaciones de retrocruzas, son *X. hellerii* completos, excepto por 10 Mb del genoma de *X. maculatus* en el cromosoma 2. Entre otras innovaciones, la hibridación en este género ha resultado en el surgimiento de un nuevo cromosoma sexual en un breve período de tiempo (Franchini et al., 2018).

En el presente estudio se utilizaron los peces del experimento de cruzamientos a largo plazo entre especies del género *Xiphophorus* de Franchini y colaboradores (2018) para intentar comprender las bases genéticas de su forma corporal. Se utilizaron cepas híbridas que presentan o carecen del fragmento *Mac1*, cepas que difieren en la posición de dicho bloque en el genoma (cromosoma 2 o 21), cepas que difieren en la funcionalidad del oncogén *Xmrk* y ambas especies parentales. A medida que se repiten los retrocruzamientos generación tras generación, los híbridos presentan cada vez más información genética proveniente de *X. hellerii* y menor cantidad de *X. maculatus*, por lo que también se incluyeron cepas híbridas que difieran en la proporción de material genético proveniente de cada una de las especies parentales (ver descripción de cada cepa en la Tabla 1). El hecho de conocer la variabilidad genética de los individuos, la facilidad de manipulación

experimental y la reproducción en laboratorio en condiciones estandarizadas que proporciona un control total sobre las condiciones ambientales, provee de enormes ventajas para este tipo de estudios. A su vez, en entornos experimentales, los cambios en el desarrollo se pueden visualizar y cuantificar con precisión con cepas de organismos que portan mutaciones de interés o marcadores transgénicos (Hallgrímsson et al., 2009).

Datos preliminares surgidos de medidas lineales del cuerpo de individuos de cada una de las cepas, sugieren que existe una correlación entre la región *Mac1* y la morfología de los híbridos. Además, mostraron similitud en la forma corporal de la especie parental *X. maculatus* y la cepa *Sd / hIII BCr 407* (híbrido con todo el genoma de *X. hellerii* excepto el fragmento *Mac1* perteneciente a la otra especie parental *X. maculatus*). A partir de estos resultados preliminares surge la hipótesis de trabajo, donde se plantea que la morfología corporal de estos individuos tiene una base genética asociada al fragmento *Mac1*. En este contexto se busca responder si realmente en esta región del cromosoma sexual existen genes que afectan la morfología corporal en el género *Xiphophorus*. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es analizar la correlación entre la morfología corporal de los peces de las especies *X. hellerii* y *X. maculatus* y la región *Mac1*.

Para alcanzar el objetivo de este trabajo, fueron propuestos los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una comparación de la forma corporal entre las especies parentales, así como de los sexos dentro de cada una de ellas.
- Evaluar si existe correlación entre la presencia del oncogen *Xmrk* con la forma corporal en los individuos de este género.

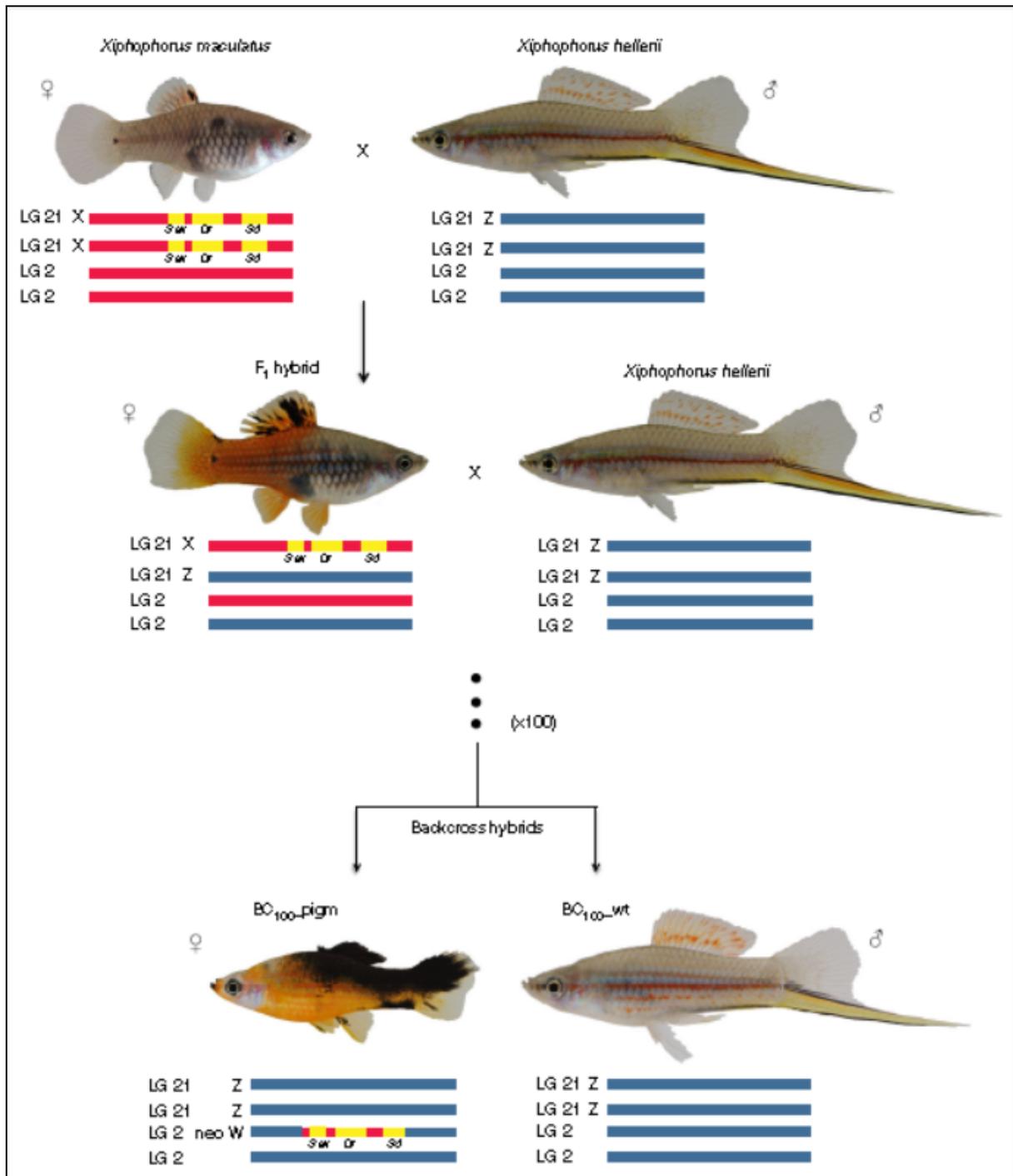


Figura 3: Esquema del cruzamiento de laboratorio realizado por Franchini y colaboradores (2018). Se muestran las especies parentales *X. maculatus* y *X. hellerii*, un individuo hembra híbrido de primera generación y la descendencia resultante obtenida después de aproximadamente 100 generaciones de retrocruzamientos. También se destacan color del cuerpo rojo (*Dr*), el cuerpo manchado (*Sd*) y el oncogén *Xmrk*, estrechamente ligado al cromosoma X de *X. maculatus* (LG21). Un evento de translocación de una región genómica que contiene estos loci acompañado por la supresión de la recombinación probablemente contribuyó a la formación de un nuevo cromosoma sexual, un cromosoma neo W (LG2), durante el experimento de retrocruzamiento. Imágenes de peces por M. Scharf. Figura extraída de Franchini et al., 2018.

2. Materiales y métodos

2.1. Descripción del sistema

Se utilizaron peces criados en el laboratorio *Physiological Chemistry, University of Würzburg*, Alemania. Los ejemplares pertenecen a las especies *X. maculatus*, *X. hellerii* y a cepas híbridas resultantes de distintos cruces entre ellas.

Las cepas utilizadas presentan, a grandes rasgos, las siguientes características (Tabla 1):

- ***X. maculatus* (Jp 163 A)** y ***X. hellerii* 1337**: especies parentales.
- ***Sd / hIII BCr 407***: cepa híbrida perteneciente a la F100 en adelante. Contiene todo el genoma de la especie parental *X. hellerii*, excepto la región *Mac1* proveniente de la otra cepa parental *X. maculatus*.
- ***ArDr / XhIII BCn 1116***: cepa de la misma línea que *Sd / hIII BCr 407* pero *Xmrk* perdió su función debido a un elemento transponible.
- ***407 ohne Sd 6608***: cepa de la misma línea que *Sd / hIII BCr 407* pero *Xmrk* perdió su función, por razones desconocidas.
- ***Sd / XhIII BCr 634***: cepa similar a la línea 407, pero el parental *X. hellerii* utilizado para el retrocruzamiento fue una cepa albina. Además, el fragmento *Mac1* que se encuentra en el cromosoma 2 en la línea 407 está presente en otro lugar.
- ***Sd / hIII BCr x X. hIII green 407***: En las retrocruzas se observa que la mitad de los híbridos son rojos (la línea 407, que son rojos debido a la presencia del locus *Dr* de *X. maculatus*) y la otra mitad son “verdes”. Esta cepa corresponde a los “verdes”, y por lo tanto carecen de la región *Mac1* proveniente de la cepa parental *X. maculatus*.

Las siguientes cepas son híbridos producto de retrocruzas de generaciones anteriores. El acrónimo *BCn* significa que es la cepa híbrida retrocruzada de la generación *n*. En otras palabras, han sido retrocruzadas *n* veces. El genoma de la cepa *BC1*, por ejemplo, contiene un 25% proveniente *X. maculatus* y 75% de *X. hellerii*. Con cada retrocruzamiento se pierde más porción del genoma de *X. maculatus*. Entonces, básicamente, estas cepas contienen la mayor parte del genoma perteneciente a *X. hellerii*, la región de interés *Mac1*, y el porcentaje restante del genoma de *X. maculatus* que aún no se perdió. La diferencia entre cepas de la misma generación radica en el tanque en el que se criaron.

- ***Xmac JP163 A/hIII x X.hIII BC2 7000***

- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC5 6282***
- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC6 6409***
- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC6 6602***
- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC6 6726***
- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC6 6727***
- ***X.h.III / mac-Jp163A / h.F.O.I18t X.h.III BC6 6626***

Tabla 1. Detalle de la cantidad de individuos de cada cepa utilizados, su respectivo sexo, si contienen o no el fragmento *Mac1* y una breve descripción de las características de la cepa. (H) Hembras; (M) Machos.

CEPA/ESPECIE	n	H	M	Mac 1	Descripción de la cepa
<i>Sd/hIII BCr xX.hIII grin 407</i>	21	0	21	No	Carecen de la región <i>Mac1</i>
<i>Xmac JP163 A/hIII x X.hIII BC2 7000</i>	19	10	9	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 2
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC5 6282</i>	6	5	1	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 5
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6409</i>	6	6	0	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 6 (tanque 505)
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6602</i>	14	14	0	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 6 (tanque 438)
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6726</i>	5	5	0	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 6 (tanque 459)
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6727</i>	1	1	0	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 6 (tanque 340)
<i>X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6626</i>	7	7	0	Si	Híbridos retrocruzados de la generación 6 (tanque 357)
<i>Sd/hIII BCr 407</i>	16	16	0	Si	Híbrido 100 <i>back cross</i> . Contiene todo el genoma de <i>X. hellerii</i> , excepto la región <i>Mac1</i> .
<i>407 ohne Sd 6608</i>	32	32	0	Si	Cepa de la misma línea que <i>Sd / hIII BCr 407</i> pero <i>Xmrk</i> perdió su función (por razones desconocidas).
<i>Sd/XhIII BCr 634</i>	10	10	0	Si	Similar a la cepa 407 pero la <i>X. hellerii</i> utilizada para el retrocruzamiento fue una cepa albina. El fragmento <i>Mac1</i> que se encuentra en el cromosoma 2 en la línea 407 está presente en otro lugar.
<i>ArDr/XhIII BCr 1116</i>	23	23	0	Si	Cepa de la misma línea que <i>Sd / hIII BCr 407</i> pero <i>Xmrk</i> perdió su función debido a un elemento transponible.
<i>X. mac. Jp 163 A</i>	36	23	13	Si	Especie parental
<i>X. hellerii 1337</i>	72	30	42	No	Especie parental
TOTAL	268	163	81		

2.2. Método morfométrico

En este trabajo se realizaron los análisis morfométricos a partir de 244 fotografías tomadas en el laboratorio donde se criaron los peces (*Physiological Chemistry, University of Würzburg, Alemania*). Las fotografías fueron tomadas por la misma persona y utilizando la misma cámara fotográfica en iguales condiciones de luz y manteniendo la misma distancia y punto focal en todos los individuos, a modo de minimizar las posibles fuentes de error.

El estudio de morfometría geométrica se realizó a través del método de Procrustes, también conocido como método de mínimos cuadrados generalizado, basado en procedimientos analíticos para superponer configuraciones de marcos anatómicos de referencia ("*landmarks*") del cuerpo de los ejemplares y así obtener variables de forma (Gower, 1975; Bookstein, 1986; Rohlf y Slice, 1990). El método de Procrustes se implementó como una serie de operaciones. Primero, de cada muestra, se obtuvo un conjunto de puntos de referencia que registran las posiciones relativas anatómicamente definibles. Este primer paso se realizó utilizando el programa *tpsDig* (<https://tpsdig2.software.informer.com/1.1/>). Estos puntos de referencia se pueden considerar "puntos fijos", ya que definen la ubicación de rasgos anatómicos particulares que representan atributos biológicos discretos (Figura 2). Se seleccionaron 15 puntos anatómicos de referencia homólogos del cuerpo de los ejemplares, utilizando criterios establecidos previamente (e.g. D'Anatro & Loureiro, 2005; Tobler et al., 2011). Los puntos de referencia utilizados fueron: (1) punta del labio superior; (2) punta posterodorsal de la cresta supraoccipital; (3) la unión anterior de la aleta dorsal con la línea media dorsal; (4) la unión posterior de la aleta dorsal con la línea media dorsal; (5) la unión de la aleta caudal con la línea media dorsal; (6) la unión de la aleta caudal con la línea media ventral; (7) la unión posterior de la aleta anal con la línea media ventral; (8) la unión anterior de la aleta anal con la línea media ventral; (9) la unión anterior de las aletas pélvicas y la línea media ventral; (10) inserción dorsal de la aleta pectoral en el cuerpo; (11) inserción ventral de la aleta pectoral en el cuerpo; (12) inserción dorsal de la membrana opercular en la cabeza; (13) la unión del opérculo con la línea media ventral; (14) margen posterior de la órbita del ojo; (15) margen anterior de la órbita del ojo. Para cada ejemplar, cada uno de los puntos anatómicos de referencia queda definido por coordenadas cartesianas (x, y) (figura 4).



Figura 4. Digitalización de landmarks en las fotografías en ejemplar perteneciente a la cepa *X.mac-Jp163A/h.III x X.h.III BC2 7000*. Los puntos rojos y su correspondiente referencia numérica indican los puntos de referencia utilizados en el análisis: (1) punta del labio superior; (2) punta posterodorsal de la cresta supraoccipital; (3) la unión anterior de la aleta dorsal con la línea media dorsal; (4) la unión posterior de la aleta dorsal con la línea media dorsal; (5) la unión de la aleta caudal con la línea media dorsal; (6) la unión de la aleta caudal con la línea media ventral; (7) la unión posterior de la aleta anal con la línea media ventral; (8) la unión anterior de la aleta anal con la línea media ventral; (9) la unión anterior de las aletas pélvicas y la línea media ventral; (10) inserción dorsal de la aleta pectoral en el cuerpo; (11) inserción ventral de la aleta pectoral en el cuerpo; (12) inserción dorsal de la membrana opercular en la cabeza; (13) la unión del opérculo con la línea media ventral; (14) margen posterior de la órbita del ojo; (15) margen anterior de la órbita del ojo.

En el siguiente paso, y teniendo en cuenta la definición de forma propuesta por Kendall (1977) explicada anteriormente, la información sobre la variación se obtuvo mediante superposición de Procrustes (Gower 1975; Rohlf y Slice 1990; Bookstein 1991; Dryden et al., 2016). En el mismo, las configuraciones de las coordenadas de los puntos de referencia, tal como fueron medidas, se escalan, se trasladan y rotan para eliminar de los datos efectos tales como tamaño, posición en la imagen y orientación respectivamente (Rohlf y Slice 1990) (Figura 5). El procedimiento comienza escalando configuraciones a un tamaño estándar y moviéndolas a una posición estándar. Cada configuración de puntos de referencia tiene un centro geométrico o “centroide”, que es el punto que describe su posición en el espacio matemático de forma (Toro Ibacache et al., 2010). El tamaño en morfometría geométrica se cuantifica como el tamaño del centroide, concepto geométrico independiente de la forma de la estructura; que se calcula como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado de cada punto de referencia desde el centroide de una configuración (Zelditch et al., 2004). Una vez obtenido el tamaño del centroide, puede ser

escalado de manera de llevar varias configuraciones a un tamaño común. Luego, para eliminar la variación en la posición, todas las configuraciones se trasladan de modo que sus centroides se ubican en el origen del sistema de coordenadas. Finalmente, las configuraciones se rotan alrededor de este centro de gravedad común para llevar todas las configuraciones a una orientación óptima en donde la suma de las desviaciones cuadradas entre los puntos de referencia correspondientes es mínima. En otras palabras, hasta llegar a un punto en que todas las formas se encuentren lo más cerca posible de una forma consenso o promedio, y por ende, sus diferencias morfológicas estén libres de los efectos ya mencionados. Estos procedimientos se realizaron en el programa *MorphoJ* (https://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html). La variación en las coordenadas de los puntos de referencia después de la superposición de Procrustes es la variación en la forma; este proceso de superposición produce un sistema de coordenadas común y genera un conjunto de variables de forma; por tanto, los datos de forma resultantes se pueden utilizar para análisis con las herramientas habituales de la estadística multivariada (Klingenberg, 2010), como por ejemplo el Análisis de Componentes Principales o el Análisis de Variables Canónicas (ACP y AVC respectivamente) y otros análisis para la prueba de hipótesis como el análisis Multidimensional de Varianza, o pruebas no paramétricas (Toro Ibacache et al., 2010).

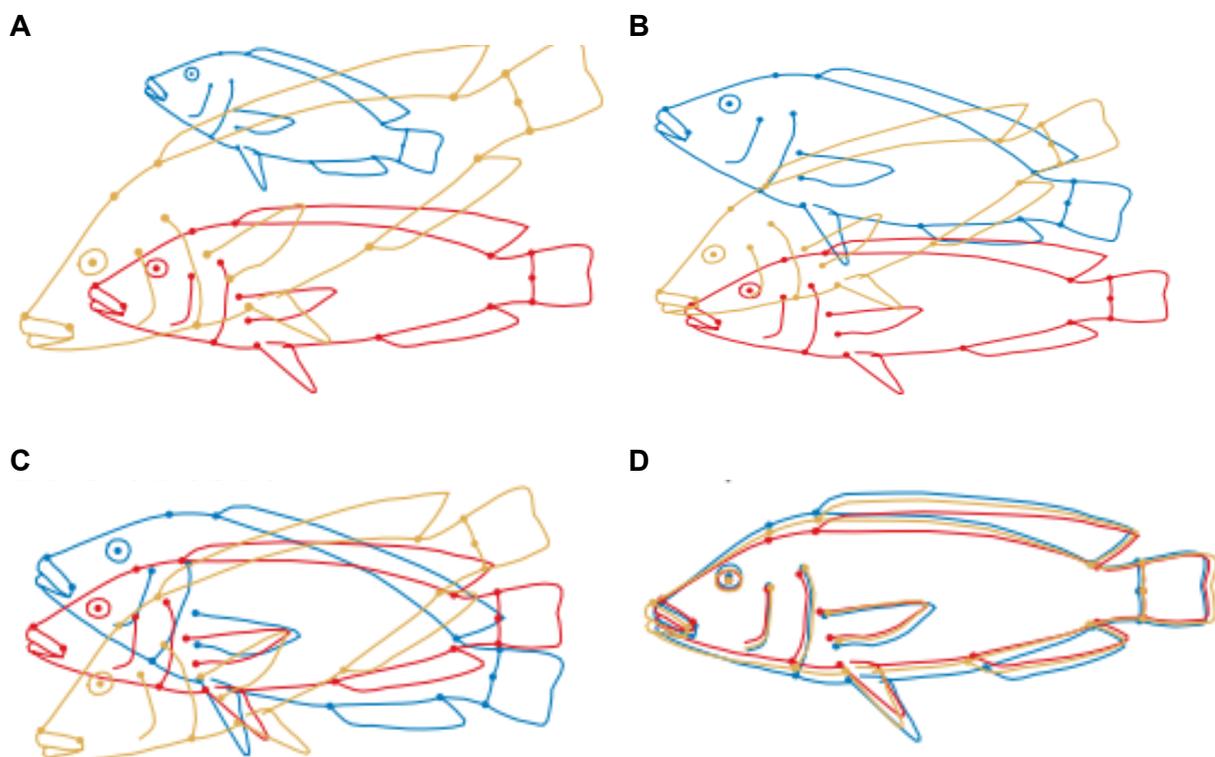


Figura 5: Esquema ilustrativo del método de superposición de Procrustes. (A) Configuraciones originales; (B) Escalado de las configuraciones originales a un tamaño estándar; (C) Translación de las configuraciones; (D) Rotación de las configuraciones. Ilustraciones extraídas de Klingenberg, 2010.

En el tercer paso del método de Procrustes, se utilizaron métodos gráficos para visualizar patrones de variación de forma y facilitar las descripciones de los cambios de la misma.

La técnica de *Thin-Plate Spline*, desarrollada por Bookstein (1991), es una función de interpolación entre *landmarks*, que toma el desplazamiento relativo de cada *landmark* con respecto a la forma promedio. Esta técnica se fundamenta en la analogía física de superponer placas de metal delgadas. Cada una contiene una configuración de landmarks en su superficie y se hacen coincidir los landmarks homólogos en una placa que permanece fija. Al hacer coincidir los landmarks de una placa delgada sobre una placa fija, la placa debe sufrir una torsión: cuanto más parecida sea la configuración de landmarks, la energía de torsión es menor. Utilizando las coordenadas de Procrustes, la placa fija es tomada como la forma promedio de todas las configuraciones, por lo que las deformaciones de cada configuración de *landmarks* resultan de su comparación con una configuración promedio. La obtención de las deformaciones relativas son el equivalente al análisis de componentes principales aplicado a las distancias procrusteanas, obteniendo las deformaciones parciales como vectores propios y las deformaciones relativas que son los componentes principales (Bookstein, 1989; Zelditch et al., 2004).

Algunas deformaciones no requieren de energía, las cuales equivalen a la rotación o deslizamiento de la placa. A estas deformaciones se las conoce como deformaciones uniformes o afines. Las deformaciones uniformes conllevan a una expansión o contracción y describen las deformaciones del mismo componente (Zelditch, et.al., 2004). Para visualizar esto de manera gráfica, es de utilidad representar una cuadrícula sobre la superficie de la placa: si al sobreponer la configuración de landmarks la malla mantiene su paralelismo, se habla de deformaciones uniformes. En el caso donde las deformaciones ocurren en zonas específicas y se pierde el paralelismo en la malla, estas deformaciones son llamadas no uniformes o no afines (Zelditch, et.al., 2004).

2.3. Análisis estadístico

Dado el evidente dimorfismo sexual en las especies, el sistema de híbridos con el que se trabajó y la pregunta que se quería responder, machos y hembras fueron analizados separadamente en todos los análisis realizados. Además, con el fin de obtener una mayor cantidad de individuos en cada uno de los grupos a analizar, agrupamos distintas cepas de la misma línea, como por ejemplo todas las cepas de la línea 407 (*Sd / hIII BCr 407*, *ArDr / XhIII BCn 1116*, *407 ohne Sd 6608* y *Sd / XhIII BCr 634*; a partir de ahora *G407*).

Primero se realizó un control para evaluar el margen de error a la hora de colocar los puntos de referencia sobre las imágenes de los individuos. Para esto se seleccionaron cinco individuos de distintas cepas utilizadas en el trabajo y se realizaron cinco repeticiones de la puesta de landmarks sobre cada uno de ellos. Luego, se observó, de forma gráfica y sencilla en el programa MorphoJ, el consenso de los puntos de referencia colocados y la dispersión de puntos alrededor del mismo.

En segundo lugar se realizó un breve análisis para evaluar la forma promedio de las cepas parentales. Para esto, se digitalizaron las fotografías de todos los individuos parentales del pool de datos: 72 individuos de la especie parental *X. hellerii* y 36 de *X. maculatus*. Además, se analizó y comparó por separado la forma del cuerpo de los sexos de cada una de las especies parentales. Al igual que en el análisis anterior, se utilizó el AVC. La comparación de la especie *X. maculatus* se realizó sobre 23 hembras y 13 machos. Por otro lado, para el análisis de *X. hellerii* se utilizaron 30 hembras y 42 machos. Para lograr la forma consenso de las cepas se utilizó un análisis de Procrustes Generalizado, realizado en el programa *MorphoJ* (https://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html). Además, en ambos casos, y en el mismo programa informático, se llevó a cabo un Análisis Discriminante como forma de corroborar que las cepas -o los sexos dentro de ellas- fueran asignadas a los grupos correctos.

De igual manera, se analizaron y compararon las diferencias morfológicas entre las hembras de las especies parentales y el grupo *G407*. Para esto, se llevaron a cabo análisis exploratorios para obtener la forma consenso de cada una de las cepas y así poder visualizar a grandes rasgos las diferencias morfológicas de cada grupo de individuos. Además, mediante el mismo análisis, se obtuvo la forma consenso de los tres grupos juntos.

Por otra parte, se realizó un ACP. El ACP no es más que una rotación de los datos originales; es simplemente una herramienta descriptiva y no sirve para poner a prueba las hipótesis de trabajo; el propósito de este análisis es simplificar los patrones de variación y hacerlos más fáciles de interpretar, reemplazando las variables originales por otras nuevas

(componentes principales), que son combinaciones lineales de las variables originales e independientes entre sí (Zelditch et al., 2004). En este método estadístico, la mayor parte de la variación en la muestra generalmente se puede describir con solo unos pocos componentes principales, por lo tanto, es utilizado para resumir la mayor parte de la variación en un conjunto de datos multivariados en menos dimensiones, y por ende, facilitar tanto la descripción como la presentación de resultados (Zelditch et al., 2004). A su vez, el ACP simplifica la descripción de las diferencias entre individuos; los conjuntos de individuos suelen ser más evidentes en los gráficos de componentes principales que en los gráficos de las variables originales. Sin embargo, dichos conjuntos no representan evidencia de entidades estadísticamente distintas. Además, y en adición a lo mencionado recientemente, se utilizó un análisis de trayectorias para observar de forma gráfica la forma promedio de los tres grupos superpuestos en el espacio. En suma, se utilizaron métodos gráficos para visualizar patrones de variación de forma y facilitar las descripciones de los cambios de la misma; utilizando la técnica de *Thin-Plate Spline* se compararon las formas correspondientes a los extremos de los ejes del gráfico de componentes principales respecto a la forma consenso global.

Por otra parte, a partir de modelos en los que se puede observar el efecto de distintos tratamientos en lo relativo a la forma corporal de los individuos, se analizó el efecto del tamaño y del oncogén *Xmrk* sobre la forma. Estos datos fueron empleados en un Procrustes ANOVA que analizó la variación en la forma (efecto fijo) con respecto al tamaño (efecto aleatorio), empleando un modelo de pendientes heterogéneas, según los resultados obtenidos en análisis exploratorios previos comparando diferentes modelos. El mismo Procrustes ANOVA se aplicó a la búsqueda de la correlación entre el oncogén y la forma corporal de los individuos. Para esto, se realizó una comparación de individuos dentro del grupo *G407*. Dentro del grupo, contamos con 16 individuos de la cepa *Sd/hIII BCr 407* y 10 de la cepa *Sd/XhIII BCr 634* en las que *Xmrk* se encuentra funcional y otros 23 individuos de la cepa *ArDr/XhIII BCr 1116* y 32 ejemplares de la cepa *407 ohne Sd 6608* donde *Xmrk* por distintas razones se encuentra en su forma no funcional. Además, con el fin de obtener las distancias de Procrustes entre grupos se realizó una comparación por pares. Estos análisis fueron implementados mediante el paquete “geomorph” v. 4.0.4 del entorno estadístico y de representación gráfica R (<https://www.r-project.org/>).

Además, se realizó un AVC. Al igual que el ACP, el AVC construye un nuevo sistema de coordenadas (las variantes canónicas, VC) y determina las puntuaciones en esos ejes para todos los individuos de un estudio. Además, las VC son combinaciones lineales de las variables originales y están limitadas a ser mutuamente ortogonales. Sin embargo, mientras

que ACP se usa para describir diferencias entre individuos, AVC se usa para describir diferencias entre las medias de los grupos. Sin embargo, al igual que el ACP, no puede usarse para probar la significancia estadística de las diferencias entre conjuntos; para eso, se necesita un análisis multivariante (Zelditch et al., 2004). También se realizó un Procrustes ANOVA con la finalidad de comparar las posibles diferencias morfológicas entre las hembras de ambas especies parentales y las hembras del grupo G407. También se obtuvieron las distancias de Mahalanobis entre estos grupos, una medida importante de distancia multivariada que tiene en cuenta la covariación entre las variables (Remagnino et al., 2017). Para Reyment et al. (1984), la distancia de Mahalanobis "proporciona la única medida realista de distancia multivariante". El objetivo del AVC es simplificar la descripción de diferencias entre grupos (Zelditch et al., 2004). Estos análisis fueron realizados usando el programa *MorphoJ* (https://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html).

3. Resultados

3.1. Control

En la Figura 6 se observan dos ejemplos del control realizado para evaluar el margen de error a la hora de colocar los puntos de referencia sobre las imágenes de los peces. Se puede observar que los *landmarks* de los individuos utilizados para el control se encuentran dentro del consenso arrojados por el programa informático (puntos azules), salvo en muy escasas excepciones donde algunos de ellos están muy próximos al mismo (puntos negros).

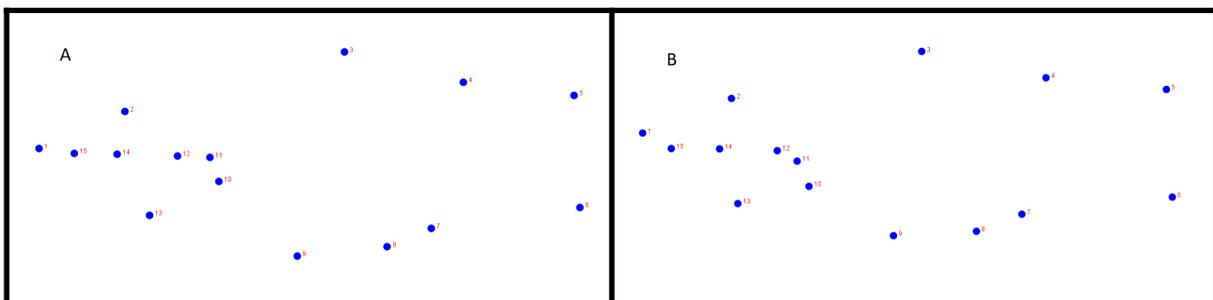


Figura 6: Dispersión de los puntos de referencia colocados en función del consenso. Los puntos azules corresponden a las coordenadas consenso, y los puntos negros a los puntos que no se encuentran dentro del promedio. (A) Ejemplar hembra de la cepa 407 ohne Sd 6608 perteneciente al G407. (B) Ejemplar hembra de la cepa X.h.III/mac-Jp163A/h.F.O.118t X.h.III BC6 6626.

3.2. Comparación de la forma de las especies parentales

En la Figura 7 se observa la forma corporal promedio de cada una de las especies parentales utilizadas en este trabajo. A partir del AVC, se observa que la forma de las especies parentales es estadísticamente diferente. Este test arrojó una distancia de Mahalanobis de 9,954 entre ambos grupos y un p -valor de $<0,001$. A su vez, se realizó un análisis de reclasificación del AVC con 10.000 permutaciones, donde el 100% de los individuos de ambas especies parentales fueron asignadas correctamente a su respectivo grupo, lo que indica y refuerza que la forma corporal de ambas especies es distinta.

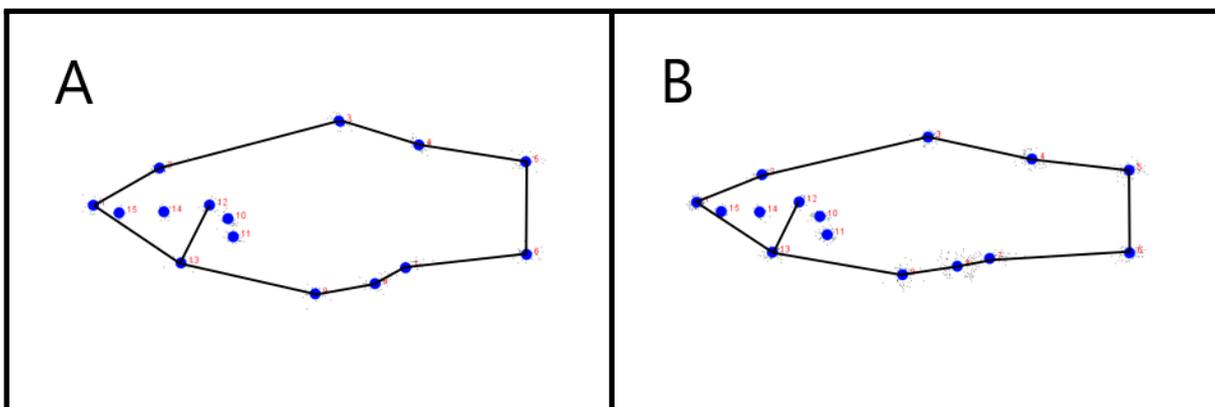


Figura 7: Forma consenso de ambas especies parentales. (A) Forma consenso de *X. maculatus* / $n=36$; (B) Forma consenso de *X. hellerii* / $n=72$

3.3. Comparación de los sexos dentro de cada especie parental

Por otro lado, la comparación por separado de la forma del cuerpo de los sexos de cada una de las especies parentales se observa en la Figura 8. La distancia de Mahalanobis entre machos y hembras de la especie *X. hellerii* es de 8,945 y la distancia entre ambos sexos de *X. maculatus* es de 13,355. El p -valor observado luego de 10.000 rondas de permutación para la distancia de Mahalanobis entre los machos y hembras de ambas especies fue $<0,0001$. Además, se realizó un análisis de reclasificación con 10.000 rondas de permutación. Este análisis agrupó a todos los individuos en sus respectivos grupos, lo que refuerza y corrobora los datos del análisis de variables canónicas.

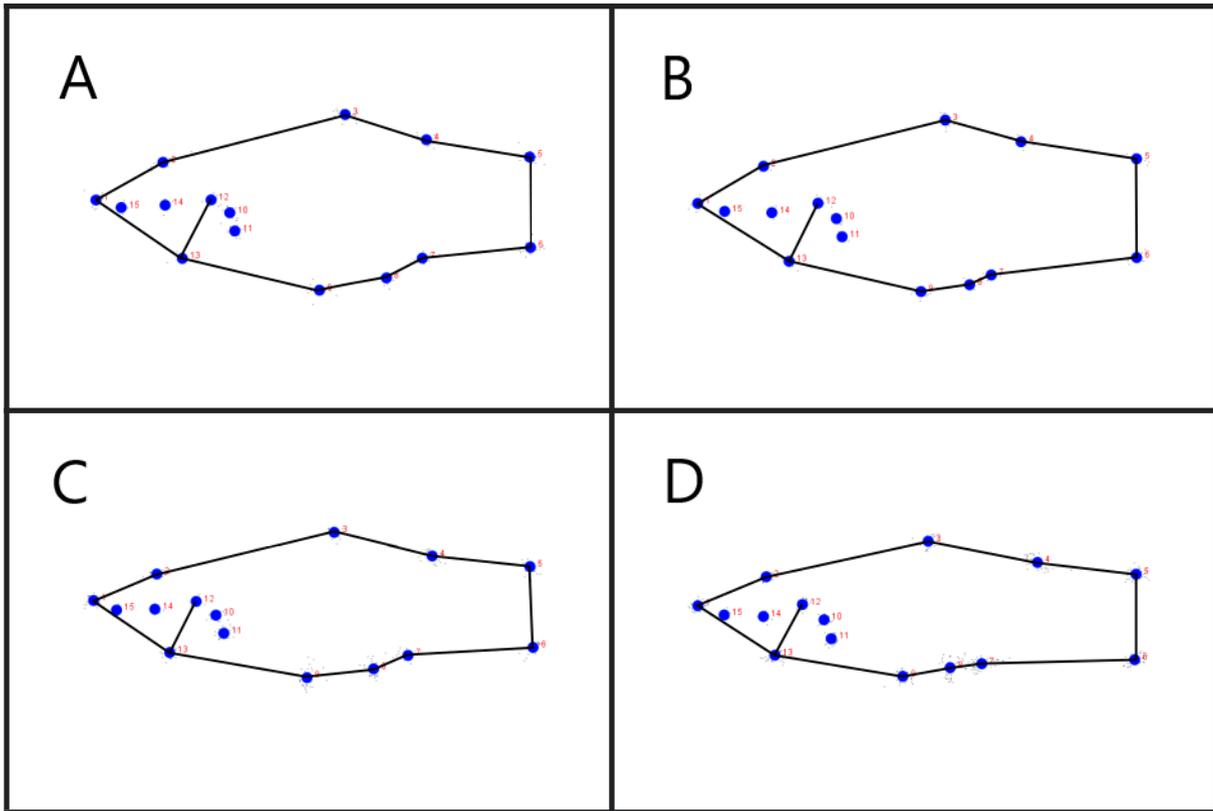


Figura 8: Forma consenso de ambos sexos en las especies parentales. **(A)** Forma consenso de hembras de *X. maculatus* / n= 23; **(B)** Forma consenso de machos de *X. maculatus* / n= 13; **(C)** Forma consenso de hembras de *X. hellerii* / n= 30; **(D)** Forma consenso de machos de *X. hellerii* / n= 42

3.4. Análisis de la variación morfológica entre las tres principales cepas utilizadas: *X. helleri*, *X. maculatus* e híbridos *G407*

En las Figuras 9B, 9C y 9D se demuestra la forma promedio de cada una de las cepas utilizadas en el análisis principal del estudio (las dos especies parentales y el *G407*). Además, como se observa en la figura 9A, se grafica la forma consenso de los tres grupos juntos. Por otra parte, a partir de un análisis de trayectorias, se obtuvo la forma consenso de las tres cepas superpuestas (Figura 9E). Esto permite la visualización clara de las principales diferencias morfológicas entre los grupos.

3.5. Análisis de Componentes Principales

La inspección del ACP (figura 10) indica que los peces de las especies parentales y el grupo *G407* ocupan un área distinta en el morfoespacio. Los primeros Componentes Principales describen la mayor parte de la varianza de los datos. El componente principal 1 explica el 30,85% de la variación, mientras que el componente principal 2 explica el 14,42% de la misma. Dado que la suma de ambos componentes principales explica casi un 45,5% de la varianza del sistema, se consideran suficientes para realizar las representaciones gráficas.

Si bien las hembras de *X. hellerii* y el grupo *G407* se solapan en parte de su distribución a lo largo del Componente Principal 1, la especie parental presenta valores más negativos a lo largo del Componente Principal 2. Las hembras de la especie parental *X. maculatus* presentan valores similares a los grupos recientemente mencionados en el Componente Principal 2. Sin embargo, las principales diferencias con respecto a los otros grupos radican en la distribución a lo largo del Componente Principal 1, presentando valores positivos en todos los individuos.

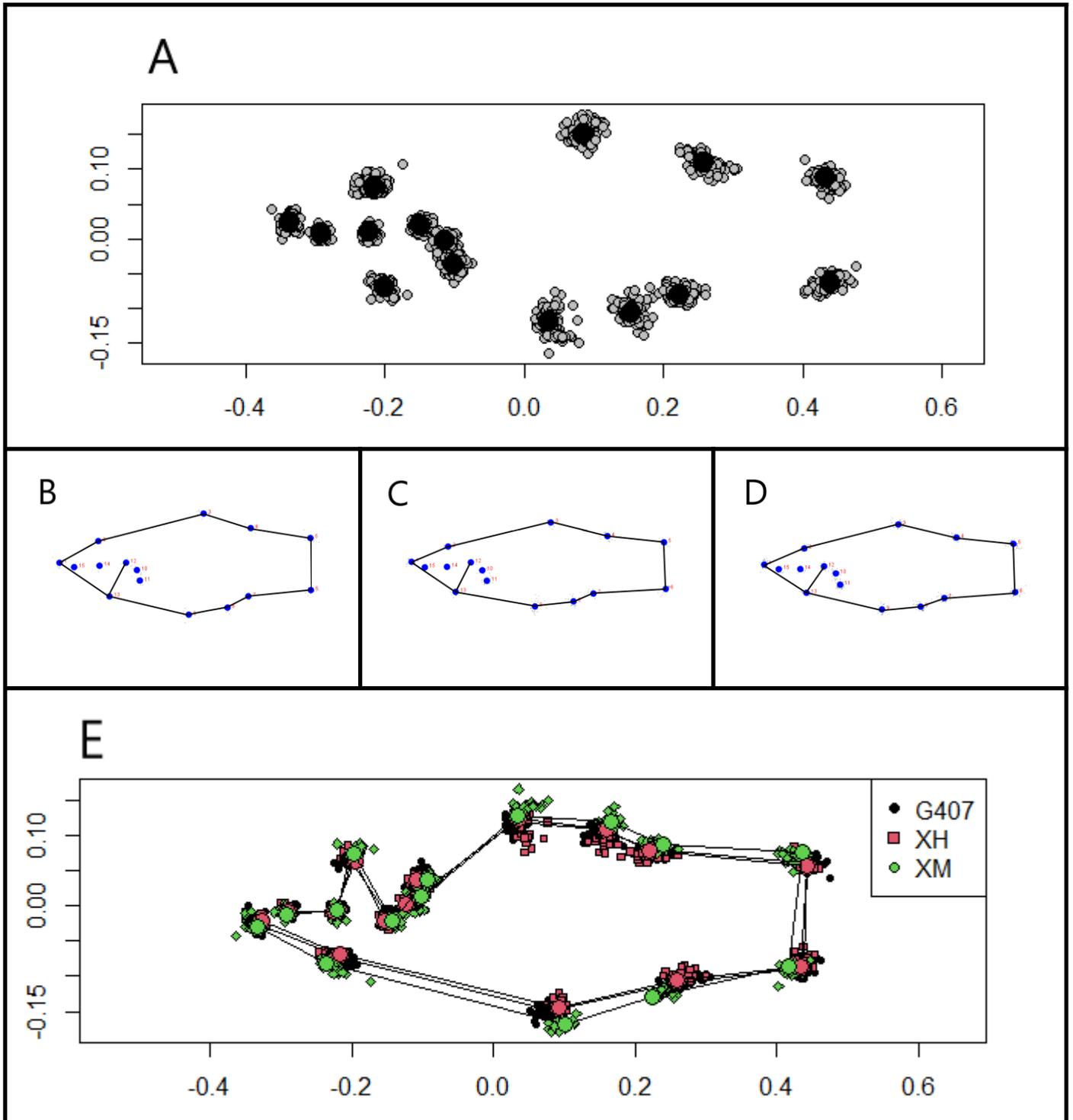


Figura 9: Forma promedio de los individuos hembras de las tres cepas utilizadas en el análisis. (A) Todos los individuos juntos / n= 134. Los puntos negros indican la ubicación promedio de los *landmarks* y los puntos grises todos los *landmarks* colocados; (B) *X. maculatus* / n=23 ; (C) *X. hellerii* / n= 30 ; (D) G407 / n=81; (E) Análisis de trayectoria para las tres cepas juntas.

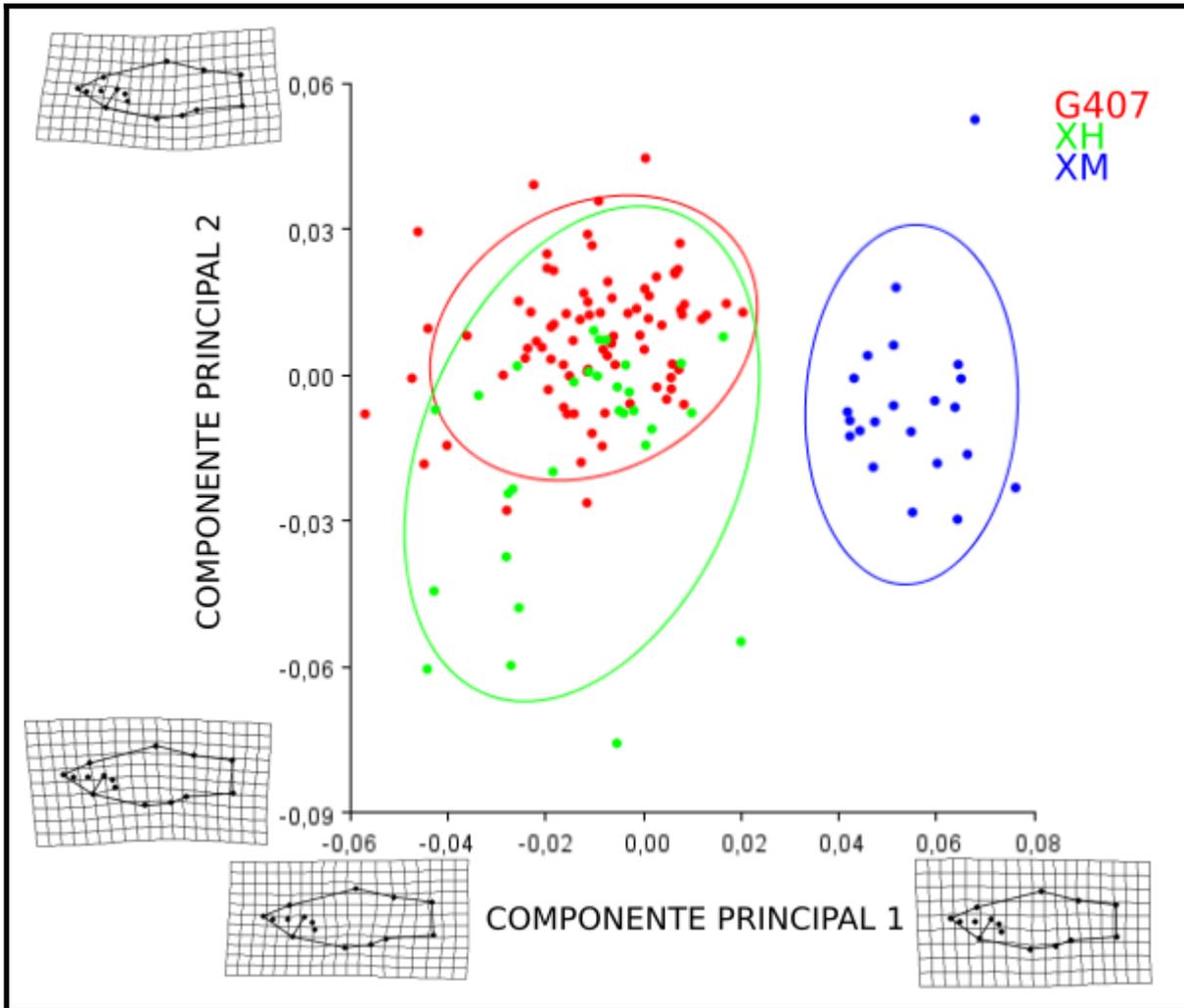


Figura 10: Gráfico del análisis de componentes principales de las especies parentales y G407

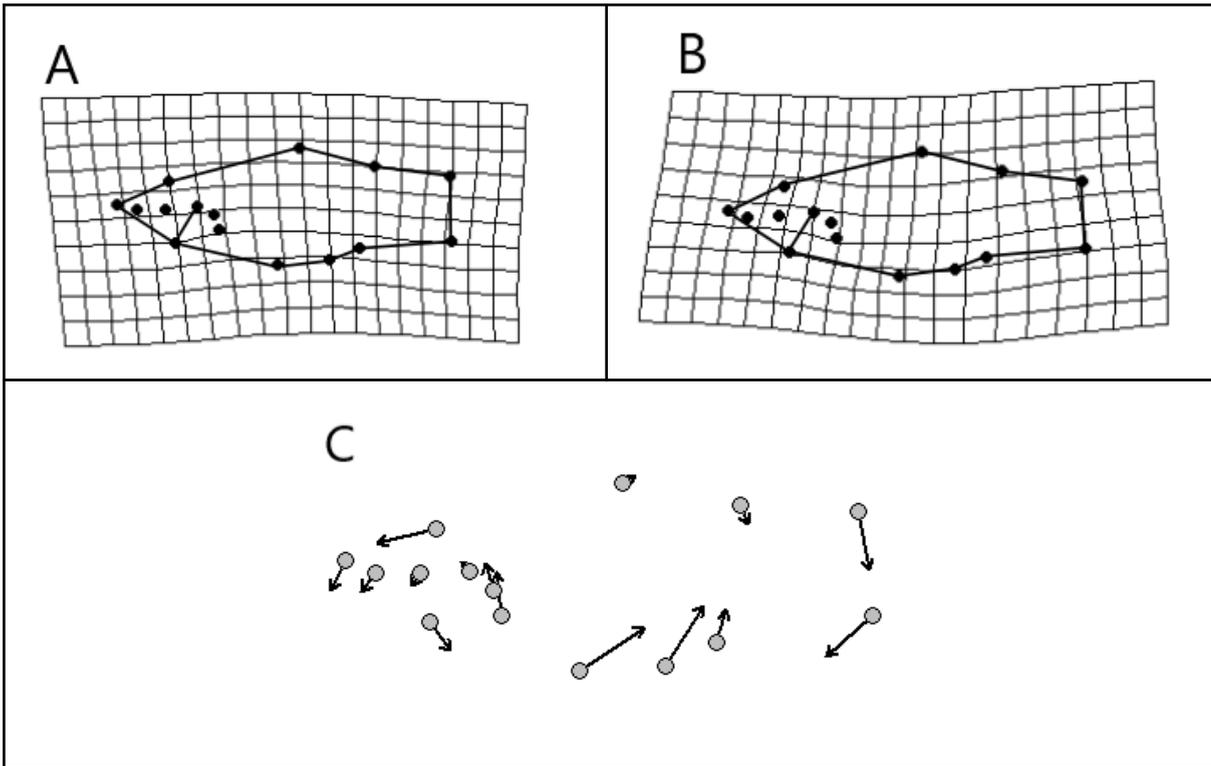
3.6. Exploración de la variación de formas y visualización de patrones de formas

Utilizando cuadrículas de deformación en base a la técnica de *Thin-Plate Spline* se compararon las formas correspondientes a los extremos de los ejes del gráfico de componentes principales respecto al consenso global (figura 11A, 11B y figura 12A, 12B). Complementariamente, se analizaron los cambios en la forma entre los valores mínimos y máximos de cada componente (figura 11C y figura 12C).

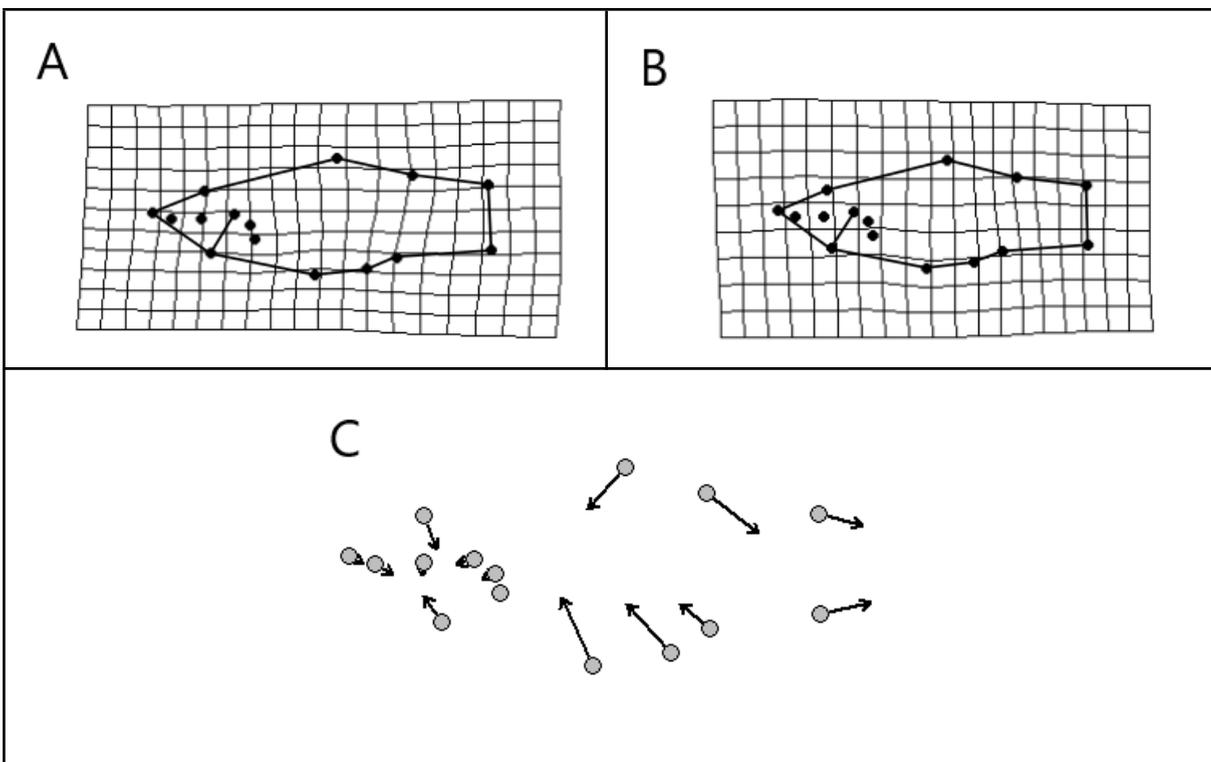
A lo largo del eje del Componente Principal 1 se observan diferencias principalmente a nivel dorso-ventral (figura 11). Los individuos que se encuentran en los valores mínimos

de dicho eje (figura 11A) presentan el cuerpo más comprimido en sentido dorso-ventral y más alargado. A su vez, presentan la aleta caudal a mayor distancia de la cabeza. Estos individuos pertenecen, en su mayoría, a la especie *X. hellerii* y al grupo G407. Por contraparte, el análisis muestra que los individuos que rondan los valores máximos del eje 1 (figura 11B), y que pertenecen a la especie *X. maculatus*, poseen una forma corporal más comprimida en sentido anteroposterior y expandida a nivel dorso-ventral. Además, presentan la punta posterodorsal de la cresta supraoccipital y la unión del opérculo con la línea media ventral más alejadas entre sí. También se puede observar que las uniones anterior y posterior de la aleta dorsal con la línea media dorsal se encuentran más próximas entre sí, mientras que los puntos de unión de la aleta caudal con el cuerpo se encuentran a mayor distancia.

Con respecto a las diferencias observadas entre los valores mínimos y máximos del componente principal 2 (figura 12) se puede visualizar, en los individuos que se agrupan en los valores mínimos del eje -pertenecientes a *X. hellerii*- (figura 12A), un desplazamiento hacia la parte anterodorsal de los puntos de referencia colocados tanto en la unión posterior y anterior de la aleta anal con la línea media ventral como en la unión anterior de las aletas pélvicas y la línea media ventral. Además, en la gradilla de deformación se pueden observar diferencias en la posición de la unión de la aleta caudal y la línea media dorsal y ventral, así como de la punta posterodorsal de la cresta supraoccipital. En el caso de la primera, en los valores mínimos a lo largo del eje, se observa un corrimiento hacia abajo, mientras que en la segunda el desplazamiento es hacia el lado anterior del cuerpo. En suma, y en menor magnitud, se observan desplazamientos de la inserción dorsal y ventral de la aleta pectoral en el cuerpo hacia la parte dorsal, de la punta del labio superior hacia la zona antero-ventral y por último un corrimiento de la unión del opérculo con la línea media ventral hacia el lado postero-ventral del cuerpo.



(A y B) Visualización de las formas correspondientes a los extremos del eje 1 del gráfico de componentes principales respecto al consenso global: (A) Extremo mínimo (B) Extremo máximo; (C) Representación vectorial de los cambios en la forma entre los valores mínimos y máximos del eje.



(A y B) Visualización de las formas correspondientes a los extremos del eje 2 del gráfico de componentes principales respecto al consenso global: (A) Extremo mínimo (B) Extremo máximo; (C) Representación vectorial de los cambios en la forma entre los valores mínimos y máximos del eje.

3.7. Evaluación de la correlación del oncogén *Xmrk* y la forma corporal

Mediante comparación de diferentes modelos de ANOVA se determinó que existe una asociación estadísticamente significativa entre el tamaño corporal y la forma de los individuos analizados ($p = 0,001$, Tabla 2). En otras palabras, parte de las diferencias entre los grupos están explicadas por el tamaño además de por la forma.

Los datos arrojados por los modelos utilizados demuestran una diferencia significativa entre los grupos en estudio: $Pr(>F)=0,004$ (Tabla 3) y $Pr > d=0,85$ (Tabla 4). La distancia de Procrustes arrojada en el análisis de comparación por pares entre los individuos con el oncogén *Xmrk* funcional (SI) y los que no lo tienen (NO) ($d=0,01584699$; Tabla 4) es menor en magnitud si lo comparamos con las distancias realizadas en el posterior análisis entre especies parentales y el grupo *G407* ($G407:XH=0,02983921$; $G407:XM=0,06879008$ y $XH:XM=0,09273027$; Tabla 5). Por otra parte, se realizó un análisis de trayectorias para ambos grupos, donde se vió que el desplazamiento de los landmarks es, apreciado en forma cualitativa, de poca magnitud (Figura 13).

Tabla 2: Resultados de la prueba de alometría. (**CS**) tamaño del centroide; (**Df**) grados de libertad; (**SS**) suma de cuadrados; (**Z**) efecto del tamaño en base a la distribución F; (**Pr(>F)**) valor estadístico. Código de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**'.

	Df	SS	F	Z	Pr(>F)
log(CS)	1	0,04788	20,438	7,1601	0,001
Residuals	131	0,30691			
Total	132	0,35479			

Tabla 3: Resultados del análisis de la correlación entre la forma y la presencia de *Xmrk*. (**CS**) tamaño del centroide; (**Df**) grados de libertad; (**SS**) suma de cuadrados; (**Z**) efecto del tamaño en base a la distribución F; (**Pr(>F)**) valor estadístico. Código de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**'.

	Df	SS	F	Z	Pr(>F)
shape ~ log(CS) + XMRK_FUN (Null)	1				
shape ~ log(CS) * XMRK_FUN	1	0,0042488	2,5166	2,6201	0,004

Tabla 4: Resultados de la comparación por pares.

(**NO**) *Xmrk* no funcional; (**SI**) *Xmrk* funcional; (**d**) distancia de Procrustes; (**UCL**) límite de confianza superior; (**Pr > d**) valor estadístico.

	d	UCL (95%)	Z	Pr > d
NO:SI	0,01584699	0,02296947	-1,025731	0,85

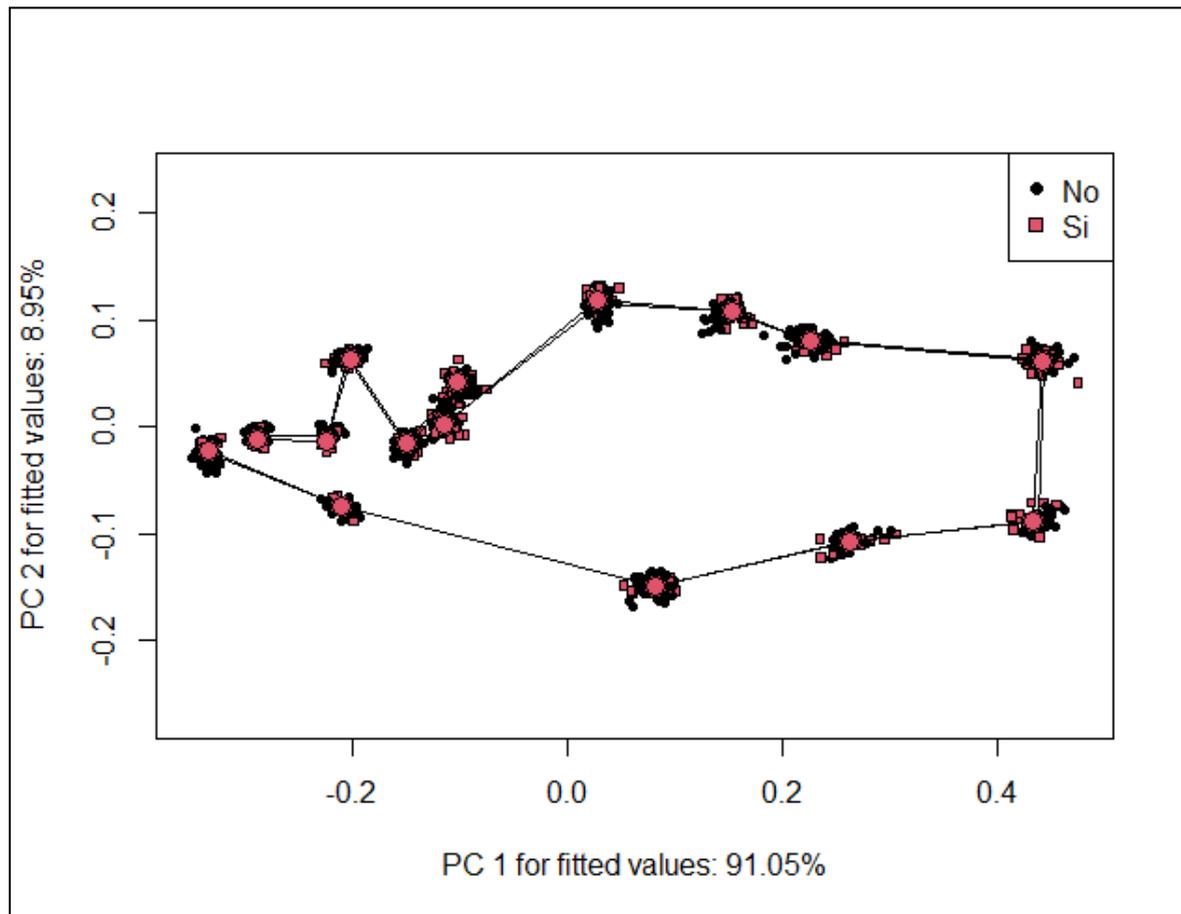


Figura 13: Análisis de trayectoria realizado para los grupos con *Xmrk* funcional y *Xmrk* no funcional. (**No**) individuos que presentan *Xmrk* no funcional / n=55; (**Si**) individuos que presentan *Xmrk* funcional / n=26.

3.8. Análisis de las distancias morfológicas entre las tres principales cepas utilizadas

Los datos del modelo de Procrustes ANOVA arrojan una diferencia significativa entre los tres grupos en estudio: $G407:XH = 0,715$; $G407:XM = 0,945$ y $XH:XM = 0,946$ (Tabla 5). Al especificar un nivel de confianza (95%), obtenemos límites de confianza superiores (UCL) de las distribuciones de distancias por pares. Podemos ver que si la distancia observada es mayor que la UCL, el valor P es menor que 1-confianza; es decir, es “significativo”. A su vez, mediante un análisis de variables canónicas en el MorphoJ también se obtuvieron las distancias morfológicas (en este caso de Mahalanobis) entre los tres grupos (Tabla 6). Al igual que en el análisis anterior, las distancias entre los grupos fue estadísticamente diferente (< 0.0001 en los tres casos).

Al analizar los valores de distancia arrojados en ambos análisis, se puede decir que la especie parental *X. hellerii* es la más cercana, morfológicamente, al grupo *G407*. Además, se observa que la especie *X. maculatus* se encuentra a una distancia intermedia, pero más próxima al grupo *G407* que a la otra especie parental *X. hellerii*. Por último, los grupos más lejanos, morfológicamente hablando, serían ambas especies parentales.

Tabla 5: Resultados del análisis de Procrustes ANOVA. Comparación por pares. (**XH**) *X. hellerii*; (**XM**) *X. maculatus*; (**G407**) grupo *G407*; (**d**) distancia de Procrustes; (**UCL**) límite de confianza superior; (**Pr > d**) valor estadístico.

	d	UCL (95%)	Z	Pr > d
G407:XH	0,02983921	0,03653959	-0,5643495	0,715
G407:XM	0,06879008	0,09465757	-1,6318880	0,945
XH:XM	0,09273027	0,09273027	-1,6510478	0,946

Tabla 6: Valores de las distancias de Mahalanobis y sus respectivos *p*-valores observados en el análisis de variables canónicas (AVC) realizado en el programa MorphoJ. (XH) *X. hellerii*; (XM) *X. maculatus*; (G407) grupo G407.

Distancias de Mahalanobis entre los grupos:			P-valores para las distancias de Mahalanobis entre los grupos:		
	G407	XH		G407	XH
XH	3,5904		XH	<0.0001	
XM	9,3536	9,0263	XM	<0.0001	<0.0001

4. Discusión

Los resultados indican que existen diferencias morfológicas entre *X. hellerii*, *X. maculatus* -especies parentales- y los híbridos que poseen todo el genoma de *X. hellerii* excepto el fragmento *Mac1* perteneciente a *X. maculatus*, al menos en lo que respecta a las hembras. También se vieron diferencias significativas en la comparación de los sexos dentro de ambas especies parentales. Además, se muestra que el tamaño influye sobre la variación en la forma del cuerpo de los distintos grupos. Sin embargo, los análisis finales, contemplan y filtran esa variación, por lo que los resultados representan la forma sin el efecto del tamaño sobre ella.

Podemos decir que los resultados obtenidos en este estudio van en concordancia con la hipótesis de trabajo, donde se plantea que la morfología corporal de estos individuos tiene una base genética asociada al fragmento *Mac1*. Por lo tanto, los resultados aportan información sobre una pequeña región del genoma donde es posible se encuentre algún gen que determine la forma corporal en el género *Xiphophorus*.

La forma del cuerpo en los peces influye y determina varios aspectos de su vida (eg. Chan, 2001; Johnsson 1993; Koehl, 1996; Motta et al., 1995) y en general refleja una combinación de influencias tanto genéticas como ambientales, que pueden interactuar en una variedad de formas complejas (Conover & Schultz, 1995). Los peces de éste género, que comprenden dos grupos principales y morfológicamente bastante divergentes (*platyfish* y *swordtails*), son modelos destacados para el estudio de rasgos polimórficos como el

desarrollo sexual, la reproducción, la pigmentación y el cáncer (e.g. Meierjohann y Schartl 2006; Schartl 2008). En *Xiphophorus maculatus* y en otras especies de *Xiphophorus*, muchos loci genéticos involucrados en el control de estos rasgos están ubicados en los cromosomas sexuales, donde están vinculados a la región determinante del sexo (Gutbrod y Schartl 1999). Si bien no se conocen todos los genes involucrados en el control de dichos rasgos polimórficos, en base a los resultados obtenidos en este estudio, es probable que los genes involucrados en la determinación de la morfología corporal de los peces de este género también se encuentren en los cromosomas sexuales.

A su vez, existen varios estudios que intentan dilucidar la arquitectura genética determinados caracteres fenotípicos morfológicos (eg. Peichel et al., 2001; Sharpe et al., 2008; Peichel & Marques, 2017; Kautt et al., 2020). Estos trabajos, realizados con peces –principalmente con *Gasterosteus aculeatus*– dieron como resultados principales que caracteres fenotípicos tales como la forma del cuerpo o la longitud de la columna vertebral, entre otros, tienen un fuerte componente genético. A partir del mapeo de QTL se identificaron múltiples loci ubicados en distintos cromosomas para dichos caracteres. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios recientemente citados, se puede concluir que la forma del cuerpo de los peces suele ser un carácter poligénico y distribuido en varias regiones del genoma. Aunque es probable que la forma corporal en estas especies del género *Xiphophorus* y sus híbridos también sea un carácter poligénico y distribuido en varias regiones del genoma, en concordancia con estudios anteriores (Peichel et al., 2001; Sharpe et al., 2008; Peichel & Marques, 2017; Kautt et al., 2020), los resultados obtenidos en este trabajo arrojan que en el fragmento *Mac1* podría existir al menos un gen que influye o determina la forma corporal de estos individuos. Es por esto que este trabajo aporta resultados valiosos a la hora de intentar dilucidar la base genética de la morfología corporal de los peces. El hecho de que además de los loci conocidos en esos 10 Mb de genoma, se encuentre también algún gen responsable de determinar la forma del cuerpo, es asombroso. Además, que sea una región acotada y bastante conocida y estudiada permite que sea más sencillo encontrar algún gen involucrado en la forma del cuerpo.

En definitiva, la forma corporal es una característica que condiciona un amplio espectro de aspectos de la vida de un pez, por lo que el estudio de la naturaleza de la variación morfológica en estos organismos así como en vertebrados en general, es un abordaje que aporta a muy diversas áreas de la biología. Estudiar en mayor profundidad estos organismos podría ayudar a entender un poco más sobre esta temática, incluso determinar qué gen o genes estarían afectando la forma corporal de estas especies.

Por otra parte, cabe destacar que el sistema utilizado de los peces del experimento de cruzamientos a largo plazo entre las especies *X. hellerii* y *X. maculatus* de Franchini y colaboradores (2018) permitió: (i) trabajar sobre un modelo de estudio establecido, con abundantes investigaciones en genética, biología molecular, y biología evolutiva entre otras, que brindan información, hipótesis y conocimiento técnico (ii) trabajar con individuos que no hibridizan en la naturaleza; (iii) estudiar en profundidad un fragmento de ADN reducido en cuanto a cantidad de pares de bases, con algunos genes conocidos dentro del mismo; (iv) conocer la variabilidad genética de los individuos con los que se trabajó; (v) eliminar las influencias ambientales que puedan interactuar con el genoma a la hora de determinar características fenotípicas complejas como la forma del cuerpo de los individuos, y por lo tanto realizar el estudio contemplando únicamente las variables genéticas; (vi) obtener gran variedad de combinaciones génicas acordes a la hipótesis biológica formulada para este trabajo. Es por estas razones que este sistema de híbridos aporta grandes ventajas para este estudio.

Aunque algunos estudios analizan mediante morfometría geométrica la forma corporal de *X. hellerii* (Rocamontes-Morales et al., 2021), esta es la primera vez que se estudian peces de laboratorio criados en las mismas condiciones, lo que excluye los factores externos que pueden modificar la forma corporal de los organismos (Wainwright & Reilly, 1994; Sharpe et al., 2008; Audzijonyte et al., 2020; Rocamontes-Morales et al., 2021), y permite analizar exclusivamente las variaciones de forma determinadas por el genoma de los individuos. Entre las diferencias fenotípicas reportadas en estudios anteriores entre ambas especies parentales, se destacan el tamaño, la coloración corporal y el gonopodio de los machos adultos de *X. hellerii* (e.g. Kallman & Kazianis, 2006; Meierjohann & Scharl, 2006). En base a los resultados de este trabajo, donde se comparó la forma de ambas especies parentales, se puede inferir que la forma del cuerpo de *X. hellerii* y *X. maculatus* es significativamente diferente, así como la forma de los machos y las hembras dentro de cada una de las especies.

El dimorfismo sexual reportado para estas dos especies se basa en descripciones fenotípicas sobre la aleta caudal, la coloración, tamaño o manchas en el cuerpo (e.g. Darwin, 1871, Alderton, 2012; Axelrod & Wischnat, 1991; Kallman & Kazianis, 2006, Rocamontes-Morales et al., 2021) además de diferencias comportamentales (eg. Franck & Ribowski 1993; Rosenthal & Evans, 1998). En base a mi conocimiento, este trabajo sería uno de los escasos estudios que analiza el dimorfismo sexual en estas especies en base a la morfometría geométrica. Si bien se han reportado varias diferencias fenotípicas entre ambas especies, y entre sexos dentro de cada una de ellas, según la búsqueda bibliográfica realizada, este trabajo podría ser el que analice y establezca una correspondencia entre los

caracteres fenotípicos que ya fueron mencionados por otros autores y la variación en la forma que aquí se reporta. No se han encontrado casi estudios que analicen la forma del cuerpo en estas especies, por lo tanto es difícil afirmar si dichas diferencias van en consonancia o no con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los gráficos obtenidos en la comparación de los sexos dentro de cada especie parental (Figura 8), concuerdan con los resultados del trabajo de Jacquemin y Pyron (2016), que realizaron un conjunto de pruebas para identificar posibles co-variables morfológicas en peces Cyprinidae durante el último siglo, y obtuvieron como generalidad que las hembras exhibieron regiones abdominales más profundas o distendidas en comparación con los machos. Aunque las especies de nuestro trabajo y las de Jacquemin y Pyron (2016) no pertenecen a la misma familia y no se encuentran relativamente muy emparentadas, los modelos morfológicos de dicho trabajo también identificaron relaciones de forma significativas con el tamaño corporal y la hidrología. Si bien ningún patrón describió la forma de Cyprinidae de manera consistente en todas las especies, en general surgieron varias tendencias que indican similitudes y diferencias en las contribuciones relativas de cada variable; en general, las tendencias del tamaño del cuerpo tendieron a ser similares entre los taxones: los individuos más grandes, al igual que *X. hellerii*, tendían a exhibir formas de cabeza más estrechas y los puntos de unión de la aleta caudal con el cuerpo más próximos entre sí en relación con los individuos más pequeños (Jacquemin & Pyron, 2016). Sin embargo, otra de las tendencias surgidas a partir del trabajo recientemente citado, en donde se generaliza que los individuos más grandes presentan cuerpos más profundos, no concuerda con nuestros resultados ya que es en *X. maculatus* donde encontramos formas corporales más expandidas a nivel dorso-ventral.

Por otra parte, la forma corporal entre las hembras de ambas especies parentales y la cepa G407 también es significativamente distinta. En base a los resultados obtenidos con las cuadrículas de deformación, podemos generalizar que *X. hellerii* y el G407 presentan el cuerpo más comprimido en sentido dorso-ventral y más alargado, y los individuos pertenecientes a *X. maculatus* poseen una forma corporal más comprimida en sentido anteroposterior y expandida (profunda) a nivel dorso-ventral. A su vez, se puede decir que *X. maculatus* presenta cabeza más ancha o profunda que los otros dos grupos, así como la base de la aleta dorsal más pequeña. En suma, el pedúnculo caudal en *X. maculatus* es mayor que en *X. hellerii* y G407. Además, *X. hellerii* y G407 poseen la base de la aleta anal más pequeña. Sabemos que las condiciones ambientales (temperatura, altitud, velocidad del flujo de agua) varían a lo largo de la distribución de *X. hellerii* (Miller et al., 2009), mientras que *X. maculatus* habita generalmente pequeños arroyos y masas de agua pequeñas, estancadas, de poca corriente (Kallman & Kazianis, 2006), por lo que es probable que las diferencias observadas en la forma corporal se deban a dos ecotipos

diferentes, adaptados principalmente a las condiciones hidrológicas, más específicamente a la velocidad del flujo de agua de los lugares que habitan. Nuestro trabajo podría aportar más evidencia y reforzar las hipótesis y resultados que se mencionan a continuación. Langerhans & Reznick (2010) realizaron una serie de predicciones sobre la forma del cuerpo en base a las condiciones hidrológicas, donde indican que: (i) los peces que habitan cursos de agua más rápidas y de mayor caudal -ambientes donde la selección favorece el rendimiento de natación estable- los peces deberían evolucionar a cuerpos más hidrodinámicos (fusiformes), delgados, con el pedúnculo caudal más estrecho y menores aletas caudales y anales, porque tales características reducen la resistencia; (ii) los peces deberían presentar cuerpos menos hidrodinámicos, con una mayor asignación a la parte posterior del cuerpo (e.g. pedúnculos caudales más grandes, cabezas más chicas o menos profundas) en cursos de agua más lentos y de menor caudal, donde la selección favorezca el rendimiento de natación inestable, es decir, aumentar la maniobrabilidad. Además, se han realizado numerosos estudios donde se refuerzan y comprueban estas predicciones. Por ejemplo, Langerhans y colaboradores (2003) identificaron formas corporales más fusiformes en peces neotropicales en hábitats de canales principales en comparación con hábitats de lagunas de menor caudal. Del mismo modo, Haas y colaboradores (2010) encontró que *Cyprinella* (Cyprinidae) de cuerpo más profundo son indicativas de un embalse en comparación con los hábitats ribereños. En suma, Langerhans y Reznick (2010) muestran un estudio realizado con varias especies del género *Gambusia*, familia Poeciliidae, misma familia a la que pertenecen los peces del género *Xiphophorus*. En dicho trabajo se realizó un estudio de morfometría geométrica donde se analizó la forma corporal de machos de estas especies en base a la velocidad del flujo de agua en el que habitan. Al igual que en *X. maculatus* y *X. hellerii*, *Gambusia* tienden a buscar microhábitats de flujo más lento, incluso dentro de entornos generalmente de flujo rápido; sin embargo, las especies categorizadas como de "alto flujo" navegan regularmente velocidades de agua considerablemente más fuertes que las especies incluidas en la categoría de "bajo flujo". Combinado con trabajos discutidos anteriormente, podemos decir que la velocidad del agua generalmente juega un papel importante en la evolución fenotípica de los peces. Nuestros resultados van en concordancia con las predicciones y resultados citados recientemente. El único dato que no concuerda con lo mencionado anteriormente es el hecho que *X. maculatus*, aunque habite cursos de agua más lentos, presenta la cabeza más ancha.

Por otra parte, las distancias obtenidas entre los grupos, tanto las distancias de Procrustes como las de Mahalanobis, indican que *X. hellerii* y *G407* se encuentran morfológicamente más próximas entre sí que con *X. maculatus*. Si bien el resultado es

coherente con el porcentaje genético que comparte *G407* con ambas especies parentales, que esta cepa sea distinta a *X. hellerii*, sugiere que el fragmento *Mac1* podría contener algún componente genético que determinase la forma corporal de los individuos. El fragmento génico analizado -*Mac1*- contiene cuatro loci conocidos: el locus que define la identidad del gonosoma -determinante del sexo- *SD* (Kallman, 1984), el oncogén *Xmrk* (Gordon 1927; Meierjohann & Schartl, 2006; Schartl, 2008), el locus del patrón de color rojo-amarillo *Dr* (Kallman, 1975) y el locus *P*, donde se encuentra el gen que afecta al receptor tipo 4 de melanocortina (*Mc4r*), que determina el inicio de la pubertad (Lampert et al., 2010; Volff et al., 2013).

Algunas de las cepas analizadas, poseen una mutación en *Xmrk* que genera la pérdida de función de este gen. Este cambio permite discernir si dentro del fragmento *Mac1* ese oncogén tiene un rol en particular a la hora de la determinación de la forma del cuerpo. Los resultados arrojaron que la interacción entre el efecto del oncogén *Xmrk* y la forma corporal de los individuos es positiva. Si bien el resultado sugiere que puede haber una asociación entre el oncogén y la forma corporal de los distintos grupos, no quiere decir que sea responsable de la determinación de la misma. Es difícil realizar inferencias o conclusiones de dicho resultado, sobre todo teniendo en cuenta que la distancia morfológica entre ambos grupos es bastante pequeña en magnitud, si la comparamos con las distancias obtenidas en la comparación entre pares realizada para el análisis de las especies parentales y el *G407*.

A su vez, *Xmrk* fue el único gen dentro del fragmento *Mac1* que se analizó, por lo que esa interacción positiva entre la forma del cuerpo y *Xmrk* no es concluyente y podría estar determinada o influenciada por algún otro gen que se encuentre dentro del fragmento de estudio. Dentro de los genes conocidos del fragmento, el candidato más probable a estar influenciando la forma corporal de estos individuos es el gen *Mc4r*. Se ha demostrado que el inicio de la pubertad está modulado en el locus *P* por el polimorfismo de secuencia y la variación del número de copias del gen que afecta al receptor tipo 4 de melanocortina, donde hasta 9 alelos determinan el inicio de la madurez sexual en machos y hembras, la fecundidad en hembras y el tamaño adulto en machos. Estos alelos están ubicados en el cromosoma X e Y, en una región ligada al locus determinante del sexo *SD* (Kallman, 1989; Kallman y Borkoski, 1977; Lampert et al., 2010; Schreibam et al., 1994; Volff et al., 2013). Las melanocortinas son hormonas peptídicas neuromoduladoras y se expresan principalmente en la glándula pituitaria y el sistema nervioso central. En los vertebrados, estas hormonas median sus efectos a través de la interacción con cinco tipos de proteínas acopladas a receptores G (*Mc1r-Mc5r*) y están involucradas en diversos procesos fisiológicos que incluyen la pigmentación, regulación del apetito y el peso corporal,

regulación del sistema cardiovascular, secreción glandular y función sexual entre otros (Cone 2006).

Por otra parte, en cuanto a las perspectivas de trabajo que deja este estudio, se podría decir que la principal es seguir indagando en qué gen o genes del fragmento podrían estar implicados en la determinación de la forma corporal de estas especies y sus híbridos. Con una eventual lista de genes pertenecientes al fragmento *Mac1*, sumado a la identificación y registro de mutaciones presentes en los distintos grupos de estudio, se podrían seguir realizando diversos análisis tanto morfométricos como genéticos para identificar el gen o los genes responsables de provocar cambios en la forma de estos individuos.

Una importante limitación de este estudio es el tamaño de las muestras. Si bien la cantidad de individuos analizados alcanza para realizar un estudio primario y obtener datos confiables, una mayor cantidad de peces ayudaría a aproximarnos a resultados más robustos.

5. Bibliografia

Adam, D., Dimitrijevic, N., & Scharl, M. (1993). Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science*, 259(5096), 816-819.

Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2013). A field comes of age: Geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1).

Ahuja, M. R., & Anders, F. (1976). A Genetic Concept of the Origin of Cancer, Based in Part upon Studies of Neoplasms in Fishes¹. En C. J. Dawe (Ed.), *Progress in Tumor Research* (Vol. 20, pp. 380-397). S. Karger AG.

Alderton, D. (2012). *Livebearers: Understanding guppies, mollies, swordtails and others*. Fox Chapel Publishing.

Anders, F. (1991). Contributions of the Gordon-Kosswig Melanoma System to the Present Concept of Neoplasia. *Pigment Cell Research*, 4(1), 7-29.

Audzijonyte, A., Richards, S. A., Stuart-Smith, R. D., Pecl, G., Edgar, G. J., Barrett, N. S., & Blanchard, J. L. (2020). Fish body sizes change with temperature but not all species shrink with warming. *Nature Ecology & Evolution*, 4(6), 809-814.

Axelrod, H. R., & Wischnath, L. (1991). *Swordtails and platies*. Tfh Publications Incorporated.

Beldade, P., Koops, K., & Brakefield, P. M. (2002). Developmental constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature*, 416(6883), 844-847.

Berven, K. A., Gill, D. E., & Smith-Gill, S. J. (1979). Countergradient Selection in the Green Frog, *Rana clamitans*. *Evolution*, 33(2), 609.

Bookstein, F. L. (1986). Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical science*, 1(2), 181-222.

Bookstein, F. L. (1989). Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 11(6),

567-585.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology* (1.^a ed.). Cambridge University Press.

Bookstein, F. L. (1997). Landmark methods for forms without landmarks: Morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, 1(3), 225-243.

Chan, M. D. (2001). *Fish ecomorphology: predicting habitat preferences of stream fishes from their body shape*. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Cone, R. D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine reviews*, 27(7), 736-749.

Conover, D. O., & Schultz, E. T. (1995). Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(6), 248-252.

Corti, M. (1993). Geometric morphometrics: An extension of the revolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(8), 302-303.

D'Anatro, A., & Loureiro, M. (2005). Geographic variation in *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Journal of Fish Biology*, 67(3), 849-865.

Darwin, C. (1871). *The descent of man*. New York: D. Appleton.

Douglas, M. E. (1987). An ecomorphological analysis of niche packing and niche dispersion in stream fish clades. *Community and evolutionary ecology of North American stream fishes*. University of Oklahoma Press, Norman, 144-149.

Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (2016). *Statistical shape analysis: with applications in R* (Vol. 995). John Wiley & Sons.

Dugas, M. B., Franssen, N. R., Bastille, M. O., & Martin, R. A. (2016). Morphological correlates of river velocity and reproductive development in an ornamented stream

fish. *Evolutionary ecology*, 30, 21-33.

Eklöv, P., & Svanbäck, R. (2006). Predation risk influences adaptive morphological variation in fish populations. *The American Naturalist*, 167(3), 440-452.

Fausch, K. D. (1988). Tests of Competition between Native and Introduced Salmonids in Streams: What Have We Learned? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(12), 2238-2246.

Franchini, P., Jones, J. C., Xiong, P., Kneitz, S., Gompert, Z., Warren, W. C., Walter, R. B., Meyer, A., & Scharl, M. (2018). Long-term experimental hybridisation results in the evolution of a new sex chromosome in swordtail fish. *Nature Communications*, 9(1), 5136.

Franck, D., & Ribowski, A. (1993). Dominance hierarchies of male green swordtails (*Xiphophorus helleri*) in nature. *Journal of Fish Biology*, 43(3), 497-499.

Gatz Jr, A. J. (1979). Community organization in fishes as indicated by morphological features. *Ecology*, 60(4), 711-718.

Gordon, M. (1927). The genetics of a viviparous top-minnow *Platypoecilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics*, 12(3), 253.

Gordon, M. (1931). Hereditary basis of melanosis in hybrid fishes. *The American Journal of Cancer*, 15(3), 1495-1523.

Gordon, M. (1947). Speciation in Fishes Distribution in Time and Space of Seven Dominant Multiple Alleles in *Platypoecilus maculatus*. *Advances in genetics*, 1, 95-132.

Gordon, H., & Gordon, M. (1954). Biometry of seven natural populations of the platyfish *Xiphophorus maculatus* from Central America. *Zoologica*, 39(2), 37-59.

Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, 40(1), 33-51.

Gutbrod, H., & Scharl, M. (1999). Intragenic sex-chromosomal crossovers of *Xmrk* oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in

Xiphophorus. *Genetics*, 151(2), 773-783.

Gutiérrez-Castañeda, L. D., Nova, J. A., & Tovar-Parra, J. D. (2020). Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma: A systemic review. *Melanoma research*, 30(1), 62.

Hallgrímsson, B., Jamniczky, H., Young, N. M., Rolian, C., Parsons, T. E., Boughner, J. C., & Marcucio, R. S. (2009). Deciphering the Palimpsest: Studying the Relationship Between Morphological Integration and Phenotypic Covariation. *Evolutionary Biology*, 36(4), 355-376.

Haas, T. C., Blum, M. J., & Heins, D. C. (2010). Morphological responses of a stream fish to water impoundment. *Biology letters*, 6(6), 803-806.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 59(2), S21-S26.

Hood, C. S., & Heins, D. C. (2000). Ontogeny and allometry of body shape in the blacktail shiner, *Cyprinella venusta*. *Copeia*, 2000(1), 270-275.

Jacquemin, S. J., Martin, E., & Pylon, M. (2013). Morphology of bluntnose minnow *Pimephales notatus* (Cyprinidae) covaries with habitat in a central Indiana watershed. *The American Midland Naturalist*, 169(1), 137-146.

Jacquemin, S. J., & Pylon, M. (2016). A century of morphological variation in Cyprinidae fishes. *BMC ecology*, 16, 1-18.

James, F. C. (1983). Environmental Component of Morphological Differentiation in Birds. *Science*, 221(4606), 184-186.

Johnsson, J. I. (1993). Big and brave: Size selection affects foraging under risk of predation in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Behaviour*, 45(6), 1219-1225.

Jones, J. C., Perez-Sato, J.-A., & Meyer, A. (2012). A phylogeographic investigation of the hybrid origin of a species of swordtail fish from Mexico: PHYLOGEOGRAPHY OF HYBRID ORIGIN OF A SWORDTAIL SPECIES. *Molecular Ecology*, 21(11),

2692-2712.

Kallman, K. D. (1975). The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In Handbook of genetics (pp. 81-132). Springer, Boston, MA.

Kallman, K. D. (1984). A new look at sex determination in poeciliid fishes. In Evolutionary genetics of fishes (pp. 95-171). Springer, Boston, MA.

Kallman, K. D. (1989). Genetic control of size at maturity in *Xiphophorus*. Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae), 163-184.

Kallman, K. D., & Borkoski, V. (1977). A sex-linked gene controlling the onset of sexual maturity in female and male platyfish *Xiphophorus maculatus*.

Kallman, K. D., & Kazianis, S. (2006). The Genus *Xiphophorus* in Mexico and Central America. *Zebrafish*, 3(3), 271-285.

Kang, J. H., Scharl, M., Walter, R. B., & Meyer, A. (2013). Comprehensive phylogenetic analysis of all species of swordtails and platies (Pisces: Genus *Xiphophorus*) uncovers a hybrid origin of a swordtail fish, *Xiphophorus monticolus*, and demonstrates that the sexually selected sword originated in the ancestral lineage of the genus, but was lost again secondarily. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 25.

Kautt, A. F., Kratochwil, C. F., Nater, A., Machado-Schiaffino, G., Olave, M., Henning, F., Torres-Dowdall, J., Härer, A., Hulsey, C. D., Franchini, P., Pippel, M., Myers, E. W., & Meyer, A. (2020). Contrasting signatures of genomic divergence during sympatric speciation. *Nature*, 588(7836), 106-111.

Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9(3), 428-430.

Klingenberg, C. P. (2002). Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287(1-2), 3-10.

Klingenberg, C. P. (2010). Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 623-635.

Klingenberg, C. P. (2016). Size, shape, and form: Concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226(3), 113-137.

Klingenberg, C. P., & Monteiro, L. R. (2005). Distances and Directions in Multidimensional Shape Spaces: Implications for Morphometric Applications. *Systematic Biology*, 54(4), 678-688.

Knudson Jr, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.

Koehl, M. A. R. (1996). WHEN DOES MORPHOLOGY MATTER? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 501-542.

Lampert, K. P., Schmidt, C., Fischer, P., Volff, J.-N., Hoffmann, C., Muck, J., Lohse, M. J., Ryan, M. J., & Scharl, M. (2010). Determination of Onset of Sexual Maturation and Mating Behavior by Melanocortin Receptor 4 Polymorphisms. *Current Biology*, 20(19), 1729-1734.

Langerhans, R. B., Layman, C. A., Langerhans, A. K., & Dewitt, T. J. (2003). Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological journal of the Linnean Society*, 80(4), 689-698.

Langerhans, R. B., & Reznick, D. N. (2010). Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. *Fish locomotion: an eco-ethological perspective*, 200, 248.

Langlade, N. B., Feng, X., Dransfield, T., Copsey, L., Hanna, A. I., Thebaud, C., Bangham, A., Hudson, A., & Coen, E. (2005). Evolution through genetically controlled allometry space. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29), 10221-10226.

Lu, Y., Sandoval, A., Voss, S., Lai, Z., Kneitz, S., Boswell, W., ... & Walter, R. (2020). Oncogenic allelic interaction in *Xiphophorus* highlights hybrid incompatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(47), 29786-29794.

McPeck, M. A., Shen, L., Torrey, J. Z., & Farid, H. (2008). The Tempo and Mode of Three-Dimensional Morphological Evolution in Male Reproductive Structures. *The*

American Naturalist, 171(5), E158-E178.

Meierjohann, S., & Schartl, M. (2006). From Mendelian to molecular genetics: The Xiphophorus melanoma model. *Trends in Genetics*, 22(12), 654-661.

Meyer, A., Morrissey, J. M., & Schartl, M. (1994). Recurrent origin of a sexually selected trait in Xiphophorus fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature*, 368(6471), 539-542.

Meyer, A., Salzburger, W., & Schartl, M. (2006). Hybrid origin of a swordtail species (Teleostei: Xiphophorus clemenciae) driven by sexual selection: HYBRID SPECIATION VIA SEXUAL SELECTION. *Molecular Ecology*, 15(3), 721-730.

Minelli, A. (2003). The development of animal form: ontogeny, morphology, and evolution. Cambridge University Press.

Motta, P. J., Norton, S. F., & Liem, K. F. (Eds.). (1995). *Ecomorphology of fishes* (Vol. 16). Springer Netherlands.

Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 119-127.

Patton, E. E., Mathers, M. E., & Schartl, M. (2011). Generating and analyzing fish models of melanoma. In *Methods in cell biology* (Vol. 105, pp. 339-366). Academic Press.

Peichel, C. L., Nereng, K. S., Ohgi, K. A., Cole, B. L. E., Colosimo, P. F., Buerkle, C. A., Schluter, D., & Kingsley, D. M. (2001). The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. *Nature*, 414(6866), 901-905.

Peichel, C. L., & Marques, D. A. (2017). The genetic and molecular architecture of phenotypic diversity in sticklebacks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1713), 20150486.

Powell, D. L., García-Olazábal, M., Keegan, M., Reilly, P., Du, K., Díaz-Loyo, A. P., & Schumer, M. (2020). Natural hybridization reveals incompatible alleles that cause melanoma in swordtail fish. *Science*, 368(6492), 731-736.

Raff, R. A. (2012). *The shape of life: genes, development, and the evolution of animal form*. University of Chicago Press.

Remagnino, P., Mayo, S., Wilkin, P., Cope, J., & Kirkup, D. (2017). Morphometrics: A Brief Review. En P. Remagnino, S. Mayo, P. Wilkin, J. Cope, & D. Kirkup, *Computational Botany* (pp. 11-32). Springer Berlin Heidelberg.

Reyment, R. A., Blackith, R. E., & Campbell, N. A. (1984). *Multivariate morphometrics* (Vol. 10). Academic Press.

Rocamontes-Morales, J. A., Gutiérrez-Rodríguez, C., Rios-Cardenas, O., & Hernandez-Romero, P. C. (2021). Genetic and morphological differentiation in the green swordtail fish, *Xiphophorus hellerii*: The influence of geographic and environmental factors. *Hydrobiologia*, 848(19), 4599-4622.

Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology*, 39(1), 40-59.

Rosenthal, G. G., & Evans, C. S. (1998). Female preference for swords in *Xiphophorus hellerii* reflects a bias for large apparent size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4431-4436.

Rosenthal, G. G., de la Rosa Reyna, X. F., Kazianis, S., Stephens, M. J., Morizot, D. C., Ryan, M. J., & García de León, F. J. (2003). Dissolution of Sexual Signal Complexes in a Hybrid Zone between the Swordtails *Xiphophorus birchmanni* and *Xiphophorus malinche* (Poeciliidae). *Copeia*, 2003(2), 299-307.

Ross, S. T., Matthews, W. J., & Echelle, A. A. (1985). Persistence of stream fish assemblages: effects of environmental change. *The American Naturalist*, 126(1), 24-40.

Schartl, M. (2008). Evolution of *Xmrk*: An oncogene, but also a speciation gene? *BioEssays*, 30(9), 822-832.

Schartl, M. (2014). Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human

disease. *Disease models & mechanisms*, 7(2), 181-192.

Schartl, A., Malitschek, B., Kazianis, S., Borowsky, R., & Schartl, M. (1995). Spontaneous melanoma formation in nonhybrid *Xiphophorus*. *Cancer Research*, 55(1), 159-165.

Schluter, D. (2000). Ecological character displacement in adaptive radiation. *the american naturalist*, 156(S4), S4-S16.

Schreibman, M. P., Schartl, M., Kallman, K. D., & Magliulo-Cepriano, L. (1994). Molecular approaches to study the genetic regulation of the fish reproductive system.

Sharpe, D. M., Räsänen, K., Berner, D., & Hendry, A. P. (2008). Genetic and environmental contributions to the morphology of lake and stream stickleback: implications for gene flow and reproductive isolation. *Evolutionary Ecology Research*, 10(6), 849-866.

Svanbäck, R., & Eklöv, P. (2002). Effects of habitat and food resources on morphology and ontogenetic growth trajectories in perch. *Oecologia*, 131, 61-70.

Thomas, R., & Weihua, Z. (2019). Rethink of EGFR in cancer with its kinase independent function on board. *Frontiers in Oncology*, 9, 800.

Thomas, R., & Weihua, Z. (2019). Rethink of EGFR in cancer with its kinase independent function on board. *Frontiers in oncology*, 9, 800.

Tobler, M., Palacios, M., Chapman, L. J., Mitrofanov, I., Bierbach, D., Plath, M., Arias-Rodriguez, L., García de León, F. J., & Mateos, M. (2011). EVOLUTION IN EXTREME ENVIRONMENTS: REPLICATED PHENOTYPIC DIFFERENTIATION IN LIVEBEARING FISH INHABITING SULFIDIC SPRINGS: REPLICATED EVOLUTION IN SULFIDE SPRING FISH. *Evolution*, 65(8), 2213-2228.

Todaro, G. J., & Huebner, R. J. (1972). NAS symposium: new evidence as the basis for increased efforts in cancer research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(4), 1009-1015.

Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., & Suazo Galdames, I. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la

Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977-990.

Volff, J.-N., Selz, Y., Hoffmann, C., Froschauer, A., Schultheis, C., Schmidt, C., Zhou, Q., Bernhardt, W., Hanel, R., Böhne, A., Brunet, F., Ségurens, B., Couloux, A., Bernard-Samain, S., Barbe, V., Ozouf-Costaz, C., Galiana, D., Lohse, M. J., & Schartl, M. (2013). Gene Amplification and Functional Diversification of Melanocortin 4 Receptor at an Extremely Polymorphic Locus Controlling Sexual Maturation in the Platyfish. *Genetics*, 195(4), 1337-1352.

Wainwright, P. C. (1991). Ecomorphology: Experimental Functional Anatomy for Ecological Problems. *American Zoologist*, 31(4), 680-693.

Wainwright, P. C. (1994). Functional morphology as a tool in ecological research. *Ecological morphology: integrative organismal biology*, 42, 59.

Wainwright, P. C., & Reilly, S. M. (Eds.). (1994). *Ecological morphology: integrative organismal biology*. University of Chicago Press.

Walter, R. B., & Kazianis, S. (2001). Xiphophorus interspecies hybrids as genetic models of induced neoplasia. *ILAR journal*, 42(4), 299-321.

Weinberg, S. M., Andreasen, N. C., & Nopoulos, P. (2009). Three-dimensional morphometric analysis of brain shape in nonsyndromic orofacial clefting. *Journal of Anatomy*, 214(6), 926-936.

Winston, M. R. (1995). Co-occurrence of morphologically similar species of stream fishes. *The American Naturalist*, 145(4), 527-545.

Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Mäueler, W., Raulf, F., Telling, A., Robertson, S. M., & Schartl, M. (1989). Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. *Nature*, 341(6241), 415-421.

Young, N. M., Wagner, G. P., & Hallgrímsson, B. (2010). Development and the evolvability of human limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3400-3405.

Zelditch, M. L., Donald L. Swiderski, H. David Sheets, & William L. Fink. (2004).

Geometric morphometrics for biologists: A primer (1.^a ed.). Elsevier Academic Press.