

Tesis de Maestría. PEDECIBA BIOLOGÍA. SUBÁREA ZOOLOGÍA.

Diversidad filogeográfica a múltiple escala en poblaciones de
Limnomedusa macroglossa (Anura, Alsodidae) de Uruguay

Prof. Claudia Fernández

Julio, 2016

Tesis de Maestría: Diversidad filogeográfica a múltiple escala en poblaciones de *Limnomedusa macroglossa* (Anura, Alsodidae) de Uruguay

PEDECIBA/Biología/Zoología

Autor: Prof. Claudia Fernández

Dirección de e-mail: gafe88@gmail.com

Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, UdelaR

Orientador: Dr. Arley Camargo

Co-orientador: Dr. Raúl Maneyro

Tribunal:

Dra. Susana González

Dra. Graciela García

Dra. Ivanna Tomasco

Agradecimientos

A los Doctores Arley Camargo y Raúl Maneyro por aceptarme como estudiante y permitirme aprender mucho más de lo que creí posible. Al tribunal por aceptar la corrección de este trabajo y por sus valiosos aportes. Al Dr. Jack Sites Jr. por permitir el trabajo del Dr. Arley Camargo en su Laboratorio para la extracción y secuenciación de parte del ADN utilizado aquí.

A la ANII, por la financiación de mi beca de Maestría por el proyecto Análisis de la diversidad intraespecífica a múltiple escala para Limnomedusa macroglossa (Anura, Cycloramphidae) de Uruguay; a PEDECIBA por los apoyos económicos a lo largo de este trayecto y finalmente, a CSIC por la financiación de este Proyecto en sus diferentes etapas, a través del fondo I+D 2012 (proyecto: Filogeografía Comparada de Anfibios y Reptiles del Bioma Pampa: Patrones de Diversidad Genética, Morfológica y Filogenética en las Quebradas del Norte).

A mis profesoras Msc. Gabriela Varela y María Noel López que desde sus lugares me motivaron, enseñándome a amar la Biología, la educación y el aprendizaje continuo en todas sus dimensiones.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados, pero especialmente a Gise, Nacho, Ernesto, Joaquín, Vane, Ceci, Vale y Sabri por ayudarme a transitar este camino sinuoso, por compartir sus conocimientos, por acompañarme en los muestreos y por mostrarme sus puntos de vista cuando lo necesité.

A mis amigos que siempre estuvieron apoyándome y dándome su aliento. A mi familia toda por creer en mí siempre, especialmente a mis padres que se esforzaron por darme las herramientas para continuar creciendo como estudiante, profesional pero sobre todo como persona. Finalmente, quisiera agradecer a mi soporte técnico y emocional en cada paso de este proceso, Mauri. Y a mi hija, Maia, por bancarse todas las ausencias y brindarme todo su amor cuando pasaba por momentos de crisis.

Índice

<i>Resumen</i>	6
<i>Abstract</i>	8
<i>Marco general</i>	10
<i>1.Introducción</i>	11
<i>1.1Características de los anfibios</i>	11
<i>1.2 El contexto geográfico</i>	13
<i>1.3 La especie</i>	18
<i>1.4 Hipótesis de trabajo</i>	21
<i>1.5 Objetivo general</i>	21
<i>1.6 Objetivos específicos</i>	21
<i>2. Materiales y Métodos</i>	22
<i>2.1 Sitios de muestreo y distribución</i>	22
<i>2.2 Colecta y preservación de especímenes</i>	24
<i>2.3 Procedimiento de laboratorio</i>	26
<i>3.Referencias</i>	30
<i>Anexo 1</i>	31
<i>Capítulo 1</i>	41
<i>1. Introducción</i>	42
<i>2. Metodología</i>	47
<i>2.0 Diseño de muestreo</i>	47
<i>2.1 Procedimiento de laboratorio</i>	49
<i>2.2 Red de haplotipos</i>	49
<i>2.3 Árbol filogenético</i>	50
<i>2.4 Índices de diversidad genética</i>	51

2.5 Historia demográfica.....	51
2.6 Estructuración geográfica.....	52
2.7 Diversidad filogeográfica.....	53
3. Resultados.....	55
3.1 Red de haplotipos.....	55
3.2 Árbol filogenético.....	55
3.3 Índices de diversidad genética.....	58
3.4 Historia demográfica.....	58
3.5 Estructuración geográfica.....	59
3.6 Diversidad filogeográfica.....	64
4. Discusión.....	67
5. Referencias.....	74
Anexo 2.....	82
Capítulo 2.....	90
1.Introducción.....	91
2.Metodología.....	95
3.Resultados.....	100
4.Discusión.....	105
5.Referencias.....	111
Anexo 3.....	117
Conclusiones y Perspectivas.....	118
1.Conclusiones.....	119
2.Perspectivas.....	121

Resumen

Limnomedusa macroglossa es un anfibio anuro perteneciente a un género monotípico de distribución pampeana, con adultos altamente fieles al sitio reproductivo, con escasa vagilidad y con larvas de alto potencial dispersivo a través de cursos de agua lóticos. Este trabajo tiene como objetivo analizar patrones de diversidad genética y espacial en poblaciones de *L. macroglossa*, utilizando fragmentos del gen mitocondrial citocromo b de aproximadamente 800 pares de bases. Utilizando un abordaje filogeográfico clásico y una aproximación de Genética del Paisaje, se explora la estructuración geográfica de la especie en Uruguay, con mayor énfasis en su distribución en la zona de las Quebradas del Norte. Este sitio posee una gran singularidad paisajística marcada por la vegetación dominante típica de estos paisajes así como por la escarpa basáltica y la fauna asociada a la región; además incluye al Área Protegida “Valle del Lunarejo” que ha sido catalogada como un área altamente diversa y valiosa desde el punto de vista natural, social, y económico dentro del territorio nacional. Los resultados indican que la especie presenta una moderada diversidad genética, con individuos de algunas localidades muy divergentes filogenéticamente cuya identidad taxonómica debe ser abordada con mayor profundidad en próximos estudios. Existe una gran población conformada por muchas localidades distribuidas en la ladera este de las Quebradas del Norte, y una diferenciación con poblaciones ubicadas al oeste de la misma, configurándose un posible quiebre filogeográfico en la zona. La conectividad entre cuencas a través de los cursos de agua puede producirse efectivamente por dispersión en el estadio larval, aunque no se descarta el movimiento entre parches vía terrestre por parte de los adultos. Pese a que ha sido hallado un patrón de aislamiento por distancia, dada la persistente conectividad encontrada, se ha mantenido la estabilidad poblacional así como la diversidad genética. En las Quebradas del Norte, la cuenca del Arroyo Tres Cruces (Departamento de

Tacuarembó) aparece como la mejor opción para complementar a la cuenca del Arroyo Lunarejo (Departamento de Rivera), dado su alto grado de diversidad filogenética respecto a otras. Los indicadores de diversidad filogenética utilizados aquí pueden contribuir a la priorización de otros sitios de interés para preservar en las Quebradas del Norte que complementen las unidades de conservación ya existentes.

Abstract

Limnomedusa macroglossa is a frog (Anura: Alsodidae) that belongs to a monotypical genus typical of rocky outcrops in the Pampas ecoregion. Adults appear to have strong habitat fidelity and low vagility through the open grassland, while tadpoles are expected to disperse through lotic water courses. This work aims to analyze spatial patterns of genetic diversity in populations of *L. macroglossa*, using mitochondrial cytochrome b gene fragments of approximately 800 base pairs. Using filogenetic, phylogeographic, and landscape genetics approaches, this work first explores the geographic structure of the species in Uruguay, and with a fine-grained focus across the Quebradas del Norte hills in northern Uruguay. These hills constitute a distinct landscape within the dominant Pampean grassland, which includes the “Valle del Lunarejo” Protected Area, a highly valuable area from the natural, social, and economic perspectives. The results show that *L. macroglossa* has a moderate genetic diversity, with some phylogenetically divergent individuals whose taxonomic identity should be assessed in future studies. There is a large population across the eastern slopes of the Quebradas del Norte, partially distinct from the western slope population, suggesting the occurrence of a potential phylogeographic break in the zone. Larval dispersion appears to be connecting separate major basins via the watercourses, although it is also likely that adults disperse between habitat patches by land. There is a pattern of non-stationary isolation by distance that might be the result of a stepping-stone population network among basins. The population size and the genetic diversity have remained stable through the demographic history of the species in the region. The basin of the Tres Cruces Stream appears to be the best option to complement the Lunarejo Stream's basin based on phylogenetic diversity estimates compared to other major basins of the Quebradas del Norte. These indicators represent a contribution towards prioritizing areas of interest for long-term conservation of the unique ecosystems of the Quebradas del Norte of Uruguay.

“Organisms have parents, who in turn had parents, and so on back through time. Thus, the branches in macroevolutionary trees have a substructure that consists of smaller branches and twigs, ultimately resolved as generation-to-generation pedigrees. It is through these pedigrees that genes have been transmitted, tracing the stream of heredity that is phylogeny”.

Avise, 1994

Marco general

1. Introducción general

1.1 Características de los anfibios

Los anfibios son vertebrados ectotermos anamniotas de piel delgada y permeable (Wells 2007). Las casi 7500 especies vivientes de anfibios se agrupan en tres órdenes: Caudata (salamandras), Gymnophiona (cecilias) y Anura (sapos y ranas), siendo este último el más numeroso, compuesto por unas 6500 especies (Frost, 2016). Muchas de ellas poseen estrategias de vida complejas ocupando hábitats tanto acuáticos como terrestres en sus distintas etapas de desarrollo (Whiles *et al.* 2006) aunque en general poseen poca vagilidad (Blaustein 1994). La fenología de los anfibios, así como su morfología y fisiología, son contexto-dependiente y pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales (Wells 2007). Por estas razones, los anfibios son especialmente vulnerables a alteraciones en el ambiente, tanto acuático como terrestre, ya sea por variaciones en la temperatura, las precipitaciones, o la radiación UV entre otros factores (Blaustein & Bancroft 2007). Por otra parte, ha sido señalado que estos organismos constituyen uno de los grupos de vertebrados que está experimentando las mayores tasas de extinción de sus poblaciones (Stuart *et al.* 2004).

Las principales amenazas que enfrentan los anfibios incluyen la fragmentación y pérdida de calidad del hábitat principalmente debido a su uso para cultivos agrícolas (en el Neotrópico, el 71% de las especies de anfibios anuros amenazados se ven afectadas por ello), así como la polución y la acción de patógenos (Stuart *et al.* 2008). Además, existen múltiples restricciones evolutivas relacionadas sobre todo con las características de sus historias de vida, que en conjunto repercuten en su capacidad de adaptación a cambios extremos (Blaustein & Bancroft 2007). Por otra parte, ha sido detectado que el cambio climático también afecta o bien afectará en un futuro cercano a un porcentaje importante de especies (Walther *et al.* 2002). Sin embargo, son los efectos sinérgicos de los diferentes agentes de

amenaza, así como las características propias de las especies, los que pueden desencadenar la declinación de sus poblaciones (Gardner 2001).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) tiene entre sus cometidos la evaluación del estado de conservación de las especies a nivel mundial a través del desarrollo de una serie de criterios y categorías que permiten la sistematización del conocimiento y estudio de la diversidad biológica en el planeta. En particular esta organización ha recomendado la utilización del nivel genético de biodiversidad como un factor a considerar en la determinación del estatus de conservación de las especies ya que se considera que, cuanto mayor es la diversidad genética, menor es el riesgo de extinción para la especie (McNeely *et al.* 1990). Por su parte, Reed & Frankham (2003), indican que existen dos grandes motivos para su uso como indicador de vulnerabilidad. Por un lado, la diversidad genética es importante para especies que evolucionan en ambientes cambiantes, ya que la posibilidad de adaptación se incrementa. Por otro, el grado de heterocigosidad hallada en las poblaciones está altamente asociada con el grado de endogamia que presentan las mismas. En este contexto, la inclusión de estudios genéticos de especies en peligro de extinción o potencialmente amenazadas, son cada vez más utilizados como fuente de información valiosa para determinar o corroborar su estatus de conservación, su mantenimiento en hábitats inestables y/o reconocer las potenciales vulnerabilidades de sus poblaciones (Thomsen *et al.* 2012; Shaffer *et al.* 2015; Jetz & Freckleton 2015). Particularmente, los anfibios serían más propensos que otros grupos de vertebrados a perder diversidad genética debido a sus estrategias reproductivas, las rápidas disminuciones poblacionales recientes, la fragmentación de sus hábitats y la escasa capacidad de dispersión que poseen (Allentoft & O'Brien 2010). Por estas razones, la diversidad genética resulta un buen indicador del riesgo de extinción de los anfibios, ya que por intermedio de su uso han podido inferirse fluctuaciones históricas en

poblaciones naturales, así como, delimitar unidades de conservación de forma más precisa (Shaffer *et al.* 2015).

1.2 El contexto geográfico

Olson *et al.* (2001) incluyen a Uruguay dentro de la eco-región denominada Sabanas Uruguayas que además comprende parte de la Provincia de Buenos Aires y del sur de Río Grande del Sur. Esta delimitación coincide parcialmente con lo que se conoce como Bioma Pampa, una extensión de pastizales predominantes con suelos fértiles y clima moderado, pero interrumpido en varios puntos por formaciones boscosas y serranías. Debido a sus peculiaridades, “la Pampa” ha sido explotada de forma diversa desde la llegada de las primeras poblaciones humanas hace unos 12000 años, cuando la vegetación predominante eran los pastizales (Vélez-Martin *et al.* 2014), y desde ese entonces, particularmente en Uruguay, ha ido incrementándose su fragmentación así como su conversión para uso tanto agrícola como ganadero, minero y forestal (GEO Uruguay, 2008).

En particular, Uruguay presenta una inmensa variabilidad tanto geomorfológica como biótica. Grela (2004) realizó una evaluación de la distribución de la flora en Uruguay y propuso una distinción en regiones fitogeográficas del territorio, haciendo especial hincapié en el hallazgo de dos grandes patrones bien diferenciados de distribución de especies arbóreas en el norte del país (Flora oriental), separando al oeste de Uruguay (incluyendo los Departamentos de Salto y Artigas) del Este-Noreste (Principalmente Quebradas y Cerros de Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo). Considerando especies de leñosas, Grela (2004) propone que los límites de lo que se conoce como “núcleo Misiones” y la provincia Paranaense (ambos pertenecientes al arco Pleistocénico) deberían extenderse hasta llegar a Uruguay, ya que las mismas podrían haber estado conectadas en el pasado debido a sus similitudes

florísticas. Gautreau & Lezama (2009) por su parte, encontraron que en especies leñosas distribuidas en las sierras del este y noreste de Uruguay, puede observarse un gradiente florístico-fisionómico estrechamente vinculado con las características del paisaje. Más recientemente, se ha destacado la diversidad del paisaje de las Pampas en Uruguay por una división en siete eco-regiones realizada por Brazeiro *et al.* (2012), aplicando una regionalización biótica del territorio (considerando especies leñosas así como tetrápodos). Particularmente, la zona de las Quebradas del Norte comprende dos de las regiones propuestas por Brazeiro *et al.* (2012): la Cuesta Basáltica (extensa altiplanicie de orientación norte a noroeste, que se extiende desde el departamento de Artigas hasta Durazno) y la Cuenca Sedimentaria Gondwánica (ubicada al norte y noreste del territorio, comprende gran parte de los departamentos de Cerro Largo, Durazno, Rivera y Tacuarembó) (Fig. 1). En conjunto, presentan los mayores porcentajes totales de riqueza de especies leñosas, peces, anfibios, aves, reptiles y mamíferos considerando todo el territorio nacional. Además, la Cuenca sedimentaria Gondwánica presenta una elevada tasa de especies endémicas, casi endémicas y bio-indicadoras (Brazeiro *et al.* 2012). Pese a esto, es escaso el conocimiento que se tiene de la historia de la región, por lo que no ha sido sencilla la elaboración de hipótesis para explicar tanto la distribución de la biota como los patrones filogeográficos y de diversidad en todo el Bioma Pampa.

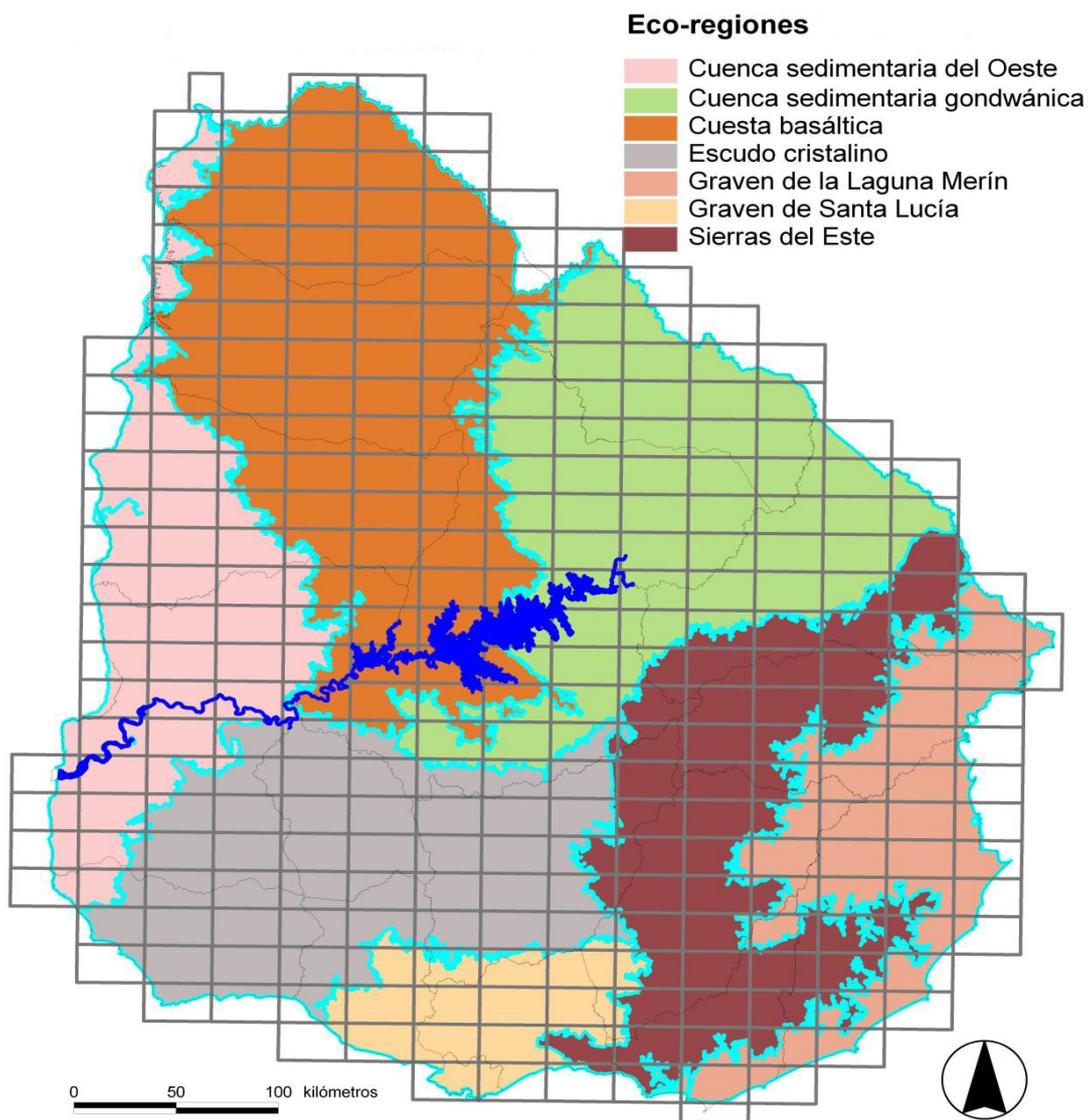


Figura 1. Delimitación de eco-regiones en Uruguay. Modificado de Brazeiro *et al.* (2012)

Las Quebradas del Norte de Uruguay quedan comprendidas en la zona conocida como zona de retroceso de la Cuesta (basáltica) (Panario 1988). Dicha cuesta ha surgido como producto del avance de la erosión provocada por los cursos de agua y la basculación evidenciada en las corrientes de lava del cretácico en la zona norte del país (Panario *et al.* 2014). De singular belleza y de alto interés cultural, paisajístico y biológico, constituye una rareza entre los pastizales predominantes del territorio nacional. Dentro de esta zona, se

encuentra el Parque Natural Regional Valle del Lunarejo, ubicado en el Departamento de Rivera próximo al límite con los Departamentos de Artigas y Tacuarembó. El mismo, presenta dentro del área varios cursos de agua, dentro de los cuales destaca la naciente del Arroyo Lunarejo. Declarada en 2001 como área protegida por el Gobierno Departamental, esta zona ha sido valorada como tal por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP, categoría V UICN, paisaje protegido) desde el año 2009, debido a su fiel representación de las Quebradas del Norte ya que, posee una gran singularidad paisajística marcada por la vegetación dominante típica de estos paisajes así como, por la escarpa basáltica y la fauna asociada a la región. Dentro de los objetivos iniciales propuestos para el manejo de esta unidad de conservación, se planteó el interés por “conservar la diversidad biológica en sus tres niveles (ecosistemas, especies y genes)”. Particularmente, presenta especies de distribución restringida y con categoría de amenaza a nivel nacional como son el sapito de Devicenzii (*Melanophryniscus devicenzii*) y la serpiente de cascabel (*Crotalus durissus terrificus*), así como otras especies de preocupación menor desde el punto de vista de la conservación, como la rana de las piedras (*Limnomedusa macroglossa*). En las proximidades, se encuentra otra “bio-región” que también ha sido de interés para la delimitación de estrategias para la conservación dadas sus características naturales, la zona “Laureles-Cañas”; en un principio se ha planteado la conformación de un Parque Natural regional que comprenda al ya protegido Valle del Lunarejo junto con la mencionada área, pero aún no ha sido posible su conformación como tal.

Según Beheregaray (2008), pese a que Sudamérica posee la mayor biodiversidad del planeta, el número de artículos vinculados con la filogeografía de esta región constituye tan solo el 6.3% del total de trabajos publicados, dentro del cual el estudio herpetológico y más específicamente el relacionado a los anfibios anuros, tiene una mínima representación. Esto se refleja en los pocos estudios filogeográficos que han sido realizados con poblaciones

uruguayas de anfibios (Langone 2013; Barrasso 2014). El uso de estos organismos como modelo para esta disciplina puede aportar no sólo al conocimiento biogeográfico de la región y de los procesos evolutivos a microescala que en ella ocurrieron, sino también mejorar nuestro entendimiento sobre los patrones de diversidad a nivel intraespecífico con potenciales aplicaciones en planes de manejo y conservación. Recientemente, se ha considerado a la Genética del Paisaje como una herramienta útil para predecir el efecto de potenciales cambios en el paisaje sobre el flujo génico entre poblaciones, a través de la construcción de escenarios futuros que impliquen modificaciones en el hábitat de una especie y la consiguiente evaluación de los patrones genéticos resultantes de las mismas (Van Strien *et al.* 2014). De esta forma, se ha convertido en un abordaje fundamental para la delimitación de áreas a preservar y el diseño de planes de manejo de poblaciones y comunidades vulnerables.

La definición de áreas a conservar ha propiciado la generación de múltiples métodos para establecer que sitios son más biodiversos y merecen por ello ser preservados. Algunos autores plantean que dada la gran variedad de aproximaciones para la evaluación de estos sitios, el volumen de información excesiva puede volverse intratable, ya que no es sencilla su integración en una única medida de resumen (Lean & Maclaurin 2016). Se hace necesario entonces, la búsqueda de características cuya presencia pueda correlacionarse con la diversidad. Faith (1992) propuso una novedosa aproximación integradora, el cálculo de lo que dio en llamar diversidad filogenética (DF), como una medida general de la biodiversidad de un sitio ya que considera el proceso evolutivo que causa la diversidad morfológica y funcional de linajes, sin necesidad de medir ambas diversidades de forma directa (Lean & Maclaurin 2016). Faith (2016) ha señalado recientemente que entre las aplicaciones de este índice de diversidad destaca la posibilidad de identificar lugares clave para la conservación de la biodiversidad de importancia global (considerando especies, haplotipos o poblaciones). Por otra parte, en un contexto filogenético, la distinción evolutiva ("evolutionary

distinctiveness"; ED) es una forma viable para definir y ordenar por prioridad áreas a conservar, tomando en cuenta la historia de cada taxa presente en la región (Miranda Esquivel 2016). A nivel filogeográfico, Moritz & Faith (1998) extendieron este concepto al nivel intraespecífico considerando los patrones genealógicos entre múltiples especies codistribuidas para priorizar áreas que tienen un alto componente de la diversidad genealógica dentro de especies.

Esta tesis pretende aportar elementos para la identificación y priorización de unidades de conservación y proveer información de base para el desarrollo de planes de manejo para las áreas protegidas (creadas o en proceso de creación), en particular en la zona de las Quebradas del Norte, en donde el muestreo fue más intenso. En dicha zona se encuentra el Paisaje Protegido Valle del Lunarejo, que integra el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, por lo que podrá llevarse adelante una comparación entre las áreas en donde se realizó un muestreo denso y homogéneo para comparar la diversidad genética que existe en esta cuenca con la de otras cuencas de las Quebradas del Norte.

1.3 La especie

Limnomedusa macroglossa (Duméril & Bibron 1841) es un anfibio anuro perteneciente a la familia Alsodidae, una familia sudamericana que incluye también a los géneros *Alsodes* y *Eupsophus* (Fig. 2). El género *Limnomedusa* es monotípico, ya que se encuentra conformado por una única especie, endémica de ambientes con suelos superficiales de la región pampeana. Se distribuye en el sur de Brasil, noreste argentino y sureste paraguayo mientras que en Uruguay habita prácticamente en todo el país (Maneyro & Carreira 2012) (Fig. 3), casi exclusivamente en ambientes pedregosos asociados a cursos de agua lóticos, tanto en cuchillas como planicies o sierras (Gudynas & Gerhau 1981). La especie se encuentra presente en todo el territorio nacional pero su distribución es parcheada



Figura 2. Ejemplar adulto de la especie *Limnomedusa macroglossa*. Fotografía: Ernesto Elgue



Figura 3. Mapa de distribución de la especie *Limnomedusa macroglossa*. Fuente: amphibiaweb.org

debido a su alta fidelidad al hábitat y su presumible escasa vagilidad (Gudynas & Gehrau 1981). Ha sido propuesto que sus larvas suelen hallarse en zonas bajas debido a que luego de fuertes lluvias, podría ocurrir la transferencia de huevos recién puestos desde zonas altas (Gudynas & Gehrau 1981). De esta manera, la conectividad entre las poblaciones o subpoblaciones de *L. macroglossa* estaría dada por la dispersión durante el período larvario entre los cuerpos de agua reproductivos.

La especie ha sufrido varios cambios en su clasificación taxonómica a lo largo de los años; inclusive fue sinonimizada a *Limnomedusa macroglossa*, una especie inicialmente conocida como *Limnomedusa misionis* de Argentina (Barrio 1971). Aunque se ha incrementado sobre todo el conocimiento de su biología reproductiva (Gudynas & Gehrau 1981; Langone & Prigioni 1985; Kaefer *et al.* 2009), existen en general pocas publicaciones que traten sobre otros aspectos de su historia natural.

Desde el punto de vista de su estatus de conservación, *L. macroglossa* se encuentra en la categoría de preocupación menor, tanto a nivel mundial (Silvano *et al.* 2004) como nacional (Carreira & Maneyro 2015). Sin embargo, la especie tiene una alta fidelidad a los suelos superficiales, sitios que han experimentado recientemente un significativo cambio ambiental debido al avance de la forestación, y en la actualidad también de la minería (GEO Uruguay 2008). La especie se encuentra catalogada como críticamente amenazada en la Estado de Paraná (Brasil) (De Patta Pillar & Lange 2014), así como es considerada en peligro de extinción en Paraguay (Carreira & Maneyro 2015); de todas formas, en base a su distribución modelada a futuro y a diferencia de lo que ocurriría en otras especies de anfibios anuros, se espera que sus poblaciones permanezcan relativamente estables ante el cambio climático en el territorio uruguayo (Toranza *et al.* 2013).

1.4 Hipótesis de trabajo

(1) En los anfibios que poseen alta fidelidad al hábitat, las cuencas hidrográficas pueden ser determinantes de la estructura genética de las poblaciones.

(2) *Limnomedusa macroglossa* presenta distribución parcheada y puede mantener conectadas a sus poblaciones a través de los cursos de agua, ya que sus larvas son acuáticas y presentan alta capacidad de dispersión.

(3) La estructura del paisaje puede influir en la conectividad entre poblaciones, impidiendo o favoreciendo la dispersión de los individuos.

1.5 Objetivo general

Describir patrones de diversidad intraespecífica en *Limnomedusa macroglossa* de Uruguay a distintas escalas geográficas y explorar su asociación con variables del hábitat y del clima.

1.6 Objetivos específicos

(1) Estimar la estructura poblacional y los niveles de flujo génico entre poblaciones a diferentes escalas espaciales (p. ej. localidades, entre cuencas y dentro de cuencas).

(2) Comparar la estructuración genética con la variación de parámetros ambientales importantes para la especie.

(3) Evaluar si la estructuración genética de la especie está influenciada por su uso de hábitat.

(4) Delimitar unidades de conservación y/o manejo y evaluar la diversidad filogenética entre áreas protegidas y no protegidas de las Quebradas del Norte de Uruguay.

2. Materiales y Métodos

2.1 Sitios de muestreo y distribución

La especie se halla ampliamente distribuida en Uruguay, pero por lo general asociada a cuerpos de agua lóticos cercanos a sierras, planicies o pedregales (Figs. 4 y 5). Para esta tesis se seleccionaron sitios dentro del paisaje Quebradas del Norte del Uruguay, ya que ese ambiente representa un escenario ideal para poner a prueba las hipótesis sobre la estructuración por cuencas hidrográficas debido al grado de aislamiento que ocurre por la altura y la pendiente del terreno. Además, los cuerpos de agua de estas sierras son ambientes ideales para el hábitat de la especie y aseguran un buen muestreo espacial dada la abundancia de la especie en la zona. También se añadieron puntos de muestreo al sur del Río Negro y una muestra de Misiones (Argentina) para tener una visión más global de la variabilidad y la estructuración genética en el rango de distribución de la especie.

Los sitios se seleccionaron utilizando por un lado imágenes satelitales obtenidas a través de las herramientas Google Earth y Google Maps, así como mapas departamentales (disponibles en la página web del Instituto Nacional de Estadística) y el software libre QGIS 2.0.1 (QGIS Development Team, 2009). Para ello se consideraron las cercanías a cuerpos de agua y pedregales, así como la existencia de caminos que permitieran allegarse a los puntos seleccionados. Adicionalmente, en el sur, se tuvieron en cuenta también datos de colectas científicas previas para la especie.



Figura 4. Área de muestreo en el Arroyo Laureles (Departamento de Tacuarembó).



Figura 5. Área de muestreo en el Arroyo del Penitente (Departamento de Lavalleja).

El área de estudio comprende entonces las cuencas ubicadas en las Quebradas del Norte, en los Departamentos de Rivera, Tacuarembó, Artigas y Salto (Fig. 6), y puntos representativos al sur del Río Negro, en los Departamentos de Cerro Largo, San José, Maldonado y Lavalleja. Los muestreos se efectuaron entre los meses de Octubre de 2013 a Marzo del 2014 y de Noviembre del 2014 a Febrero del 2015.

2.2 Colecta y preservación de especímenes

Se colectaron manualmente tanto de día como de noche, adultos, juveniles y larvas que fueron capturados y colocados en frascos debidamente identificados y acondicionados (con número o código), marcando en GPS la localización del punto muestreado. En total se colectaron 150 individuos, pertenecientes a 49 localidades diferentes en Uruguay (Anexo 1, Tabla 1). Para este estudio y siguiendo el criterio propuesto por Slatkin & Maddison (1989) se procuró incluir al menos dos individuos por localidad, con el fin de lograr una adecuada evaluación de la variación genética y el flujo génico entre poblaciones, considerando además la estimación de que los adultos son altamente fieles al hábitat y por tanto, una muestra pequeña podría ser igualmente representativa de cada localidad.

La eutanasia de los animales se realizó utilizando el anestésico Tiopental sódico (0.5 a 10 ml. de solución 0.25 g/l), suministrado mediante inyección intraperitoneal en sobredosis (proporción acorde al tamaño y características del individuo), siguiendo un protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), puesto en práctica bajo la habilitación correspondiente (acreditación personal categoría B vigente, expedida por la CHEA) y bajo la supervisión del co-director de tesis (Dr. Raúl Maneyro) que también posee la acreditación así como los permisos de colecta necesarios.

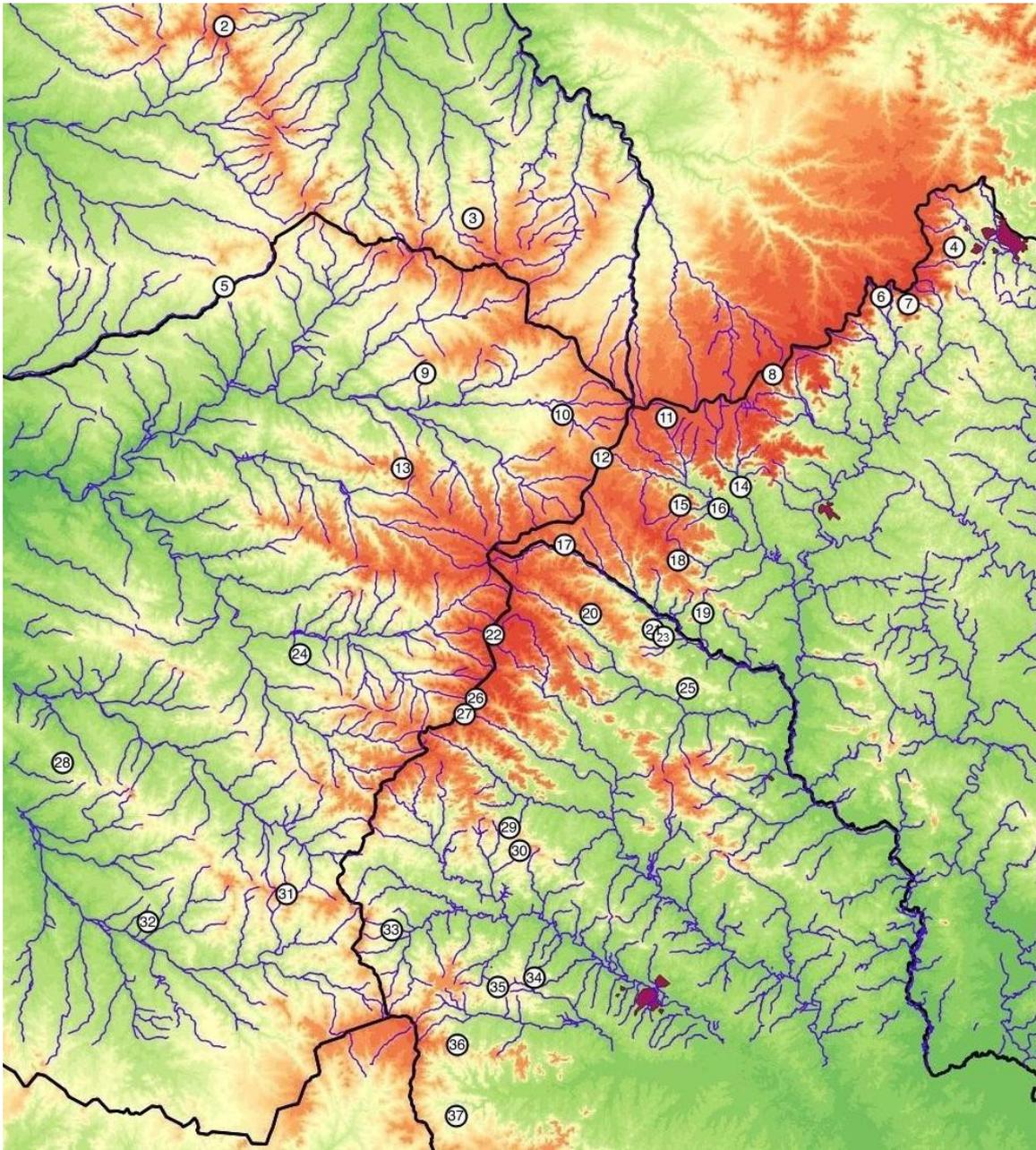


Figura 6. Localidades muestreadas en la zona de las Quebradas del Norte de Uruguay (Departamentos de Tacuarembó, Rivera, Salto y Artigas). En azul aparecen los cursos de agua y en rojo las áreas de mayor elevación.

Se realizaron disecciones parciales de los ejemplares, para obtener sus tejidos (principalmente muscular y hepático), los cuales se conservaron en etanol 95%, junto con el código previamente asignado en la colecta. Los animales fueron fijados con formol al 10% y

conservados en etanol 70% para la posterior toma de medidas morfométricas en el laboratorio. Los ejemplares se encuentran depositados en la colección científica de Facultad de Ciencias (ZVC-B) y del Centro Universitario de Rivera (CURC-B) (Anexo 1, Tabla 1).

2.3 Procedimiento de laboratorio

El ADN fue extraído utilizando el kit comercial Quick-gDNATMMiniPrep (Zymo Research Corp.). Se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo *b* de localización cercana al extremo 3', para una muestra representativa del total de ejemplares disponibles. Para amplificar este fragmento se utilizaron los oligonucleótidos MVZ15 (Moritz *et al.* 1992) y CB3Xen (Palumbi *et al.* 1991) diseñados para anfibios. Las reacciones de PCR se realizaron incluyendo en cada caso controles negativos, empleando Taq DNA polimerasa (Tiangen) en un termociclador Arktik (ThermoScientific) y siguiendo un protocolo que incluye una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, y luego, 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 52°C durante 45 segundos, 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para verificar el resultado del PCR, los productos de la amplificación fueron sometidos a corridas electroforéticas en gel de agarosa (0,7 %) al que se le añadió la tinción GoodView (SBS Genetech) para su posterior visualización en un transiluminador UV. Se descartaron para la secuenciación aquellas muestras que mostraron bandas secundarias en la misma. Finalmente, se purificaron los productos utilizando el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research Corp.).

Debido a que los oligonucleótidos universales de PCR utilizados en anfibios para amplificar el gen mitocondrial citocromo *b* (MVZ15 y CB3Xen) tuvieron limitado éxito en *Limnomedusa*, se procedió a diseñar nuevos oligonucleótidos y evaluar su efectividad para amplificar este gen en las muestras analizadas en esta tesis. En primer lugar se descargaron

desde GenBank secuencias completas del gen citocromo *b* para varios representantes de la familia Alsodidae que incluye *Eusophus*, *Alsodes* y *Limnomedusa* (Frost 2016). Las secuencias descargadas y sus números de acceso en GenBank fueron: *Alsodes gargola* (JX564852), *Alsodes verrucosus* (JX203977), *Alsodes vanzolini* (JX203974), *Eusophus emiliopugini* (JX203988), *Eusophus calcaratus* (JX203983), y *Limnomedusa macroglossa* (AY843935).

Las secuencias fueron alineadas con Clustal X (Larkin *et al.* 2007) y se buscaron regiones del alineamiento con un alto grado de similitud entre todas las especies. En el alineamiento obtenido de 1.090 pb, se encontraron cuatro regiones conservadas que fueron seleccionadas como potenciales oligonucleótidos: MVZ15Als, CB3Als, CB3Als2, y CB3XenAls (Anexo 1, Fig. 1). El MVZ15Als se ubica en la misma región y tiene la misma dirección que el MVZ15 (entre las posiciones 65 y 86 del alineamiento) pero difiere en algunas bases que complementan de mejor forma con la única secuencia disponible para el extremo 5' del alineamiento (*A. gargola*). El oligonucleótido en dirección reversa CB3XenAls se encuentra entre las posiciones 886 y 908 del alineamiento, casi en la misma región que el oligonucleótido CB3Xen, pero complementando mejor las secuencias disponibles de *Alsodes* y *Eusophus* (Anexo 1, Fig. 1). Los oligonucleótidos CB3Als y CB3Als2 también son reversos y se aparean en el final del alineamiento en las posiciones 1.025 y 1.090 (Anexo 1, Fig. 1).

Se utilizó la aplicación en línea PCR Primer Stats para evaluar las propiedades y la utilidad potencial de los oligonucleótidos en PCR (Tabla 1). Todos los oligonucleótidos pasaron las pruebas de utilidad para PCR aplicados: repetición de nucleótidos simples, repetición de dinucleótidos, número de nucleótidos (entre 15 y 30 pares de bases), %GC (porcentaje de Guanina- Citosina de la secuencia), Tm (temperatura de disociación similares,

en la cual el 50% del oligonucleótido se encuentra dissociado y el otro 50% unido a su secuencia diana), auto-apareamiento (evitando que los extremos del oligonucleótido incluyan guanina o citosina, así como otras interacciones moleculares), y formación de horquilla (sin generación de zonas sin apareamiento de bases nitrogenadas).

Tabla 1. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados. Tm: temperatura de fusión.

“Primer”	Secuencia	%GC	Tm
MVZ15Als	AACTAATGGCCCCCATWWTACG	45	60.3
CB3XenAls	GCGTARGCRAAKARRAARTAYCA	26	54.0
CB3Als	CGRAARATAAGRSTTCGTTG	30	52.3
CB3Als2	TCCTCCGATTCARGTRAG	44	51.6

Para evaluar la eficiencia de los nuevos oligonucleótidos diseñados, se realizaron reacciones de amplificación por PCR con las mismas condiciones utilizadas con los oligonucleótidos universales. Se eligieron dos individuos de este estudio (PQDN 27 y PQDN 199) para comparar la eficiencia de todas las combinaciones entre los dos oligonucleótidos hacia adelante (MVZ15 y MVZ15Als) y con los oligonucleótidos reversos (CB3Als, CB3Als2, y CB3XenAls). Se utilizaron los mismos reactivos y protocolos para PCR y electroforesis de geles descritos en la metodología de esta tesis.

Los resultados de los PCR visualizados en geles de electroforesis muestran la amplificación exitosa de las dos muestras de *L. macroglossa* para tres combinaciones: (1) MVZ15 y CB3XenAls (aprox. 800 pb), (2) MVZ15Als y CB3Als (aprox. 920 pb), y (3) MVZ15Als y CB3XenAls (aprox. 980 pb) (Anexo 1, Fig. 2). Se seleccionó la combinación del oligonucleótido universal MVZ15 con el oligonucleótido nuevo CB3XenAls como la que generó la mejor calidad de bandas de amplificación. Los fragmentos fueron secuenciados con el oligonucleótido CB3XenAls y luego alineados al alineamiento de Alsodidae. El

alineamiento final no muestra ninguna inserción o delección de bases y fueron traducidas completamente a proteínas, sugiriendo un marco de lectura abierto para todas las secuencias generadas, y por lo tanto, confirmando la amplificación del gen mitocondrial citocromo *b*. Posteriormente, la mayor parte de las muestras de *L. macroglossa* de esta tesis fueron amplificadas con los oligonucleótidos MVZ15 y CB3XenAls para completar las secuencias ya obtenidas con la combinación original entre MVZ15 y CB3Xen.

Las muestras resultantes se secuenciaron utilizando entonces oligonucleótidos en ambas direcciones, en el servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo y en Macrogen (<http://www.macrogen.com>). Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y las secuencias se editaron y alinearon manualmente con el software ProSeq3 (Filatov 2009). Una vez realizadas las correcciones, todas las secuencias se alinearon utilizando el programa Mega6 (Tamura *et al.* 2013), bajo la modalidad ClustalW (Sievers *et al.* 2011) dejándolas de un largo de 764 bases. Una vez realizadas las publicaciones de este trabajo, las secuencias serán depositadas a GenBank.

3. Referencias

Allentoft M. & J. O'Brien (2010). Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity* 2010, 2: 47-71.

Barrasso D. (2014). Estructura poblacional y filogeografía de *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* (Amphibia: Anura). Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Barrio A. (1971). Sobre la coespecificidad de *Limnomedusa misionis* Schmidt y *Limnomedusa macroglossa* (Duméril et Bibron) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 30: 667–672.

Beheregaray L. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754-3774.

Blaustein A., Wake D. & W. Sousa (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, 8: 60–71.

Blaustein A. & B. Bancroft (2007). Amphibian Population Declines: Evolutionary Considerations. *BioScience*, 57(5): 437 – 444.

Brazeiro A., Panario D., Soutullo A., Gutierrez O., Segura A. & y P. Mai (2012). Clasificación y delimitación de las eco-regiones de Uruguay. Informe Técnico. Convenio MGAP/PPR – Facultad de Ciencias/Vida Silvestre/ Sociedad Zoológica del Uruguay/CIEDUR. 40p.

Carreira, S. & R. Maneyro (2015). Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de

los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.

De Patta Pillar V. & O. Lange (2014). Os campos do sul. UFRGS, Porto Alegre. 192 p.

Faith D. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61: 1-10.

Faith D. (2016). The PD Phylogenetic Diversity Framework: Linking Evolutionary History to Feature Diversity for Biodiversity Conservation. En: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis.* Ed.: Roseli Pellens & Philippe Grandcolas. Springer.

Filatov D.A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, 25: 3189-3190.

Frost, D. (2016). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (7 de julio del 2016). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Gardner T. (2001). Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation*, 24 (2): 25-44.

Gautreau P. & F. Lezama (2009). Clasificación florística de los bosques y arbustales de las sierras del Uruguay. *Ecología Austral*, 19: 81-92.

GEO Uruguay (2008). Informe del Estado del Ambiente. CLAES, PNUMA, DINAMA.

Grela I. (2004). Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Opción Botánica, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Gudynas E. & A. Gerhau (1981). Notas sobre la distribución la ecología de *Limnomedusa macroglossa* (Duméril & Bibron, 1841) en Uruguay (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia (Série Zoologia)*, 60: 81-99.

Jetz W. & R. Freckleton (2015). Towards a general framework for predicting threat status of data-deficient species from phylogenetic, spatial and environmental information. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B*, 370: 1- 10.

Kaefer I., Both C. & S. Zanini Cechin (2009). Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura:Cycloramphidae) in southern Brazil. *Journal of Natural History*, 43(19–20): 1195–1206.

Langone J. & C. Prigioni (1985). Observaciones sobre una puesta de *Limnomedusa macroglossa* (Anura:Leptodactylidae). *Actas de las Jornadas Zoológicas del Uruguay*, 1:83–86.

Langone J. (2013). Filogeografía de *Pseudopalodicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.

Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. & D. Higgins (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.

Lean C. & J. Maclaurin (2016). The Value of Phylogenetic Diversity. En: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Ed.: Roseli Pellens & Philippe Grandcolas. Springer.

Miranda Esquivel D. (2016). Support in Area Prioritization Using Phylogenetic Information. En: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Ed.: Roseli Pellens & Philippe Grandcolas. Springer.

Moritz C., Schneider C. & D. Wake (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41:273-291.

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

Olson D., Dinerstein E., Wikramanayake E., Burgess N., Powell G., Underwood E., D'amico J., Itoua I., Strand H., Morrison J., Loucks C., Allnutt T., Ricketts T., Kura Y., Lamoreux J., Wettengel W., Hedao P. & K. Kassem (2001). Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience*, 51(11): 933-938.

Palumbi S., Martin A., Romano S., Mcmillan W., Stice L. & G. Grabowski (1991). *The simple fool's guide to PCR, version 2.0*. University Hawaii, Honolulu.

Panario D. (1988). Geomorfología del Uruguay, Propuesta de un marco estructural y un esquema de evolución del modelado del relieve uruguayo. Departamento Publicaciones - Facultad de Humanidades y Ciencias, UdelaR, Montevideo. 32 p. (Avances de Investigación).

Panario D., Gutiérrez O., Sánchez Bettucci L., Peel E., Oyhançabal P. & J. Rabassa (2014). Ancient Landscapes of Uruguay. En: *Gondwana Landscapes in southern South America. Argentina, Uruguay and southern Brazil*. Ed.: Jorge Rabassa & Cliff Ollier. Springer.

QGIS Development Team (2009). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL <http://qgis.osgeo.org>

Reed D. & R. Frankham (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17(1): 230–237.

Shaffer H., Gidis M., McCartney-Melstad E., Neal K., Oyamaguchi H., Tellez M. & E. Toffelmier (2015). Conservation Genetics and Genomics of Amphibians and Reptiles. *Annual Review of Animal Bioscience* 2015. 3:23.1–23.26.

Sievers F., Wilm A, Dineen D., Gibson T., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. & D. Higgins (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7: 539.

Silvano D., García P., Kwet A., Segalla M., Langone J. & D. Baldo (2004). *Limnomedusa macroglossa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57176A11580028>. Revisado el 04 Abril 2016.

Slatkin M. & W. Maddison (1989). A Cladistic Measure of Gene Flow Inferred from the Phylogenies of Alleles. *Genetics*, 123: 603-613.

Stuart, S., Chanson J., Cox N, Young B., Rodrigues A., Fischmann D. & R. Waller (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.

Stuart S., Hoffmann M., Chanson J., Cox N., Berridge R., Ramani P., & B. Young (2008). *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, Virginia, USA.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Thomsen P., Kielgast J., Iversen L., Wiuf C., Rasmussen M., Gilbert M., Orlando L. & E. Willerslev (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 2565–2573.

Toranza C., A. Brazeiro & R. Maneyro (2013). Efectos del Cambio Climático sobre Biodiversidad: El caso de los anfibios de Uruguay. Pp. 35-50. En: Picasso V., G. Cruz, L. Astigarraga & R. Terra (Eds.): *Cambio y variabilidad climática: Respuestas Interdisciplinarias*. Espacio Interdisciplinario. Montevideo.

Van Strien M., Keller D., Holderegger R., Ghazoul J., Kienast F. & J. Bolliger (2014). Landscape genetics as a tool for conservation planning: predicting the effects of landscape change on gene flow. *Ecological Applications*, 24(2): 327–339.

Vélez-Martin E., Rocha C., Blanco C., Oliveira B., Hasenack H. & V. De Patta Pillar (2014). Capítulo 12: conversão e fragmentação. En: *Os campos do sul*. Ed.: Valério De Patta Pillar & Omara Lange. UFRGS, Porto Alegre. 192 p.

Walther G., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T., Fromentin J., Hoegh-Guldberg O. & F. Bairlein (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416: 389-395.

Wells K. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. 1º Edición. The University of Chicago Press.

Whiles M., Lips K., Pringle C., Kilham S., Bixby R., Brenes R., Connelly S., Colon-Gaud J., Hunte-Brown M., Huryn A., Montgomery C. & S. Peterson (2006). The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1): 27–34.

Anexo 1

Tabla 1. Individuos de *Limnomedusa macroglossa* utilizados para los análisis filogeográficos. En gris aparecen los dos ejemplares que se excluyeron para la mayoría de los análisis. Aquellos que se utilizaron para la aplicación del AMOVA, fueron posteriormente asignados a una localidad de acuerdo a la similitud lo más precisa posible de sus coordenadas geográficas. Se especifica en la columna “Medición” aquellos individuos a los que fue posible tomarles medidas morfométricas.

ACRÓNIMO	DEPARTAMENTO	CUENCA	LATITUD	LONGITUD	MEDICIÓN
PQDN 1	Rivera	Lunarejo	-31.187389	-55.948306	Si
PQDN 2	Tacuarembó	De las Cañas	-31.383868	-55.937189	Si
PQDN 3	Tacuarembó	De las Cañas	-31.383868	-55.937189	Si
PQDN 6	Tacuarembó	De las Cañas	-31.383644	-55.937342	Si
PQDN 7	Tacuarembó	De las Cañas	-31.383293	-55.937173	Si
PQDN 8	Tacuarembó	De las Cañas	-31.384056	-55.937216	Si
PQDN 21	Tacuarembó	De las Cañas	-31.3836	-55.937116	Larva
PQDN 22	Tacuarembó	De las Cañas	-31.3836	-55.937116	Larva
PQDN 23	Tacuarembó	De las Cañas	-31.3836	-55.937116	Larva
PQDN 24	Rivera	Lunarejo	-31.246939	-55.951008	Si
PQDN 25	Rivera	Lunarejo	-31.246939	-55.951008	Si
PQDN 27	Rivera	Lunarejo	-31.24676	-55.951045	Si
PQDN 43	Rivera	Laureles	-31.302764	-55.919315	larva
PQDN 45	Tacuarembó	Laureles	-31.32859	-55.967853	larva
PQDN 46	Tacuarembó	Laureles	-31.321135	-55.979993	larva
PQDN 47	Tacuarembó	Laureles	-31.321135	-55.979993	larva
PQDN 48	Tacuarembó	Laureles	-31.321135	-55.979993	larva
PQDN 49	Tacuarembó	Laureles	-31.321135	-55.979993	larva
PQDN 52	Tacuarembó	Laureles	-31.231378	-56.091165	Si
PQDN 53	Tacuarembó	Laureles	-31.231378	-56.091165	Si
PQDN 55	Tacuarembó	Laureles	-31.231378	-56.091165	Si
PQDN 56	Tacuarembó	De las Cañas	-31.304409	-56.058552	Si
PQDN 57	Tacuarembó	De las Cañas	-31.304672	-56.058542	Si

PQDN 94	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.533773	-56.156813	Si
PQDN 141	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	Si
PQDN 142	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	Si
PQDN 143	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	Si
PQDN 144	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	Si
PQDN 145	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	Si
PQDN 146	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412821	-56.211557	Si
PQDN 193	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.32815	-56.177571	Si
PQDN 194	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.32815	-56.177571	Si
PQDN 196	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.32815	-56.177571	Si
PQDN 197	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.32815	-56.177571	Si
PQDN 199	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.32815	-56.177571	Si
PQDN 225	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.694423	-56.124028	Si
PQDN 226	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.694423	-56.124028	Si
PQDN 237	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.55925	-56.143444	Si
PQDN 253	Tacuarembó	Tambores	-31.766552	-56.218975	Si
PQDN 268	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.704677	-56.168827	Si
PQDN 269	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.704677	-56.168827	Si
PQDN 285	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	-31.644083	-56.301694	Si
PQDN 316	Rivera	Tacuarembó	-30.962817	-55.703867	Si
PQDN 317	Rivera	Tacuarembó	-30.962817	-55.703867	Si
PQDN 322	Rivera	Tacuarembó	-30.962817	-55.703867	Si
PQDN 327	Rivera	Tacuarembó	-31.047167	-55.836517	Si
PQDN 328	Rivera	Tacuarembó	-31.047167	-55.836517	Si
PQDN 343	Tacuarembó	Tacuarembó chico	-31.558806	-56.143639	Larva criada en laboratorio
PQDN 344	Tacuarembó	Tacuarembó chico	-31.558806	-56.143639	Larva criada en laboratorio

PQDN 354	Lavalleja	Santa Lucía	-34.409894	-54.886417	no
PQDN 409	Artigas	Cuareim	-30.88287	-56.20686	Si
PQDN 411	Artigas	Cuareim	-30.52418	-56.51335	Si
PQDN 412	Artigas	Cuareim	-30.67911	-56.51334	Si
PQDN 414	Artigas	Cuareim	-30.67911	-56.51334	Si
PQDN 418	Artigas	Arapey	-30.95684	-56.51189	Si
PQDN 419	Artigas	Arapey	-30.95684	-56.51189	Si
PQDN 420	Salto	Arapey	-31.04859	-56.2642	Si
PQDN 421	Salto	Arapey	-31.04859	-56.2642	Si
PQDN 425	Salto	Arapey	-31.15043	-56.29138	Si
PQDN 426	Salto	Arapey	-31.15043	-56.29138	Si
RML 2576	Cerro Largo	Yaguarón	-32.13216	-53.73367	?
RML 2666	Rivera	Cuñapirú	-30.9088	-55.61486	Si
RML 2667	Rivera	Cuñapirú	-30.9088	-55.61486	Si
RML 2668	Rivera	Cuñapirú	-30.9088	-55.61486	Si
RML 2696	Rivera	Lunarejo	-31.094367	-55.966331	Si
RML 2697	Rivera	Lunarejo	-31.094367	-55.966331	Si
RML 2699	Rivera	Lunarejo	-31.094367	-55.966331	Si
RML 2722	Rivera	Lunarejo	-31.137392	-56.045823	Si
RML 2723	Rivera	Lunarejo	-31.137392	-56.045823	Si
RML 2734	Rivera	Lunarejo	-31.190479	-55.901291	Si
RML 2736	Rivera	Lunarejo	-31.190688	-55.90164	Si
RML 2737	Rivera	Lunarejo	-31.167248	-55.873827	Si
RML 2739	Rivera	Lunarejo	-31.187389	-55.948306	Si
RML 2740	Rivera	Lunarejo	-31.187389	-55.948306	Si
RML 2744	Rivera	Lunarejo	-31.190698	-55.90163	Larva
RML 2745	Rivera	Lunarejo	-31.187385	-55.948057	Larva
RML 2769	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.412848	-56.212814	larva
RML 2773	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.395993	-56.199046	Larvas
RML 2776	Tacuarembó	Tres Cruces	-31.449517	-56.263167	larva
CURC-B 69	Rivera	Tacuarembó	-30.96986667	-55.66975	no

CURC-B 70	Rivera	Tacuarembó	-30.96986667	-55.66975	no
CURC-B 88	Tacuarembó	Tambores	-31.842403	-56.219946	no
CURC-B 89	Tacuarembó	Tambores	-31.842403	-56.219946	no
CURC-B 240	Salto	Arapey	-34.092389	-56.095083	no
CURC-B 252	Salto	Arapey	-31.63716	-56.60358	no
ZVC-B 23301	Lavalleja	Santa Lucía	-34.373028	-55.053361	Larva
ZVC-B 23340	San José	Santa Lucía	-34.04514	-56.8922	Si
ZVC-B 23341	Salto	Arapey	-31.60659	-56.43186	Si
ZVC-B 23342	Salto	Arapey	-31.34989	-56.41685	Si
ZVC-B 23347	Salto	Arapey	-31.60659	-56.43186	Si
ZVC-B 23348	Salto	Arapey	-31.46705	-56.71	Si



Figura 1. Regiones del alineamiento de secuencias de citocromo b para especies de Siphonophora mostrando las posiciones de apareamiento de los oligonucleótidos MVZ15, MVZ15AIs, CB3XenAIs, CB3AIs, y CB3AIs2.

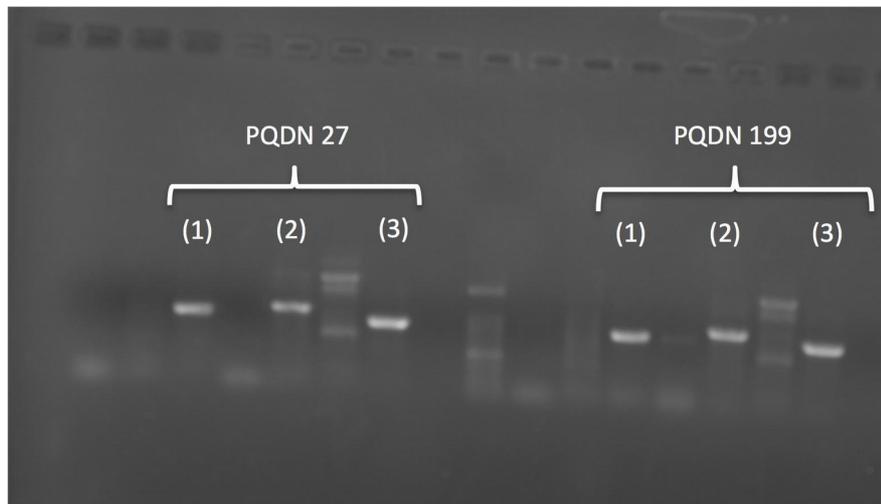


Figura 2. Foto de la electroforesis de las reacciones de PCR realizadas para dos individuos de *Limnomedusa macroglossa* (PQDN 27 y PQDN 199) utilizando combinaciones de oligonucleótidos universales de citocromo b para anfibios y nuevos oligonucleótidos diseñados para este estudio. Se indentifican las bandas para los PCR positivos obtenidos para tres combinaciones: (1) MVZ15 y CB3XenAIs, (2) MVZ15AIs y CB3AIs, y (3) MVZ15AIs y CB3XenAIs.

Capítulo 1: Filogeografía de *Limnomedusa macroglossa* en Uruguay

1. Introducción

La filogeografía, subdisciplina de la Biogeografía relativamente reciente, busca comprender la historia evolutiva de las especies y sus poblaciones a través de la información genética y su vinculación con la historia de la región que habitan (Avise *et al.* 1987; Marske *et al.* 2013). El estudio de la biodiversidad de un sitio, desde una perspectiva filogeográfica, puede abordarse considerando diversos niveles organizacionales (Faith 1994), o analizando la variación entre individuos distribuidos en hábitats o ambientes diferentes (Faith & Walker 1996). Puntualmente, los estudios filogeográficos pueden aportar valiosa información para investigar la estructura genética y la dinámica espacial y temporal de las poblaciones (Moritz & Faith 1998; Moritz 2002). A su vez, la estimación de flujo génico permite establecer si las poblaciones constituyen entidades evolutivas independientes que pueden ser consideradas como unidades de conservación y/o manejo (Templeton 2001), lo que puede interpretarse como una medida del grado de conectividad que presenta o presentó alguna vez el paisaje (Kool *et al.* 2012).

La utilización de ADN mitocondrial para reconstruir historias genealógicas por inferencia filogenética o coalescente, ha permitido hallar patrones concordantes entre la estructura genética y la distribución espacial de los individuos, asociables con procesos históricos y/o contemporáneos (Avise 2009). En base a este y otros marcadores moleculares y múltiples métodos filogeográficos puede resolverse el número y la distribución geográfica de poblaciones, los patrones de migración entre poblaciones, y los cambios demográficos ocurridos durante la historia evolutiva de las especies (Avise *et al.* 1987; Zink & Barrowclough 2008).

El ADN mitocondrial es ideal para estos estudios debido a su abundancia en músculo e hígado así como la baja incidencia de heteroplasmia. Por otra parte, su alta tasa mutacional

y el pequeño tamaño efectivo poblacional (particularmente importante ya que los haplotipos pueden llegar a coalescer en promedio cuatro veces más rápido de lo que ocurre cuando se utilizan marcadores nucleares) (Moore 1995), lo vuelve ideal para reconstruir eventos demográficos e historias de poblaciones recientes. Sin embargo, puede presentar algunas limitaciones ya que pese a que se encuentra presente tanto en machos como en hembras, es de herencia matrilineal en el grupo, por lo que los patrones que resultan del análisis de los haplotipos pueden reflejar de forma parcializada el flujo génico y la dispersión de las especies (Avice 1995).

Pese a esto, Avice (1995) señala que cualquier marcador neutral puede ser suficiente para caracterizar la estructura y la demografía de una población, cuando ambos sexos son sedentarios, por lo que el uso de un marcador mitocondrial, como el gen citocromo b, puede ser de gran utilidad para el estudio de esta especie. Por esta razón, el ADN mitocondrial ha sido considerado el "*workhorse*" de la filogeografía ya que las inferencias sobre historias poblacionales y estructura geográfica son generalmente corroboradas por marcadores nucleares (Zink & Barrowclough 2008). En general, la dispersión en anfibios es considerada como aquella debida a movimientos desde y hacia los charcos reproductivos (Funk *et al.* 2005a), existiendo alta fidelidad al sitio de reproducción por parte de los adultos, lo cual da lugar a estructuras poblacionales altamente diferenciadas genéticamente, pese a la homogeneidad de los hábitats. Debido a esto, los charcos reproductivos han sido considerados como sistemas de parches y a las poblaciones allí existentes como metapoblaciones (Marsh & Trenham 2001). Sin embargo, estudios genéticos han revelado que algunas especies forman poblaciones discretas (Lampert *et al.* 2003; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005) y otras no (Jehle *et al.* 2005). Puntualmente, Smith & Green (2005) realizaron un meta-análisis sobre estudios realizados en anfibios considerando como hipótesis previa la idea de metapoblación y hallaron que, en la mayoría de los casos, dicha hipótesis se asume

pero no se testea; los autores señalan que una serie de eventos que suceden fuera de los charcos reproductivos, como la migración o la supervivencia posterior al invierno, también inciden en las dinámicas poblacionales. Por lo pronto, es probable que diferencias en las distintas historias de vida, tal como variados niveles de dispersión y/o territorialidad, pueden repercutir en la estructuración de las poblaciones de anfibios (Smith & Green 2005).

Debido a que la variabilidad intraespecífica representa un potencial adaptativo para enfrentar cambios ambientales repentinos condicionando la capacidad de las poblaciones de colonizar y sobrevivir en hábitats subóptimos (Frankham 2005; Rowe & Beebee 2005), resulta de gran interés estudiar esta variabilidad a nivel genético y a múltiples escalas espaciales para poder evaluar el potencial adaptativo a lo largo del rango de distribución de las especies. La aplicación de la genética de poblaciones en ecología evolutiva permite determinar los patrones genéticos en el espacio como un reflejo de la intensidad del flujo génico, y por lo tanto interpretar la homogeneidad genética en las poblaciones y la diferenciación, como resultado de altas y bajas tasas de flujo génico respectivamente (Holderegger *et al.* 2006; Marko & Hart 2011). Sin embargo, también ha sido señalado que centrándose en este aspecto, han sido omitidos o subestimados otros procesos evolutivos que pueden también afectar a los patrones observados, como la deriva genética o la selección (Marko & Hart 2011). Es por ello que, Holderegger *et al.* (2006), han propuesto que para el estudio de procesos como el flujo génico, deben seleccionarse marcadores que sean independientes de otras fuerzas evolutivas (como la selección), es decir, que sean neutrales y no adaptativos.

La diversidad genética es considerada un factor fundamental de la biodiversidad y por ello, es cada vez más contemplada como un objetivo en las estrategias diseñadas para la conservación de especies (Allentoft & O'Brien 2010). En este marco Faith (1992) propuso

como un indicador de áreas a preservar lo que se conoce como "Diversidad Filogenética" (DF), una medida que parte de información genética de una o varias especies que ocupan un sitio de interés, y que representa la diversidad característica subyacente a lo observable. Este autor la definió como la suma de largos de rama que conectan por el camino más corto de un árbol filogenético a los taxa presentes en un área, es decir, se trata de una medida de diversidad evolutiva que toma en cuenta los tiempos de divergencia entre taxa. Este índice ha sido utilizado y re afirmado como la mejor opción para definir estrategias de conservación ante otros habituales indicadores. Al igual que la riqueza específica, la diversidad filogenética es dependiente tanto del tamaño de la muestra como de su completitud, por lo que la DF observada puede ser subestimada con respecto a la real (Chao *et al.* 2015). Recientemente ha sido propuesto un nuevo método que implica rarefacción y extrapolación de la diversidad filogenética (Chao *et al.* 2015).

Limnomedusa macroglossa ha sido caracterizada como una especie cuya dispersión está limitada por la capacidad de desplazarse que pueda exhibir la larva, ya que los adultos tienen una elevada fidelidad al sitio (Gudynas & Gehrau 1981). Se trata de una especie con una distribución fuertemente asociada a afloramientos rocosos cercanos a cursos de agua (ver Gudynas & Gehrau 1981). Si bien ambientes abiertos no serían favorables para la migración de los adultos, los cuales parecen estar restringidos a los cursos lóticos durante la época reproductiva y posteriormente refugiados en las cercanías de estos cursos, se prevé que los movimientos entre poblaciones o subpoblaciones dependan de rutas de dispersión no terrestres. De esta forma la conectividad entre los cuerpos de agua en donde depositan sus huevos y se desarrollan las larvas, sería clave para mantener poco diferenciadas a sus poblaciones, el principal factor estructurador de sus poblaciones.

Así, se proponen como objetivos estimar la estructura poblacional y los niveles de flujo génico entre poblaciones a diferentes escalas espaciales (p. ej., localidades, dentro de cuencas y entre cuencas), y delimitar unidades de conservación y/o manejo de la especie y evaluar la diversidad filogenética entre áreas protegidas y no protegidas de las Quebradas del Norte. Para ello, se procurará: (1) describir patrones de diversidad genética para *Limnomedusa macroglossa* en Uruguay, así como evaluar el reparto de la diversidad genética entre individuos considerando diferentes escalas espaciales; (2) reconstruir la historia demográfica de la especie y estimar el número y la distribución de las poblaciones presentes en las Quebradas del Norte de Uruguay; y (3) estimar la diversidad filogenética de las poblaciones por cuenca en las Quebradas del Norte y proponer aquella que complemente al área protegida actual Valle del Lunarejo.

2. Metodología

2.0 Diseño de muestreo

Se efectuaron muestreos luego de obtener los permisos correspondientes, en cuencas distribuidas en ocho Departamentos de Uruguay: Rivera, Tacuarembó, Artigas, Salto, Cerro Largo, Maldonado, Lavalleja y San José. Los mismos fueron más intensos en la zona de las Quebradas del Norte del país, añadiéndose algunos puntos adicionales de muestreo al sur del Río Negro para obtener un panorama más general del reparto genético de la especie en Uruguay. Los sitios de muestreo se caracterizan por ser ambientes pedregosos y hallarse cercanos a cursos de agua lóticos, ubicándose a diversa altitud (Figs. 1 y 2). Los ejemplares adultos fueron capturados en actividad tanto diurna como nocturna; cuando se encontraban refugiados, se los halló bajo piedras y entre la vegetación. Las larvas fueron mayoritariamente encontradas en charcos con escasa o ninguna corriente, distribuidos en las cercanías de cursos de agua lóticos. Se llevó a cabo la eutanasia siguiendo un protocolo aprobado por la Comisión honoraria de experimentación animal (C.H.E.A.), para luego efectuar la disección parcial de los individuos en el sitio de colecta. Del total de ejemplares muestreados, pertenecientes a doce cuencas, se seleccionaron 91 individuos, entre adultos y larvas: doce del Río Arapey (Artigas y Salto); cuatro del Río Cuareim (Artigas); tres del Arroyo Cuñapirú (Rivera); diez del Arroyo de Las Cañas (Tacuarembó); nueve del Arroyo Laureles (Rivera y Tacuarembó); 16 del Arroyo Lunarejo (Rivera); 15 del Arroyo Tres Cruces (Tacuarembó); tres del Arroyo Tambores (Tacuarembó); ocho del Arroyo Tacuarembó Chico (Tacuarembó); siete del Río Tacuarembó (Rivera); tres del Río Santa Lucía (Lavalleja y San José); y finalmente uno del Río Yaguarón (Cerro Largo). Luego, para algunos análisis a nivel de las Quebradas del Norte (en los Departamentos de Rivera y Tacuarembó), y considerando su proximidad (según sus coordenadas geográficas), los individuos fueron agrupados dentro de sus cuencas en localidades (Anexo 2, Tabla 1).



Figura 1. Sitio muestreado en el Arroyo Tres Cruces (Departamento de Tacuarembó).



Figura 2. Ejemplar de *Limnomedusa macroglossa* del Arroyo Lunarejo (Departamento de Rivera).

2.1 Procedimiento de laboratorio

El ADN fue extraído utilizando el kit comercial Quick-gDNATMMiniPrep (Zymo Research Corp.), posterior a la eutanasia de los ejemplares; se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b, utilizando los oligonucleótidos MVZ15 (Moritz et al. 1992) y CB3Xen (Palumbi et al. 1991) desarrollados para anfibios, así como nuevos oligonucleótidos diseñados. Se efectuaron reacciones de PCR y los productos de la amplificación fueron sometidos a corridas electroforéticas en gel de agarosa (0,7 %) al que se le añadió la tinción GoodView (SBS Genetech) para su posterior visualización en un transiluminador UV. Se descartaron para la secuenciación aquellas muestras que mostraron bandas secundarias en la misma. Finalmente, se purificaron los productos utilizando el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research Corp.).

Las muestras resultantes se enviaron al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo y a Macrogen (<http://www.macrogen.com>). Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y las secuencias se editaron manualmente con el software ProSeq3 (Filatov 2009). Una vez realizadas las correcciones, todas las secuencias se alinearon utilizando el programa Mega6 (Tamura *et al.* 2013), dejándolas de un largo de 764 pb.

2.2 Red de haplotipos

Las relaciones genealógicas entre haplotipos se reconstruyeron con el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) el cual utiliza el método de parsimonia estadística para generar una red de haplotipos sin raíz, cuyos nodos se conectan considerando el menor número de pasos mutacionales no homoplásicos entre ellos, definido por un límite de confianza predeterminado, en este caso del 95%. Posteriormente, la red de haplotipos estimada con TCS fue visualizada gráficamente con el software POPART (Leigh & Bryant 2015).

2.3 Árbol filogenético

Para la estimación de un árbol filogenético utilizando las secuencias de citocromo *b* se empleó el paquete BEAST v.1.8 (Drummond *et al.* 2012). El modelo de sustitución fue estimado utilizando el programa jModelTest v.2.0 (Darriba *et al.* 2012). Además, se especificaron frecuencias de bases empíricas, un reloj molecular relajado, una tasa de sustitución de 0,01 mutaciones por sitio por millón de años (Mueller *et al.* 2006), un tree prior de tipo "skyride" y el algoritmo de máxima verosimilitud para la reconstrucción filogenética. El número de pasos definido para el MCMC fue de veinte millones, muestreándose cada mil, por lo que se generaron veinte mil árboles; los primeros dos mil fueron descartados ("burn-in"). Se utilizaron como grupos externos secuencias pertenecientes a cinco especies de la familia Alsodidae, además de una secuencia correspondiente a un ejemplar de *Limnomedusa macroglossa* de Misiones, Argentina (Tabla 1). Los árboles obtenidos fueron resumidos en un árbol consenso utilizando el programa TreeAnnotator, previa evaluación del tamaño efectivo de muestreo y del estado estacionario del análisis MCMC en Tracer v.1.6 (Rambaut *et al.* 2013). Utilizando FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2012) se visualizó el árbol filogenético obtenido.

Tabla 1. Especies y número de acceso en GenBank de las secuencias utilizadas como grupo externo (excepto *L. macroglossa*) en el árbol filogenético con citocromo *b*.

Especie	Número de acceso
<i>Alsodes gargola</i>	JX564852
<i>Alsodes vanzolinii</i>	JX203974
<i>Alsodes verrucosus</i>	JX203977
<i>Eupsophus calcaratus</i>	JX203983
<i>Eupsophus emiltopugini</i>	JX203988
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	AY 843935

2.4 Índices de diversidad genética

Para el estudio de la variación intraespecífica a nivel genético, se efectuaron análisis de polimorfismos del ADN, utilizando datos de las secuencias en el programa DnaSP v. 5.10.1 (Librado & Rozas 2009). Se calcularon los siguientes índices de diversidad: índice de diversidad nucleotídica (π), entendida como la probabilidad de que al tomar dos secuencias al azar, las mismas difieran en una posición determinada (Tajima 1983); índice de diversidad haplotípica (h), es decir, la probabilidad de que al tomar dos secuencias al azar, las mismas sean diferentes (Nei 1987); número de sitios variables (S), dependiente de la longitud de la secuencia y del número de secuencias disponibles (Tajima 1983); y, número de haplotipos (nH).

2.5 Historia demográfica

Se efectuaron dos test de neutralidad: el test D de Tajima (basado en sitios segregantes) y el test de Fu (F_s), cuyos valores se tornan significativamente diferentes de cero cuando la variación no es neutra. Si se obtienen resultados menores a cero existe un exceso de polimorfismos en baja frecuencia, lo que puede estar indicando un caso de expansión poblacional o bien de selección (Tajima 1989; Fu 1997). Realizando un análisis de diferencias pareadas (*mismatch distribution*) en el programa DnaSP v. 5.10.1 (Librado & Rozas 2009), se buscó conocer la distribución del número de diferencias entre pares de haplotipos de la muestra para poner a prueba la hipótesis de expansión demográfica, agrupando a los mismos de acuerdo a su proximidad, dentro de la misma cuenca y localidad (Anexo 1, Tabla 1).

Por otra parte se analizó también expansión poblacional implementando el método no paramétrico basado en el coalescente denominado “*GMRF Bayesian Skyride*” en el paquete BEAST v.1.8 (Drummond *et al.* 2012). En Tracer v.1.6 (Rambaut *et al.* 2013) se indicó el

tipo de reconstrucción demográfica especificado en BEAST previamente, empleando un reloj molecular relajado y una tasa de sustitución de 0,01 mutaciones por sitio por millón de años (Mueller *et al.* 2006), para obtener la distribución *a posteriori* del tamaño efectivo poblacional (N_e) en función del tiempo y asumiendo un tiempo generacional de dos años.

2.6 Estructuración geográfica

Se realizó una cuantificación de la distribución de la variabilidad genética en la zona de las Quebradas del Norte a través de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), asignando a los secuencias de forma tal que las localidades se agruparan por cuencas, y luego las cuencas más cercanas y conectadas quedasen bajo un mismo grupo (Anexo 2, Tabla 1). De esta manera se agruparon los individuos de las cuencas del Río Tacuarembó con los del Arroyo Lunarejo, los del Arroyo Laureles con los del Arroyo de las Cañas, y los del Río Tacuarembó Chico con los del Arroyo Tres Cruces. Los individuos pertenecientes a las cuencas del Río Arapey, el Río Cuareim, el Arroyo Tambores y el Arroyo Cuñapirú no fueron considerados en este análisis debido al bajo número de individuos por localidad.

Por otra parte, para estimar indirectamente el flujo génico entre poblaciones de las Quebradas del Norte, los individuos con la misma o similar coordenada geográfica fueron agrupados en una misma localidad (ver Anexo 2, Tabla 1), para luego llevar adelante estimaciones de ϕ_{ST} pareados (Excoffier *et al.* 1992), con el programa Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). Se aplicó adicionalmente un test de Mantel (Mantel 1967) entre las distancias genéticas estimadas y las distancias geográficas entre localidades con el programa zt (Bonnet & Van de Peer 2002), para evaluar la existencia de una correlación entre estas variables.

Para estimar el número de poblaciones e identificar discontinuidades genéticas, así como posibles individuos migrantes, se empleó el paquete Geneland v.4.0.4 (Guillot *et al.*, 2005) implementado en la plataforma R (R Development Core Team 2013). Se trata de un método de asignación espacial explícita de individuos a grupos o “*clusters*”, buscando maximizar el equilibrio Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones cuando el marcador molecular utilizado es diploide, o bien asumiendo una distribución multinomial de los genotipos cuando los mismos son haploides, partiendo de información genotípica y fenotípica georreferenciada (coordenadas de las localidades a las que pertenecen los individuos muestreados) (Guillot *et al.* 2012). El método tiene como principales supuestos que: el número de poblaciones no es conocido y que todas las posibilidades son *a priori* igualmente probables; existe equilibrio de ligamiento entre los loci; las frecuencias alélicas son desconocidas y son tratadas como variables aleatorias; las poblaciones se distribuyen en un área describiendo un polígono espacial también estimado durante el análisis (Guillot *et al.*, 2005). Se estableció para el análisis un máximo de cinco poblaciones, 300,000 iteraciones con un *thinning* de 300, efectuándose cinco corridas independientes asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas. Los resultados fueron ordenados según su probabilidad *a posteriori*, y los análisis subsecuentes se realizaron considerando aquella corrida con mayor valor. A partir del muestreo MCMC, se realizó una estimación *a posteriori* del número de poblaciones, del área geográfica ocupada por cada población y de la probabilidad de membresía de cada individuo a cada población.

2.7 Diversidad filogenética

El cálculo de la diversidad filogenética (DF, Faith 1992) por área se realizó utilizando el programa PDA 1.0.3 (Chernomor *et al.* 2015) a partir de una red de haplotipos estimada en SplitsTree4 (Huson & Bryant 2006). También se estimaron otros tres índices asociados: DF

de endemismo, que representa la historia evolutiva exclusivamente representada por área (es decir, el número de unidades únicas contenidas), DF exclusiva y DF de complementariedad, que es una medida de lo que aporta un taxón a otro, en cuanto a la representación de la historia evolutiva de una región (grado de aporte a lo que no fue abarcado en otra área, por ejemplo, ya protegida) (Faith 2016). Así, el DF de complementariedad permite identificar el área que mejor complementa, desde el punto de vista de su aporte a la diversidad filogenética, a la ya existente área protegida que, en este estudio, comprende parte de la cuenca del Arroyo Lunarejo. Por este motivo el análisis se aplicó considerando únicamente localidades que están incluidas en las cuencas de las Quebradas del Norte: Tambores, Tacuarembó, Tacuarembó Chico, Lunarejo, Laureles, de las Cañas, Arapey, Cuareim, Cuñapirú y Tres Cruces.

Finalmente, se estimó la diversidad filogenética para las cuencas de las Quebradas del Norte, pero corrigiendo por tamaño de muestra aplicando un análisis de "*rarefaction*" de la DF con el paquete iNextPD v0.1.0 (Chao *et al.* 2015) en la plataforma R (R Development Core Team 2013), especificando 1.000 réplicas de "*bootstrap*" y un máximo de 30 secuencias por área. Se trata de una extensión de la curva de acumulación de especies, que ha sido diseñada al concluir que el índice DF tiende a incrementar con el número de muestras por sitio (Chao *et al.* 2015). Mediante este análisis se hace una rarefacción (interpolación) y luego una extrapolación (predicción) que indica cual sería la diversidad si se tuvieran más muestras por localidad. La extensión de este tipo de aproximación puede entonces ser de particular valor para el estudio de especies o poblaciones vulnerables para las cuales el número de muestras a obtener debe reducirse al mínimo. Para este análisis se excluyó la localidad de Tacuarembó Chico ya que mostró un intervalo de confianza muy amplio.

3. Resultados

Se obtuvieron 91 secuencias de un largo de 764 pares de bases (posterior a su edición y alineamiento). El modelo de sustitución óptimo elegido para estas secuencias fue el HKY+G, el cual permite diferentes tasas de transición/transversión, así como también frecuencias desiguales de bases para los cuatro nucleótidos (Hasegawa *et al.* 1985), bajo un modelo de distribución gamma por sitio. Las secuencias se tradujeron a proteínas, y no se hallaron ni codones "stop" ni desplazamientos del marco de lectura (Anexo 2, Figs. 1, 2).

3.1 Red de haplotipos

Se hallaron 23 haplotipos para *Limnomedusa macroglossa* en Uruguay, uno de ellos se encuentra en 51 individuos, representando el 56% del total de la muestra, y se halla ampliamente distribuido en todo el país (Anexo 2, Tabla 2). Los restantes, presentan en general escasos pasos mutacionales entre ellos, habiendo un total de 15 haplotipos únicos. La red de haplotipos por su parte muestra un particular arreglo en relación a dos secuencias que divergen, RML 2776 y PQDN 237, que son más próximas a secuencias correspondientes a ejemplares tomados como grupo externo (*E. emiliopugini*) y a *L. macroglossa* de Argentina (Anexo 2, Fig. 3).

3.2 Árbol filogenético

En el árbol filogenético se observa en general bajo apoyo de los nodos (incluyendo la que separa a los grupos externos), salvo en la que se detecta la clara separación observada en las dos secuencias mencionadas con respecto a las restantes (Fig. 3). La secuencia correspondiente a un ejemplar de Misiones Argentina aparece relacionado con otros individuos del Uruguay (PQDN 253, CURC-B 88, PQDN 2, PQDN 3, PQDN 240, PQDN 197 y ZVC-B 23341) aunque con bajo apoyo. Debido a esta gran diferenciación hallada, se

decidió excluir a ambas secuencias de los restantes análisis, incluida la red de haplotipos final (Fig. 4).

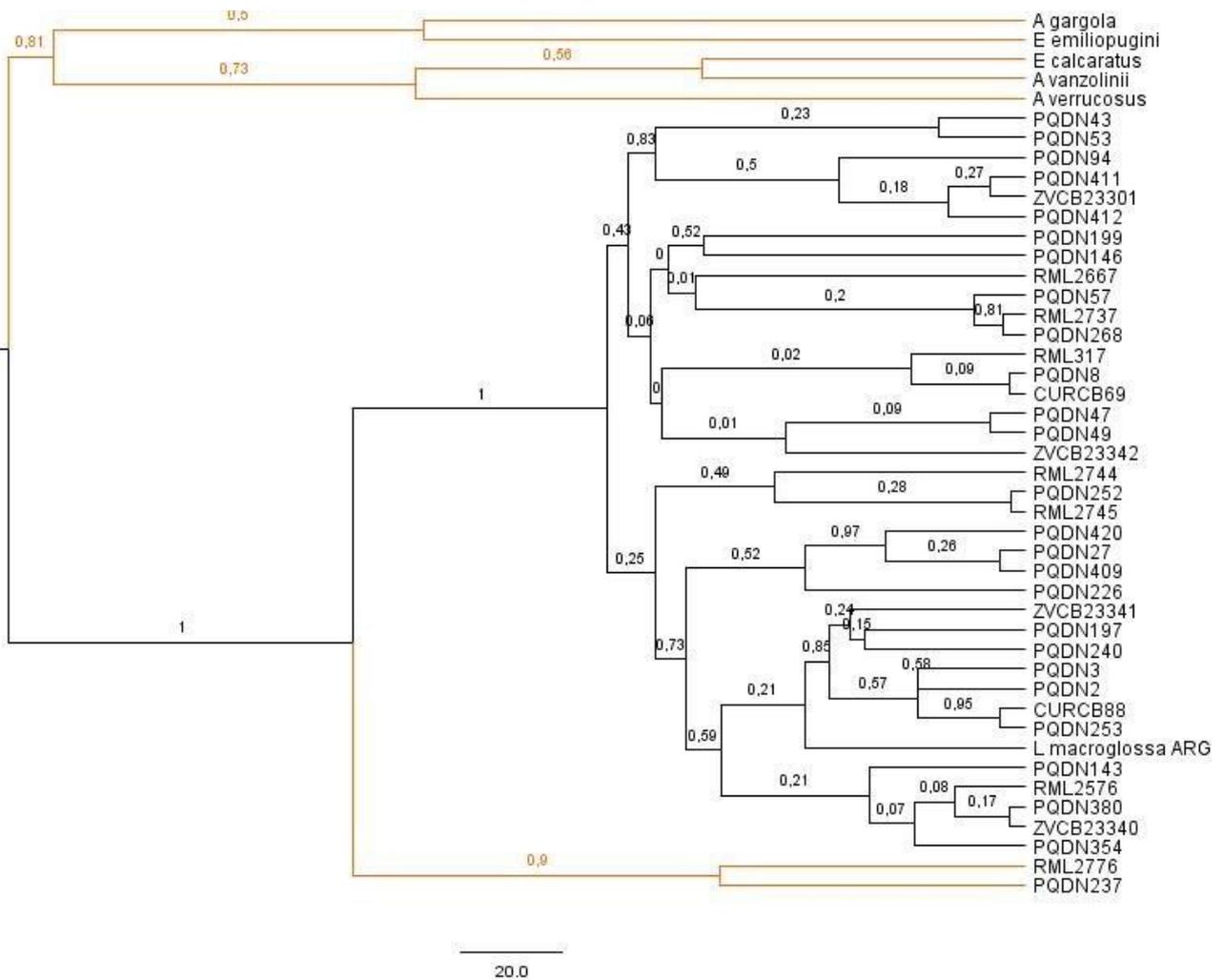


Figura 3. Árbol filogenético para el gen citocromo b de *Limnomedusa macroglossa* junto con secuencias tomadas como grupos externos (algoritmo Máxima verosimilitud).

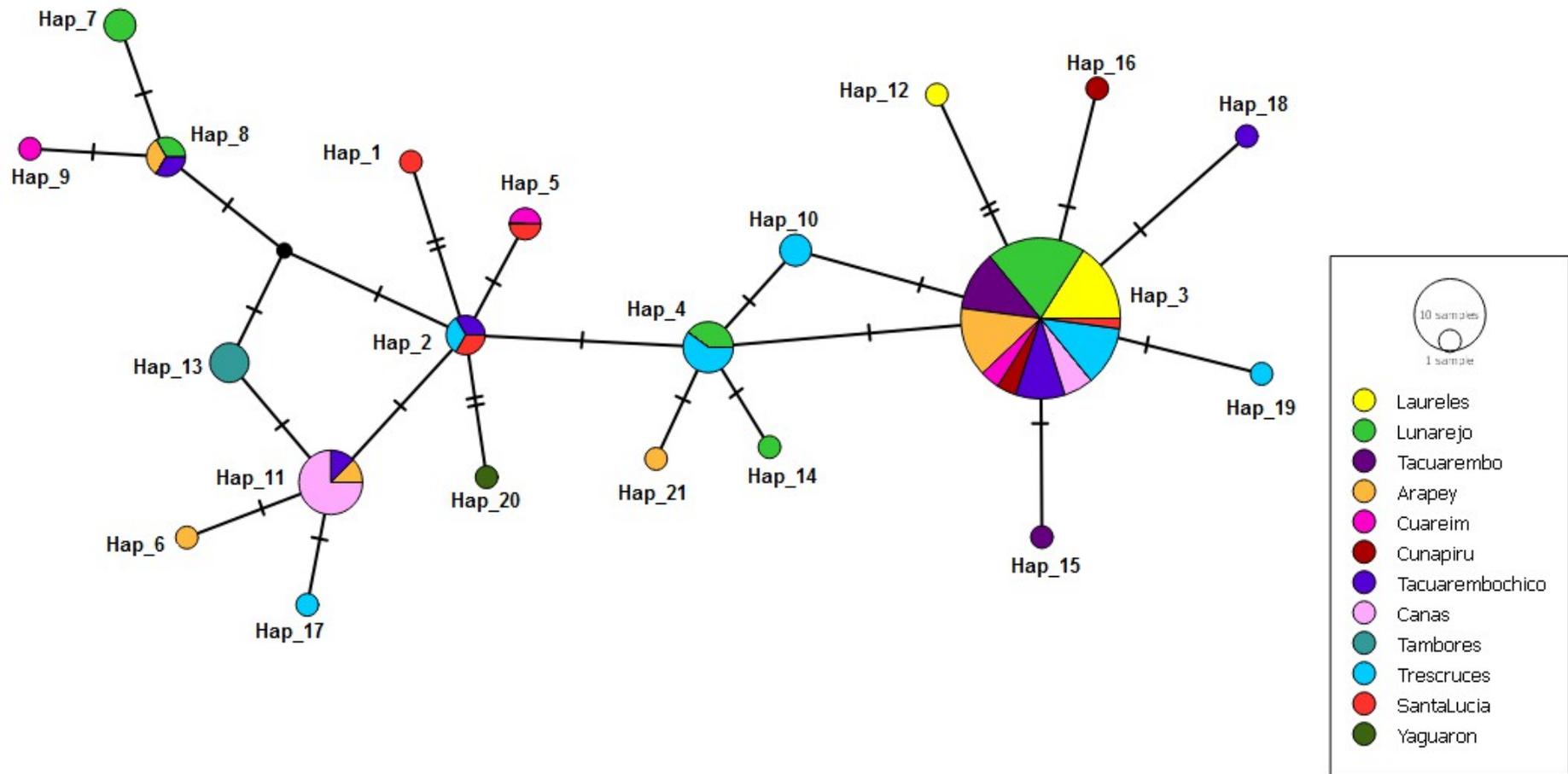


Figura 4. Red de haplotipos para el gen citocromo b de *Limnomedusa macroglossa*. Se excluyen en este caso tanto los grupos externos como secuencias muy variables (ver Anexo 2, Fig.3).

3.3 Índices de diversidad genética

Se analizaron 89 secuencias correspondientes a individuos tanto del Norte como del Sur de Uruguay de un largo total de 764 pares de bases, hallándose 21 haplotipos diferentes, una diversidad haplotípica y nucleotídica de 0,662 (desvío standard = 0,056) y 0,005 respectivamente, así como 19 sitios variables.

3.4 Historia demográfica

El estadístico D de Tajima tiene un valor negativo pero no significativo cuando se aplica al total de las muestras ($D = -1,611$; $p > 0,05$), así como el estadístico de Fu ($F_s = -0,236$; $p > 0,05$). Sin embargo, cuando se observan los resultados por cuencas, tanto para el caso de Laureles como de Tacuarembó si se obtienen valores negativos y significativos ($D = -1,678$; $p = 0,023$; y $D = -1,524$; $p = 0,036$, respectivamente), lo cual daría cuenta de un caso de expansión poblacional reciente.

Por otra parte, el análisis de diferencias pareadas entre haplotipos bajo un modelo de expansión demográfica muestra una distribución bimodal, marcada por un pico suave, lo cual indicaría un caso de estabilidad poblacional (promedio de diferencias pareadas, $k=1,78$; Índice de desigualdad, $r=0,05$)(Fig. 5).

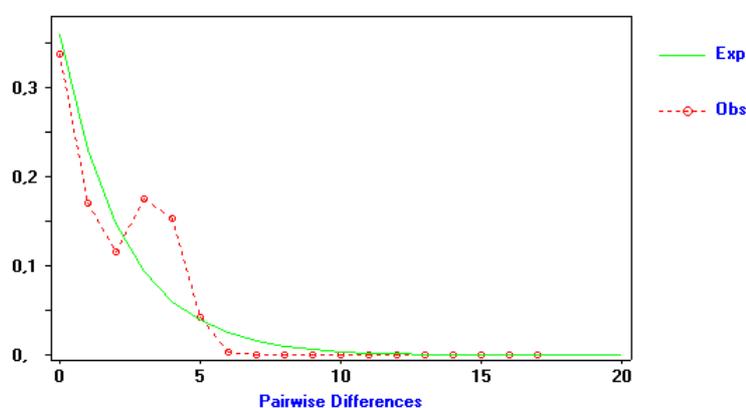


Figura 5. Distribución de diferencias pareadas entre haplotipos. La distribución esperada se representa con línea continua verde, mientras que la distribución observada con línea punteada roja.

El resultado del GMRF Bayesian Skyride indica que el tamaño poblacional se ha mantenido estable al menos durante los últimos 125.000 años (Fig. 6).

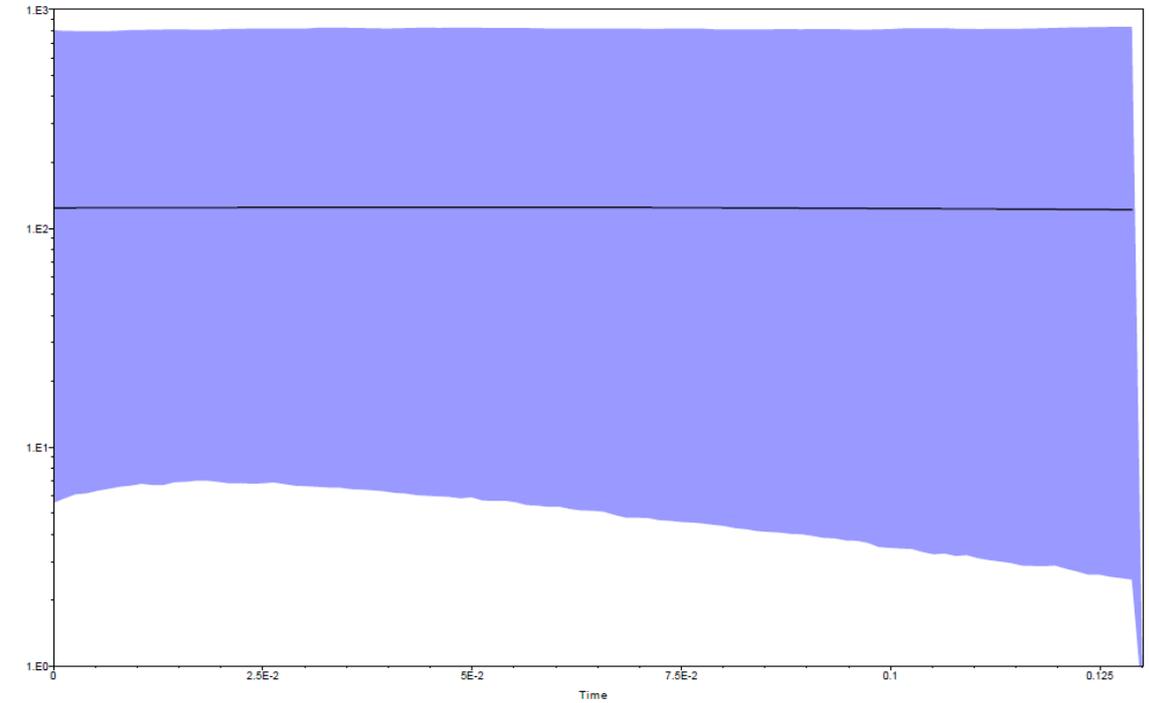


Figura 6. GMRF Bayesian Skyride. Se observa la historia demográfica de *Limnomedusa macroglossa*. Se grafica tiempo (en millones de años; eje X) y tamaño efectivo poblacional (eje Y).

3.5 Estructuración geográfica

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) aplicado a tres grupos de cuencas (Laureles-de las Cañas; Tacuarembó-Lunarejo; Tres Cruces-Tacuarembó Chico) muestra que el mayor porcentaje de variación ocurre dentro de poblaciones (96,05% de la variación); por otra parte, los tres índices de fijación resultan no significativos (Tabla 2). Sin embargo, al aplicar el mismo análisis utilizando los mismos grupos pero aplicando la opción de computar los estadísticos considerando las frecuencias de haplotipos, los índices de fijación, F_{ST} y F_{SC} , resultan significativos ($F_{ST} = 0,13$; $p < 0,0001$; $F_{SC} = 0,16$; $p = 0,001$). Por su parte el F_{CT} , índice que maximiza la separación entre grupos, bajo distintas hipótesis de agrupación de

localidades, nunca fue significativo. Así, se mantiene la mayor diversidad dentro de cuencas (86,92%)(Tabla 3), reforzándose la idea de falta de estructuración en la zona.

Tabla 2. Resultados de AMOVA. Comparaciones entre 3 grupos en base al método Pairwise difference: Cuenca de Laureles y De Las Cañas; Cuenca de Tacuarembó y Lunarejo; Cuenca de Tres Cruces y Tacuarembó Chico * No significativo ($p>0,05$).

Fuente de variación	g.d.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	índices de fijación
Entre grupos	2	16.966	-0.04245	-0.67	Fct= - 0.007*
Entre poblaciones dentro de grupos	3	26.433	0.29235	4.62	Fsc= 0.046*
Dentro de poblaciones	56	340.214	6.07526	96.05	Fst= 0.040*
Total	61	383.613	6.32515		

Tabla 3. Resultados de AMOVA. Comparaciones entre 3 grupos en base a la frecuencia de haplotipos: Cuenca de Laureles y De Las Cañas; Cuenca de Tacuarembó y Lunarejo; Cuenca de Tres Cruces y Tacuarembó Chico * No significativo ($p>0,05$).

Fuente de variación	g.d.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	índices de fijación
Entre grupos	2	1.248	-0.01141	-3.56	Fct= - 0.04*
Entre poblaciones dentro de grupos	3	2.332	0.05330	16.64	Fsc= 0.16
Dentro de poblaciones	56	15.594	0.27847	86.92	Fst= -0.13
Total	61	19.210	0.32036		

En la Tabla 4 aparecen los valores de ϕ_{ST} pareados para las localidades definidas; los mismos variaron entre 0 y 0,84, asimilándose a cero los valores negativos. En la Tabla 5 se muestran las distancias geográficas entre los pares evaluados (ver ubicación de las localidades en Anexo 2, Fig. 4). El test de Mantel indicó correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($R=0,30$; $p < 0,05$).

Tabla 4. Distancias ϕ_{ST} calculadas con el programa Arlequín, entre pares de localidades muestreadas. (Tbo_1= Tacuarembó 1; Tbo_chico_1= Tacuarembó chico 1; Tbo_2= Tacuarembó 2; Tbo_chico_2= Tacuarembó chico 2; Tbo_chico_3= Tacuarembó chico 3). En gris aparecen las distancias con $p < 0,05$.

Distancias PhiST	Tbo_1	Tbo_chico_2	Tbo_chico_3	Tbo_2	Tbo_chico_1	Lunarejo_1	Lunarejo_2	Lunarejo_3	Lunarejo_4	Lunarejo_5	Cañas	Cañas_2	Laureles_1	Laureles_2	Tres_cruces_1	Tres_cruces_2
Tbo_1	0															
Tbo_chico_2	0	0														
Tbo_chico_3	0,67278	0,44473	0													
Tbo_2	0	0	0,84462	0												
Tbo_chico_1	0,7022	0,56604	0	1	0											
Lunarejo_1	0	0	0,3602	0	0,40219	0										
Lunarejo_2	0	0	0,84462	0	1	0	0									
Lunarejo_3	0	0	0,34427	0	0,38185	0	0	0								
Lunarejo_4	0	0	0,84462	0	1	0	0	0	0							
Lunarejo_5	0	0	0,59827	0	0,72449	0	0	0	0	0						
Cañas	0,35303	0	0	0,32161	0,02174	0	0,32161	0	0,32161	0	0					
Cañas_2	0,26991	0,12277	0,7866	0,47241	0,81992	0,1998	0,47241	0,21774	0,47241	0,04173	0,38474	0				
Laureles_1	0,01192	0	0,11738	0	0,21684	0	0	0	0	0	0	0,249	0			
Laureles_2	0,00877	0,47368	0,93544	0	1	0,18919	0	0,18919	0	0,47368	0,67587	0,61042	0,18919	0		
Tres_cruces_1	0	0	0,36477	0	0,358	0	0	0	0	0	0	0,07076	0	0,17542	0	
Tres_cruces_2	0,17477	0	0,2998	0,15191	0,26975	0	0,15191	0	0,15191	0	0	0,21425	0	0,36923	0	0

Tabla 5. Distancias geográficas en km. entre pares de localidades muestreadas. (Tbo_1= Tacuarembó 1; Tbo_chico_1= Tacuarembó chico 1; Tbo_2= Tacuarembó 2; Tbo_chico_2= Tacuarembó chico 2; Tbo_chico_3= Tacuarembó chico 3).

Dist geográficas	Tbo_1	Tbo_chico_2	Tbo_chico_3	Tbo_2	Tbo_chico_1	Lunarejo_1	Lunarejo_2	Lunarejo_3	Lunarejo_4	Lunarejo_5	Canas	Canas_2	Laureles_1	Laureles_2	Tres_cruces_1	Tres_cruces_2
Tbo_1																
Tbo_chico_2	368,221															
Tbo_chico_3	381,658	26,9464														
Tbo_2	47,0618	356,895	370,413													
Tbo_chico_1	385,249	30,5373	23,6961	373,992												
Lunarejo_1	100,143	340,181	353,684	88,877	357,198											
Lunarejo_2	102,763	342,848	356,285	91,5127	359,864	21,6649										
Lunarejo_3	90,7201	330,78	344,095	79,4189	347,735	19,8567	22,5248									
Lunarejo_4	84,9649	325,028	338,471	73,7015	342,044	15,0844	17,8034	5,70235								
Lunarejo_5	88,3779	328,384	341,839	77,061	345,45	33,8956	36,7207	24,5682	18,8579							
Canas	124,039	320,487	333,898	112,775	337,503	95,9937	98,6552	86,5767	80,8664	82,8581						
Canas_2	106,842	303,327	316,765	95,5609	320,344	78,7867	81,5105	69,4174	63,7449	67,0587	20,3546					
Laureles_1	122,974	326,069	339,506	111,754	343,085	94,9579	97,6337	85,4777	79,8449	83,2209	81,8773	64,718				
Laureles_2	105,255	307,932	321,369	93,948	325,293	77,1663	79,521	67,7636	62,0911	65,4049	64,0801	46,9264	22,7669			
Tres_cruces_1	406,173	185,154	198,858	394,874	202,339	377,912	380,549	368,617	362,758	366,214	358,352	341,226	363,799	345,807		
Tres_cruces_2	398,66	177,833	191,267	387,381	194,845	370,542	373,258	361,123	355,432	358,887	349,335	333,714	356,455	338,295	57,5124	

Tomando en cuenta solamente las localidades que se encuentran en las Quebradas del Norte (Departamentos de Rivera, Tacuarembó, Artigas y Salto), Geneland detectó de forma consistente un máximo de dos poblaciones en la zona (Figs. 7, 8). Las mismas, se encuentran separadas por una zona de transición en donde es más difícil la asignación de individuos a una u otra población. Por otra parte, la probabilidad posterior de membresía a cada una de ellas es relativamente baja en la mayoría de los casos (Fig. 9).

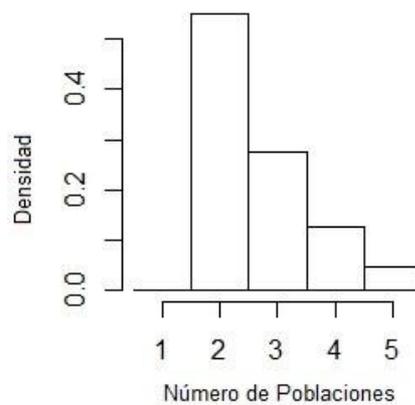


Figura 7. Estimación del número de poblaciones de la especie *Limnomedusa macroglossa* en las Quebradas del Norte de Uruguay, obtenidas con el programa Geneland.

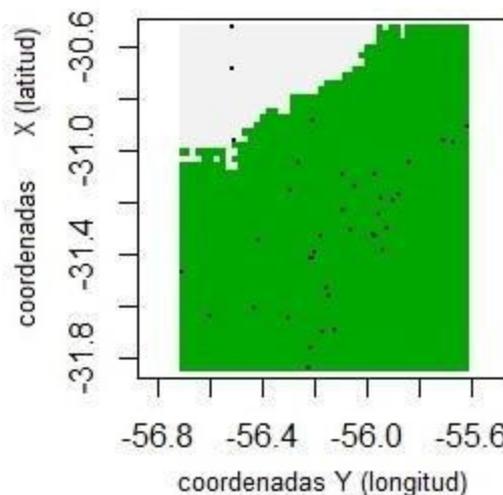


Figura 8. Estimación del número de poblaciones de la especie *Limnomedusa macroglossa* en las Quebradas del Norte de Uruguay, obtenidas con el programa Geneland. En gris y verde aparecen dos posibles poblaciones diferenciables.

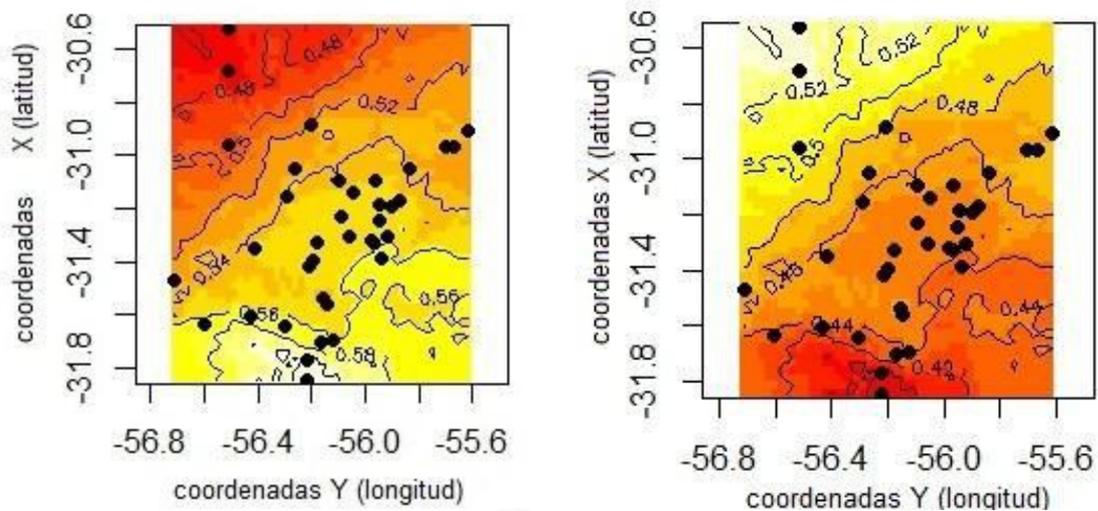


Figura 9. Estimación del número de poblaciones de la especie *Limnomedusa macroglossa* en las Quebradas del Norte de Uruguay, obtenidas con el programa Geneland. Se aprecia escala de colores en donde en amarillo se agrupan aquellos haplotipos cuya probabilidad de pertenencia a una misma población es mayor. En naranja se indica una zona de posible transición entre una y otra población.

3.6 Diversidad filogenética

La cuenca con mayor diversidad filogenética fue la de Tres Cruces (DF = 0,0294), seguida por la cuenca del Arapey (DF = 0,0246) y la de menor diversidad fue la de Cuñapirú (DF = 0,0018). Al considerar las cuencas con DF complementario a Lunarejo, se encuentra que Tres Cruces representa el valor más alto (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos con el programa PDA 1.0.3 sobre la Diversidad Filogenética (DF) del gen citocromo b, para *L. Macroglossa*. En gris aparecen la cuenca del Lunarejo (área protegida ya existente) y su cuenca complementaria (Tres Cruces). Abreviaciones: Excl. DF (exclusividad de diversidad filogenética), DF-Endem. (diversidad filogenética de endemismo) y DF Compl. (diversidad filogenética de complementariedad)

Cuenca	DF	Excl.-DF	DF-Endem.	DF-Compl
Tres Cruces	0.0294	0.0107	0.0107	0.0189
Arapey	0.0246	0.0059	0.0059	0.0112
Lunarejo	0.0202	0.0036	0.0036	0
De las Cañas	0.0198	0.0031	0.0031	0.0097
Laureles	0.0172	0.0103	0.0103	0.0141
Cuareim	0.0152	0.0020	0.0020	0.0042
Tacuarembó Chico	0.0137	0.0012	0.0012	0.0056
Tacuarembó	0.0101	0.0054	0.0054	0.0063
Tambores	0.0074	0.0059	0.0059	0.0100
Cuñapiru	0.0018	0.0004	0.0004	0.0014

Al igual que lo obtenido al aplicar el análisis PDA, la cuenca del Tres Cruces es la que tiene un mayor índice de diversidad, seguida por la cuenca del Lunarejo, al aplicar el análisis de rarefacción de PD (Fig. 10). Por otra parte, observando la extrapolación, se observa que la cuenca de las Cañas mostraría un mayor índice de diversidad que Lunarejo, aunque deben añadirse más secuencias de ambos puntos para resolver si las diferencias son significativas porque existe solapamiento de los intervalos de confianza.

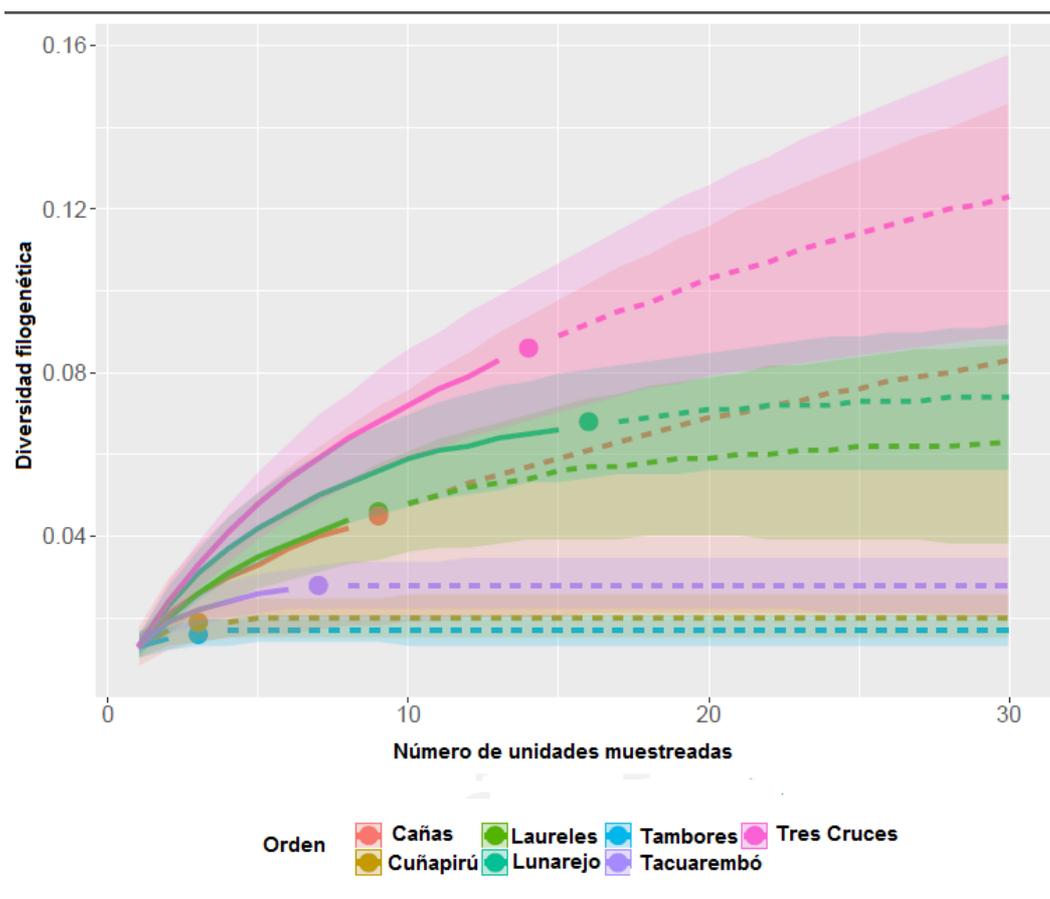


Figura 10. Diversidad filogenética corregida por rarefacción con el paquete iNextPD v0.1.0 ; con línea continua se representa la interpolación y con línea punteada la extrapolación

4. Discusión

El hallazgo de dos individuos altamente divergentes, PQDN 237 y RML 2776, colectados en el Departamento de Tacuarembó, en las cuencas del Tacuarembó Chico y Tres Cruces respectivamente, resulta de gran interés ya que, como se observa tanto en el árbol filogenético como en la red de haplotipos, se encuentran más emparentados evolutivamente entre sí y a especies utilizadas como grupos externos. Además se encuentran separados del resto de las muestras de *L. macroglossa* de Uruguay por un número alto de cambios (PQDN 237 con 36 y RML 2776 con 57 cambios). La identidad de estas muestras y su afinidad con poblaciones del resto del rango de distribución, o con otras especies de Alsodidae, debe ser resuelta en un estudio taxonómico más profundo ya que la sinonimización de *L. macroglossa* con *L. misionis* (Barrio 1971) se basó en rasgos fenotípicos y debería ser revisada utilizando un enfoque integral que incluya también datos genéticos.

Las barreras físicas ocasionalmente pueden aumentar los efectos de una movilidad limitada, promoviendo la estructuración poblacional (Avice 2009). Para *L. macroglossa*, ha sido hallada una gran población conformada por muchas localidades distribuidas en la ladera este de las Quebradas del Norte. En ese sentido, la conectividad entre cuencas a través de los cursos de agua puede producirse por dispersión en el estadio larval. A pesar de una baja diversidad nucleotídica, la diversidad haplotípica es moderada, y además la red de haplotipos y el análisis de "*Bayesian Skyride*" revelan estabilidad demográfica lo cual puede vincularse a la estabilidad ambiental que ha caracterizado a las Quebradas del Norte en comparación la matriz circundante de praderas pampeanas. La capacidad morfogenética de la zona de las Quebradas no se vio modificada durante el Cuaternario, período en el que se dieron la mayoría de los entallados de relieve en la región, hecho evidenciado por la forma de acumulación de los sedimentos en la escarpa (Panario *et al.* 2014). Según Panario *et al.*

(2014), ello derivó en el fuerte componente de pendientes y grandes formaciones persistentes, característico de la Cuenca Gondwánica Sedimentaria.

En la literatura se plantea que los anfibios en general poseen limitada capacidad de dispersión y debido a ello, una alta filopatría (Blaustein *et al.* 1994; Beebee 2005). Sin embargo, también ha sido propuesto que muchas especies asociadas a cursos de agua, tanto lénticos como lóticos, presentarían migración pasiva no sólo de larvas sino también de adultos, dadas las dinámicas hidrológicas propias del paisaje en el que habitan (Martof 1953; Smith & Green 2006; Measey *et al.* 2007). Este mecanismo de dispersión también se ha propuesto para *Pseudopaludicola falcipes* en la región pampeana (Langone *et al.* 2015). Para *L. macroglossa*, se ha hallado que las larvas pueden completar su desarrollo tanto en cuerpos de agua lénticos como lóticos, y que además pueden trasladarse de forma pasiva de un charco a otro o de un charco a un río, a través de conexiones periódicas entre los mismos durante fuertes lluvias o inundaciones (Kaefer *et al.* 2009). La escasa diferenciación entre sus poblaciones (evidenciada por un mayor reparto de la variación intra-poblacionalmente como se encontró en los análisis de AMOVA), así como la presencia de haplotipos compartidos entre cuencas relativamente distantes y el bajo valor de F_{ST} global hallado, sugiere que existe un alto grado de conectividad entre localidades de distintas cuencas. Dicha conectividad se vería a su vez gradualmente limitada por la distancia geográfica entre las mismas, como se evidencia en el análisis de ϕ_{ST} pareados, en donde las localidades separadas por grandes distancias o con poca conectividad entre los cursos de agua, muestran altos valores del mencionado índice.

En diferentes estudios se ha encontrado que en algunas especies de anfibios, poblaciones o subpoblaciones que se encuentran próximas en el espacio se hallan diferenciadas genéticamente (Lampert *et al.* 2003; Andersen *et al.* 2004), mientras que otras

incluso bastante lejanas entre sí, tienen poca o directamente ninguna diferenciación entre ellas (Newman & Squire 2001; Jungels *et al.* 2010; Langone *et al.* 2015). También han sido descritos variados patrones de estructuración genética, incluyendo casos de alta diversidad y alta estructuración (Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005), baja diversidad y alta diferenciación genética, baja diversidad y pobre estructuración (Vences *et al.* 2013) así como alta diversidad y escasa diferenciación genética (Langone *et al.* 2015). Este último caso sería coincidente con lo hallado aquí para *L. macroglossa*, y podría ser producto de aislamiento por distancia.

Los haplotipos ampliamente distribuidos y en muchas ocasiones aquellos mas frecuentes son considerados haplotipos ancestrales (Crandall & Templeton 1993). El hallazgo en *L. macroglossa* de al menos un haplotipo compartido puede entonces no deberse al flujo génico sino a la retención histórica del mismo, es decir, a la retención de alelos ancestrales en poblaciones contemporáneas. Esto es lo que se conoce como separación incompleta de linajes (“*incomplete lineage sorting*”, ILS), y es especialmente más probable cuando los tamaños poblacionales son mayores que los tiempos de divergencia (en unidades coalescentes) en un árbol genealógico (ancho y largo de ramas respectivamente) (Maddison & Knowles 2006). La historia demográfica de la especie indica estabilidad poblacional durante los últimos 125 mil años, y una estimación de tamaños poblacionales grande (Fig. 6), lo cual se correspondería con efectos más marcados de ILS.

Teniendo en cuenta el F_{ST} global obtenido al considerar las frecuencias haplotípicas de los grupos evaluados presentes en las Quebradas del Norte (sin considerar a aquellas secuencias que resultaron altamente divergentes), se observa que es bajo ($F_{ST}= 0,013$), lo cual sugiere que hubo o aún existe un moderado flujo génico, por lo que podrían considerarse como una única gran población. Sin embargo, para *Anaxyrus cognatus*, se encontró que la diferenciación entre poblaciones genéticamente similares estaría dada por un aislamiento por

distancia pero a mayor a escala (Jungels *et al.* 2010). La escala espacial puede afectar la cuantificación de los efectos del paisaje sobre el flujo génico (Anderson *et al.* 2010), por lo que aumentar el área de muestreo puede ser clave para definir con mayor precisión este punto. Moritz (2002) plantea que para establecer prioridades y estrategias acordes de conservación, es necesario comparar medidas de diversidad genética a escala local y regional para comprender que procesos permitieron el surgimiento de los patrones observados, y así dirigir los esfuerzos para su preservación. Sería recomendable la ampliación del número de muestras ya disponibles de la especie, abarcando de ser posible toda el área de distribución de la misma. Es necesario entonces, realizar colaboraciones a nivel regional para poder establecer, entre otras cosas, entre que localidades o regiones ocurren intercambios y así establecer unidades evolutivas independientes, imprescindible para la delimitación de estrategias de conservación para esta especie, ya amenazada en el estado de Paraná, Brasil (Vélez-Martin *et al.* 2014) y considerada en peligro de extinción en Paraguay (Maneyro & Carreira 2015).

En este contexto, el aislamiento por distancia también podría estar jugando un rol crítico en la modelación de la estructura genética de esta especie. Si bien el análisis llevado a cabo con Geneland muestra una clara diferenciación en dos poblaciones en las Quebradas del Norte, la probabilidad de pertenencia a cada población es baja (quizás debido al dispar número de muestras para la población en Artigas). Entre estas dos poblaciones existiría un cierto grado de aislamiento debido a la ausencia de cursos de agua que puedan mantenerlas conectadas (Fig. 11), o bien puede que esta separación sea explicada por una cuestión de altitud. En algunas poblaciones de especies que habitan en ambientes montañosos, la elevación es un factor que limita el flujo entre las poblaciones (Martínez & Gonzalez 2008, Funk *et al.* 2005b). Si sumamos a esto que el “quiebre” entre ambas poblaciones se localiza sobre una divisoria de agua (Fig. 11), los huevos depositados a mayor altitud (del lado oeste de la divisoria en Artigas y Salto), no seguirían la corriente de los cursos de agua hacia las

localidades ubicadas en dirección noreste, sino hacia el lado opuesto, manteniendo aisladas a ambas poblaciones. De todas formas, es aún necesario evaluar patrones filogeográficos en otras especies co-distribuidas para poner a prueba este potencial quiebre este-oeste en las Quebradas del Norte, ya que apoyaría la hipótesis de una potencial barrera geográfica o al menos un quiebre filogeográfico en común a nivel comunitario (Marske *et al.* 2013). Estos quiebres compartidos entre múltiples taxa co-distribuidos conformando lo que se denomina "zonas de sutura" pueden ser tomados en cuenta para el diseño de áreas protegidas con el fin de proteger una mayor proporción de la diversidad biológica a niveles intra e interespecífico (Moritz *et al.* 2009).

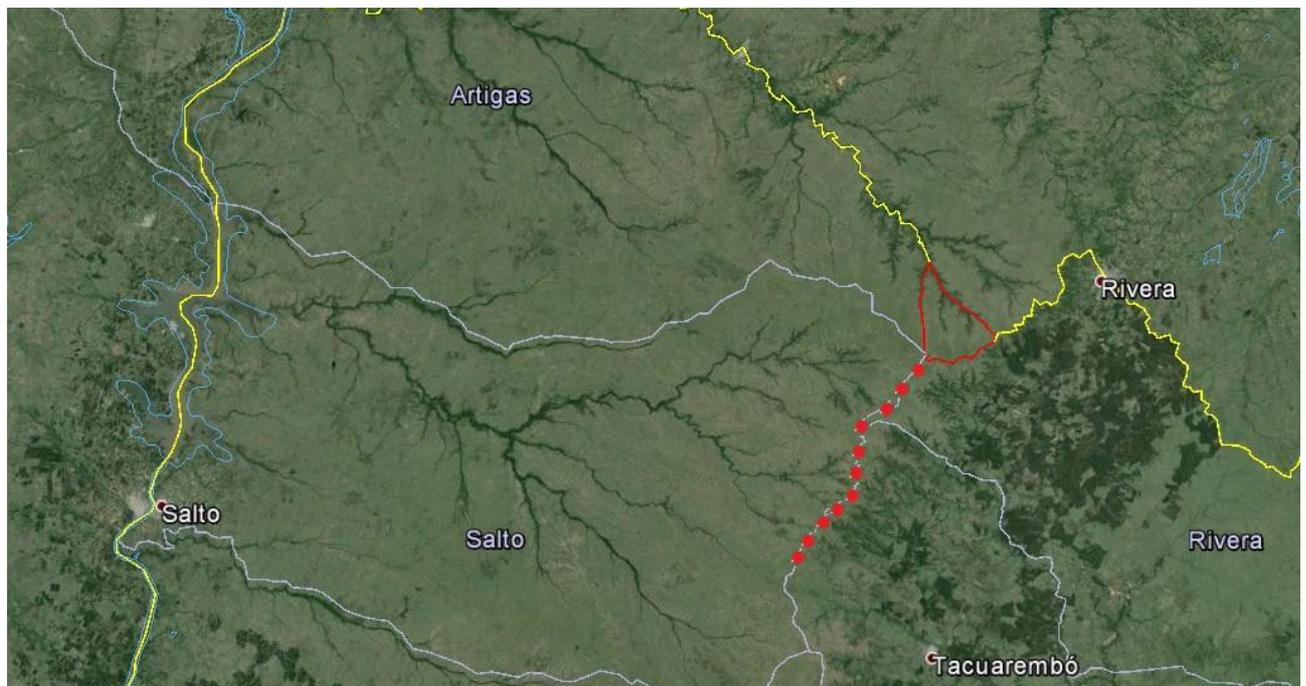


Figura 11, Imagen satelital de la zona de las Quebradas del Norte de Uruguay (GoogleEarth); en rojo se indica ubicación de la divisoria de aguas.

Con relación a la diversidad filogenética, se encontró que la cuenca del Tres Cruces (Departamento de Tacuarembó) mostró el mayor valor, complementando así a la cuenca del Arroyo Lunarejo (Departamento de Rivera). Este último, en comparación a los valores

encontrados para otras localidades, se reafirma como un área importante para preservar. La utilización de información evolutiva, tanto a nivel intra como inter-específico es fundamental para la priorización de áreas a conservar (Moritz & Faith 1998; Faith 2016), ya que medidas como la riqueza específica o la endemidad no son capaces de reflejar la diversidad y particularidad evolutiva de un área (Miranda-Esquivel 2016). Sin embargo, esto no ha sido tomado en consideración aún en nuestro país como criterio para la selección de áreas a ser ingresadas al SNAP, por lo que el aporte de este tipo de estudios puede ser relevancia en un futuro cercano. También se encontró que, al aplicar rarefacción y extrapolación sobre los índices de diversidad filogenética, se encuentran mayoritariamente los mismos resultados que con el análisis PDA. Por lo pronto, parece ser que con un mínimo de individuos por cuenca puede arribarse a los mismos resultados, aunque claramente el aumento en el número de muestras por sitio contribuirá a esclarecer y resolver con mayor precisión este punto. En principio, las cuencas de los Arroyos Lunarejo y Tres Cruces parecen albergar la mayor diversidad filogenética, con el Arroyo de las Cañas como otro potencial complemento al ya protegido Arroyo Lunarejo.

Brooks *et al.* (2015) plantean la necesidad de seleccionar áreas clave para la protección de la biodiversidad poniendo el foco más allá del nivel de especie, dándole mayor peso a la conservación tanto de la diversidad genética como filogenética y por ende a las condiciones que propiciaron el origen y mantenimiento de las mismas. De allí que, pese a que *Limnomedusa macroglossa* se encuentra clasificada como una especie de preocupación menor en cuanto a su vulnerabilidad en nuestro país, la información aquí obtenida puede ser de utilidad para la selección de áreas de conservación. En este estudio, la cuenca del Arroyo Tres Cruces tendría relevancia particular desde el punto de vista de la conservación de la diversidad genética debido a que representa una historia evolutiva única en la zona, y mejor complementa a la de la cuenca del Arroyo Lunarejo, según los índices DF de

complementariedad y de endemismo. En cualquier caso, es necesario expandir este tipo de estudios a una proporción mayor de la biota para realizar una priorización de áreas tomando en cuenta que distintos patrones filogeográficos pueden ocurrir entre especies co-distribuidas y ello debe considerarse a la hora de delimitar áreas de preservación (Moritz & Faith 1998).

Moritz (2002) plantea que para establecer prioridades y estrategias acordes de conservación, es necesario comparar medidas de diversidad genética a escala local y regional para comprender que procesos permitieron el surgimiento de los patrones observados, y así dirigir los esfuerzos para su preservación. Sería recomendable la ampliación del número de muestras ya disponibles de la especie, abarcando de ser posible toda el área de distribución de la misma.

La inclusión de estudios ecológicos sería también de gran relevancia para poder comprender de forma más profunda a esta especie y los patrones genéticos observados. Por ejemplo, trabajos a nivel poblacional que permitan inferir la capacidad de dispersión y los ámbitos de hogar de los individuos adultos y de las larvas, así como la fenología y otros parámetros demográficos y reproductivos, pueden contribuir a esclarecer patrones de estructuración pobremente asociada al sistema de cuencas. Este tipo de información puede ser relevante ya que la distribución de la variación genética, no está moldeada únicamente por eventos históricos sino también por restricciones ecológicas (Rodríguez *et al.* 2015). En este sentido, el siguiente capítulo de esta tesis trata sobre algunas variables ambientales que pueden correlacionarse con los patrones de conectividad genética en el paisaje de las Quebradas del Norte.

5. Referencias

Allentoft M. & J. O'Brien (2010). Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity*, 2: 47-71,

Andersen L., Fog K. & C. Damgaard (2004). Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings from the Royal Society B*, 271: 1293–1302.

Anderson C., Epperson B., Fortin M.J., Holderegger R., James P., Rosenberg M., Scribner K. & S. Spear (2010). Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology*, 19: 3565–3575.

Avise J.C., Arnold J., Ball R., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. & N. C. Saunders (1987). Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 89-522.

Avise J.C. (1995). Mitochondrial DNA Polymorphism and a Connection Between Genetics and Demography of Relevance to Conservation. *Conservation Biology*, 9(3): 686-690.

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

Barrio A. (1971). Sobre la coespecificidad de *Limnomedusa misionis* Schmidt y *Limnomedusa macroglossa* (Duméril et Bibron) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 30: 667–672.

Beebee T.J.C. (2005). Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 95: 423-427.

Blaustein A., Wake D. & W. Sousa (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, 8: 60–71.

Brooks T., Cuttelod A., Faith D., Garcia-Moreno J., Langhammer P. & S. Pérez-Espona (2015). Why and how might genetic and phylogenetic diversity be reflected in the identification of key biodiversity areas?. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 370: 20140019.

Carreira, S. & R. Maneyro (2015). Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. DINAMA. Montevideo, Uruguay.

Chao A., Chiu C., Hsieh T., Davis T., Nipperess D. & D. Faith (2015). Rarefaction and extrapolation of phylogenetic diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(4): 380-388.

Chernomor O., Minh B.Q., Forest F., Klaere S., Ingram T., Henzinger M., & A. von Haeseler (2015). Split diversity in constrained conservation prioritization using integer linear programming. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 83-91.

Clement M., Posada D. & A. Crandall (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.

Crandall K. & A. Templeton (1993). Empirical Tests of Some Predictions From Coalescent Theory With Applications to Intraspecific Phylogeny Reconstruction. *Genetics*, 134: 959-969.

Darriba D., Taboada G., Doallo R. & D. Posada (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.

Drummond, A.J., Suchard M.A., Xie D. & A. Rambaut (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969–1973.

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

Faith D. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61: 1-10.

Faith D. (1994). Phylogenetic pattern and the quantification of organismal biodiversity. *Philosophical transactions of The Royal Society London (B)*, 345: 45-58.

Faith D. & P. Walker (1996). Environmental diversity: on the best-possible use of surrogate data for assessing the relative biodiversity of sets of areas. *Biodiversity and Conservation*, 5: 399-415.

Faith D. (2016). The PD Phylogenetic Diversity Framework: Linking Evolutionary History to Feature Diversity for Biodiversity Conservation. En: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Ed.: Roseli Pellens & Philippe Grandcolas. Springer.

Filatov D.A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, 25: 3189-3190.

Frankham R. (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 750-755.

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

Funk W., Greene A., Corn P. & F. Allendorf (2005)**a**. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biology Letters*, 1: 13-16.

Funk W., Blouin M., Corn P., Maxell B., Pilliod D., Amish S. & F. Allendorf (2005)**b**. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, 14: 483–496.

Gudynas E. & A. Gehrau (1981). Notas sobre la distribución la ecología de *Limnomedusa macroglossa* (Duméril & Bibron, 1841) en Uruguay (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia (Séri Zoologia)*, 60: 81-99.

Guillot G, Mortier F. & A. Estoup (2005). Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712–715.

Guillot G., Renaud S., Ledevin R., Michaux J. & J. Claude (2012). A Unifying Model for the Analysis of Phenotypic, Genetic and Geographic Data. *Systematic Biology*, 61(5) 897-911.

Hasegawa M., Kishino H. & T. Yano (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160–174.

Holderegger R., Kamm U. & F. Gugerli (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21:797–807.

Huson D. & D. Bryant (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254-267.

Jehle R., Burke T. & J.W. Arntze (2005). Delineating fine-scale genetic units in amphibians: Probing the primacy of ponds. *Conservation Genetics*, 6:227–234.

Jungels J., Griffis-Kyle K. & W. Boeing (2010). Low Genetic Differentiation among Populations of the Great Plains Toad (*Bufo cognatus*) in Southern New Mexico. *Copeia*, 3: 388-396.

Kaefer I., Both C. & S. Zanini Cechin (2009). Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura:Cycloramphidae) in southern Brazil. *Journal of Natural History*, 43 (19–20): 1195–1206.

Kool J., Moilanen A. & E. Treml (2012). Population connectivity: recent advances and new perspectives. *Landscape Ecology*, 28: 165-185.

Kraaijeveld-Smit F., Beebee T., Griffiths R., Moore R. & L. Schley (2005). Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology*, 14: 3307–3315.

Lampert K., Rand A., Mueller U. & M. Ryan (2003). Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology*, 12: 3325–3334.

Langone J., Camargo A. & R. de Sá (2015). High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel,1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95: 137-155.

Leigh J. & D. Bryant (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110–1116.

Librado P. & J. Rozas (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451–1452.

Maddison W. & L. Knowles (2006). Inferring Phylogeny Despite Incomplete lineage Sorting. *Systematic Biology*, 55(1): 21-30.

Measey G., Galbusera P., Breyne P. & E. Matthysen (2007). Gene flow in a direct-developing, leaf litter frog between isolated mountains in the Taita Hills, Kenya. *Conservation Genetics*, 8:1177–1188.

Marko P. & M. Hart (2011). The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology and Evolution*, 26 (9): 448-456.

Marsh D. & P. Trenham (2001). Metapopulation Dynamics and Amphibians Conservation. *Conservation Biology*, 15(1): 40-49.

Marske K., Rahbek C. & D. Nogués-Bravo (2013). Phylogeography: spanning the ecology – evolution continuum. *Ecography*, 36: 1-13.

Martínez I. & E. González (2008). Patterns of gene flow and source-sink dynamics in high altitude populations of the common toad *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(4): 824–839.

Martof B. (1953). Home Range and Movements of the Green Frog, *Rana clamitans*. *Ecology*, 34 (3): 529-543.

Miranda Esquivel D. (2016). Support in Area Prioritization Using Phylogenetic Information. En: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis*. Ed.: Roseli Pellens & Philippe Grandcolas. Springer.

Moore W. (1995). Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution*, 49 (4): 718-726.

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

Moritz C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51(2): 238–254.

Moritz C., Hoskin C., MacKenzie J., Phillips B., Tonione M., Silva N., VanDerWal J., Williams S. & C. Graham (2009). Identification and dynamics of a cryptic suture zone in tropical rainforest. *Proceedings of The Royal Society B*, 276: 1235–1244.

Mueller R. (2006). Evolutionary Rates, Divergence Dates, and the Performance of Mitochondrial Genes in Bayesian Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 55(2): 289–300.

Nei M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York. 512 p.

Newman R. & T. Squire (2001). Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*, 10: 1087-1100.

Panario D., Gutiérrez O., Sánchez Bettucci L., Peel E., Oyhantçabal P. & J. Rabassa (2014). Ancient Landscapes of Uruguay. En: Gondwana Landscapes in southern South America. Argentina, Uruguay and southern Brazil. Ed.: Jorge Rabassa & Cliff Ollier. Springer.

R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Rambaut A. (2012). FigTree v.1.4.2. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rambaut A., Suchard M. & A. Drummond (2013). Tracer, Version 1.6. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.

Rodríguez A., Börner M., Pabijan M., Gehara M., Haddad C. & M. Vences (2015). Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. *Evolutionary Ecology*, 29(5): 765-785.

Rowe G. & T. Beebee (2007). Defining population boundaries: use of three Bayesian approaches with microsatellite data from British natterjack toads (*Bufo calamita*). *Molecular Ecology*, 16: 785–796.

Smith M. & D. Green (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*, 28: 110-128.

Smith M. & D. Green (2006). Sex, isolation and fidelity: unbiased long-distance dispersal in a terrestrial amphibian. *Ecography*, 29: 649-658.

Tajima F. (1983). Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105 (2): 437-460.

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

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A. & S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Templeton A. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10: 779-791.

Vélez-Martin E., Rocha C., Blanco C., Oliveira B., Hasenack H. & V. De Patta Pillar (2014). Capítulo 12: conversão e fragmentação. En: *Os campos do sul*. Ed.: Valério De Patta Pillar & Omara Lange. UFRGS, Porto Alegre. 192 p.

Vences M., Hauswaldt S., Steinfartz S., Rupp O., Goesmann A., Künzel S., Orozco-Wengel P., Vieites D., Nieto-Roman S., Haas S., Laugsch C., Gehara M., Bruchmann S., Pabijan M., Ludewig A., Rudert D., Angelini C., Borkin L., Crochet P., Crottini A., Dubois A., Ficetola F., Galán P., Geniez P., Hachtel M., Jovanovic O., Litvinchuk S., Lymberakis P., Ohler A. & N. Smirnov (2013). Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3): 657-670.

Zink R. & G. Barrowclough (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17: 2107–2121.

Anexo 2

Tabla 1. Individuos considerados para las estimaciones ϕ_{st} pareados; individuos con la misma o similar coordenada geográfica fueron agrupados en una misma localidad.

<i>ACRÓNIMO</i>	<i>DEPARTAMENTO</i>	<i>CUENCA</i>	<i>LOCALIDAD</i>	<i>LATITUD</i>	<i>LONGITUD</i>
PQDN 1	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 3	-31.187389	-55.948306
PQDN 2	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.383868	-55.937189
PQDN 3	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.383868	-55.937189
PQDN 6	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.383644	-55.937342
PQDN 7	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.383293	-55.937173
PQDN 8	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.384056	-55.937216
PQDN 21	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.3836	-55.937116
PQDN 22	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.3836	-55.937116
PQDN 23	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 2	-31.3836	-55.937116
PQDN 24	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 5	-31.246939	-55.951008
PQDN 25	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 5	-31.246939	-55.951008
PQDN 27	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 5	-31.24676	-55.951045
PQDN 45	Tacuarembó	Laureles	Laureles 2	-31.32859	-55.967853
PQDN 46	Tacuarembó	Laureles	Laureles 2	-31.321135	-55.979993
PQDN 47	Tacuarembó	Laureles	Laureles 2	-31.321135	-55.979993
PQDN 48	Tacuarembó	Laureles	Laureles 2	-31.321135	-55.979993
PQDN 49	Tacuarembó	Laureles	Laureles 2	-31.321135	-55.979993
PQDN 52	Tacuarembó	Laureles	Laureles 1	-31.231378	-56.091165
PQDN 53	Tacuarembó	Laureles	Laureles 1	-31.231378	-56.091165
PQDN 55	Tacuarembó	Laureles	Laureles 1	-31.231378	-56.091165
PQDN 56	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 1	-31.304409	-56.058552
PQDN 57	Tacuarembó	De las Cañas	De las Cañas 1	-31.304672	-56.058542
PQDN 141	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814
PQDN 142	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814
PQDN 143	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814
PQDN 144	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814

PQDN 145	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814
PQDN 146	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412821	-56.211557
PQDN 193	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 1	-31.32815	-56.177571
PQDN 194	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 1	-31.32815	-56.177571
PQDN 196	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 1	-31.32815	-56.177571
PQDN 197	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 1	-31.32815	-56.177571
PQDN 199	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 1	-31.32815	-56.177571
PQDN 225	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	Tacuarembó chico 2	-31.694423	-56.124028
PQDN 226	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	Tacuarembó chico 2	-31.694423	-56.124028
PQDN 268	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	Tacuarembó chico 3	-31.704677	-56.168827
PQDN 269	Tacuarembó	Tacuarembó Chico	Tacuarembó chico 3	-31.704677	-56.168827
PQDN 316	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 1	-30.962817	-55.703867
PQDN 317	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 1	-30.962817	-55.703867
PQDN 322	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 1	-30.962817	-55.703867
PQDN 327	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 2	-31.047167	-55.836517
PQDN 328	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 2	-31.047167	-55.836517
PQDN 343	Tacuarembó	Tacuarembó chico	Tacuarembó chico 1	-31.558806	-56.143639
PQDN 344	Tacuarembó	Tacuarembó chico	Tacuarembó chico 1	-31.558806	-56.143639
RML 2696	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 1	-31.094367	-55.966331
RML 2697	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 1	-31.094367	-55.966331
RML 2699	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 1	-31.094367	-55.966331
RML 2722	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 2	-31.137392	-56.045823
RML 2723	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 2	-31.137392	-56.045823
RML 2734	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 4	-31.190479	-55.901291
RML 2736	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 4	-31.190688	-55.90164
RML 2739	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 3	-31.187389	-55.948306
RML 2740	Rivera	Lunarejo	Lunarejo 3	-31.187389	-55.948306
RML 2769	Tacuarembó	Tres Cruces	Tres Cruces 2	-31.412848	-56.212814

CURC-B 69	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 1	-30.96986667	-55.66975
CURC-B 70	Rivera	Tacuarembó	Tacuarembó 1	-30.96986667	-55.66975

Tabla 2. Haplotipos del gen citocromo b para *Limnomedusa macroglossa* por Departamento

	Artigas	Salto	Rivera	Tacuarembó	San José	Maldonado	Lavalleja	Cerro Largo	Total
Hap_1							1		1
Hap_2				2		1			3
Hap_3	5	6	19	20			1		51
Hap_4			2	3					5
Hap_5					1				1
Hap_6		1							1
Hap_7	1								1
Hap_8		1	1						2
Hap_9			2						2
Hap_10				2					2
Hap_11		1		7					8
Hap_12				1					1
Hap_13				3					3
Hap_14			1						1
Hap_15			1						1
Hap_16			1						1
Hap_17				1					1
Hap_18				1					1
Hap_19				1					1
Hap_20								1	1
Hap_21		1							1

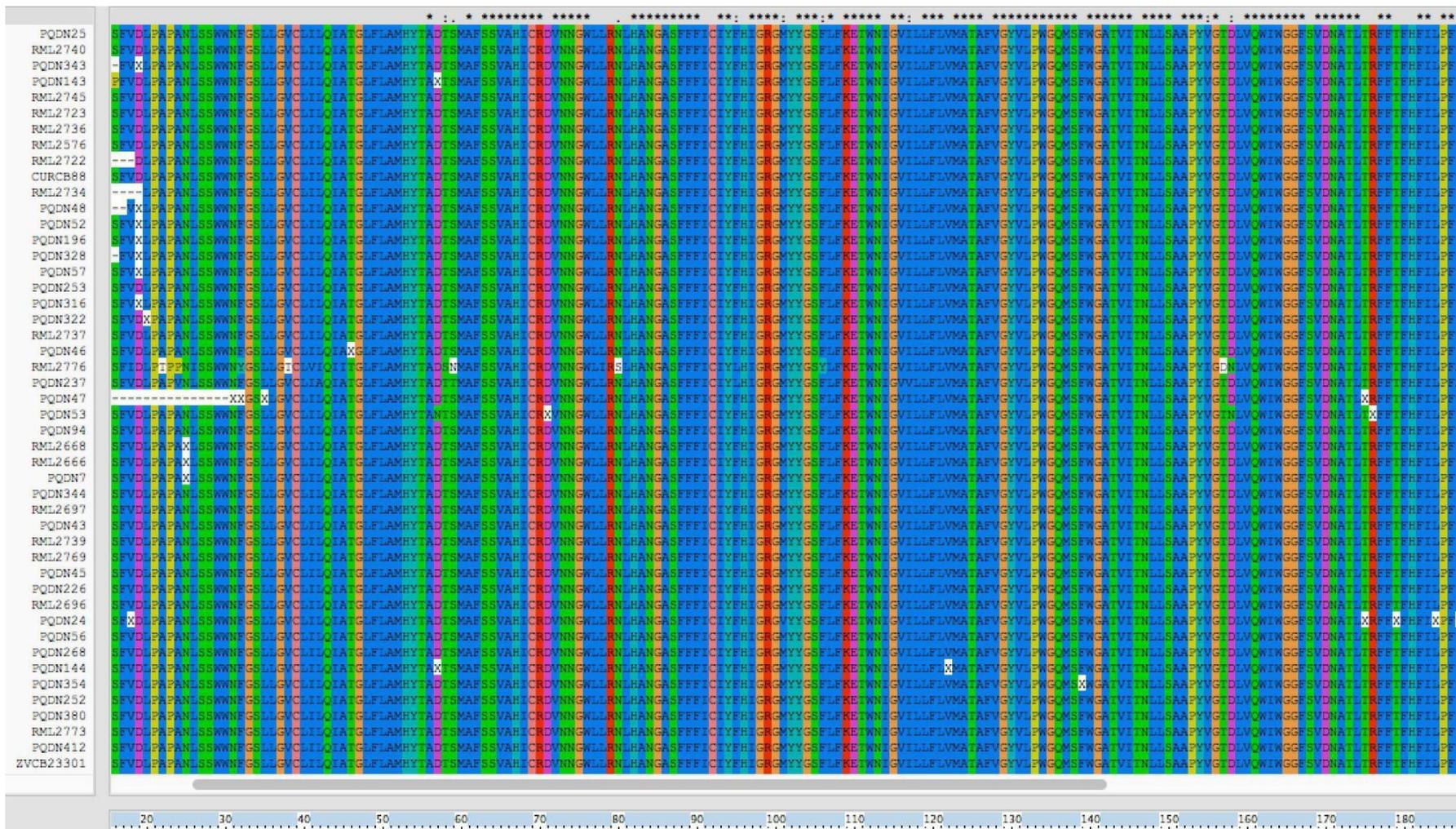


Figura 1. Secuencias traducidas a proteínas, no se observan ni codones *stop* ni desplazamientos del marco de lectura

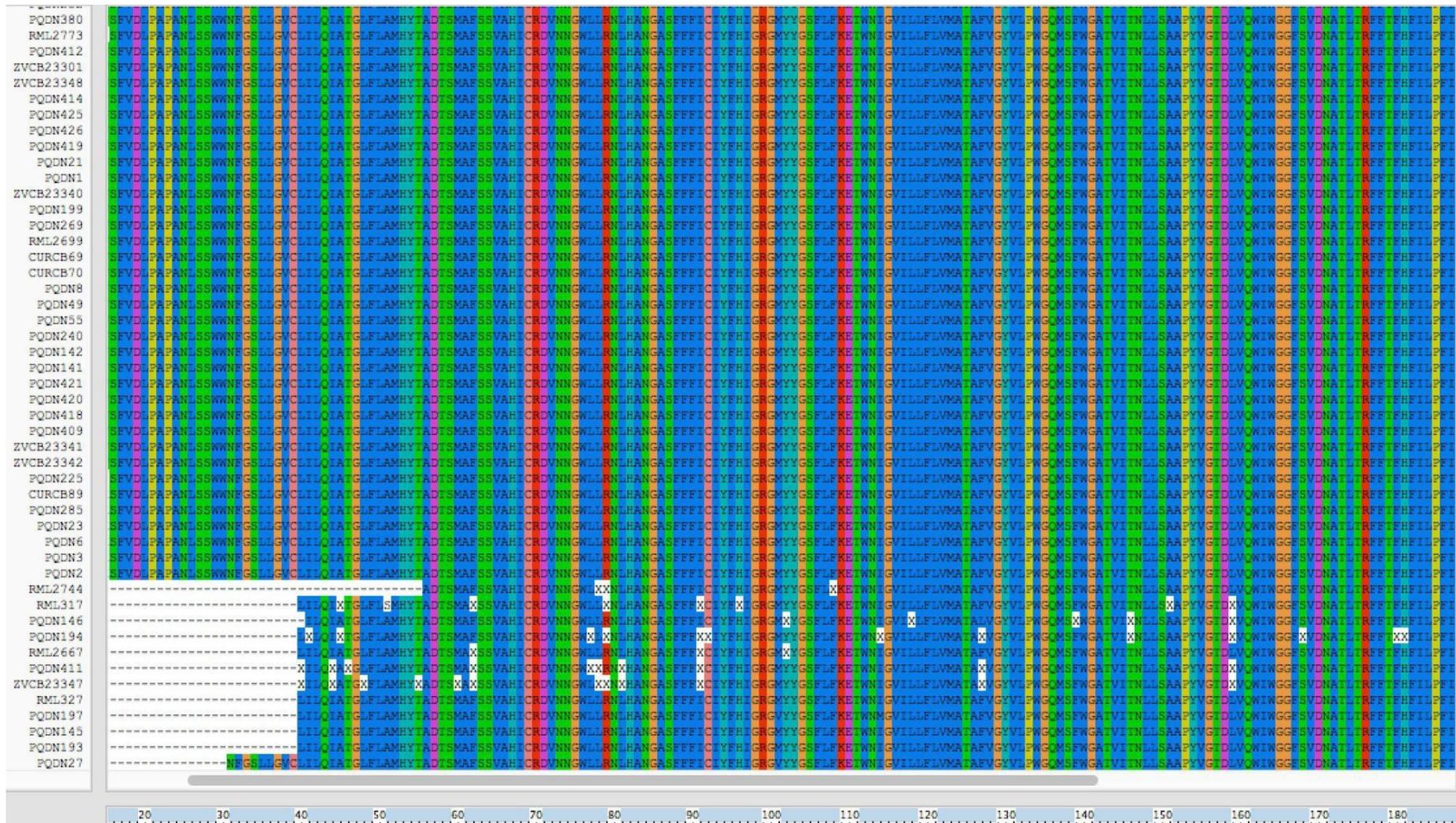


Figura 2. Secuencias traducidas a proteínas, no se observan ni codones *stop* ni desplazamientos del marco de lectura.

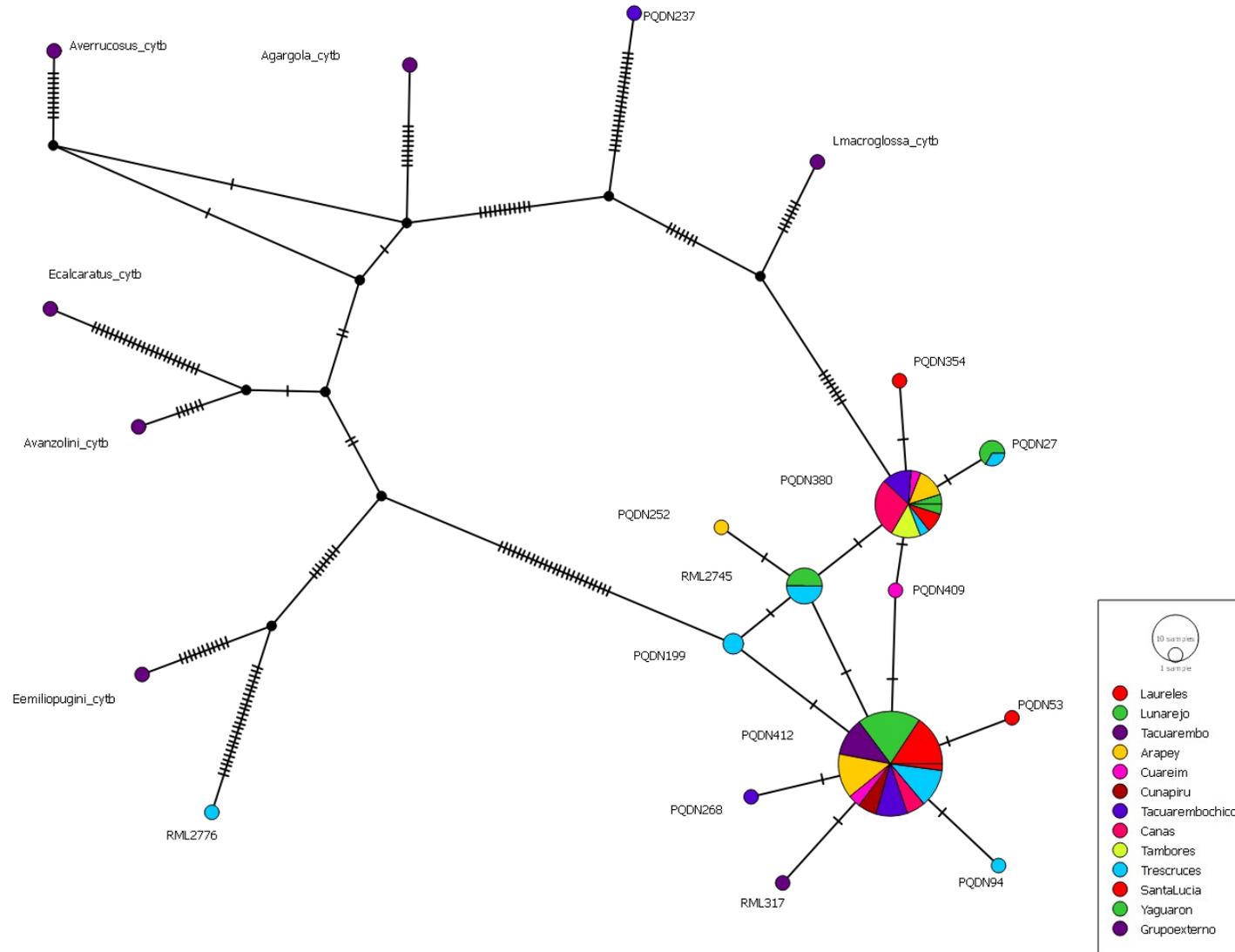


Figura 3. Red de haplotipos para el gen citocromo b de *Limnomedusa macroglossa*, incluyendo secuencias de especies consideradas como grupo externos y una adicional correspondiente a un individuo de *L. macroglossa* de Argentina.

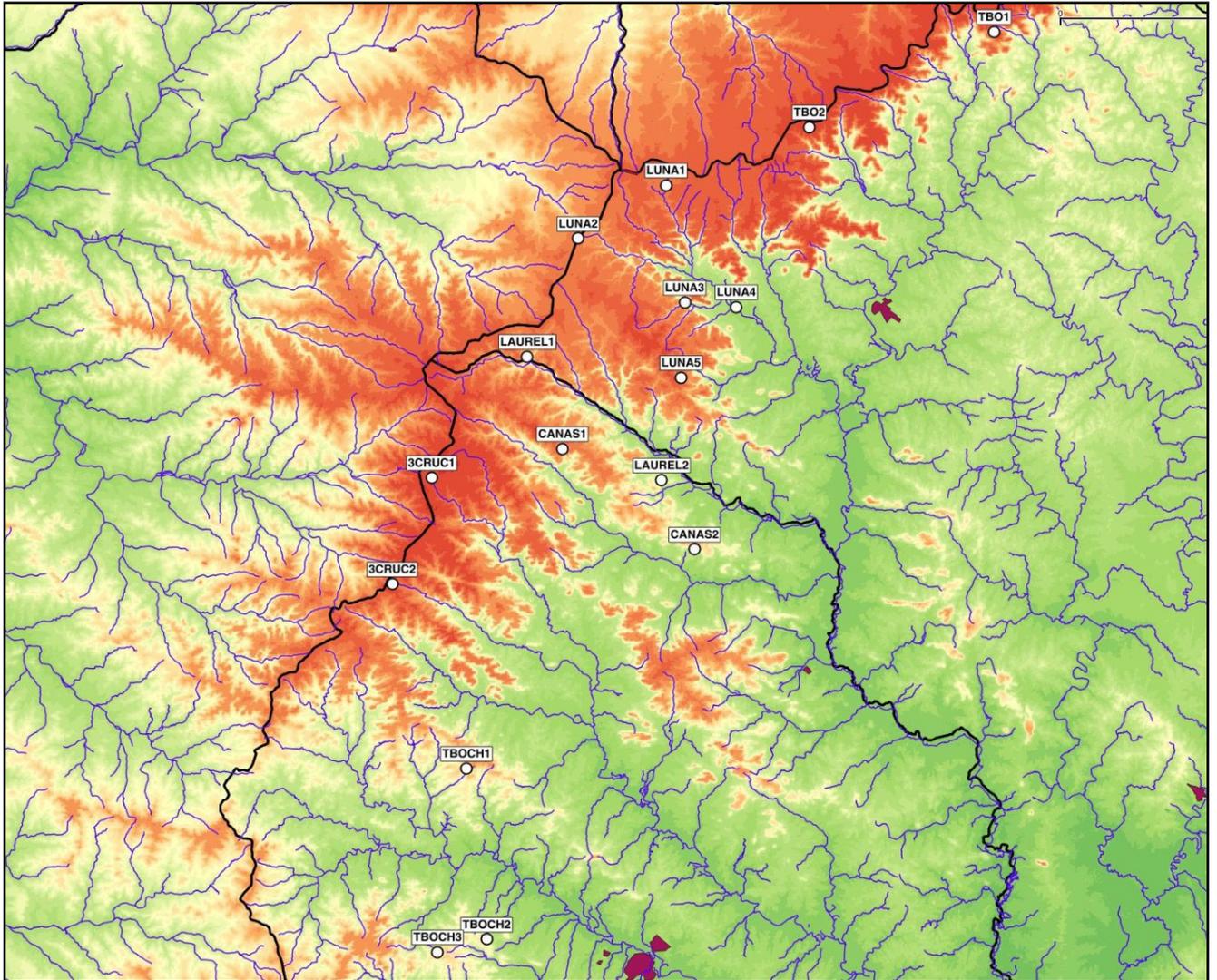


Figura 4. Localidades consideradas para los análisis de ϕ st pareados; individuos con la misma o similar coordenada geográfica fueron agrupados en una misma localidad. Ver códigos de localidades en Anexo 2,Tabla 1.

CAPÍTULO 2: Genética del Paisaje en las Quebradas del Norte

1.Introducción

Las especies con escasa vagilidad, es decir, con poca capacidad de movimiento en un determinado ambiente, suelen tener poblaciones que se mantienen aisladas por distancia, aún cuando se encuentren relativamente próximas mostrando una alta estructuración y diferenciación poblacional y genética (Awise *et al.* 2009). El uso de las distancias genéticas para la estimación de las tasas de migración se ha extendido, ya que este parámetro contiene información histórica y está asociado a la conectividad entre poblaciones, la cual es difícil de detectar por otros medios (Jaquiéry *et al.* 2011). Se habla de aislamiento por distancia (isolation by distance; IBD) como un patrón observable entre muestras en el cual la similitud genética va en decremento conforme incrementa la distancia geográfica (Manel & Holderegger 2013). Los patrones genéticos poblacionales de IBD han sido explicados y simulados básicamente dos formas: (1) asumiendo poblaciones ampliamente distribuidas, continuas en el espacio, pero con limitada capacidad de movimiento, lo cual evita la formación de unidades panmícticas (modelo de islas propuesto por Wright en 1943); (2) considerando poblaciones más o menos discontinuas, formando unidades discretas, en donde individuos pueden intercambiarse, al menos un “paso” a la vez en cada generación, entre unidades adyacentes o próximas, modelo dado en llamar “stepping stone” (Kimura & Weiss 1964). Esta posibilidad de intercambio o movimiento de los individuos y el patrón generado, es decir de aislamiento por distancia, está fuertemente influenciado por la configuración del hábitat, la topología de las poblaciones o subpoblaciones y la distancia máxima de migración propia de la especie (Van Strien *et al.* 2015).

La conectividad funcional, entendida como la posibilidad que brinda el paisaje para el movimiento de individuos entre recursos parcheados (Taylor *et al.*, 1993), puede ser conocida indirectamente a través de la medición de la conectividad genética, representada por el nivel

de flujo génico entre poblaciones, especialmente cuando su distribución es discontinua (Kool *et al.*, 2012). La genética del paisaje ha surgido como una disciplina a través de la cual puede evaluarse el papel que juegan las variables paisajísticas en el modelaje de la estructura genética de poblaciones, combinando datos provenientes de variados marcadores moleculares, junto con información espacial y diferentes métodos estadísticos (Storfer *et al.* 2007). Esta disciplina provee información útil sobre las interacciones entre el paisaje y los procesos microevolutivos que ocurren y se ven afectados por el mismo, como el flujo génico, la selección o la deriva genética (Manel *et al.* 2003). Según Guillot *et al.* (2015) existen dos etapas principales en estudios de genética del paisaje: (1) la detección y localización de discontinuidades genéticas, y (2) su correlación con el paisaje y las características ambientales. Sin embargo, las respuestas genéticas a cambios en el paisaje tienden a no ser simultáneas (Spear & Storfer 2008; Bolliger *et al.* 2014), lo cual determina que la variación genética actual pueda ser más representativa de un paisaje pasado que de uno actual. Esto puede llegar a obstaculizar la interpretación de cómo la actividad antropogénica y los paisajes contemporáneos modelan el flujo génico en la actualidad (Epps & Keyghobadi 2015). A su vez, existen factores adicionales que modelan la diversidad y la estructura genética en poblaciones naturales, como la densidad poblacional, atributos de la historia de vida, los patrones de movimiento o el sistema de apareamiento (Richardson 2012; Bolliger *et al.* 2014). Dyer & Nason (2004) propusieron una metodología denominada *Population Graphs* que, basada en la teoría de grafos, pretende explicar los patrones actuales de variación intraespecífica en poblaciones naturales caracterizando su compleja topología. Se asume en este contexto, que la misma surge como producto de la interacción genética tanto contemporánea como pasada entre poblaciones. Esta aproximación, permite incorporar una cuantificación de la distancia genética más confiable que el clásico F_{ST} y, permite extraer el componente histórico de la estructura filogeográfica, que puede interferir con las inferencias sobre procesos contemporáneos de la genética del paisaje (Dyer 2015).

Si bien diversos estudios han hecho hincapié en la composición del paisaje como un factor determinante de la estructuración genética poblacional, Bolliger *et al.* (2014) sugieren que debe darse mayor atención sobre la configuración espacial del mismo, es decir, la organización en el espacio del ambiente y su heterogeneidad, lo cual afecta la topología de las unidades poblacionales obstaculizando o propiciando la conectividad entre ellas. Por otra parte, considerando este aspecto, es necesario tomar en cuenta la escala a la que ocurre la migración y dispersión, debido a que los elementos paisajísticos que afectan la diferenciación genética y el flujo génico, cambian según la escala espacial que se considere (Angelone *et al.* 2011; Mims *et al.* 2015a).

Las Quebradas del Norte representan una peculiaridad geográfica en un país como Uruguay, en donde predominan las praderas y una topografía homogénea. Con un marcado relieve, están constituidas por una sucesión de cerros “chatos” y serranías que delimitan estrechos valles por entre los que discurren varios cursos de agua, característicamente poseen paredones verticales, saltos de agua y cuevas o grutas (Evia & Gudynas 2000; Panario *et al.* 2014). El complejo está formado por una serie de quebradas de gran pendiente que se presentan como profundas hendiduras en la roca basáltica. La superficie de la cuesta presenta una pendiente suave hacia el Río Uruguay, siendo la misma, abrupta del lado opuesto (la "escarpa" basáltica, de orientación este), lo cual se corresponde con grandes sinuosidades entre las que destacan cuchillas y sierras (Chebataroff 1969). Por ello, los cursos de agua tienden a discurrir en dirección noroeste-sureste, siendo más destacados por su extensión y caudal, los Arroyos Lunarejo, Laureles, de las Cañas, Tres Cruces y Tacuarembó Chico, todos tributarios del Río Tacuarembó (ver Fig. 1).

Limnomedusa macroglossa se encuentra ampliamente distribuida en el territorio

uruguayo, incluyendo la zona de las Quebradas del Norte del Uruguay. Dado que los adultos muestran una marcada preferencia de hábitat y suele encontrarse en los cursos de agua o refugiada bajo piedras en las cercanías, se presume que tienen una escasa vagilidad, particularmente entre sitios separados por una topografía compleja y/o por hábitats evitados por la especie (Gudynas & Gehrau 1981). En este contexto resulta plausible suponer que existe dispersión por cursos de agua durante la etapa larvaria, desde zonas elevadas hacia zonas más bajas. En vez de usar distancias geográficas lineales para correlacionar con distancias genéticas, es posible la estimación de distancias geográficas pero por cursos de agua, así como la distancia corregida por topografía (para vías terrestres complejas), o considerar potenciales corredores cuando la especie presumiblemente utiliza una o todas las vías para su dispersión (Measey *et al.* 2007; Mims *et al.* 2015b). Se espera entonces que, dados los resultados obtenidos previamente, las subpoblaciones muestren bajos niveles de diferenciación cuanto más próximas estén entre sí, y que las distancias genéticas aumenten cuanto más alejadas se encuentren. De todas formas, si la especie tiene una alta capacidad de dispersión, entonces, la diferenciación genética no debería de aumentar enormemente con la distancia geográfica. Por lo pronto, se pretende comparar la estructuración genética con la variación morfológica y ambiental para *Limnomedusa macroglossa* en las Quebradas del Norte del Uruguay, así como evaluar si la estructuración genética de la especie está influenciada por distancias lineales, distancias por cursos de agua, y/o distancias ambientales (p. ej., clima, altitud). Puntualmente se explorará la incidencia de algunas variables climáticas y las características del paisaje en la estructura poblacional de *L. macroglossa*, analizando y describiendo las posibles relaciones entre las distancias genética, ambiental, morfológica y geográfica; además de que serán evaluadas posibles vías de dispersión para la especie.

2. Metodología

Para la realización de los análisis que se detallan a continuación, se emplearon datos provenientes de individuos adultos colectados en la zona de las Quebradas del Norte, pertenecientes a los Departamentos de Rivera y Tacuarembó (Fig. 1). Se eligió esta zona geográfica para el estudio porque es conveniente que la escala espacial de análisis sea concordante con la escala en la que se estima que ocurre flujo génico (Anderson *et al.* 2010). Según los resultados obtenidos a través del análisis efectuado en el paquete Geneland v.4.0.4. (Guillot *et al.*, 2005), se identificaron dos poblaciones para *L. macroglossa* en las Quebradas del Norte de Uruguay. La delimitación de poblaciones es necesaria para evaluar la existencia de aislamiento por distancia, ya que ha sido también sugerido que de no conocerse la distancia máxima de migración, se consideren pares de subpoblaciones que estén próximas ya que potencialmente pueden intercambiar migrantes (Van Strien *et al.* 2015).

Utilizando la base de datos WorldClim (<http://www.worldclim.org/current>), se obtuvieron 19 variables Bioclimáticas (Anexo 3, Tabla 1) con una resolución de 1 km x 1 km para el área de estudio. Partiendo de las coordenadas geográficas de los individuos muestreados, en el programa QGIS 2.0.1 (QGIS Development Team, 2009), se levantaron las capas obtenidas en Worldclim y se extrajeron los datos climáticos por cada punto, así como la capa correspondiente a la altura (variable topográfica). Para establecer que variables Bioclimáticas explican la mayor cantidad de los datos se hizo un Análisis de Componentes Principales (ACP), implementado con la función `prcomp` del paquete STATS en la plataforma R (R Core Team, 2013) con los datos logaritmizados. Luego se calcularon las Distancias de Mahalanobis (Mahalanobis 1936) usando el paquete StatMatch implementado en R (R Development Core Team, 2013) entre las localidades de muestreo en base a los

"scores" de los componentes principales, obteniéndose una matriz de distancias climáticas entre puntos.

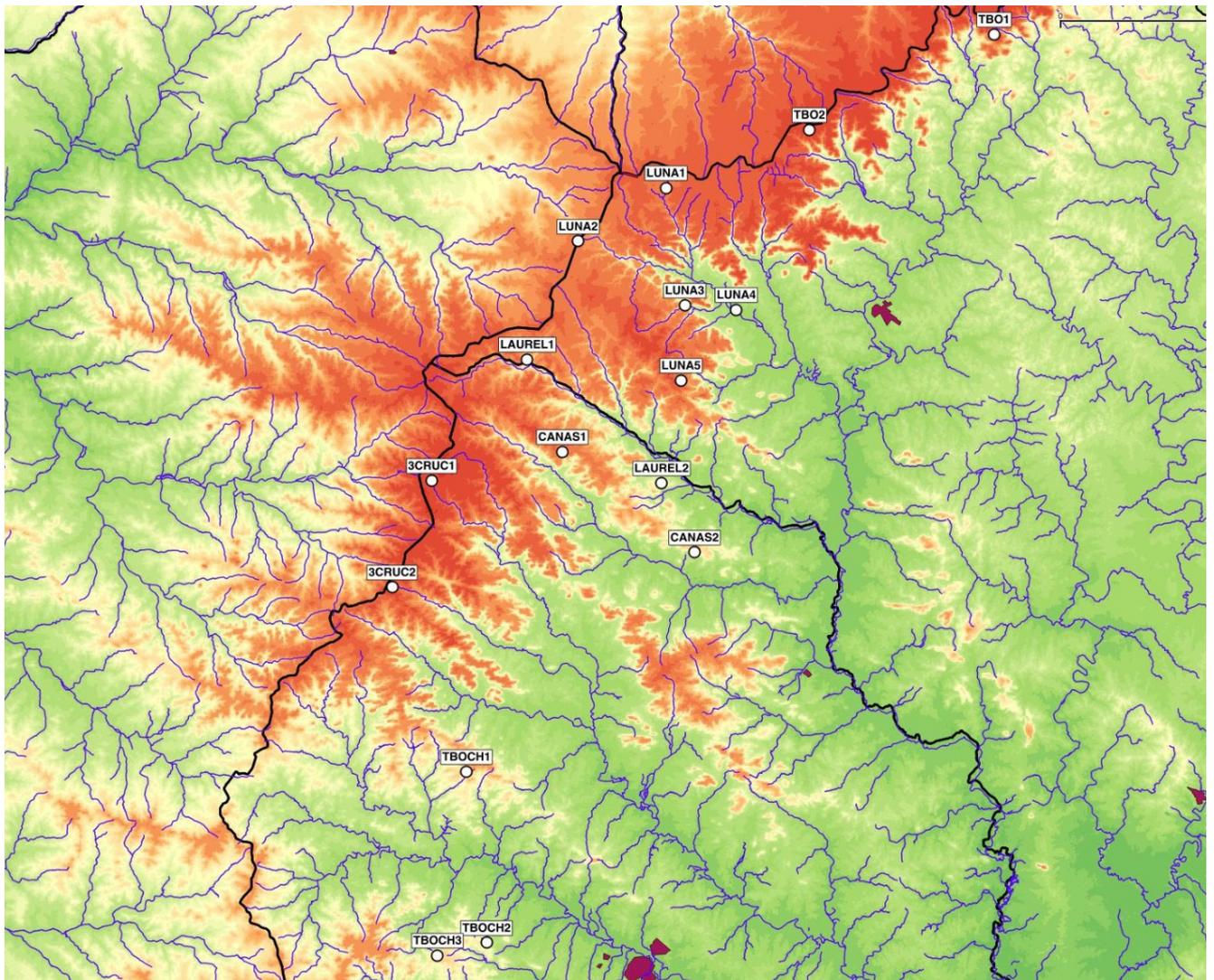


Figura 1. Localidades consideradas para los análisis de genética del paisaje; individuos con la misma o similar coordenada geográfica fueron agrupados en una misma localidad. Ver códigos de localidades en Anexo 2,Tabla 1

Se tomaron 11 medidas morfométricas en individuos adultos utilizando un calibre digital (0.01 mm de precisión): largo hocico cloaca (SVL), ancho mandibular (MW), largo de la cabeza (HL), distancia interorbital (IOD), diámetro del ojo (ED), distancia entre narinas (IND), distancia ojo-narina (SED), largo del brazo (ARML), largo de la tibia (TIB), largo del tarso (TRL) y largo del metatarso (META).

Utilizando el módulo PADWin en el programa CLIC (Dujardin 2013), se efectuó una corrección de tamaño de las medidas morfométricas logaritmizadas, para luego aplicar un Análisis de Componentes Principales (ACP) entre individuos y así determinar que variables explican en mayor proporción la variabilidad total en morfología. Usando los componentes sugeridos y corregidos, se calculó la distancia Mahalanobis (Mahalanobis 1936) empleando el paquete StatMatch implementado en R (R Development Core Team, 2013) de forma de obtener así una matriz de distancias morfológicas.

Ya que para *L. macroglossa* se estima que los adultos presentan alta fidelidad al hábitat, mientras que las larvas representarían la etapa dispersiva, el abordaje de las correlaciones genéticas y geográficas debería entonces efectuarse empleando distancias por cursos de agua. Pese a ello, ya que tampoco se tiene certeza de que los adultos sean poco vágiles, la distancia lineal también será empleada para el estudio de estas relaciones. Para el cálculo de las distancias geográficas se emplearon dos aproximaciones: la distancia en línea recta entre localidades utilizando el programa Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3 (http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Para el cálculo de la distancia vía cursos de agua, se empleó el *plugin* "Road Graph" de QGIS 2.0.1 (QGIS Development Team, 2009).

Las distancias genéticas se obtuvieron con el programa Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), aplicando un Análisis de Varianza Molecular (a partir de las secuencias

correspondientes a los individuos con medidas morfométricas asociadas pertenecientes a los grupos seleccionados previamente en el AMOVA), del cual se obtiene una matriz de distancias expresadas como ϕ_{ST} (Excoffier *et al.* 1992), que aparece en la Tabla 4 del capítulo 1. El ϕ_{ST} es un análogo del F_{ST} el cual toma en cuenta la frecuencia como la distancia entre los haplotipos. También, fueron calculadas distancias genéticas simples (proporción de sitios variables) para la comparación de distancias entre individuos, utilizando el programa PAUP* 4.0d90 (Swofford 2002). Una vez obtenidas las cuatro matrices de distancias (morfológica, genética, geográfica y ambiental) se realizaron tests de Mantel simples para evaluar las correlaciones entre las mismas en todas las combinaciones posibles con el programa zt (Bonnet & Van de Peer 2002). Al realizar el test parcial de Mantel, se testearon correlaciones entre morfología y distancias genéticas simples controlando por las variables climáticas por un lado y con la distancia geográfica por otro. Se usó el paquete MCMCglmm 2.22.1 (Hadfield 2010) de R para realizar un análisis de efectos lineales mixtos (GLMM) de la relación entre las distancias genéticas (variable dependiente) y varios factores explicativos. Como efectos fijos, se utilizaron la distancias geográfica y climática (variables explicativas), en modelos con diferentes combinaciones de efectos e interacciones entre ellas. Como efecto aleatorio se especificó a las localidades geográficas para tomar en cuenta la interdependencia entre las observaciones de las matrices de distancia (Van Strien *et al.* 2012). El ajuste de los modelos con distintos efectos fijos fueron comparados con el índice DIC (“*deviance information criterion*”), y el poder explicativo se estimó con el valor de $R^2_{GLMM(m)}$ (Nakagawa & Schielzeth 2013) que cuantifica la varianza explicada sólo por los efectos fijos. El modelo que mejor se ajusta a los datos se seleccionó según el valor de DIC más bajo.

Utilizando el paquete popgraph (Dyer 2014) en la plataforma R (R Development Core Team, 2013), se estimó el grafo poblacional de la especie en la zona de las Quebradas del Norte; esta aproximación analiza de forma gráfica y estadística la covarianza genética

calculándola entre todas las poblaciones a considerar, pero de manera simultánea, a diferencia de otros métodos, como el F_{ST} y otros basados en el coalescente, en donde la evaluación se realiza a través de un modelo pareado (Dyer & Nason 2004). El método busca hallar la topografía gráfica que requiera un menor conjunto de conexiones o pasos entre poblaciones para explicar la covariación genética de todas las poblaciones, debido a que en mayor o menor medida se encuentran todas conectadas desde el punto de vista genético. Así, cada cuenca representa un nodo cuyo diámetro muestra el grado de diferenciación genética que posee; a través de líneas, se conectan los nodos que aparecen menos diferenciados entre sí y por lo tanto más cercanos genéticamente, mientras que la presencia de nodos sin conectar estaría indicando que los mismos evolucionarían de manera independiente al resto.

Finalmente, empleando el programa LocalDiff 1.5 (Duforet *et al.*, 2014), se evaluó si el aislamiento por distancia es espacialmente homogéneo. Construyendo una matriz de similitud, en donde los puntos con menor diferenciación genética tendrán valores cercanos al cero y aquellos con mayor diferenciación estarán cercanos al uno, el programa puede interpolar, usando datos conocidos, las distancias genéticas en puntos no muestreados. Se obtiene así un polígono como resultado con un gradiente de diferenciación genética local que muestran patrones no estacionarios de aislamiento por distancia.

3.Resultados

El ACP indica que las variables bioclimáticas que mayor influencia tienen sobre el primer componente son la estacionalidad de la temperatura y el rango de temperatura anual (BIO 4 y BIO 7 respectivamente), mientras que sobre el segundo componente lo son la máxima temperatura en el mes más cálido y el promedio de la temperatura en el trimestre más cálido (BIO 5 y BIO 10) (Fig. 2). A su vez, con estas cuatro primeras variables se explica el 96% de los datos, por lo que las mismas se utilizaron para calcular la matriz de distancias climáticas en base a distancias de Mahalanobis (Mahalanobis 1936).

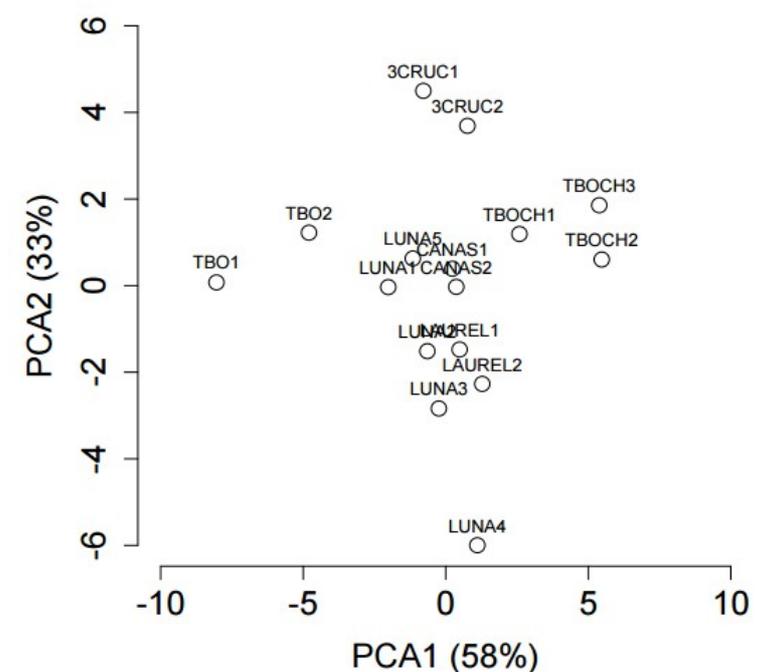


Figura 2. Representación de los dos primeros componentes del Análisis de Componentes Principales de las variables bioclimáticas para las localidades de las Quebradas del Norte (Departamentos de Rivera y Tacuarembó). Abreviaciones: TBO 1 (Tacuarembó 1); TBO 2 (Tacuarembó 2); LUNA 1 (Lunarejo 1); LUNA 2 (Lunarejo 2); LUNA 3 (Lunarejo 3); LUNA 4 (Lunarejo 4); LUNA 5 (Lunarejo 5); LAUREL 1 (Laureles 1); LAUREL 2 (Laureles 2); TBOCH 1 (Tacuarembó chico 1); TBOCH 2 (Tacuarembó chico 2); CAÑAS 1 (de las Cañas 1); CAÑAS 2 (de las Cañas 2); 3CRUC 1 (Tres Cruces 1), 3CRUC 2 (Tres Cruces 2).

Al aplicar el test de Mantel simple, no se halló correlación entre las distancias genéticas y la altitud ($r=-0.09$; $p=0.27$), ni entre las distancias genéticas y las distancias climáticas ($r=0.05$; $p=0.36$). Tampoco se halló relación significativa entre la altitud y la distancia geográfica lineal ($r=0.16$; $p=0.10$). Las distancias climáticas mostraron sin embargo, relación significativa tanto con las distancias geográficas lineales ($r=0.68$; $p<0.05$), así como con las distancias por cursos de agua ($r=0.42$; $p=0.05$) y con la altitud ($r=0.51$; $p<0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1 Resultados del test de Mantel simple (DistPhist = distancia genética; DistGeo = distancia geográfica lineal; DistArro = distancia geográfica por cursos de agua; DistAlt = diferencia de altitud; DistClim = distancias climáticas).

	DistPhist	DistGeo	DistArro	DistAlt	DistClim
DistPhist	-				
DistGeo	$R=0.30$, $p<0.05$	-			
DistArro	$R=0.25$, $p=0.05$	$R=0.66$, $p<0.01$	-		
DistAlt	$R=-0.09$, $p=0.27$	$R=0.17$, $p=0.10$	$R=0.11$, $p=0.16$	-	
DistClim	$R=0.05$, $p=0.36$	$R=0.69$, $p<0.01$	$R=0.42$, $p<0.01$	$R=0.52$, $p<0.01$	-

Cabe destacar que al realizar una regresión entre las distancias por cursos de agua y las distancias lineales geográficas, se halló una correlación positiva ($r=0.66$; $p<0.01$).El test parcial de Mantel resultó no significativo en la evaluación de una posible correlación entre la morfología y las distancias genéticas simples ($r=0.49$; $p=0.24$).

Los resultados de la aplicación del análisis de modelos lineales mixtos, muestra que, considerando el DIC, la distancia genética estaría siendo influenciada en tanto por las

distancias geográficas lineales como por las distancias por los cursos de agua y, en menor medida, por la altitud (Tabla 2). Estas distancias está muy correlacionadas entre sí y es dificultoso tomar su efecto por separado en el modelo debido a la colinealidad.

Tabla 2 Resultados de GLMM. Gen= distancias genéticas; Geo = distancias geográficas lineales; Río=distancias geográficas por cursos de agua; Alt= diferencias de altitud; Clim= distancias climáticas; NA= no aplica.

Modelo	R²GLMM(m)	DIC
Gen = Geo + Río (Int)	0.100	150.3
Gen = Río	0.090	151.5
Gen = Geo + Alt (Int)	0.140	152.8
Gen = Geo	0.040	153.8
Gen = Clim	0.020	158.6
Intercepto	NA	158.7
Gen = Río + Alt (Int)	0.100	161.8
Gen = Alt	<0.01	162.7

La aplicación de la aproximación *population graphs* por su parte, separa a las poblaciones en un modelo tipo "*stepping stone*"; el orden de las mismas (cuencas en este caso), se corresponde casi perfectamente con el arreglo geográfico de las cuencas (Fig. 3). La cuenca del Tres Cruces aparece claramente diferenciada del resto y sin conexión con las mismas.

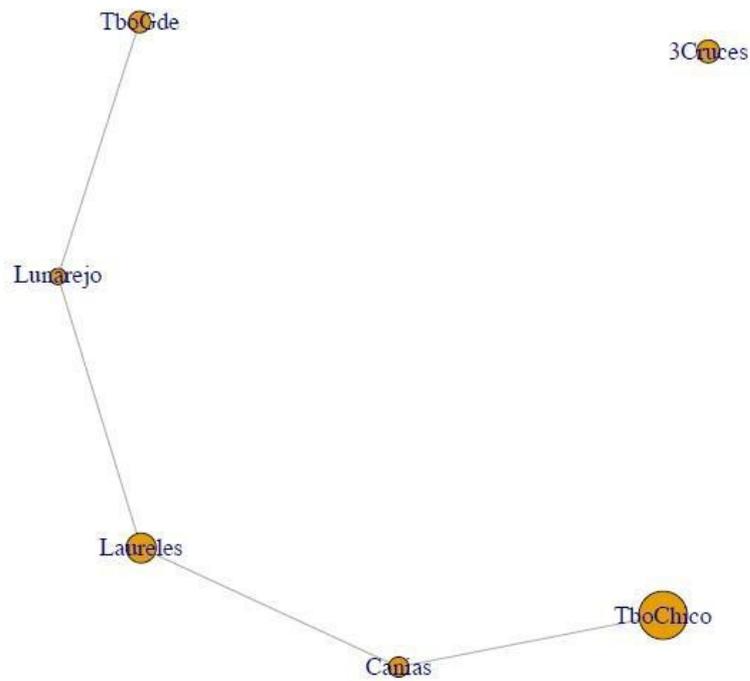


Figura 3. Análisis PopGraph mostrando relación entre las cuencas: TboGrande (Tacuarembó Grande); TboChico (Tacuarembó Chico); 3Cruces (Tres Cruces), Lunarejo, Laureles, Canias (Cañas). El diámetro de las esferas es proporcional a la variación dentro de cada cuenca.

Por último, la evaluación de aislamiento por distancia mostró un patrón no estacionario, siendo la diferenciación genética local más baja en el centro de las Quebradas del Norte. Sin embargo, hacia el Norte y Sur de la región, la diferenciación local se hace cada vez más pronunciada con la distancia geográfica (Fig. 4).

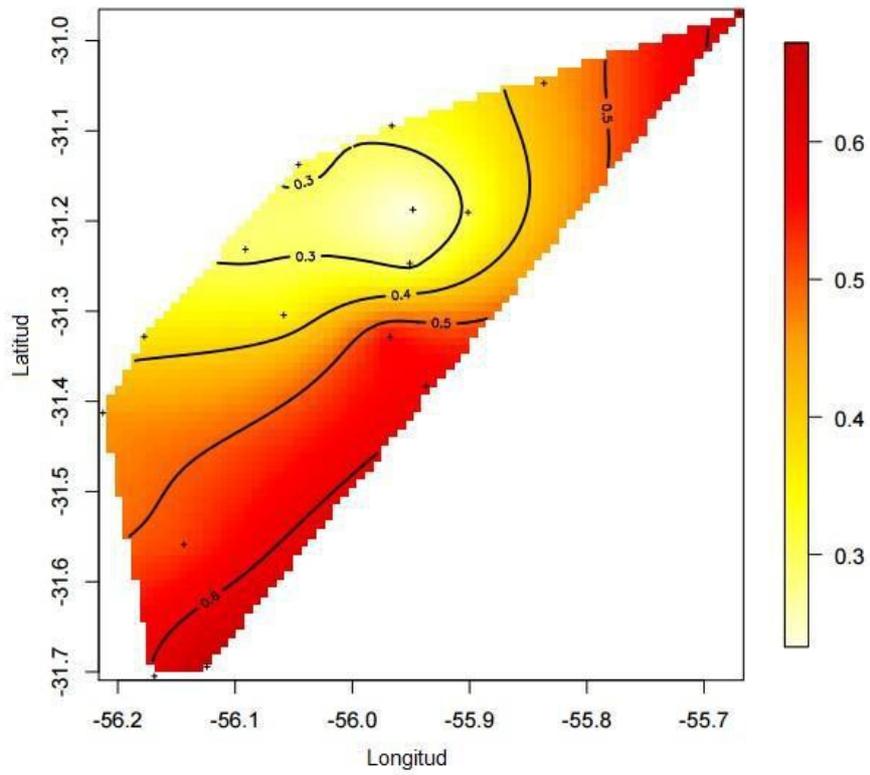


Figura 4. Patrón no estacionario de aislamiento por distancia; el polígono muestra en color rojo las áreas con mayor diferenciación genética local y en amarillo las que poseen menor diferenciación. Las cruces representan los puntos muestreados.

4. Discusión

La naturaleza interdisciplinaria de la genética del paisaje, dada la necesidad del conocimiento tanto de la genética poblacional, la ecología y la estadística espacial para realizar una aproximación realista de las estructuras poblacionales y su relación con el ambiente en que se desarrollan, ha tenido un impulso extraordinario en años recientes que se reflejan en revisiones y libros sobre la temática (Manel & Holderegger 2013; Hall & Beissinger 2014; Denton 2015; Balkenhol *et al.* 2016). Recientemente, la publicación del libro de Balkenhol *et al.* (2016) pretende unificar en un sólo tomo la multiplicidad de métodos, conceptos y técnicas que se han desarrollado en torno al tema, buscando la consolidación de la disciplina como tal.

Los eventos reproductivos de *L. macroglossa* se asocian a los meses más cálidos (Maneyro & Carreira 2012), lo cual se condice con lo hallado en el ACP realizado, que muestra las variables bioclimáticas relacionadas con la temperatura en meses y estaciones más cálidas como factores altamente explicativos de la variación entre localidades. Preocupa a nivel mundial, la incidencia que puede tener el cambio climático sobre los anfibios, dada el pronóstico de aumento de la temperatura global en el futuro y las repercusiones que puede tener, por ejemplo alterando los períodos reproductivos. Luego de aplicar escenarios futuros de cambio climático, Toranza *et al.* (2013), concluyen que para *L. macroglossa* no se darán modificaciones sustanciales en su distribución, por lo que se estima que no será afectada por dicho cambio, al menos en el territorio uruguayo. Esta estabilidad poblacional parece ser una característica de la especie, manteniendo tamaños poblacionales constantes durante los últimos 125 mil años (ver Cap. 1, Fig. 6), pese a que en este período tuvo lugar el último máximo glacial. La limitada influencia de esta fase glacial más reciente sobre la

estructuración genética ya ha sido encontrada en otros estudios filogeográficos de anfibios y reptiles del sur de Sudamérica (Camargo *et al.*, 2013; Langone *et al.* 2015).

Por otra parte, tanto el test de Mantel simple, como los modelos lineales mixtos indican que la distancia genética se correlaciona con la distancia geográfica (tanto lineal como por cursos de agua). Una relación positiva entre la distancia genética con variables del paisaje sugieren que estas variables son importantes limitantes de la dispersión (Jaquiéry *et al.* 2011). Estos resultados estarían apoyando la noción de que *L. macroglossa* puede utilizar ambas vías de dispersión: una por cursos de agua (tanto adultos como larvas) y otra vía terrestre (sólo en adultos). Las vías alternativas de dispersión pueden mantener conectadas subpoblaciones ubicadas en puntos distantes aislados, propiciando el incremento de la estabilidad poblacional y la disminución del riesgo de extinción (Ranta *et al.* 2008), como fue hallado en el Capítulo 1.

Esto podría haber favorecido la constancia en el tamaño de las poblaciones de *L. macroglossa* y el mantenimiento de su estado de conservación en el tiempo, pese a que haya una tendencia de aislamiento entre parches distantes, así como la persistencia de una única gran población de la especie en las Quebradas del Norte. Por lo pronto, si bien existe un aislamiento por distancia en la zona, persiste la conectividad, lo cual puede contribuir a la estabilidad poblacional y al mantenimiento de la diversidad genética.

La existencia de vías alternativas a la dispersión ha sido determinada en otros anfibios. Por ejemplo, Campbell *et al.* (2010) hallaron que en salamandras del género *Desmognathus* asociadas a cabeceras de río, los individuos recién metamorfoseados tienen altas tasas de dispersión por vía terrestre, pese a que alternativamente pueden emplear las corrientes como ruta de dispersión. Por su parte, Wang *et al.* (2009) encontraron que lo que

parecía ser una vía terrestre plausible, dada la aparente afinidad de *Ambystoma californiense* a los ambientes abiertos de pastizales, resultaba altamente costoso para la especie, ya que si bien lo prefieren como lugar de residencia, a la hora de dispersarse es riesgoso debido a la sequedad del ambiente y el aumento de la posibilidad de desecación. Es así que, las corrientes características de los sitios de oviposición de *L. macroglossa* parecen ser ideales para la dispersión de sus larvas, mientras que los paisajes abiertos se presentan como potencialmente riesgosos para moverse entre parches distantes para los adultos, debido a la alta probabilidad de desecación. Esto fue evidenciado durante los muestreos de campo, particularmente en días calurosos, en donde algunos individuos que fueron colectados en sus refugios (bajo piedras cercanas a cursos de agua), morían rápidamente pese a ser colocados en frascos con agua inmediatamente a su captura. El movimiento entre parches vía terrestre pueda ser posible a través de hábitats con cobertura vegetal, durante la noche o en estaciones más frías ya que, las especies, pueden preferir diferentes hábitats para residir o dispersarse a lo largo de su vida o en distintas estaciones a lo largo del año (Wang *et al.* 2009).

Bajo este contexto, otras características del paisaje podrían estar influyendo en el movimiento de *L. macroglossa* entre parches. Una aproximación a través de la aplicación de capas de resistencia y asignación de costos al movimiento entre hábitats heterogéneos, puede ser esclarecedor sobre cuáles son los variables del paisaje que imponen restricciones a la dispersión de una especie (McRae 2006; Koen *et al.* 2012). Pese a ello, puede resultar extremadamente difícil asignar costos cuando no se posee información sobre la sensibilidad de una especie a determinadas características del paisaje (Spear *et al.* 2005). Debido a esto, es necesario promover estudios ecológicos para conocer los límites y las limitantes específicas al movimiento en diferentes especies.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la distancia es efectivamente una

limitante al intercambio de migrantes. El análisis llevado a cabo con popgraph separa a las poblaciones en un típico modelo de "stepping-stone", pero que también podría ser consistente con un patrón de aislamiento por distancia; la cuenca del Arroyo Tres Cruces se muestra como altamente divergente con respecto a las demás, por lo que requiere de mayor atención a los efectos de su conservación. Sin embargo, este aislamiento no sería uniforme (ver Fig. 4), ya que se observa un gradiente de diferenciación genética local a lo largo del espacio geográfico. En el centro de las Quebradas habría menor diferenciación mientras que al alejarse hacia el Norte y Sur la misma aumentaría, por lo que no habría homogeneidad a través del paisaje, apoyando un caso de no estacionalidad del aislamiento. Duforet *et al.* (2014) puntualizan que patrones no estacionarios son típicos cuando la acumulación de la diferenciación genética con la distancia es dependiente del espacio. Por ejemplo, Guarnizo *et al.* (2016) encontraron que para *Norops meridionalis* la diferenciación genética no era homogénea entre poblaciones pertenecientes a distintas localidades, sino que seguía un patrón fuertemente influenciado por la composición del paisaje. Probablemente, la distinción en dos poblaciones hallada en el análisis de Geneland responda también a alguna influencia del hábitat que genere una mayor diferencia entre localidades más próximas pero separadas por la divisoria de aguas en la zona de las Quebradas del Norte. Según Duforet *et al.* (2014), una barrera al flujo génico suele generar patrones de diferenciación rápidos entorno a la misma, como se observa en el área de estudio. La escarpa que se ha mantenido estable en cuanto a su geomorfología a lo largo del tiempo (Panario *et al.* 2014), podría entonces estar actuando como un diferenciador de poblaciones de *L. macroglossa*.

Por otra parte, la facilidad o la inhibición de movimientos que pueden producir distintos elementos del paisaje, puede ser detectado si se evalúa el flujo génico entre subpoblaciones que potencialmente intercambian migrantes (Van Strien *et al.* 2015). Bajo este supuesto, es preciso entonces que el muestreo se haga a una distancia menor de lo que

correspondería con la distancia máxima de migración. De lo contrario, se corre el riesgo de confundir un aparente aislamiento por distancia con el producto de limitantes físicos o fisiológicos de la especie. Se ha visto que diferencias interespecíficas en vagilidad pueden predecirse a partir de características fisiológicas, y pueden utilizarse para entender su efecto sobre la estructuración poblacional (Hillman *et al.* 2014). Es por ello que también puede ser sumamente relevante efectuar estudios sobre ámbitos de hogar y tasas de dispersión para determinar la máxima distancia de migración o bien la capacidad efectiva de movimiento para evaluar si la distancia es una limitante potencial.

A su vez, la distancia climática parece explicar a las distancias geográficas y a la altitud, sin embargo, estas son distancias simples entre las localidades, por lo que sería relevante implementar una superficie de resistencia en trabajos futuros para fortalecer este resultado. El uso de distancias simples, puede llegar a simplificar lo que representa para los individuos el hecho de moverse entre parches. Las superficies de resistencia son capas diseñadas en ambientes de tipo GIS que representan hipótesis de como las características del paisaje entorpecen o propician el flujo génico, en relación a las características propias de la especie en cuestión, y basándose en la probabilidad de éxito a través de la aplicación de diferentes coberturas de paisaje (Spear *et al.* 2010).

Los avances tecnológicos y el incremento de la disponibilidad de datos a nivel global es alentador, por lo que la perspectiva a futuro hace de la genética del paisaje una herramienta fundamental para el diseño y selección de áreas a conservar. Es importante comprender los requerimientos de hábitat así como aquellos vinculados con la conectividad de las poblaciones para poder diseñar un manejo eficiente de las mismas y favorecer su persistencia, sobre todo en paisajes sometidos a un continuo cambio (Goldberg & Waits 2010). Una aproximación a través de métodos comparados en genética del paisaje, empleando especies

co-distribuidas, puede contribuir a la inferencia de la influencia del paisaje (especie-específica) sobre parámetros vinculados a la genética de las poblaciones, como lo es el flujo génico (Goldberg & Waits 2010; Zancolli *et al.* 2014).

Referencias

Anderson C., Epperson B., Fortin M.J., Holderegger R., James P., Rosenberg M., Scribner K. & S. Spear (2010). Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology*, 19: 3565–3575.

Angelone S., Kienast F. & R. Holderegger (2011). Where movement happens: scale-dependent landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. *Ecography*, 34: 714-722.

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

Balkenhol N., Cushman S., Storfer A. & L. Waits (2016). *Landscape genetics: concepts, methods, applications*. Wiley Blackwell.

Bolliger J., Lander T. & N. Balkenhol (2014). Landscape genetics since 2003: status, challenges and future directions. *Landscape Ecology*, 29:361–366.

Bonnet E. & Y. Van de Peer (2002). zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical Software*, 7(10): 1-12.

Camargo A., Werneck F., Morando M., Sites Jr. J & L. Avila (2013). Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata: Liolaemidae) in the Monte Desert of central Argentina using Bayesian phylogeography and ecological niche modelling. *Molecular Ecology*, 15: 4038-4054.

Campbell E., Nichols J., Lowe W. & W. Fagan (2010). Use of multiple dispersal pathways facilitates amphibian persistence in stream networks. *PNAS*, 107(15): 6936–6940.

Chebataroff J. (1969). *Relieve y Costas*. Nuestra Tierra 3, Uruguay.

Denton R. (2015). Reviewing the reviews: Twelve years of Landscape Genetics. En: <http://www.molularecologist.com/2015/03/reviewing-the-reviews-twelve-years-of-landscape-genetics/>.

Duforet N. & M. Blum (2014). Nonstationary patterns of isolation-by-distance: Inferring measures of local genetic differentiation with bayesian kriging. *Evolution*, 68:

1110–1123.

Dujardin J. (2013) MoMe-CLIC: Morphometrics in Medical Entomology, Collection of Landmarks for Identification and Characterization. <http://mome-clic.com>

Dyer R. & J. Nason (2004). Population Graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, 13: 1713–1727.

Dyer, R. (2014). popgraph: R package that constructs and manipulates population graphs. R package version 1.4. <http://CRAN.R-project.org/package=popgraph>.

Dyer R. (2015). Population Graphs and Landscape Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 46:327–342.

Epps C. & N. Keyghobadi (2015). Landscape genetics in a changing world: disentangling historical and contemporary influences and inferring change. *Molecular Ecology*, 24: 6021–6040.

Evia G. & E. Gudynas (2000). *Ecología del Paisaje en Uruguay. Aporte para la conservación de la Diversidad Biológica*. MVOTMA, AECI y Junta de Andalucía, Sevilla: 58-61.

Excoffier L., Smouse P. & J. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-91.

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

Goldberg C. & L. Waits (2010). Comparative landscape genetics of two pond-breeding amphibian species in a highly modified agricultural landscape. *Molecular Ecology*, 19: 3650–3663.

Guarnizo C., Werneck F., Giugliano L., Santos M., Fenker J., Sousa L., D'Angiolella A., dos Santos A., Strüssmann C., Rodrigues M., Dorado-Rodrigues T., Gamble T. & G. Colli

(2016). Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4A: 279-289.

Gudynas E. & A. Gehrau (1981). Notas sobre la distribución la ecología de *Limnomedusa macroglossa* (Duméril & Bibron, 1841) en Uruguay (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia (Série Zoologia)*, 60: 81-99.

Guillot G, Mortier F. & A. Estoup (2005). Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology, Notes* 5: 708-711.

Guillot G.,Mortier F. & A. Estoup (2015). Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 712–715.

Hadfield J. (2010). MCMC methods for Multi–response Generalised Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *Journal of Statistical Software*, 33(2): 1–22.

Hall L. & S. Beissinger (2014). A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies. *Landscape Ecology*, 29(9):1487-1504.

Hillman S., Drewes R., Hedrick M. & T. Hancock (2014). Physiological Vagility: Correlations with Dispersal and Population Genetic Structure of Amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1):105–112.

Jaquiéry J., Broquet T., Hirzel A., Yearsley J. & N. Perrin (2011). Inferring landscape effects on dispersal from genetic distances: how far can we go?. *Molecular Ecology*, 20: 692–705.

Kimura M. & G. Weiss (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49(4): 561-76.

Koen E., Bowman J. & A. Walpole (2012). The effect of cost surface parameterization on landscape resistance estimates. *Molecular Ecology Resources*, 12: 686–696.

Kool J., Moilanen A. & E. Treml (2012). Population connectivity: recent advances and new perspectives. *Landscape Ecology*, 28: 165-185.

Langone J., Camargo A. & R. de Sá (2015). High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel,1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95: 137-155.

Measey G., Galbusera P., Breyne P. & E. Matthysen (2007). Gene flow in a direct-developing, leaf litter frog between isolated mountains in the Taita Hills, Kenya. *Conservation Genetics*, 8:1177–1188.

Mahalanobis P. (1936). On the generalised distance in statistics. *Proceedings of the National Institute of Science of India*, 12: 49-55.

Manel S., Schwartz M., Luikart G. & P. Taberlet (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (4): 189-197.

Manel S. & R. Holderegger (2013). Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(10): 614-621.

Maneyro R. & S. Carreira (2012). *Guía de Anfibios del Uruguay*. Colección Ciencia Amiga, Ediciones de la Fuga, Montevideo. 207 pp.

McRae B. (2006). Isolation by resistance. *Evolution*, 60(8): 1551–1561.

Mims M., Phillipsen I., Lytle D., Hartfield E. & J. Olden (2015)a. Ecological strategies predict associations between aquatic and genetic connectivity for dryland amphibians. *Ecology*, 96 (5): 1371–1382.

Mims M., Hauser L., Goldberg C., J. Olden (2015)b. Genetic Differentiation, Isolation-by-Distance, and Indications of a Metapopulation of the Arizona Treefrog (*Hyla wrightorum*) in an Isolated Portion of its Range. *Ecology*, 96 (5): 1371-1382.

Nakagawa S. & Schielzeth H. (2013). A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, 4:133–142.

Panario D., Gutiérrez O., Sánchez Bettucci L., Peel E., Oyhançabal P. & J. Rabassa (2014). Ancient Landscapes of Uruguay. En: Gondwana Landscapes in southern South America. Argentina, Uruguay and southern Brazil. Ed.: Jorge Rabassa & Cliff Ollier. Springer.

QGIS Development Team (2009). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL <http://qgis.osgeo.org>

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Ranta E., Fowler M. & V. Kaitala (2008). Population synchrony in small-world networks. *Proceedings Royal Society B*, 275: 435–442.

Richardson J. (2012). Divergent landscape effects on population connectivity in two co-occurring amphibian species. *Molecular Ecology*, 21: 4437–4451.

Spear S., Peterson C., Matocq M. & A. Storfer (2005). Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, 14: 2553–2564.

Spear S. & A. Storfer (2008). Landscape genetic structure of coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in protected vs. managed forests. *Molecular Ecology*, 17: 4642–4656 .

Spear S., Balkenhol N., Fortin M., Mcrae B. & K. Scribner (2010). Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology*, 19: 3576–3591.

Storfer A., Murphy M., Evans J., Goldberg C., Robinson S., Spear S., Dezzani R., Delmelle E., Vierling L. & L. Waits (2007). Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity*, 98: 128–142.

Swofford, D. L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taylor P., Fahrig L., Henein K. & G. Merriam (1993). Connectivity Is a Vital Element of Landscape Structure. *Oikos*, 68(3): 571-573.

Toranza C., A. Brazeiro & R. Maneyro (2013). Efectos del Cambio Climático sobre Biodiversidad: El caso de los anfibios de Uruguay. Pp. 35-50. En: Picasso V., G. Cruz, L. Astigarraga & R. Terra (Eds.): Cambio y variabilidad climática: Respuestas Interdisciplinarias. Espacio Interdisciplinario. Montevideo.

Van Strien M., Keller D. & R. Holderegger (2012). A new analytical approach to landscape genetic modelling: least-cost transect analysis and linear mixed models. *Molecular Ecology*, 21: 4010 – 4023.

Van Strien M., Holderegger R. & H. Van Heck (2015). Isolation-by-distance in landscapes: considerations for landscape genetics. *Heredity*, 114: 27–37.

Wang I., Savage W. & H. Shaffer (2009). Landscape genetics and least-cost path analysis reveal unexpected dispersal routes in the California tiger salamander (*Ambystoma californiense*). *Molecular Ecology*, 18: 1365–1374.

Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 38: 114- 138. Zancolli G., Rödel M., Steffan-Dewenter I. & A. Storfer (2014). Comparative landscape genetics of two river frog species occurring at different elevations on Mount Kilimanjaro. *Molecular Ecology*, 23: 4989–5002.

Anexo 3

Tabla 1. Variables climáticas obtenidas de <http://www.worldclim.org/current>.

	Variable
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Rango medio diario (Promedio mensual (max temp - min temp))
BIO3	Isotermalidad (BIO2/BIO7) (* 100)
BIO4	Estacionalidad de la temperatura (desvio estandard *100)
BIO5	Máxima temperatura en el mes mas cálido
BIO6	Mínima temperatura en el mes mas frío
BIO7	Rango de Temperatura anual (BIO5-BIO6)
BIO8	Promedio de la temperatura en el trimestre mas húmedo
BIO9	Promedio de la temperatura en el trimestre mas seco
BIO10	Promedio de la temperatura en el trimestre mas cálido
BIO11	Promedio de la temperatura en el trimestre mas frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes mas húmedo
BIO14	Precipitación del mes mas seco
BIO15	Estacionalidad de las precipitaciones (Coeficiente de variación)
BIO16	Precipitación del trimestre mas húmedo
BIO17	Precipitación del trimestre mas seco
BIO18	Precipitación del mes mas cálido
BIO19	Precipitación del mes mas frío

Conclusiones y perspectivas

1. Conclusiones

Los resultados indican que la especie presenta una moderada diversidad genética, con individuos de algunas localidades muy divergentes filogenéticamente. Por lo pronto su identidad taxonómica debe ser abordada con mayor profundidad para establecer con mayor certidumbre la existencia de más de una especie de *Limnomedusa*.

Por otra parte, existe una población conformada por localidades distribuidas en la ladera este de las Quebradas del Norte, que están diferenciadas de poblaciones ubicadas al oeste de la misma, configurándose un posible quiebre filogeográfico en la zona. Posiblemente la presencia de una divisoria de aguas correspondiente a la Cuchilla de Haedo esté contribuyendo al aislamiento de estas dos grandes poblaciones.

A su vez, la conectividad entre cuencas a través de los cursos de agua puede estar ocurriendo efectivamente por dispersión en el estadio larval, aunque no se descarta el movimiento entre parches vía terrestre por parte de los adultos. A través de la conectividad encontrada entre cuencas, se ha establecido un patrón de aislamiento por distancia de tipo heterogéneo y se ha mantenido la estabilidad poblacional así como la diversidad genética en la zona. La estabilidad ambiental asociada a los afloramientos basálticos también habría contribuido a la estabilidad demográfica de la especie en las Quebradas del Norte.

La cuenca del Arroyo Tres Cruces (Departamento de Tacuarembó) aparece como la mejor opción para complementar a la cuenca del Arroyo Lunarejo (Departamento de Rivera),

dado su alto grado de diversidad filogenética respecto al resto de las cuencas de las Quebradas del Norte.

2. Perspectivas

La resolución taxonómica del género *Limnomedusa*, a partir del hallazgo de ejemplares altamente divergentes en el territorio uruguayo, se presenta como impostergable, por lo que, en colaboración con laboratorios de la Región, se pretende obtener ejemplares de toda la distribución de la especie así como aumentar el número de loci evaluados, de forma de evaluar lo hallado a partir del gen mitocondrial citocromo b.

Por otra parte, la intensificación de los muestreos en la zona comprendida en la ladera oeste de las Quebradas del Norte favorecería la delimitación más precisa del aparente quiebre filogeográfico hallado, al menos para *L. macroglossa*. Además, si este mismo patrón también se hallara para otras especies, se podría establecer con mayor apoyo la existencia de un quiebre en esta zona del país.

La realización de nuevos análisis de genética del paisaje a su vez, permitirían una mejor comprensión de los fenómenos vinculados a la dispersión y migración de esta especie. La implementación de superficies de resistencia y de asignación de costos a los movimientos por hábitats heterogéneos, pueden brindar valiosas herramientas para establecer posibles vías de dispersión y de restricción al movimiento de *L. macroglossa*, así como para la delimitación de áreas de interés para la conservación.

También se pretende profundizar en estudios basados en la teoría de redes en la zona, de forma de establecer que subpoblaciones actúan como nodos que mantienen la estabilidad

de la red, y por lo tanto determinar cuales son esenciales para el mantenimiento de la diversidad y la conectividad genética en las Quebradas del Norte.

Finalmente, los indicadores de diversidad filogenética a nivel intraespecífico utilizados aquí pueden contribuir a la priorización de otros sitios de interés para preservar en las Quebradas del Norte, además de la ya existente Área Protegida “Valle del Lunarejo”. La utilización de indicadores complementarios a la diversidad específica como criterio para la selección de áreas protegidas va en aumento, siendo la diversidad filogenética especialmente recomendada como una importante fuente de información a la hora de la toma de decisiones. Por estas razones, se pretende profundizar en el estudio del área, implementando análisis similares en otros taxa de anfibios y reptiles de la región que pueden servir para fundamentar la priorización de áreas candidatas para el ingreso al SNAP en la zona de las Quebradas del Norte.