

**Filogeografía de Teleósteos de las cuencas de
Pendiente Atlántica: su correlación con
fenómenos tectónicos y paleoclimáticos que
afectaron el Área Pampeana Austral**

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Doctorando: María Cecilia Bruno

Directora: Dra. Marta S. Lizarralde

Co-Director: Dr. Jorge R. Casciotta

La Plata, 20 de Marzo, 2014

Agradecimientos

A mis viejos y a mis hermanos Pablo y Nacho, y a Pato, que acompañaron este proyecto, desde el financiamiento hasta las corridas con las computadoras, y la asistencia técnica de los departamentos.

A mis Directores Marta y Jorge, por haberme recibido en su grupo sin preguntar edad y promedio. Y por acompañar cada momento de este proyecto

A mis compañeros del CREG, Sebastián, Mariana, Diego, Luciana y Magalí, por tanto aprendizaje, y tantos buenos momentos compartidos.

A Las chicas del 10 Cris, Nali, Lore y Debo, por el aguante, la paciencia, los mates y tantas risas. A Pablito por las entrañables charlas que ya se extrañan.

A Marcos Cenizo, por la asistencia en materia geológica y paleoclimática, y por el entusiasmo puesto en este proyecto y en las futuras campañas que se darán en breve. A Flor por escuchar cada queja y acompañar el proceso

A mis grandes Amigos Eli y Gaby, que siempre escuchan y nunca preguntan, mi vida es maravillosa gracias a ustedes. A Ine, que me hospedó un su casa durante los primeros años de beca.

A Magui por las traducciones y el entusiasmo.

A la Cátedra de Histología y Embriología Animal. En especial a Juan, un gran compañero y a Debo y Mary por toda la asistencia y paciencia durante la cursada. A Laurita, Sil, Pili, Pato, Juli y Coquita por todo el aguante.

A Gus, amigo entrañable que ayudó con la compu, el análisis de las secuencias, los consejos, las charlas, la paciencia y tanta ayuda

A Mariana, Gracias Amiga por los repasos de las clases, los consejos, las charlas y las ideas.

Al excelentísimo Dr. Ronderos, gracias jefe por la paciencia, las enseñanzas histológicas, los buenos momentos compartidos, la confianza y por mantener una cátedra donde da gusto trabajar.

Al Dr. Chino, jefe, compañero y amigo. Esta tesis te debe el capítulo de *Corydoras*. Yo te debo mucho más. Gracias por estar siempre que te necesité, por acompañar, escuchar, resolver y hacer mis días laboratoriles mucho más divertidos. Sos un gran jefe, compañero y amigo.

A mi gran Amigo Pato, que acompañó esta idea desde un principio, desde Alemania con muestras largas charlas por Skype mientras discutíamos sobre la Pampasia meridional. Fuiste el primero en escuchar de este proyecto y siempre te alegraste honestamente de casa paso logrado. Sos una de las personas más generosas que conozco, siempre al lado, ni adelante ni atrás. Gracias por todo tu tiempo en esta tesis y por ser mi Amigo.

A Pato, se que estarías acá disfrutando...se te extraña.

A Yani, mi hermana, simplemente gracias por tanto, y gracias por mis dos sobrinos Emi y Eze mis amores que hacen mi vida tan feliz.

A Jorge y Adriana, todo lo que aprendí fue gracias a ustedes. A vos Flaca, que siempre estuviste aún cuando no tuviste un rol formal dentro de la tesis. Gracias ambos por enseñarme más que ciencia. Son un ejemplo del trabajo cotidiano, sin amiguismos y con mucho esfuerzo y dedicación. Gracias por todo el apoyo y todo el amor.

A Fer, sin vos esta tesis no hubiera sido posible. Gracias desde las explicaciones filogeográficas a la campaña y las correcciones. Fue difícil el

camino recorrido, desde Córdoba 2009 hasta La Plata 2013, pero acá estamos.

Simplemente Gracias...

En fin, gracias a todos por haber acompañado este momento, por tanto esfuerzo y tanta paciencia.

INDICE

Resumen.....	1
--------------	---

Abstract.....	5
---------------	---

Introducción

I- Área Pampeana Austral.....	10
II- La Filogeografía y su contexto en el estudio de peces de agua dulce: método y respuesta a los interrogantes.....	16
III- El ADN mitocondrial: su rol en estudios filogeográficos.....	19
IV- Especies modelo: el por qué de dichas especies.....	21
<i>i-Jenynsia multidentata</i>	22
<i>ii-Cnesterodon decemmaculatus</i>	24
<i>iii-Corydoras paleatus</i>	26
V- Hipótesis de trabajo y objetivos.....	27

Materiales y métodos

I- Área de estudio y diseño de muestreo.....	32
II- Colecta y preservación de especímenes.....	39
III- Análisis morfológicos.....	40
IV- Análisis moleculares.....	40
V- Análisis poblacionales.....	42

Estimadores de la variación genética.....	42
Relaciones genealógicas entre los haplotipos.....	43
Demografía histórica.....	51
Estructura poblacional.....	56

Resultados

<i>Jenynsia multidentata</i>	64
Variación genética.....	64
Relaciones genealógicas entre los haplotipos.....	69
Demografía histórica.....	72
Estructura poblacional.....	77
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	81
Variación genética.....	81
Relaciones genealógicas entre los haplotipos.....	85
Demografía histórica.....	89
Estructura poblacional.....	94
<i>Corydoras paleatus</i>	97
Variación genética.....	97
Relaciones genealógicas entre los haplotipos.....	101
Demografía histórica.....	105

Estructura poblacional.....	110
Discusión.....	114
Conclusiones.....	139
Apéndice.....	141
Soluciones utilizadas en los protocolos de laboratorio.....	141
Protocolos para extracción de ADN y amplificación de la región control del ADN mitocondrial.....	146
Valores de Φ_{ST} en las distintas especies.....	150
Correlación y edades propuestas para los depósitos neógenos.....	152
Referencias.....	153

Resumen

Las cuencas de pendiente atlántica en el Área Pampeana Austral se encuentran representadas por una serie de arroyos y ríos de mediano porte. Estos nacen en áreas elevadas de los sistemas serranos de Ventania y Tandilia como así también en la Llanura Interserrana Bonaerense. Estas cuencas presentan un diseño paralelo, no existiendo actualmente conexión entre ellas. El patrón hidrogeográfico de esta región es el resultado de una combinación de factores tectónicos, climáticos y cambios en el nivel del mar acaecidos desde el Mioceno. La zona presenta un carácter positivo desde el Mioceno medio y podría haber funcionado como una isla durante la ingresión Entrerriana ocurrida en ese período. Por otra parte, los registros paleoclimáticos de la zona para el Cuaternario tardío sugieren una alternancia entre condiciones áridas y húmedas, asociadas principalmente a las glaciaciones y deglaciaciones. Esto probablemente haya afectado el caudal de muchos de los cursos de agua, llegando incluso a extinguirse los de menor porte durante los períodos más áridos. La fauna de peces presente en estas cuencas representa uno de los últimos elencos de la Subregión Brasílica, resultando particularmente interesante el hecho que la composición íctica de estas cuencas es similar a los sistemas hídricos ubicados más al norte, a pesar de que en la actualidad no existe conexión entre dichas cuencas. No obstante, el conocimiento de la ictiofauna del área y de las posibles causas que llevaron a su aislamiento es aún fragmentario.

La filogeografía aplica los algoritmos de la filogenia molecular, sólo que a un nivel intraespecífico. Utiliza como herramienta metodológica el análisis espacial o geográfico de genealogías génicas, a partir del cual se extraen

conclusiones acerca de los procesos históricos o recurrentes que causaron esa distribución particular de la variabilidad. A nivel filogeográfico la utilidad del análisis de la Región Control del ADN mitocondrial ha sido probadamente útil en estudios recientes sobre diversos taxa. Los peces de agua dulce constituyen un modelo ideal para ilustrar la forma en que los cambios climático-tectónicos actúan sobre la distribución de la variación genética. Los cuerpos de agua dulce son ampliamente afectados a consecuencia de los cambios ambientales, alterando su cauce en los casos más extremos. Estos procesos tienen una gran influencia sobre la persistencia y la distribución de las especies de peces, modificando marcadamente su dinámica poblacional. Esta situación afortunadamente, queda representada en la composición genética de las poblaciones y puede inferirse en la actualidad.

En el presente estudio fueron seleccionadas tres especies de teleósteos, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata* debido a que, presentan una amplia distribución en las cuencas en estudio así como un tamaño poblacional abundante. Dichas características son fundamentales a la hora de realizar inferencias sobre la secuencia de colonización, distribución y la persistencia de los linajes de genes.

El objetivo general de este proyecto es analizar y comparar el patrón filogeográfico de tres especies de teleósteos codistribuidas en las cuencas de pendiente atlántica en el Área Pampeana Austral. En este contexto, se desea examinar la relación entre este patrón y la historia tectónica, geomorfológica y climática de la región. De esta forma se pretende inferir si las condiciones geológicas y paleoclimáticas han influido en la distribución de los linajes de genes de la ictiofauna del Área Pampeana Austral. Para abordar dichos

objetivos se parte de las siguientes hipótesis: **1. Hipótesis de refugios:** Las especies de peces de agua dulce presentes en el área de estudio se encontraban allí con anterioridad al último período glacial, resistiendo las condiciones adversas de éste período en refugios ambientales que formaban parte de estas cuencas. **2. Hipótesis de conectividad y colonización:** Las especies colonizaron el sistema a través de paleoconexiones actualmente sumergidas en la plataforma continental.

La relación filogenética entre las variantes mitocondriales de cada especie se analizó mediante la construcción de árboles filogenéticos y redes de haplotipos. Se estimó para cada especie la diversidad genética y se llevaron a cabo análisis de demografía histórica. Se obtuvo además para cada especie una descripción de la estructura geográfica mediante el Análisis de la Varianza Molecular. Se examinó la posible existencia de un patrón de aislamiento por distancia analizando la correlación entre flujo génico y distancias geográficas pareadas por especie para el área total analizada.

Como resultado de este trabajo se desprenden dos patrones filogeográficos contrastantes: *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus* presentaron haplogrupos muy divergentes entre sí, confinados en algunos casos sólo a unas pequeñas poblaciones. Por otro lado se encontró un haplotipo ampliamente distribuido, el cual no se relaciona directamente con los haplogrupos divergentes. En contraste, en *Cnesterodon decemmaculatus* se observaron dos grupos principales con escasa divergencia, y amplia distribución geográfica dentro del área. La escasa divergencia hallada entre los haplotipos de *Cnesterodon decemmaculatus* podría sugerir que su historia es relativamente reciente dentro del área. Los valores hallados en la diversidad

genética, junto con los análisis de demografía histórica indican que las poblaciones de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, parecen haber permanecido estables a lo largo del tiempo, en contraposición a los resultados evidenciados por *Cnesterodon decemmaculatus* cuyos resultados sustentan un crecimiento poblacional repentino para dicha especie. De lo expuesto hasta el momento podemos concluir que la presencia de las especies analizadas en el Área Pampeana Austral podría haber sido el producto de procesos demográficos independientes pero complementarios. Por un lado se corrobora la presencia de linajes antiguos en el área, que han subsistido a las condiciones climáticas adversas en posibles refugios ambientales, tal es el caso de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*. Esta situación nos acerca a aceptar la *Hipótesis de Refugios* al menos para estas dos especies. Por otro lado, se infiere la presencia de linajes recientes, que han colonizado el área gracias al mejoramiento climático y la conexión de la red de drenaje. Tal es el caso de un linaje para *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, y el único linaje hallado para *Cnesterodon decemmaculatus*. En este sentido se propone aceptar la *Hipótesis de Conectividad y colonización* para las tres especies.

La historia tectónica, geológica y climática de la región ha influenciado en gran parte la distribución de la variación genética en las especies estudiadas, promoviendo en ciertos casos la diferenciación poblacional. Estudios futuros incluyendo mayor cantidad de especies de peces que habitan el área, así como mayor número de marcadores moleculares podría contribuir a ampliar el conocimiento sobre la distribución de la variación genética en los linajes de peces dentro del Área Pampeana Austral.

Abstract

The Atlantic slope basins in the Southern Pampean Area are formed by a number of streams and rivers of medium size. Most of these streams arise in elevated areas of Ventania and Tandilia as in the Llanura Interserrana Bonaerense. These streams flow parallel and are not connected to each other. The hidrogeographic pattern of the region is the result of a combination of tectonism, climate and sea level changes from the Miocene. The entire area presents a positive feature since de middle Miocene, and it probably was an island during the Entrerrian transgression which occurred in that period. Moreover, the paleoclimate records of Late Quaternary in the area suggest an alternation between dry and wet conditions, mainly related to deglaciations and glaciations. This situation may have affected the flow of many rivers, and the smaller sized ones could have become extinct during the driest periods. The fish fauna present in these basins is one of the last casts of the Brazilian Subregion, being particularly interesting that the fish composition of these basins is similar to that in water systems located further north, although currently there is no connection between these basins. In spite of this, knowledge of the fish fauna of the area and possible causes that led to its isolation are still fragmentary.

Phylogeography applies molecular phylogeny algorithms at an intraspecific level. It uses the spatial or geographical analysis of gene genealogies as a methodological tool, from which conclusions are drawn about historical or recurring processes that caused that particular distribution of variability. At a phylogeographic level, the usefulness of the analysis of the mitochondrial DNA control region has proven useful in recent studies on several

taxa. Freshwater fish constitute an ideal model to illustrate how climate-tectonic changes act on the distribution of genetic variation. Freshwater bodies are widely affected as a result of environmental changes, altering their course in the most extreme cases. Fortunately, this situation remains in the genetic composition of populations and it can be inferred at present.

Three species of teleosts were selected for the present study, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Jenynsia multidentata* and *Corydoras paleatus*, because they have a wide distribution in the basin under study as well as a plentiful population size.

The overall aim of this project is to analyze and compare the phylogeographic pattern of three teleost species codistributed in the Atlantic slope basins in the Southern Pampean Area. In this context, we desire to examine the relationship between this pattern and the tectonic, geomorphological and climatic history of the region. In this way, we intend to infer whether geological and paleoclimatic conditions have influenced the distribution of gene lineages of the fish fauna in the Southern Pampean Area. To address these objectives, we start from the following assumptions: **1- Refugia hypothesis:** The species of freshwater fish found in the study area were there before the last glacial age, resisting the adverse conditions of this period, in environmental refuges that were part of these basins. **2- Connectivity and colonization hypothesis:** The species colonized the system through paleoconnections currently submerged in the continental shelf.

The phylogenetic relationship among mitochondrial variants of each species was analyzed by constructing phylogenetic trees and haplotype networks. The genetic diversity was estimated for each species and historical

demography analyses were conducted. A description of the geographical structure for each species was obtained by Molecular Analysis of Variance. The possible existence of a pattern of isolation by distance was examined by analyzing the correlation between gene flow and geographic distance by species in the whole area.

The results suggest two contrasting phylogeographic patterns: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata* presented very divergent haplogroups, in some cases only confined to small populations. On the other hand, a widespread haplotype was found, which is not directly related to the divergent haplogroups. In contrast, in *Cnesterodon decemmaculatus* two main groups with low divergence and wide geographic distribution within the area were observed. The low divergence between haplotypes found in *Cnesterodon decemmaculatus* might suggest that its history is relatively recent in the area. On the other hand, the values found in genetic diversity, together with historical demography analysis, indicate that populations of *J. multidentata* and *C. paleatus* appear to have remained stable over time, in contrast to the results evidenced by *C. decemmaculatus* which support a sudden population growth for that species. For these reasons, we can conclude that the presence of the species analyzed on the Southern Pampean Area could have been the product of independent but complementary demographic processes. On the one side, the presence of ancient lineages in the area has been confirmed, as is the case of *J. multidentata* and *C. paleatus* which have persisted despite the adverse weather conditions in potential environmental refugia. This brings us to accept the Refugia Hypothesis at least for these two species. On the other hand, the presence of recent lineages that have colonized the area through improved

climate conditions and the connection of the drainage network can also be inferred. Such is the case of one lineage of *J. multidentata* and *C. paleatus*, and the only lineage found for *C. decemmaculatus*. In this sense, we propose to accept the Connectivity and Colonization Hypothesis for the three species.

The tectonic, geological and climate history of the region has largely influenced the distribution of genetic variation in the studied species, in some cases promoting population differentiation. Further studies including more species of fish that inhabit the area, as well as a greater number of molecular markers, could help increase knowledge on the distribution of genetic variation in fish lineages within the Southern Pampean Area.

Introducción

I-El Área Pampeana Austral y la particularidad de su ictiofauna: historia e interrogantes.

El Área Pampeana Austral se ubica en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina; se encuentra conformada por una amplia llanura interrumpida por dos cordones serranos: Tandilia (sierras septentrionales) y Ventania (sierras australes) (Cingolani, 2005). Rolleri (1975) distingue cuatro provincias geológicas en el Área Pampeana Austral: Tandilia, la Llanura Interserrana Bonaerense, Ventania y la cuenca del río Colorado. Las tres primeras unidades han sido denominadas como el Positivo Bonaerense por Yrigoyen (1975), y se comportan como una unidad de paisaje compleja (Zárate & Rabassa, 2005). Tandilia es un cordón serrano con orientación Noroeste-Sudeste formado principalmente por un basamento ígneo-metámorfico de 2.100-2.200 Ma. (Mesoproterozoico), y el último ciclo sedimentario asignado al Ordovícico (Fm. Balcarse) (Cingolani, 2005). Ventania constituye una estructura en arco con rumbo general Noroeste-Sudeste. Su historia geológica comienza con un basamento cristalino Neoproterozoico-Paleozoico inferior hasta unidades asignadas al Carbonífero-Pérmico (Pillahuicó). La Llanura Interserrana Bonaerense conforma una planicie con cotas máximas, algo superiores a los 200 metros, en la región central entre ambos cordones montañosos. Esta llanura desciende gradualmente hacia el océano Atlántico en el sur (Zárate & Rabassa, 2005). Está cubierta por sedimentos pampeanos del Mioceno tardío al Holoceno, los cuales son en su mayoría arrastrados por el viento. Están compuestos principalmente por limo, y cantidades menores de clastos y arena fina (Fidalgo *et al.*, 1975; Zárate & Rabassa, 2005). La cuenca del río Colorado es una cuenca extensa con fuerte subsidencia formada durante el Triásico

tardío al Cretácico reciente (Zambrano, 1980; Uliana & Biddle, 1988).

La red de drenaje en el Área Pampeana Austral (Figura 1) se encuentra representada por una serie de arroyos pequeños y ríos de mediano porte. Nacen en áreas elevadas de los sistemas de Ventania y Tandilia, y en la Llanura Interserrana Bonaerense. Después de recorrer una dirección aproximadamente norte-sur, desaguan en el Océano Atlántico o desaparecen de la superficie antes de alcanzar la costa (Kruse *et al.*, 1996, 1997).

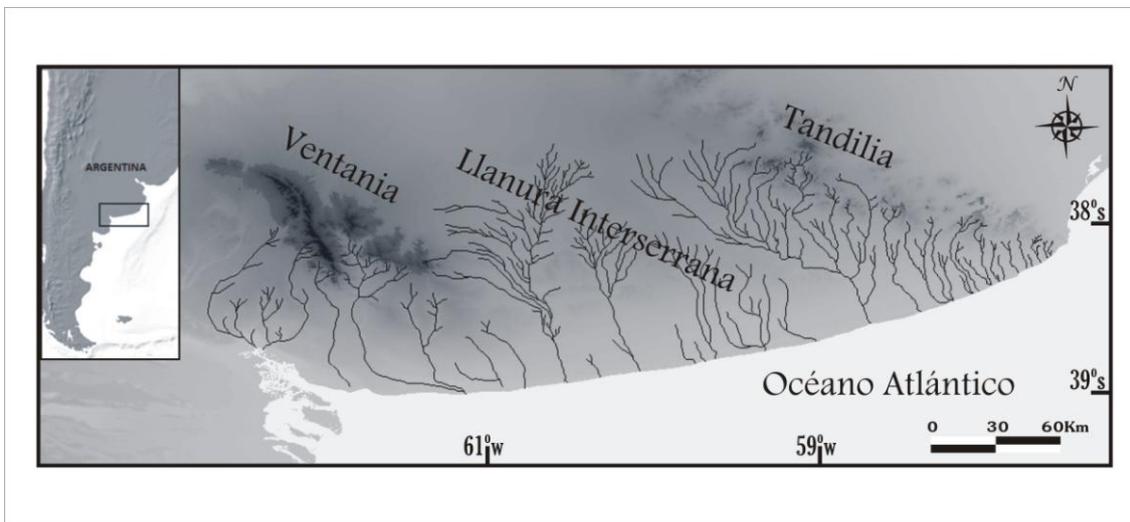


Figura1. Área Pampeana Austral.

En la actualidad, la red de drenaje del Área Pampeana Austral forma un diseño paralelo entre sí por lo que no existe conexión entre sus cursos de agua. Asimismo, tampoco se evidencia conexión con las cuencas hídricas que limitan el área (cuencas de los ríos Salado-Vallimanca y/o Colorado). El patrón hidrogeográfico de esta región es el resultado de una combinación de factores tectónicos, climáticos y cambios en el nivel del mar ocurridos desde el Mioceno tardío (Casciotta *et al.*, 1999).

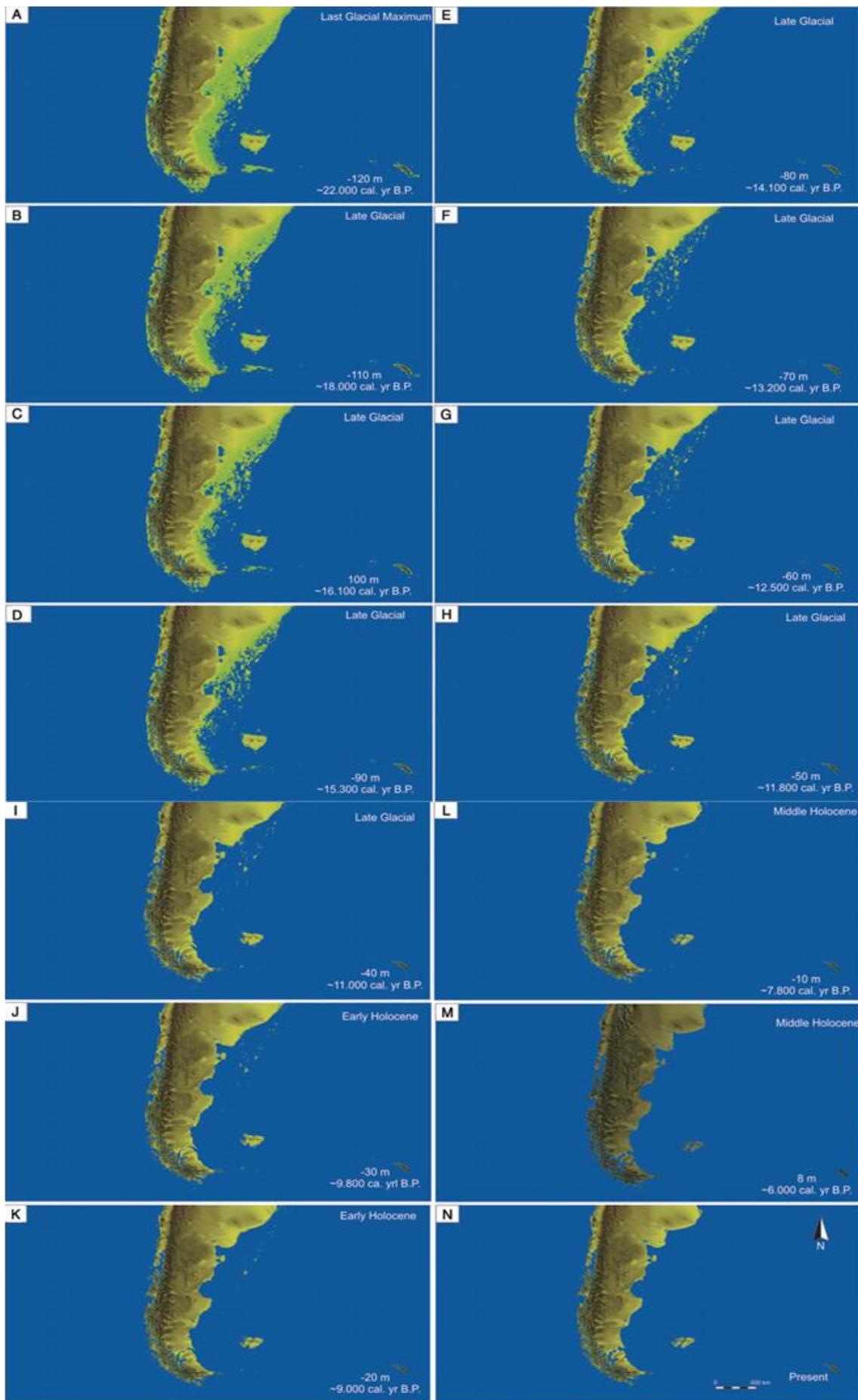


Figura 2. Modelo de evolución paleogeográfica de La Patagonia y Área Pampeana Austral desde el Ultimo Máximo Glacial al presente. Tomado de Ponce *et al.* (2011).

Durante el Cuaternario, la conexión hidrográfica más significativa de la región fue la gran cuenca del Bermejo-Desaguadero-Salado-Colorado, aunque en la actualidad se encuentra prácticamente desintegrada (Iriondo, 2010). Por otro lado, no se han encontrado sedimentos marinos dentro del área, por lo cual pudo haber funcionado como una isla durante la Ingresión Entrerriana o Paranense ocurrida en el Mioceno tardío (Yrigoyen, 1975; Russo *et al.*, 1979, Ramos, 1999; Marengo, 2000). El área fue rejuvenecida por los efectos del tectonismo andino durante el Plioceno-Pleistoceno (Yrigoyen, 1975) y del neotectonismo (Quattrocchio *et al.*, 1994; Pardiñas *et al.*, 1996).

Los cambios eustáticos ocurridos en el área durante el Pleistoceno tardío y el Holoceno han influenciado la morfología de los valles (Tonni & Cione, 1997). Durante el descenso del nivel del mar probablemente los valles de los ríos se rejuvenecieron. Del mismo modo, los cauces actuales podrían haberse conectado entre ellos, o haber confluído en una misma cuenca, cuando la plataforma continental era mucho más extensa que en la actualidad. De hecho, ha sido propuesto que el río Sauce Grande (Sistema de Ventania) formó parte de la cuenca del río Colorado durante el Cuaternario (Cione & Barla, 1997; Casciotta *et al.*, 1999; Ponce *et al.*, 2011) (Figura 2). Se ha sugerido que el patrón hidrogeográfico de la Llanura Interserrana Bonaerense data del Lujanense tardío (Pleistoceno tardío) (Fidalgo *et al.*, 1991, Tonni *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos valles demostraron ser más antiguos. El valle del río Sauce Grande incluye sedimentos del Ensenadense (Pleistoceno inferior-medio) (Pardiñas & Deschamps, 1996) y el río Quequén Salado, sedimentos Lujanenses del último Interglacial (Pardiñas *et al.*, 1996). Consecuentemente, la evidencia bioestratigráfica y radiométrica indica que el río Sauce Grande

existió en el Pleistoceno reciente y el río Quequén Salado (Llanura Interserrana Bonaerense) antes del último Interglacial. Debido a la topografía similar, es probable que los cauces en el Área Pampeana Austral siguieran direcciones similares desde el Mioceno aunque las cuencas fueron diferentes (Casciotta *et al.*, 1999).

El Área Pampeana Austral se ha caracterizado por una alternancia entre condiciones climáticas áridas y frías versus húmedas y cálidas durante el Cuaternario e inclusive desde el Mioceno (Aguirre *et al.*, 1999; Aramayo *et al.*, 2002; Quattrocchio *et al.*, 2008). Las reconstrucciones paleoclimáticas sugieren un ambiente árido-semiárido para el área durante gran parte del Cuaternario asociado principalmente a los períodos glaciales, con alternancia probablemente más breves de períodos interglaciales con clima húmedo y cálido (Tonni *et al.*, 1999; Quattrocchio *et al.*, 2008). Esto probablemente haya afectado el caudal de muchos de los cursos de agua, llegando incluso a extinguirse los de menor porte durante los períodos más áridos (Nagle, 2010).

Dentro del escenario geológico y climático que se ha descrito, resulta llamativo que, los cursos fluviales que ocupan el Área Pampeana Austral presentan una composición de la ictiofauna similar entre ellos, aunque en la actualidad estos cursos se encuentran aislados y no presentan conexión alguna entre ellos mismos.

Los cambios tectónicos, geológicos y paleoclimáticos que determinaron el aislamiento actual de las cuencas bajo estudio, probablemente hayan influido en la distribución de la ictiofauna. Lundberg *et al.* (1998) han señalado que gran parte de la diversificación de la ictiofauna Neotropical de agua dulce tuvo lugar en las cuencas hidrográficas dinámicamente cambiantes de América del Sur

durante el Cretácico tardío y el Cenozoico. Dichas aguas continentales fueron a su vez los agentes y productos de la evolución del paisaje.

En sentido ictiogeográfico, los cauces del Área Pampeana Austral se encuentran cercanos al límite entre la subregión Brasílica y la subregión Austral dentro de la región Neotropical (Casciotta *et al.*, 1999; 2005). Debido al cambio gradual (norte- sur) en las características ecológicas y del paisaje que se evidencian en la subregión Brasílica, la diversidad de especies en la zona es baja. La fauna de peces presente en estas cuencas representa uno de los últimos elencos de la Subregión Brasílica. El número de especies registradas no supera las 15, distribuidas en los órdenes Characiformes, Siluriformes, Cyprinodontiformes, Perciformes, Mugiliformes y Synbranchiformes. Debido a que, supuestamente, la ictiofauna de la zona es bien conocida, las colectas en el área no son frecuentes (Casciotta *et al.*, 2005). A pesar de ello, estudios recientes ponen de manifiesto la presencia de una nueva especie, *Astyanax pampa* (Casciotta *et al.*, 2005), la cual es endémica de la zona de estudio. Este hecho demuestra la necesidad de enfatizar estudios en el área, ya que, la fragmentación histórica del hábitat ocasionada por eventos geológicos pueden haber contribuido a generar procesos de especiación.

De acuerdo con Cione & Barla (1997) y discutido posteriormente por y Casciotta *et al.* (1999), la presencia de las especies Brasílicas en estas cuencas puede ser explicada por las siguientes hipótesis posibles:

- 1-Los peces estaban presentes en el área antes del Último Máximo glacial resistiendo climas poco favorables en posibles refugios ambientales, pudiendo dispersarse tal vez durante períodos de inundación.

2- Los peces ingresaron al área durante períodos de regresión marina, a través de cuencas que en la actualidad se encuentran sumergidas en la plataforma marina. Estas cuencas pudieron estar conectadas con otras más al norte (cuenca hídrica del río Salado).

3- Los peces ingresaron al área en períodos de inundación a través de la Llanura Interserrana Bonaerense.

4- Los peces se dispersaron por el medio marino.

5- Los peces fueron introducidos por acción humana.

De lo anteriormente expuesto surge un primer interrogante:

Si los cauces en el Área Pampeana Austral no presentan conexión entre ellos, ¿Cómo es que poseen una ictiofauna similar?

Asimismo se desprenden los siguientes interrogantes:

-¿Cómo colonizaron el área las distintas especies?

-¿Es posible establecer una correlación entre los cambios paleoclimáticos y la distribución de la ictiofauna?, de ser así,

-¿Los cambios geológicos y paleoclimáticos afectaron por igual a las distintas especies?

-¿Es posible encontrar un patrón biogeográfico similar en las distintas especies?

Dichos interrogantes junto con la necesidad de brindar una respuesta plausible a ellos han motivado el presente estudio.

II-La Filogeografía y su contexto en el estudio de peces de agua dulce: método y respuesta a los interrogantes.

De acuerdo con Vari & Weitzman (1990) y Ribeiro (2006) cuatro factores

principales limitan la precisión de la hipótesis sobre la biogeografía histórica de la ictiofauna Neotropical de agua dulce:

- 1- El pobre estado del conocimiento de la sistemática a nivel de especie de la mayoría de los taxa.
- 2- Información inadecuada sobre la distribución de la mayoría de las especies.
- 3- Información escasa sobre la historia filogenética de los taxa supraespecíficos.
- 4- Dificultades para asociar hipótesis filogenéticas a la historia geológica del continente Sudamericano.

En este sentido, si la biogeografía es la interacción o la síntesis de la geología y la biología (Nelson, 1985), las dificultades de los biólogos para entender y sintetizar los procesos geológicos, constituyen una seria limitación a nuestro conocimiento de la biogeografía de la ictiofauna Neotropical de agua dulce (Ribeiro, 2006).

La dispersión de los peces depende directamente de la interconexión de las cuencas de drenaje. Asimismo la historia de conectividad entre las cuencas refleja el desarrollo geológico subyacente del paisaje. Debido a esto, el análisis de la biogeografía histórica de los peces de agua dulce permite realizar inferencias robustas acerca de la evolución biológica y geológica de una región. (Lundberg, 1993).

Como una subdisciplina de la biogeografía, la filogeografía enfatiza aspectos históricos de la distribución contemporánea en el espacio de los linajes de genes (Avice 1996, 1998). La filogeografía integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía,

sistemática filogenética, etología y paleontología (Avice, 2000). Utiliza información temporal (histórica) que ha sido posible obtener a partir del uso y análisis de la información contenida en las moléculas de ADN. En definitiva, trata de interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de caracteres genéticos (Avice, 2000).

En la actualidad, la filogeografía se sustenta en la Teoría de la Coalescencia (Kingman, 1982; Hudson, 1990), como marco conceptual y herramienta estadística a partir del polimorfismo de ADN estudiado (Kingman, 1982; Hudson, 1990). El método coalescente sostiene que las diferencias en una secuencia de ADN entre distintos organismos retienen información sobre la historia evolutiva de dichas secuencias (Frankham *et al.*, 2004).

Asumiendo una población bajo neutralidad, de tamaño poblacional constante, el enfoque coalescente observa en retrospectiva en el tiempo y traza copias de genes desde la descendencia hacia los progenitores y, finalmente, a un único ancestro común más reciente. Es decir, si miramos hacia atrás en el tiempo, todos los alelos “coalescen” en un ancestro común. Con el tiempo, algunos alelos pueden surgir por mutación y otros perderse por deriva genética. Entonces, el patrón evolutivo de la distribución actual de alelos puede representarse como las ramas de un árbol donde se coalesce hacia un único alelo ancestral (Lanteri & Confalonieri, 2003; Frankham *et al.*, 2004). El “tiempo de coalescencia” entre alelos puede verse afectado por diversos procesos que operan a nivel poblacional, como por ejemplo fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, existencia de selección natural o variaciones en los patrones de flujo génico (Frankham *et al.*, 2004).

La teoría de la coalescencia provee un marco conceptual para el estudio de los procesos que influyeron históricamente sobre las poblaciones y que dieron lugar a la distribución actual de su variabilidad genética. Contempla el tratamiento matemático y estadístico formal de las genealogías génicas, dentro y entre especies próximas (Lanteri & Confalonieri, 2003).

La filogeografía aplica el análisis de genealogías génicas al estudio de la evolución de las poblaciones y permite sacar conclusiones con respecto a las secuencias de colonización, diversificación y extinción de los linajes génicos en determinadas áreas. Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos (Lanteri & Confalonieri, 2003). En este sentido, la filogeografía promete ser una herramienta eficaz para elucidar los interrogantes que abarcan el presente estudio.

III-El ADN mitocondrial: su rol en estudios filogeográficos

Actualmente los estudios filogeográficos en especies animales se basan principalmente en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt). Entre las características moleculares que hacen especial al ADNmt se destaca que es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño (16-20 kilobases), conformada por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia), además de una región conocida, en vertebrados y equinodermos, como Región Control que controla la replicación y transcripción en la molécula y tiene una tasa excepcionalmente alta de

sustitución y de polimorfismo en muchos taxones (Brown, 1986; Wainscoat, 1987; Lunt *et al.*, 1998).

Las secuencias de ADN mitocondrial, conocidas como haplotipos, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse de un modo filogenéticamente inteligible en un filograma o mejor llamado, árbol de genes (Avice, 2000, 2008).

La filogeografía basada en secuencias de ADN mitocondrial tiene dos componentes básicos en el estudio de la diversidad biológica. En primer lugar, el componente descriptivo del análisis filogeográfico, el cual comprende la recopilación de datos genéticos, y el análisis filogenético de dichos datos. Las secuencias de ADN proveen información acerca de las relaciones filogenéticas y la distancia genética entre linajes evolutivos, y permite realizar inferencias con respecto a la historia de taxa individuales dentro de una región (Avice *et al.*, 1979; Bermingham & Avice, 1986; Avice, 1994; Bermingham *et al.*, 1996). El segundo componente, la filogeografía comparada, examina congruencias en las historias evolutivas y de distribución de los taxa con respecto al escenario geográfico y ecológico particular de una región (Bermingham & Avice, 1986; Avice *et al.*, 1987; Bermingham *et al.*, 1992; Joseph *et al.*, 1995). Por lo tanto, el estudio del ADN mitocondrial provee un marco objetivo para el análisis formal del vínculo entre los procesos poblacionales y los patrones biogeográficos de la biodiversidad (Bermingham & Martin, 1998).

La Región Control ha sido particularmente útil para análisis filogeográficos en escalas muy pequeñas de tiempo microevolutivo (miles o cientos de miles de años), ya que, como se mencionó, tiene una tasa excepcionalmente alta de sustitución de nucleótidos y altos niveles de

polimorfismo intraespecífico (Lunt *et al.*, 1998). Así, los estudios de comparaciones filogenéticas con ADN mitocondrial, deben en general concretarse a poblaciones coespecíficas y de especies cercanamente relacionadas, cuyas separaciones no vayan más allá de algunos millones de años (Eguiarte *et al.*, 2007).

IV-Especies modelo: el por qué de dichas especies

Con el fin de seleccionar un modelo que pudiera explicar adecuadamente los interrogantes que se desprenden del análisis planteado con anterioridad, se establecieron una serie de requerimientos a cumplir por las especies a seleccionar:

- 1- Poseer amplia distribución tanto dentro del sistema de estudio como en las cuencas adyacentes.
- 2- Tamaño poblacional abundante. Dicha característica es fundamental a la hora de realizar inferencias sobre la secuencia de colonización, distribución y la persistencia de los linajes de genes.
- 3- Evitar especies de interés comercial, ya que son trasladadas intencionalmente dentro de los distintos cauces. Dicha situación podría llevar a interpretaciones erróneas sobre la distribución original de una especie. Tal es el caso de los Characiformes denominados vulgarmente “mojarras” los cuales son utilizados como carnada viva para la pesca del pejerrey *Odontesthes bonaeriensis*.

Teniendo en cuenta dichos requerimientos con fundamento en numerosos trabajos previos, así como observaciones durante colectas preliminares en la zona de estudio, se seleccionaron como especies modelo

Jenynsia multidentata, *Cnesterodon decemmaculatus* y *Corydoras paleatus*.

A continuación se destacan las características más sobresalientes de las especies.

I-*Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842)

Los peces del género *Jenynsia* pertenecen al orden Cyprinodontiformes, diagnosticados por la posesión de un gonopodio tubular, formado principalmente por el tercero, sexto y séptimo radio de la aleta anal, y por la presencia de dientes tricúspides en la serie mandibular externa en adultos (Parenti, 1981). *Jenynsia* es un género monofilético bien diagnosticado. El género comprende 13 especies cuya distribución abarca la cuenca Del Plata, cuencas de pendiente Atlántica del sur y el sudeste de Brasil, Uruguay y el sudeste de Bolivia.

El número de especies dentro del género ha crecido notablemente en los últimos años. Solo cuatro especies eran reconocidas en 1994 (Nelson, 1994) y en la actualidad se registran hasta 13 especies (Lucinda *et al.*, 2006).

Jenynsia multidentata (Figura 3) posee fecundación interna, con un período de gestación de cinco a seis semanas y un marcado dimorfismo sexual. Las hembras son mayores que los machos y poseen abertura urogenital, mientras que, los machos presentan la aleta anal modificada como gonopodio (Mai *et al.*, 2005). Es una especie eurihalina, secundariamente de agua dulce, encontrándose también en cuerpos de agua estuariales. En este sentido, se ha demostrado que la salinidad afecta favorablemente el crecimiento de dicha especie (Mai *et al.*, 2005). Son peces de superficie, relacionados con vegetación acuática y litoral, y poseen un régimen alimentario

del tipo micro y meso animalívoro (Ringuelet, 1975; López Cazorla *et al.*, 2003).



Figura 3. Ejemplar adulto de *Jenynsia multidentata*. Gentileza de Nicolás Tizio.

Jenynsia multidentata posee una amplia distribución, encontrándose desde el estado de Rio Grande do Sul en Brasil, hasta la provincia de Río Negro en Argentina (Liotta, 2005).

Jenynsia multidentata es uno de los Cyprinodontiformes más conspicuos dentro de la Pampasia, encontrándose en charcos, bañados, lagunas y ríos (Rosso, 2006). En conjunción con la amplia distribución de la especie dentro del territorio Argentino, y la gran tolerancia a ambientes salobres, (los cuales han dominado gran parte del Cuaternario dentro del área) se reportan registros fósiles del género dentro del área de estudio desde el Pleistoceno medio (Bogan *et al.*, 2009).

II-*Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)

La familia Poeciliidae es un grupo de peces diverso de pequeño tamaño con una amplia distribución en el continente americano desde el este de USA hasta el sur de Sudamérica. Dicha familia contiene más de 260 especies (Nelson, 2006). Constituye uno de los cuatro grupos de Cyprinodontiformes que han evolucionado hacia la fertilización interna, y, uno de los tres que presentan vivíparismo (Hrbek *et al.*, 2007).

Los poecílicos son un componente importante de la fauna Mesoamericana, y han jugado un rol predominante en estudios de vicarianza y biogeografía en América Central (Miller, 1996).

Uno de los modelos que intentan explicar la distribución de los poecílicos en Sudamérica es el modelo propuesto por Myers (1966), donde los poecílicos centroamericanos habrían dado origen a los poecílicos sudamericanos con el levantamiento del Istmo de Panamá durante el Plioceno tardío. De acuerdo con este postulado, los poecílicos sudamericanos estarían cercanamente emparentados con los poecílicos centroamericanos, y no podrían ser más antiguos que el Plioceno.

El género *Cnesterodon* Garman, 1895 comprende pequeños poecílicos distribuidos en el sur de Sudamérica en Brasil, Uruguay y Argentina (Lucinda, 2005).

Cnesterodon decemmaculatus (Figura 4), vulgarmente conocido como “madrecita”, es un pequeño poecílico de hasta 5 cm de longitud. Su distribución incluye gran parte de la Cuenca del Plata y la cuenca Atlántica, en Argentina, Brasil y Uruguay (Rosa & Costa, 1993). Se caracteriza por su ubicuidad en los sistemas de la región, presentando gran tolerancia a variaciones

fisicoquímicas, por lo que es común encontrarlo en ambientes alterados siendo una especie dominante en este tipo de ambientes (Bistoni *et al.*, 1999; Martí *et al.*, 2006).



Figura 4. Ejemplar adulto de *Cnesterodon decemmaculatus*

Su estrategia reproductiva es altamente exitosa, ya que es una especie vivípara con hasta tres eventos reproductivos al año (Lorier & Berois, 1995). *Cnesterodon decemmaculatus* posee hábitos omnívoros, con una gran diversidad de ítems de pequeño tamaño, como zooplancton, larvas de insectos y algas (Ringuelet, 1975; Escalante, 1983). Junto con *Jenynsia multidentata* es una de las especies más ubicuas de los sistemas dulceacuícolas de la Pampasia bonaerense (Rosso, 2006). Se considera que el vivíparismo es una forma de cuidado parental con un bajo número de crías, que constituye una adaptación a la vida en ambientes temporales y espacialmente inestables (López Cazorla *et al.*, 2003).

III-*Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842)

Corydoras es el género más especioso dentro del orden Siluriformes (Reis, 1998) ya que, incluye 143 especies y representa más del 80 % de todas las especies de la familia Callichthyidae (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios realizados por Reis (1998) y Shimabukuro-Dias *et al.* (2004) demostraron que el género *Corydoras* no es monofilético.

De acuerdo con Oliveira *et al.* (1992), el género estaría compuesto por cinco unidades naturales de especies que presentan similitudes en sus cariotipos. Los datos cariotípicos sugieren un proceso de poliploidización intenso en la diversificación y la historia evolutiva del grupo. El número cromosómico diploide varía desde $2n=40$ en *Corydoras nattereri* (Oliveira *et al.*, 1990) hasta $2n=134$ en *Corydoras aeneus* (Turner *et al.*, 1992).

Las especies del género son dulceacuícolas estrictas, sin habilidad para dispersarse a través del agua marina, en este sentido el ambiente marino representa una barrera ecológica a su dispersión a través de las aguas costeras.

Corydoras paleatus (Figura 5) se diferencia fácilmente de sus congéneres por presentar un patrón de manchas castaño oscuras en la región dorsolateral del tronco y una aleta caudal estriada (Shibatta & Hofmann, 2005). Esta especie se distribuye desde Rio Grande do Sul en Brasil, hasta la provincia de Río Negro en Argentina (Shibatta & Hofmann, 2005; Liotta, 2005). *Corydoras paleatus* también se adapta a aguas de muy baja conductividad (Menni *et al.*, 1996) y puede soportar concentraciones de oxígeno tan bajas como 1 mg/l (Gómez, 1993). El régimen alimenticio para esta especie se puede caracterizar como carnívoro bentófago (López Cazorla *et al.*, 2003). Asimismo

el género *Corydoras* presenta registro fósil para el área de estudio que data del Pleistoceno medio (Deschamps, 2005).



Figura 5. Ejemplar adulto de *Corydoras paleatus*.

V-Objetivos del presente estudio e hipótesis de trabajo

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es analizar y comparar el patrón filogeográfico de especies de teleósteos codistribuidas en las cuencas de pendiente atlántica en el Área Pampeana Austral. En este contexto, se desea examinar la relación entre este patrón y la historia tectónica, geomorfológica y paleoclimática de la región. De esta forma se pretende inferir si las condiciones geológicas y paleoclimáticas han influido en la distribución de los linajes de

genes de la ictiofauna del Área pampeana Austral.

Objetivos específicos

1. Analizar y comparar la variabilidad genética en tres de las especies que habitan la región: *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* y *Cnesterodon decemmaculatus*. Con el fin de inferir procesos genético poblacionales propios de las especies analizadas.

2. Determinar a partir de aproximaciones filogeográficas la historia demográfica de cada una de las especies, con el fin de establecer posibles correlaciones con la historia tectónica, geológica y paleoclimática de la región.

3. Analizar la relación filogenética de los haplotipos presentes en el área con el objetivo de reconstruir posibles secuencias temporales de diversificación de las especies en las diferentes cuencas del área.

4. Comparar los patrones obtenidos en las tres especies seleccionadas con el fin de indagar posibles patrones comunes a dichas especies.

5. Comparar el patrón filogeográfico y la demografía histórica de las especies estudiadas a la luz del contexto geomorfológico y paleoclimático de la región, a fin de inferir los procesos biogeográficos de mayor envergadura que ocurrieron en el área de estudio.

Para abordar dichos objetivos se parte de las siguientes hipótesis modificadas de Cione & Barla (1997):

1. Hipótesis de refugios: Las especies de peces de agua dulce presentes en el área de estudio se encontraban allí con anterioridad al último período glacial, resistiendo las condiciones adversas de éste período en refugios ambientales que formaban parte de estas cuencas. Con posterioridad, las especies colonizaron toda la región favorecidas por la conectividad entre

subcuencas, a través de un diseño hidrográfico que se preserva parcialmente en la actualidad.

Fundamentación de la hipótesis: La presencia en el área de registro fósil de los géneros *Jenynsia sp.* y *Corydoras sp.* durante el Pleistoceno medio sustenta dicha hipótesis. Si bien los climas rigurosos del Cuaternario podrían haber llevado a extinciones locales debido a las bajas temperaturas y la reducción de los cuerpos de agua, es probable que ciertas especies hayan podido soportar dichos climas adversos y favorecidas por un mejoramiento climático hayan expandido su rango geográfico.

Predicción 1: Se esperaría encontrar un alto grado de diferenciación poblacional, al menos en los cursos de agua más antiguos.

Predicción 2: El patrón filogeográfico de las especies en el área es producto de un proceso de expansión poblacional a partir de dichos refugios ambientales. Este proceso se correlaciona temporalmente con cambios paleoambientales.

2. Hipótesis de conectividad y colonización: Las especies colonizaron el sistema a través de paleoconexiones actualmente sumergidas en la plataforma continental. En este contexto, dada la gran superficie que poseía la plataforma continental durante el Último Máximo Glacial, es posible que las desembocaduras de los actuales cursos de agua en el área fueran en realidad las cabeceras de cursos que hoy se continúan debajo del mar. Debido al cambio en el terreno es posible que dichos cauces hayan establecido conexiones siendo la vía de poblamiento del área.

Fundamentación de la hipótesis: Casciotta *et al.* (1999) y Ponce *et al.* (2011) sugieren una conexión entre el río Sauce Grande y la cuenca del río

Colorado durante el Pleistoceno medio o incluso antes. Ponce *et al.* (2011) sugieren que la vía de ingesión de la ictiofauna del Área Pampeana Austral se produjo a través de dicha paleoconexión basados en la presencia del registro fósil de *Percichthys sp* durante el Pleistoceno medio en el Área Pampeana Austral (Cione & López Arbarello, 1995). Esta especie es actualmente de distribución austral, lo cual podría sugerir que dicha especie alcanzó el área cuando el nivel del mar se hallaba por debajo de su posición actual y las cuencas de los ríos Colorado y Sauce Grande estaban integradas.

Predicción 1: La distribución de la variación genética puede ser explicada por un proceso de expansión poblacional.

Predicción 2: Existe un bajo grado de estructura genético poblacional, ya que el patrón filogeográfico es el resultado de un único evento de expansión poblacional.

Materiales

y

Métodos

I-Área de estudio y diseño de muestreo

El diseño de muestreo se realizó de forma tal de obtener una cobertura completa de las cuencas de pendiente atlántica en el Área Pampeana Austral (Figura 6). Las localidades se definieron teniendo en cuenta la equidistancia de las cuencas para asegurar el rango completo de distribución de las especies seleccionadas dentro del área de estudio. Se determinaron 11 sitios de muestreo. Se realizaron dos viajes de colecta en Marzo de 2010 y Noviembre de 2011. Durante dichos viajes se colectó la totalidad de material en las localidades A° Chapadmalal, A° El Durazno, A° Chocorí, A° El Moro, río Quequén Grande, A° Cortaderas, A° Claromecó, río Quequén Salado, río Sauce Grande, A° Sauce Chico y A° Saladillo (Figuras 7 a-k).

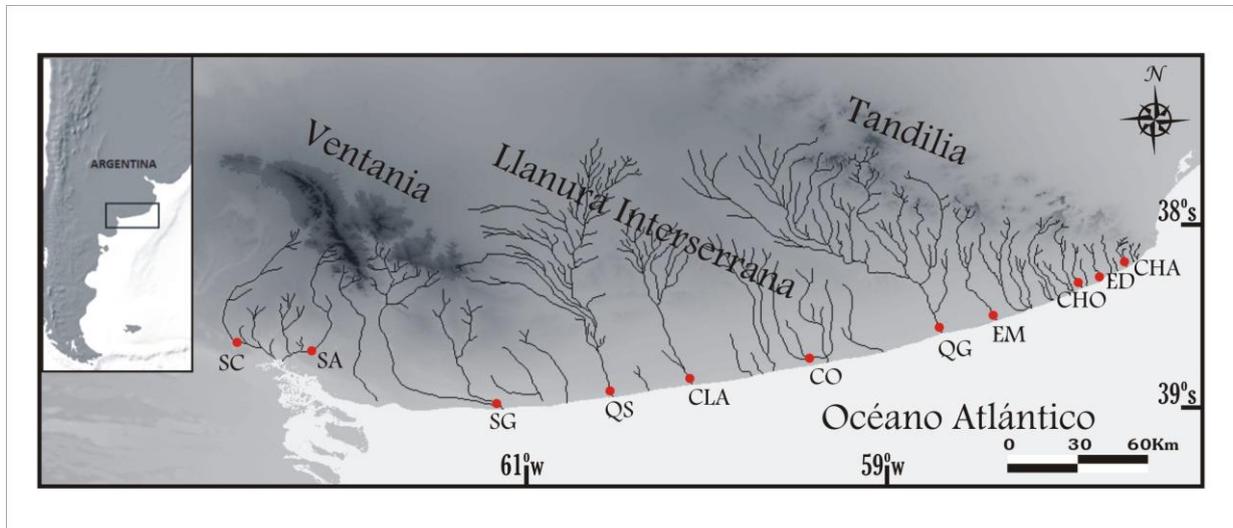


Figura 6. Área de estudio y localidades de muestreo. **CHA:** arroyo Chapadmalal. **ED:** arroyo El Durazno. **CHO:** arroyo Chocorí. **EM:** arroyo El Moro. **QG:** río Quequén Grande. **CO:** arroyo Cortaderas. **CLA:** arroyo Claromecó. **QS:** río Quequén Salado. **SG:** río Sauce Grande



Figura 7 a. Arroyo Chapadmalal. Coordenadas geográficas: 30° 8'1.9'' S 57° 44'40'' W.



Figura 7 b. Arroyo El Durazno. Coordenadas geográficas: 38°14'5.8'' S 57° 50'52.2'' W.



Figura 7 c. Arroyo Chocorí. Coordenadas geográficas: 38° 16'11.5'' S 58°25'42.1'' W.



Figura 7 d. Arroyo El Moro. Coordenadas geográficas: 38°25'42.1'' S 58°27'44'' W.



Figura 7 e. Río Quequén Grande. Coordenadas geográficas: 38°11'7.1" S 59°12'2.4" W.



Figura 7 f. Arroyo Cortaderas. Coordenadas geográficas: 38°38'16.1" S 59°34'37" W.



Figura 7 g. Arroyo Claromecó. Coordenadas geográficas: 38°42'13.7'' S 60°10'10'' W.



Figura 7 h. Río Quequén Salado. Coordenadas geográficas: 38°44'7.4'' S 60°34'20.9'' W.



Figura 7 i. Río Sauce Grande. Coordenadas geográficas: 38°45'44.6'' S 61°42'42'' W.



Figura 7 j. Arroyo Saladillo. Coordenadas geográficas: 38°33'42.6'' S 62°33'3.2'' W.



Figura 7 k. Arroyo Sauce Chico. Coordenadas geográficas: 38°29'49.9" S 62°38'45.4" W.

Se obtuvieron muestras de tejido de 110 individuos de *Jenynsia multidentata* pertenecientes a las localidades: A° Chapadmalal, A° Chocorí, A° El Moro, río Quequén Grande, A° Cortaderas, A° Claromecó, río Quequén salado, río Sauce Grande, A° Saladillo y A° Sauce Chico. Noventa y cuatro individuos de *Cnesterodon decemmaculatus* pertenecientes a las localidades: A° Chapadmalal, A° Chocorí, A° El Moro, río Quequén Grande, A° Cortaderas, A° Claromecó, río Quequén salado, río Sauce grande, A° Saladillo y A° Sauce Chico. Por último, se obtuvieron 72 individuos de *Corydoras paleatus* en las localidades A° El Durazno, A° Chocorí, A° El Moro, A° Cortaderas, río Quequén Grande, A° Claromecó, río Quequén Salado y río Sauce Grande.

Cabe destacar que, en ninguna de las campañas realizadas se colectaron individuos de *C. paleatus* más allá de la localidad Sauce Grande, estableciéndose dicha localidad como límite austral para esta especie en el

presente trabajo.

Los diferentes análisis se condujeron considerando a cada localidad como una población. Asimismo, se estableció el agrupamiento de los cauces según su pertenencia a las diferentes provincias geológicas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania. Dicho agrupamiento se llevó a cabo con el fin de establecer si las condiciones geológicas que caracterizan a estas provincias influyen de alguna forma sobre la estructura genético espacial y la demografía histórica de las especies. Estos agrupamientos comprenden el grupo Este o Tandilia, con los arroyos Chapadmalal, El Durazno, Chocorí y El Moro, el grupo Central o Llanura Interserrana Bonaerense con los ríos Quequén Grande y Quequén Salado, y los arroyos Cortaderas y Claromecó, y por último, el grupo Oeste o Ventania con el río Sauce Grande y los arroyos Saladillo y Sauce Chico. Cabe destacar que, si bien el río Quequén Grande tiene sus nacientes en la región de Tandilia, el sector analizado en el presente trabajo se corresponde con el tramo inferior del río, el cual atraviesa la llanura Interserrana. Asimismo, se han tomado los trabajos de hidrogeomorfología de la cuenca como base para dicho agrupamiento (Campo de Ferreras & Piccolo, 1999; Martínez *et al.*, 2007).

II-Colecta y preservación de especímenes

Los individuos fueron colectados utilizando redes de arrastre de ocho metros de largo por un metro de alto, con tamaño de malla de cinco milímetros. Asimismo se utilizaron copos de mano de tamaño de malla de tres milímetros.

De cada ejemplar se aisló una porción de tejido muscular y de la aleta pectoral que fueron utilizados para los análisis moleculares. Las muestras de

tejido fueron preservadas en etanol absoluto. Los ejemplares fueron fijados en formaldehído al 10% y conservados en etanol al 70% para su posterior determinación.

III- Análisis morfológicos

Se determinó el material mediante análisis de caracteres merísticos y morfométricos, como conteo de escamas de la línea lateral, escamas transversas y radios de la aleta anal. Asimismo se examinaron caracteres de la morfología interna como morfología de las quijadas y conteos de dientes del premaxilar, maxilar y dentario. En el caso de los caracteres de la morfología interna los ejemplares fueron diafanizados y posteriormente coloreados siguiendo las técnicas de Taylor & Van Dyke (1985) con modificaciones.

IV-Análisis moleculares

A partir de las muestras de tejido preservadas, se procedió a la extracción de ADN total según el protocolo de Aljanabi *et al.* (1997), realizando la digestión del tejido con proteinasa k y buffer de lisis, precipitación proteica con C1Na y posterior precipitación de ADN con etanol absoluto. El ADN obtenido fue conservado en buffer TE y refrigerado a -20°C. El ADN extraído fue cuantificado en una corrida electroforética mediante geles de agarosa al 1 %, la tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio, y se visualizaron con transiluminador UV con cámara digital incorporada.

A partir de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó la Región Control del ADN mitocondrial para las tres especies. Se utilizaron los primers K (5' AGCTCAGCGCCAGAGCGCCGGTCTTGTA 3') y G (5'

CGTCGGATCCCATCTTCAGTGTTATGCTT 3') (Lee *et al.*, 1995) para las especies *Jenynsia multidentata* y *Cnesterodon decemmaculatus*. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, con una concentración final de 0.25 µl de Taq DNA polimerasa, 1.5 µl de Cl₂Mg 3mM, 0.4 µl de dinucleótidos 50 mM, 0.25 µl 10mM de cada primer y 1µl of DNA como molde. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 95°C por cuatro minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, annealing a 57°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido por un período de extensión final de cinco minutos para los individuos de *Jenynsia multidentata*. En el caso de *Cnesterodon decemmaculatus* la reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 95°C por cuatro minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, annealing a 54°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido por un período de extensión final de cinco minutos.

En el caso de *Corydoras paleatus* se utilizaron los primers FLR-L (5' AACTCCCAAAGCTAGGATTC 3') y FLR-H (5' GCTCGTGGAACCTTTCTAGG 3') diseñados específicamente para este estudio. El diseño se llevó a cabo con el software Gene Runner v 3.01 (Spruyt & Buquicchio, 1994). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, con una concentración final de 0.25 µl de Taq DNA polimerasa, 1.5 µl de Cl₂Mg 3mM, 0.4 µl de dinucleótidos 50 mM, 0.25 µl 10mM de cada primer y 1µl of DNA como molde. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por cuatro minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, annealing a 59°C por 45 segundos

y extensión a 72°C durante 1,15 minutos, seguido por un período de extensión final de cinco minutos.

Los productos de amplificación fueron purificados con precipitación en Cloruro de litio y etanol absoluto (Sambrook, *et al.*, 1989), y cuantificados en una corrida electroforética en geles de agarosa al 1 %. Los amplicones fueron secuenciados en un servicio comercial (Macrogen Inc., Corea) con un secuenciador capilar ABI 3100. En todos los casos se realizaron controles negativos para verificar la ausencia de contaminación.

Los cromatogramas se editaron con el software Proseq (Filatov, 2002) y fueron alineados con Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994).

V-Análisis poblacionales

Estimadores de la variación genética

Se estimó la diversidad genética a partir de dos aproximaciones: la diversidad nucleotídica y la diversidad haplotípica. Dichos estimadores ofrecen evidencia de cambios demográficos en las poblaciones (Avise, 2000).

I-Diversidad nucleotídica. Se define como el promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias elegidas al azar en una muestra poblacional (Nei & Li, 1979; Nei, 1987).

$$\pi = \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde $x_i x_j$ son las frecuencias de las secuencias i ésimas y j ésimas, y π_{ij} es la proporción de los diferentes nucleótidos entre las secuencias i y j .

II- Diversidad haplotípica. El término haplotipo es una contracción de las definiciones genotipo y haploide. Se utiliza para designar una porción de ADN que se hereda como una unidad. En este sentido, el ADN mitocondrial es un ejemplo de haplotipo ya que, generalmente los genes se heredan juntos como un único grupo ligado.

La diversidad haplotípica se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes en la muestra (Nei, 1987).

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

Donde n es el número individuos de la muestra, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo.

Dichos valores se calcularon para la totalidad de las muestras en cada especie, así como por cada localidad. Asimismo se calcularon para el agrupamiento de los cauces según la pertenencia a las provincias geológicas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania. Dichos análisis se llevaron a cabo con el software Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

Relaciones genealógicas entre los haplotipos

Con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas entre los haplotipos del ADN mitocondrial de las especies en estudio, se realizaron análisis basados en métodos evolutivos (Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) y basados en distancias genéticas (Neighbour Joining).

Máxima Parsimonia (MP). Los métodos de parsimonia intentan

seleccionar el árbol más corto o más parsimonioso, el cual a su vez será el que requiera el menor número de cambios evolutivos para explicar los datos. La implementación del método de parsimonia se basa en optimizar sobre un árbol todos y cada uno de los caracteres de la matriz de datos, reconstruyendo sus estados ancestrales y contando el número de pasos del carácter a lo largo de las diferentes ramas del árbol filogenético. El primer paso en la búsqueda de los árboles más parsimoniosos con datos moleculares consiste en definir cuáles son los sitios informativos. Un sitio nucleotídico es informativo si nos permite preferir ciertos árboles sobre otros (Farris, 1970; Swofford *et al.*, 1996; Eguiarte *et al.*, 2007).

El procedimiento de cálculo del árbol más parsimonioso es no paramétrico y consiste en construir la red más corta que conecta todas las unidades de muestreo en un espacio euclidiano multidimensional (De Luna *et al.*, 2005).

Máxima Verosimilitud (ML). Bajo el enfoque probabilístico de Verosimilitud (Felsenstein, 2004), se examina qué tan bien un árbol (T) explica los datos observados (D). Depende de una completa especificación de los datos y de un modelo probabilístico que describa los datos (Eguiarte *et al.*, 2007). En principio, cada árbol posible implica diferentes probabilidades para varias configuraciones particulares de datos. La verosimilitud es la “probabilidad condicional” de obtener los datos observados (D) si un árbol (T) fuera el verdadero (Felsenstein, 2004; De Luna *et al.*, 2005). El procedimiento de selección del árbol de la Máxima Verosimilitud es paramétrico. Los árboles de ML se ubican como puntos en una superficie multidimensional en el espacio

configurado por muchos parámetros (De Luna *et al.*, 2005).

Tanto para los análisis de MP como de ML, los tiempos de cálculos son extensos. Para esto, se han desarrollado aproximaciones heurísticas en conjunción con algoritmos como “*Hill climbing*” en los cuales los árboles se van añadiendo uno a uno de acuerdo con determinada regla, por ejemplo, la adición de ramas mediante “*stepwise addition*”, combinada con el intercambio de ramas mediante el algoritmo de “*branch and swapping*” (Eguiarte *et al.*, 2007).

Inferencia Bayesiana (IB). Mientras que la Verosimilitud mide la probabilidad de los datos dado un árbol, el enfoque Bayesiano calcula las “probabilidades posteriores” de los árboles (Rannala & Yang, 1996; Lewis, 2001; Huelsenbeck *et al.*, 2002; De Luna *et al.*, 2005). La probabilidad posterior se define como la probabilidad condicional de una hipótesis (H) dados los datos observados ($\Pr_{\text{posterior}} H | D$). La probabilidad posterior es proporcional al producto de la verosimilitud de los datos condicionada a que un árbol (T) es correcto y la probabilidad *a priori* de la hipótesis. En el enfoque Bayesiano es posible asignar probabilidades *a priori* heterogéneas para los árboles (De Luna *et al.*, 2005).

Aunque la probabilidad posterior es fácil de formular, calcular la probabilidad posterior de una filogenia es computacionalmente oneroso pues requiere hacer sumas de todos los árboles posibles y, para cada árbol, integrar sobre todas las posibles combinaciones de longitudes de ramas y todos los posibles valores de los parámetros de los modelos de sustitución (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

El procedimiento de selección del árbol de Máxima Probabilidad Bayesiana es paramétrico. El espacio de todos los árboles para una colección de datos se visualiza como puntos en una superficie multidimensional. Se explora dicha superficie visitando muchas combinaciones de valores de los parámetros implícitos en diferentes árboles mediante rutas modeladas por Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). En cada paso o generación, se modifica el valor de algunos parámetros como la tasa de cambio entre estados y la longitud de las ramas y se calcula la probabilidad posterior del nuevo árbol. Se visita otra combinación de valores para evaluar el valor de la probabilidad posterior ligada a ese árbol. Si se exploran árboles de varias generaciones y se repiten varias cadenas el análisis eventualmente se estabiliza. A partir de que se llega a un punto de equilibrio, MCMC visita árboles frecuentemente en proporción de su probabilidad posterior. El conjunto de árboles visitados mediante varias cadenas de Markov se miden en una fase final de optimización y filtrado o “burn-in” para seleccionar el conjunto de los óptimos. El árbol de consenso de mayoría derivado de los árboles visitados en fase de equilibrio compila las probabilidades posteriores de cada rama muestreada y calculada (De Luna *et al.*, 2005). Las probabilidades posteriores se han interpretado como la probabilidad de que el clado es confiable dado un modelo particular y por tanto se han utilizado como medida de soporte (De Luna *et al.*, 2005).

Neighbour Joining (NJ). El algoritmo NJ fue creado por Saitou & Nei (1987) y consiste en generar un único árbol final, el cual, no necesariamente será el “árbol verdadero”. En el paso inicial, se unen los dos *neighbours* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se

considera como una sola entidad, y se busca la siguiente secuencia que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al árbol (Saitou & Nei, 1987). En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos terminales se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas. Para seleccionar los terminales que tengan menor distancia genética, lo que en la práctica es escoger las secuencias más parecidas, es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones de terminales. Entonces se construye el árbol definitivo agregando terminales tomando como información los valores de la matriz de distancias (Saitou & Nei, 1987).

Modelos de sustitución nucleotídica. Los métodos de reconstrucción filogenética realizan inferencias implícita o explícitamente acerca del proceso de sustitución de nucleótidos en una secuencia de ADN (Felsenstein, 1988), en consecuencia todos los métodos filogenéticos dependen de los modelos de sustitución subyacentes (Posada & Crandall, 1998). Debido a esto, es necesario explorar cual es el modelo de sustitución que mejor representa los datos a fin de realizar inferencias confiables (Posada & Crandall, 1998).

Los modelos de sustitución de secuencias de ADN se han concentrado en una aproximación paramétrica. Consideran tres tipos principales de parámetros (Felsenstein, 1988; Posada & Crandall, 1998; Burnham & Anderson, 2003).

1-Parámetros de frecuencia de bases (A,C,G,T). Describe las frecuencias de las bases promediadas sobre todas las posiciones y a la largo del árbol.

2-Parámetros de tasa de intercambio. Describen las tendencias relativas de las bases de ser sustituidas unas por otras (hasta seis parámetros que representan las tasas de sustitución)

3-Heterogeneidad de tasas entre sitios. Describe la tasa de sustitución de cada posición como una muestra aleatoria de una distribución Gamma. Utiliza el valor del parámetro α de la distribución Gamma.

Se utilizó el software *JModelTest* (Posada & Buckley, 2004; Posada, 2008) bajo el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974), para seleccionar el modelo de sustitución nucleotídica que mejor representa los datos. El criterio de Akaike (AIC), tiene en cuenta la cantidad de información que se pierde cuando se utiliza un modelo para aproximarse al proceso real de evolución molecular.

Para *Jenynsia multidentata* el modelo resultante fue *TPM1uf+G*. Dicho modelo se basa en tres parámetros de sustitución nucleotídica. Considera frecuencia de bases (A=0,32 C=0,21 G=0,14 T= 0,31), tasa de intercambio de bases con seis categorías (AC= 1,00 AG= 29,4 AT= 6,25 CG= 6,25 CT=29,4 GT= 1,00) y distribución Gamma con un valor de α de 0,011.

En el caso de *Cnesterodon decemmaculatus* el modelo resultante fue *TIM3*. El mismo es un modelo basado en transiciones con tres parámetros (Posada, 2003). Considera frecuencia de bases (A=0,32 C=0,21 G= 0,14 T=0,32), tasa de intercambio de bases con seis categorías (AC=0,00 AG= 83,74 AT= 1,00 CG= 0,00 CT= 0,29 GT= 1,00) y una tasa de sustitución homogénea.

Para la especie *Corydoras paleatus* el modelo de sustitución nucleotídica resultante fue HKY + G. Dicho modelo permite frecuencias de bases

desiguales. Considera frecuencia de bases (A=0,36 C=0,18 G=0,12 T= 0,32), tasa de sustitución de bases $t_i/t_v = 8,76$ y distribución Gamma con un valor de α de 0,012.

Los parámetros obtenidos para los modelos de sustitución nucleotídica fueron utilizados para optimizar los datos en la reconstrucción filogenética.

Se realizó un análisis de Máxima parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML) implementado en PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Se realizó una búsqueda heurística con 100 adiciones de ramas al azar. Se utilizó el método de swapeo “*Tree bisection & Reconnection*” (TBR).

En segundo lugar se llevo a cabo un análisis de Inferencia Bayesiana, mediante el software Mr. Bayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Se realizaron dos corridas independientes de 10×10^6 generaciones para las tres especies. Luego de graficar los valores de verosimilitud, los primeros 40.000 árboles se descartaron como burn-in para *Jenynsia multidentata*. En el caso de *Cnesterodon decemmaculatus* se descartaron 30.000 y finalmente 25.000 para *Corydoras paleatus*.

Por último, se realizó un análisis basado en distancias genéticas mediante el algoritmo de Neighbour-Joinig (NJ) implementado en PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). En los casos de *J. multidentata* y *C. decemmaculatus* debido a que, los modelos *TPM1uf+G* y *TIM3* no están disponibles en PAUP, se seleccionó el modelo GTR para ambas especies. El soporte de los nodos para los análisis de MP, ML y NJ fue puesto a prueba mediante 1.000 réplicas de *Bootstrap* (Felsenstein, 1985).

Para enraizar los árboles se utilizaron como outgroups secuencias de especies emparentadas filogenéticamente disponibles en GenBank. Las

mismas fueron los Cyprinodontiformes *Poecilia latipinna* (GenBank, número de acceso DQ445680.1), y *Poecilia reticulata* (GenBank, número de acceso GQ855708.1) para enraizar los árboles de *Jenynsia multidentata* y *Cnesterodon decemmaculatus* respectivamente. En el caso de *Corydoras paleatus* se utilizó la secuencia de *Corydoras rabauti* (GenBank número de acceso 29570739.1).

Red de haplotipos. Debido a que los métodos tradicionales de análisis filogenético no han sido diseñados para ser aplicados en un nivel intraespecífico (Posada & Crandall, 2001), las relaciones evolutivas entre las variantes haplotípicas se analizaron mediante la construcción de una red de haplotipos para cada una de las especies. Se aplicó el algoritmo de *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999), el cual parte de la construcción de un árbol de expansión mínima (minimum spanning tree). Dicho árbol conecta las distintas secuencias sin crear ciclos o inferir nodos ancestrales, de forma tal de minimizar las distancias entre secuencias unidas. (Bandelt *et al.*, 1999). En una segunda instancia, dichos árboles se combinan en una única red. Aplicando el criterio de Parsimonia, se añaden secuencias consenso a partir de secuencias cercanamente relacionadas. Estas secuencia consenso o vectores intermedios pueden interpretarse como haplotipos no muestreados o ancestros extintos (Bandelt *et al.*, 1999). En este tipo de reconstrucción se identifican las sustituciones homoplásicas y se presentan en forma de puntos reticulares, lo que facilita su interpretación evolutiva. La topología de las redes de haplotipos puede orientar acerca de la historia demográfica de una población determinada. Por ejemplo, las filogenias en forma de estrella, con un haplotipo

central del que surgen varios haplotipos separados de éste por un único o unos pocos pasos mutacionales, se interpretan como signos de una expansión poblacional demográfica. Este patrón puede explicarse de la siguiente manera: una determinada variante mitocondrial experimenta condiciones reproductivas favorables durante un largo período de tiempo y aumenta de frecuencia. Tras muchas generaciones algunos de los descendientes portadores de este haplotipo adquieren nuevas mutaciones. En algunos casos la variante ancestral se extingue por deriva genética. Si alguno de los descendientes sufre el mismo proceso que la variante inicial, en la filogenia en forma de estrella aparecen subgrupos o sub-clusters (Forster, 2004).

Demografía histórica

Teoría Neutral. La teoría neutral a nivel molecular, propone que la mayoría de las mutaciones que ocurren en una secuencia de ADN pertenecen a dos categorías: deletéreas o selectivamente neutras (Kimura, 1984). Se espera que las mutaciones deletéreas se eliminen con rapidez de una población debido a la selección natural. En consecuencia, contribuyen con poca variación dentro de las especies. Por otro lado, se espera que las mutaciones selectivamente neutras, (equivalentes a las que ya existen en la población), estén gobernadas por la deriva genética, y sean las responsables de la variación genética observada entre y dentro de especies (Ford, 2002).

Modelo Neutral de Wright-Fisher. Es un modelo de genética poblacional donde se considera un tamaño poblacional finito, generaciones discretas y un muestreo multinomial que produce generaciones sucesivas

(Ewens, 1979). Se aplica tanto a individuos haploides como diploides. En el caso de organismos haploides (o genes mitocondriales), N individuos de una generación de descendientes se obtienen muestreando con replica (posiblemente con mutación) N veces, con reemplazo a la generación parental. En el modelo neutral de Wright-Fisher, todos los individuos de la generación parental tienen la misma posibilidad de ser progenitores de cada individuo de la descendencia (Hudson, 1990). El modelo asume un tamaño poblacional constante y grande, apareamiento al azar, sin solapamiento de generaciones, sin recombinación, y una tasa de mutación neutral constante (Simonsen *et al.*, 1995).

Dentro del contexto del modelo neutral de Wright-Fisher el polimorfismo en el ADN es una poderosa fuente de información para estudiar la evolución de una población. Si una región del ADN evoluciona de forma neutral o bajo selección natural es de considerable interés en estudios evolutivos, y puede examinarse mediante pruebas diseñadas para evaluar el polimorfismo del ADN (Fu, 1996).

Para entender con mayor facilidad los fundamentos de las pruebas basadas en la distribución del polimorfismo en el ADN es necesario definir algunos parámetros básicos en genética de poblaciones que además son fundamentales en las predicciones de la teoría neutral (Eguiarte *et al.*, 2007).

Uno de estos parámetros es el de la diversidad genética, que puede ser descrita por dos estimadores: π (π) y θ (theta). El primero (π) se refiere a la diversidad nucleotídica, el segundo (θ) es calculado a partir de la expresión $\theta = 4N_e\mu$ (Kimura, 1968). Sin embargo, es difícil tener la determinación exacta de los parámetros N_e (tamaño efectivo poblacional) y μ (tasa de mutación), por lo

que una manera indirecta de estimar θ es utilizando el número total de sitios segregativos en un grupo de secuencias (un sitio segregativo es un sitio en donde las secuencias difieren), $\theta = K/a$, donde K es igual al número total de sitios segregativos en una muestra de secuencias dada y $a = 1 + 1/2 + \dots + 1/n-1$ donde n = número de secuencias en la muestra (Watterson, 1975; Tajima, 1983; Eguiarte *et al.*, 2007).

A partir de la aplicación de pruebas de neutralidad es posible distinguir dos tipos de apartamiento del modelo neutral. En una población de tamaño finito, todas las secuencias de ADN son descendientes de una secuencia ancestral, y el polimorfismo se debe a mutaciones que ocurrieron en las ramas de una genealogía dada. Las mutaciones que ocurrieron en generaciones cercanas a las generaciones donde se encuentra el ancestro común más reciente se consideran antiguas, mientras que aquellas mutaciones que ocurrieron en generaciones modernas se consideran recientes. Cuando el modelo neutral es violado, el número de mutaciones antiguas y recientes difiere de lo esperado bajo el modelo neutral. Cuando el tamaño poblacional efectivo de una población decrece, se espera observar más mutaciones antiguas y menos recientes que lo esperado bajo el modelo neutral, el cual asume tamaño efectivo poblacional constante. Por el contrario, si la población crece se espera un mayor número de mutaciones nuevas (Fu, 1996).

Prueba de Tajima. La prueba de Tajima se basa en el modelo de sitios infinitos. Compara dos estimadores del parámetro de mutación theta ($\theta = 2M\mu$, donde $M = 2N$ en organismos diploides, o $M = N$ en organismos haploides de poblaciones con un tamaño efectivo poblacional de N). Detecta

las diferencias entre los estimadores π y θ . La determinación de la D de Tajima, se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

Si D resulta negativa quiere decir que θ posee un valor mayor que π , lo que indica la presencia de mutaciones deletéreas. En cambio, si D resulta positiva quiere decir que π tiene un mayor valor que θ , indicando que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva (por ejemplo, selección balanceadora) incrementando sus frecuencias. Si D es igual a cero quiere decir que no existe diferencia alguna entre ambos estimadores y nos encontramos bajo equilibrio neutral (Tajima, 1983, 1989; Eguiarte *et al.*, 2007).

Método Fu. Al igual que la prueba de Tajima, el método de Fu se basa en el modelo de sitios infinitos sin recombinación. Evalúa la probabilidad de observar una muestra al azar con un número de alelos similar o menor al valor observado dado el número observado de diferencias pareadas, tomando como estimador el parámetro poblacional θ (Fu, 1997). Fu define esta probabilidad como

$$S' = \Pr (K \geq k_{\text{obs}} \mid \theta = \theta_{\pi})$$

Y define el F_s como el logaritmo de S'

$$F_s = \ln (S' / 1 - S')$$

Las pruebas de F_s de Fu y D de Tajima evalúan el apartamiento de

neutralidad (equilibrio mutación-deriva) a través de un exceso significativo de haplotipos de baja frecuencia. Se espera obtener valores negativos y significativos en poblaciones que han experimentado recientes expansiones poblacionales.

Para evaluar la demografía histórica se llevaron a cabo las pruebas de neutralidad de Fu (1997) y Tajima (1989). Dichos análisis se condujeron en forma global para la totalidad de las muestras de cada especie, así como dentro de cada localidad, y por último considerando las distintas regiones geográficas. La significancia de estos test se llevaron a cabo con 1,000 réplicas de simulaciones coalescentes en Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

Gráficas de diferencias pareadas o “Mismatch distributions”. Se define como la distribución del número observado de diferencias pareadas entre pares de haplotipos. Las secuencias de una muestra se comparan de a pares y se calcula el número de diferencias. Finalmente se construye un histograma con la frecuencia observada para cada número de diferencias encontradas. Usualmente es una curva errática o multimodal en poblaciones que han permanecido en equilibrio demográfico. En poblaciones que han atravesado un proceso de expansión demográfica reciente se obtiene una curva unimodal (Rogers & Harpending, 1992).

Si se asume que una población de individuos haploides en equilibrio demográfico atraviesa un proceso de expansión poblacional repentina, t generaciones desde un tamaño poblacional de N_0 a N_1 , la probabilidad de observar S diferencias entre dos haplotipos tomados al azar se encuentra dada por el parámetro poblacional θ y el tiempo desde la expansión t . Dichos

parámetros poblacionales pueden ser estimados a partir del método de mínimos cuadrados propuesto por Schneider & Excoffier (1999).

Se construyeron gráficas de diferencias pareadas para las distintas poblaciones y para el conjunto de muestras mediante el análisis de *Mismatch distributions.*, implementando el software Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

Para testear la validez del modelo de expansión poblacional de la *mismatch distribution* observada con respecto a la esperada se realizó una prueba de bondad de ajuste mediante el desvío de la suma de los cuadrados (SSD) y el Índice Raggedness o Harpending's Raggedness index (*rg*) (Harpending, 1994). Dichos análisis se llevaron a cabo con el software Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

Estructura poblacional

Las poblaciones naturales de la mayoría de las especies se subdividen o “estructuran” en unidades locales aisladas con apareamiento al azar, o **demes**. La subdivisión de una especie en subpoblaciones separadas implica que, la variación genética exista en dos niveles: variación genética dentro de poblaciones y diversidad genética entre poblaciones (Allendorf & Luikart, 2007).

Cuando una población se divide en subpoblaciones aisladas, existe menos heterocigosidad de la que habría si la población permaneciera sin dividirse. Los efectos fundadores que actúan sobre diferentes demes conducen generalmente a subpoblaciones con frecuencias alélicas diferentes a las de la población original. Debido a que, la frecuencia de los alelos en cada generación representa una muestra aleatoria de la frecuencia de los alelos de la generación anterior, habrá un mayor error de muestreo en estos pequeños

grupos de los que habría en una población mayor. Por lo tanto, la deriva genética impulsará estos demes más pequeños hacia diferentes frecuencias alélicas con la consecuente fijación de alelos más rápidamente de lo que se llevaría a cabo en una población mayor (Allendorf & Luikart, 2007).

Estadísticos F de Wright. La disminución de la heterocigosidad debido a la subdivisión dentro de una población se ha cuantificado utilizando un índice conocido como estadístico F de Wright, también conocido como el índice de fijación (Allendorf & Luikart, 2007; Frankham, *et al.*, 2004). El estadístico F es una medida de la diferencia entre la heterocigosidad media entre las subdivisiones en una población, y la frecuencia de heterocigotos si todos los miembros de la población se reproducen al azar (Hartl & Clark 1997). El índice de fijación varía desde 0 (indicando que no hay diferenciación entre la población general y sus subpoblaciones) a un máximo teórico de 1. En la práctica, el índice de fijación observado es mucho menor que 1, incluso en poblaciones altamente diferenciadas.

Los Índices de fijación se pueden determinar para los distintos niveles jerárquicos de la estructura de una población, con el fin de indicar, por ejemplo, el grado de diferenciación dentro de una población entre los grupos de demes (F_{SG}), dentro de los grupos entre los demes (F_{GT}), y dentro de una población entre los demes (F_{ST}) (Hartl & Clark, 1997).

Para determinar el índice de fijación, se debe determinar la heterocigosidad media en cada nivel. Para un locus con dos alelos alternativos, la frecuencia de los alelos se simboliza como p y la forma alternativa del alelo es igual a $1 - p$. Para una población subdividida en tres niveles jerárquicos, la

heterocigosidad media de cada nivel, se determinará de la siguiente manera:

Demes

$$H_S = \sum_i \sum_j 2p_{ij}(1 - p_{ij})$$

Grupos de demes

$$H_G = \sum_i 2 \frac{\sum_j p_{ij}}{n_i} \left(1 - \frac{\sum_j p_{ij}}{n_i} \right)$$

Población

$$H_T = \sum_i 2 \frac{\sum_j \sum_k p_{ijk}}{n_i} \left(1 - \frac{\sum_j \sum_k p_{ijk}}{n_i} \right)$$

Para cada nivel de jerarquía de la población, se determina la frecuencia media del alelo p , entonces la frecuencia de alelo se multiplica por 2 (1 - p); este producto es la frecuencia de heterocigotos para el alelo si ocurre panmixia en ese nivel jerárquico.

Una vez que se determina la heterocigosidad en cada nivel jerárquico, se pueden calcular los estadísticos F (Hartl & Clark, 1997). En el caso de genomas haploides (genoma mitocondrial), la heterocigosidad es prácticamente inexistente. En este caso, se calcula la diversidad haplotípica como equivalente a la heterocigosidad. La diversidad haplotípica se calcula en la misma forma que se calcula la heterocigosidad para genomas diploides, y provee una medida de diferenciación entre los haplotipos.

Nivel jerárquico	Estadístico-F
Entre demes dentro de grupos	$F_{SG} = \frac{H_G - H_S}{H_G}$
Entre grupos dentro de poblaciones	$F_{GT} = \frac{H_T - H_G}{H_T}$
Entre demes dentro de grupos	$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$

AMOVA. El Análisis de varianza molecular (AMOVA) es un método de estimación de diferenciación poblacional a partir de datos moleculares y pruebas de hipótesis sobre dicha diferenciación (Excoffier *et al.*, 1992).

El AMOVA trata a cualquier tipo de datos moleculares como un vector booleano p_i , es decir, una matriz de $n \times 1$ datos binarios. La presencia de un marcador se indica por 1 y 0 indicaría su ausencia. Un marcador podría ser una base de nucleótidos, una secuencia de bases, un fragmento de restricción, o un evento mutacional (Excoffier *et al.*, 1992). Se calculan distancias euclidianas entre pares de vectores restando el vector booleano de un haplotipo a otro. Se calculan distancias euclidianas al cuadrado para todos los arreglos por pares de vectores booleanos, que a continuación se disponen en una matriz, y divididos en submatrices correspondientes a las subdivisiones dentro de la población (Excoffier *et al.*, 1992).

Estas sumas de cuadrados, pueden ser analizadas en un análisis de varianza anidada. Un ANOVA anidado difiere de un ANOVA simple en que los datos se organizan jerárquicamente y la media de los cuadrados se calcula

para los agrupamientos en todos los niveles de la jerarquía. Esto permite testear hipótesis sobre las diferencias entre grupos y dentro de grupos en varios niveles jerárquicos (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 2001). El marco de ANOVA para AMOVA es

Nivel de variación	df	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Varianza
entre haplotipos dentro de demes	$n - d$	$SS(WD) = \sum_g \sum_i \frac{1}{2n_{ig}} \sum_j \sum_k \ell_{jk}^2$	$\frac{SS(WD)}{n - d}$	$\sigma_{WD}^2 = \sigma_{WG}^2 + n'' \sigma_b^2 + n''' \sigma_a^2$
entre demes dentro de grupos	$d - G$	$SS(AD) = \sum_g \frac{1}{2n_g} \sum_i \sum_{i'} \sum_j \sum_k \ell_{jk}^2 - SS(WD)$	$\frac{SS(AD)}{d - G}$	$\sigma_{AD}^2 = \sigma_{WG}^2 + n' \sigma_b^2$
Entre grupos dentro de poblaciones	$G - 1$	$SS(AG) = SS(T) - \sum_g \frac{1}{2n_g} \sum_i \sum_{i'} \sum_j \sum_k \ell_{jk}^2$	$\frac{SS(AG)}{G - 1}$	$\sigma_{WG}^2 = \frac{SS(AG)}{G - 1}$
Total	$n - 1$	$SS(T) = \frac{1}{2n} \sum_j \sum_k \ell_{jk}^2$		$\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$

Los componentes de la varianza se pueden utilizar para calcular una serie de estadísticos llamado estadísticos Φ , que resumen el grado de diferenciación entre las divisiones de la población y son análogos a los

estadísticos F de Wright (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 2001). Se derivan de la siguiente manera:

Nivel jerárquico	Estadístico Φ
Entre demes dentro de grupos	$\Phi_{SG} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}$
Entre grupos dentro de poblaciones	$\Phi_{GT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}$
Entre demes dentro de poblaciones	$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2}$

Los estadísticos Φ pueden ser tratados como una hipótesis acerca de la diferenciación en ese nivel de una población. Estas hipótesis pueden ser probadas utilizando la distribución nula de los componentes de la varianza. Si la varianza de las subpoblaciones no difiere significativamente de la distribución nula de la varianza de la población, la hipótesis de que dichas subpoblaciones se diferencian de la población más grande sería rechazada (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 2001).

Se obtuvo una descripción de la estructura genético poblacional a partir del Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) mediante el software Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010). Para dicho análisis se establecieron tres agrupamientos jerárquicos poblacionales de acuerdo a la provincia geológica donde se encuentran los cauces. Estos agrupamientos comprenden el grupo Este o Tandilia, el grupo Central o Llanura Interserrana Bonaerense y por último, el grupo Oeste o Ventania. Alternativamente se

calcularon los Φ_{ST} pareados como una medida de distancias genéticas, que permiten establecer diferenciación genética entre poblaciones. Se utilizaron 1.000 permutaciones para evaluar la significancia estadística de dichos estimadores.

Con el fin de determinar la existencia de un equilibrio migración-deriva a una escala regional, se utilizó el enfoque propuesto por Hutchinson & Templeton (1999). Bajo condiciones de equilibrio, se espera que las distancias genéticas se incrementen con el aumento de la distancia geográfica entre las poblaciones, patrón conocido como aislamiento por distancia (Wright, 1942). La falta o la debilidad de una o ambas de estas relaciones serían indicativas de una falta de equilibrio regional. Cuando el flujo de genes es más fuerte que la deriva (caso II de Hutchinson & Templeton 1999), se espera un patrón que refleja panmixia, sin relaciones entre la distancia genética y geográfica y poca variación en las estimaciones de divergencia genética. Por el contrario, se espera que esta variación sea grande cuando la deriva genética es fuerte, en relación con el flujo génico, como en los casos donde la discontinuidad de hábitat ha dado lugar a un amplio aislamiento poblacional (caso III de Hutchinson & Templeton, 1999). La relación entre las distancias geográficas y genéticas (Φ_{ST}) se evaluó a través de una prueba de Mantel (Mantel, 1967). La prueba de Mantel se basa en la correlación entre dos matrices del mismo rango, utilizando el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. La prueba de Mantel se realizó mediante el complemento de Microsoft Excel *PopTools* versión 3.2 (Hood, 2010). La significancia estadística se evaluó mediante 1.000 permutaciones.

Resultados

Jenynsia multidentata

Variación genética

Se analizó un fragmento de 773 pares de bases (pb) perteneciente a la Región Control, a partir de 110 individuos (Tabla 1). Cabe destacar que el fragmento obtenido inicialmente fue de 880-900 pb. Debido a que se observaron homopolímeros de Adenina, cuya presencia se traduce en un error en el marco de lectura, estos sitios fueron descartados en el alineamiento. Se identificaron 37 sitios polimórficos de los cuales 22 sitios fueron transiciones y ocho fueron transversiones. Asimismo se encontraron siete *indels*, definiendo un total de 12 haplotipos. Estos haplotipos quedaron definidos de la misma forma ya sea que se tuvieran en cuenta o no los *indels*, por lo tanto se consideraron en los distintos análisis como sitios polimórficos.

El haplotipo más ampliamente distribuido se encontró en ocho poblaciones, siendo el único presente en las poblaciones Quequén Grande, Cortaderas, Claromecó y Sauce Chico. La población que presentó el mayor número de haplotipos fue Sauce Grande con cinco haplotipos. Las poblaciones Chapadmalal, Chocorí y Saladillo presentaron tres haplotipos, mientras que, El Moro y Quequén Salado presentaron dos haplotipos (Tabla 1, Figura 8 a, b). Al analizar las regiones geográficas Tandilia presentó seis haplotipos, Llanura Interserrana dos haplotipos, y finalmente Ventania siete haplotipos (Tabla 1, Figura 8 c).

La diversidad haplotípica (h) para el conjunto de muestras fue de 0,54 +/- 0,05 mientras que, la diversidad nucleotídica total (π) fue de 0,0096 +/- 0,005, indicando valores bajos a levemente moderados de diversidad genética para el conjunto de las poblaciones.

Tabla 1. Diversidad genética de *Jenynsia multidentata* en el Área Pampeana Austral. N= número de individuos. S= sitios polimórficos. Nhap= número de haplotipos. $h \pm SD$ = diversidad haplotípica. $\pi \pm SD$ = diversidad nucleotídica.

Localidad/Región	N	N hap	S	$h \pm DS$	$\pi \pm DS$
Chapadmalal	11	3	17	0.58 ± 0.14	0.007 ± 0.004
Chocorí	10	3	2	0.71 ± 0.008	0.001 ± 0.0009
El Moro	11	2	2	0.18 ± 0.14	0.00004 ± 0.0005
Quequén Grande	11	1	-	-	-
Cortaderas	13	1	-	-	-
Claromecó	11	1	-	-	-
Quequén Salado	10	2	19	0.20 ± 0.15	0.004 ± 0.003
Sauce Grande	11	5	17	0.81 ± 0.08	0.008 ± 0.005
Saladillo	11	3	2	0.47 ± 0.10	0.0006 ± 0.0006
Sauce Chico	11	1	-	-	-
Tandilia	32	6	20	0.73 ± 0.05	0.009 ± 0.005
Llanura Interserrana	45	2	19	0.04 ± 0.04	0.0010 ± 0.0008
Ventania	33	7	19	0.54 ± 0.09	0.0074 ± 0.004
Global	110	12	37	0.54 ± 0.05	0.0096 ± 0.005

Cuando se analizaron las poblaciones en forma individual, las poblaciones del río Sauce Grande y el arroyo Chocorí presentaron los valores más altos en la diversidad haplotípica, aunque los valores reportados para la diversidad nucleotídica fueron bajos. Dicho patrón podría estar reflejando un crecimiento demográfico repentino a partir de una población ancestral de tamaño pequeño. El mismo patrón podría aplicarse a las poblaciones de los arroyos Saladillo y Chapadmalal, con un bajo valor para π , aunque el valor de h fue moderado. Tanto la población El Moro como Quequén Salado presentaron valores bajos de diversidad haplotípica y nucleotídica, asimismo las poblaciones Quequén Grande, Cortaderas y Claromecó presentaron un único haplotipo. Este patrón podría ser consecuente con un cuello de botella reciente o tal vez un efecto fundador a partir de unos pocos linajes mitocondriales (Tabla 1).

A analizar los valores por región geográfica, las cuencas pertenecientes

a Tandilia presentaron los mayores valores de diversidad genética ($h=0,73$ $\pi=0,009$) seguidos por las cuencas de Ventania y por las cuencas de la Llanura Interserrana Bonaerense (Tabla 1).

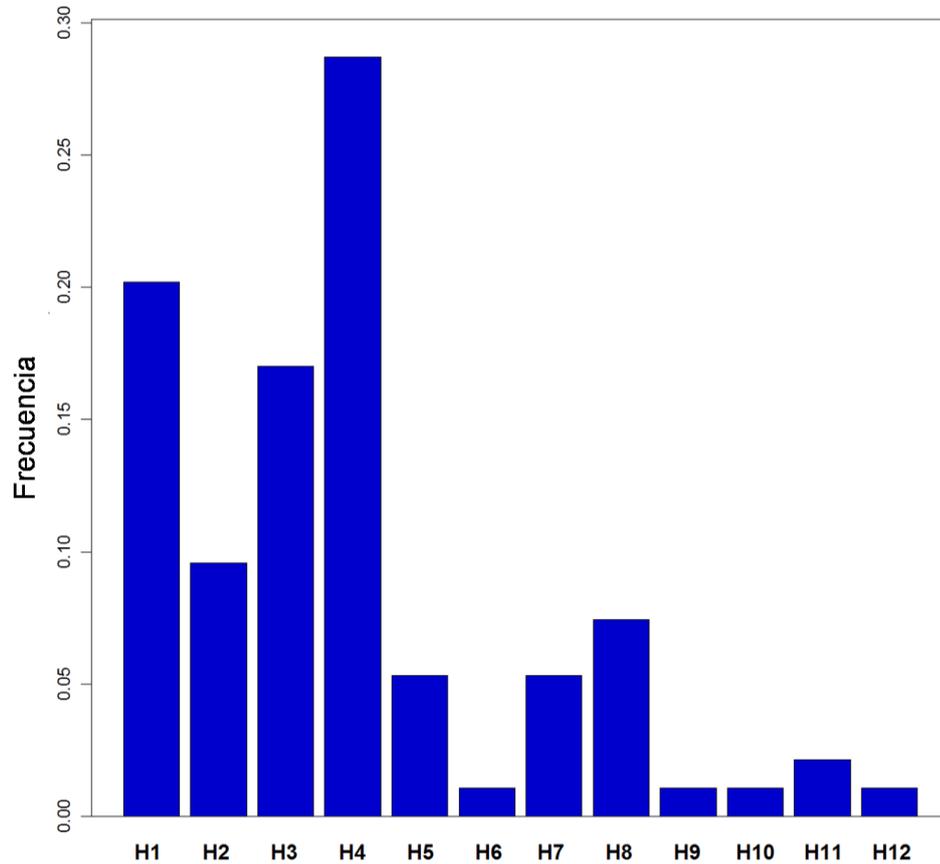


Figura 8 a. Frecuencia relativa de haplotipos en el Área Pampeana Austral para *Jenynsia multidentata*. H1-H12: haplotipos

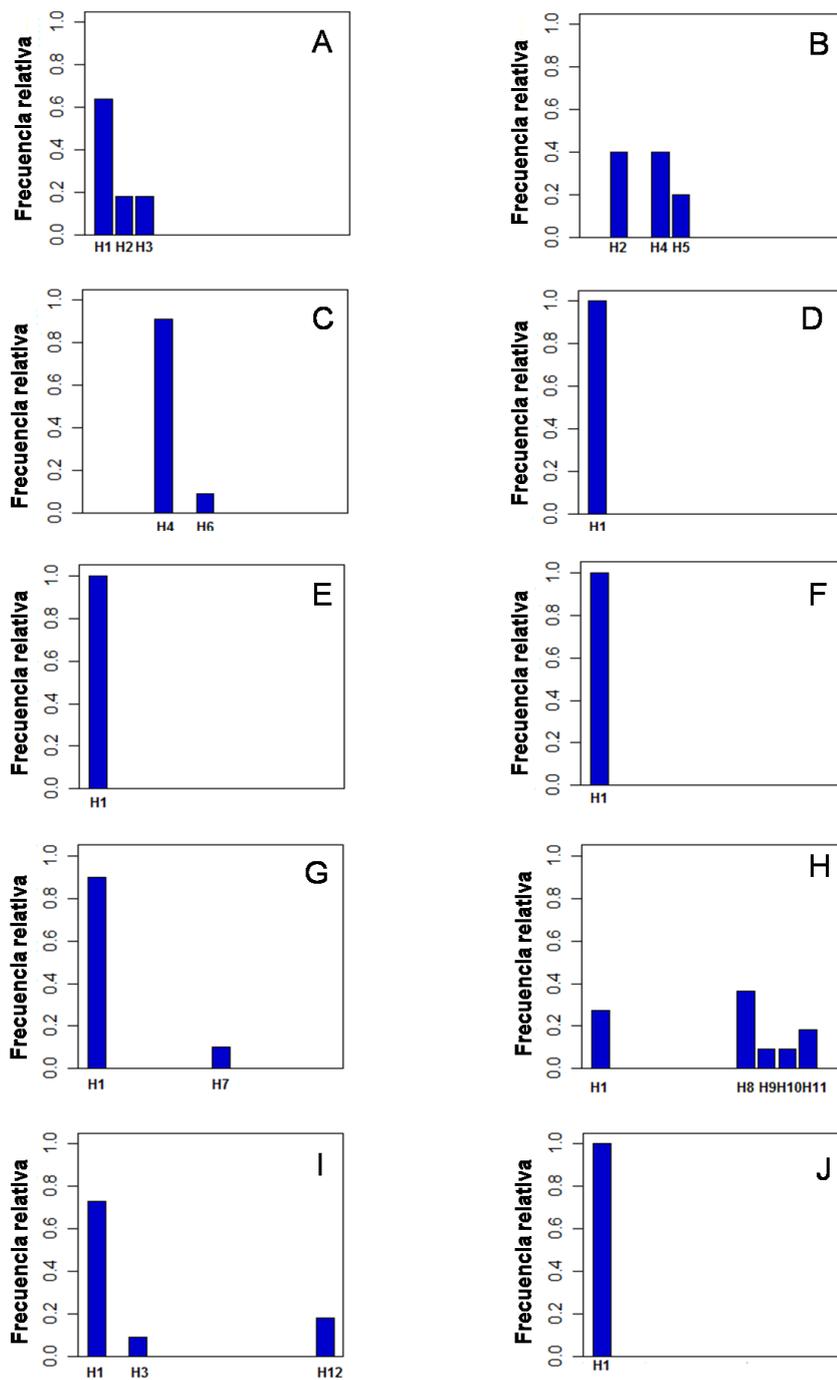


Figura 8 b. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas localidades para *Jenynsia multidentata*. A: Chapadmalal. B: Chocorí. C: El Moro. D: Quequén Grande. E: Cortaderas. F: Claromecó. G: Quequén Salado. H: Sauce Grande. I: Saladillo. J: Sauce Chico. H1-H12: haplotipos.

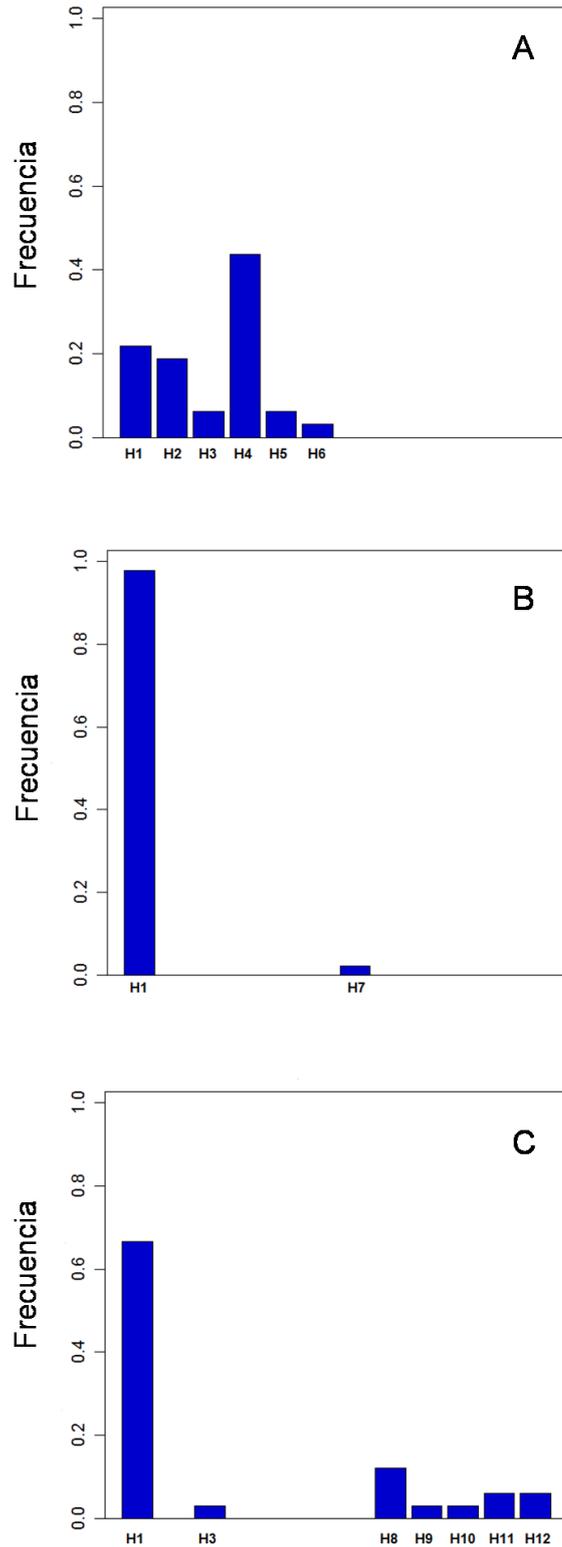


Figura 8 c. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas regiones geográficas para *Jenynsia multidentata*. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania. H1-H12: haplotipos.

Relaciones genealógicas entre los haplotipos

Tanto los métodos evolutivos (MP, IB y ML) como el método basado en distancias genéticas (NJ), arrojaron árboles con las mismas topologías (Figura 9).

Se observan dos clados (métodos evolutivos) o clusters (NJ) principales. Uno de los clados/clusters evidencia una gran politomía basal la cual incluye a todas las poblaciones (haplotipo 1) a excepción de Chocorí y El Moro. Dentro de este grupo se separan por pocas diferencias los haplotipos 3 y 12.

El restante agrupamiento parece formar un clado o linaje compuesto por haplotipos del extremo Oeste de la distribución geográfica (haplotipos 8, 9, 10 y 11, Sauce Grande) junto con haplotipos que se encuentran en el extremo Este (haplotipos 2, 4, 5, 6, Chapadmalal, Chocorí, El Moro). Asimismo dentro de dicho agrupamiento el haplotipo 7 el cual pertenece a la localidad Quequén Salado parece ser basal al clado.

La red de haplotipos fue altamente concordante con los árboles obtenidos (Figura 10). Se observa cómo se recuperan los mismos grupos terminales descritos en los árboles (Figura 9).

Se pueden observar cuatro linajes diferenciados por varios pasos mutacionales. De estos linajes, uno se encuentra exclusivamente en el río Sauce Grande (haplotipos 8, 9, 10 y 11). Otro linaje se compone sólo por un individuo del río Quequén Salado (haplotipo 7). Un tercer grupo quedó definido por individuos de las poblaciones Chapadmalal, Chocorí, El Moro (haplotipos 2, 4, 5, 6), las cuales pertenecen a la región Tandilia. Por último, se recupera un linaje ampliamente distribuido, el cual se observa en todas las poblaciones excepto en Chocorí y El Moro. Dicho linaje se encuentra compuesto por el

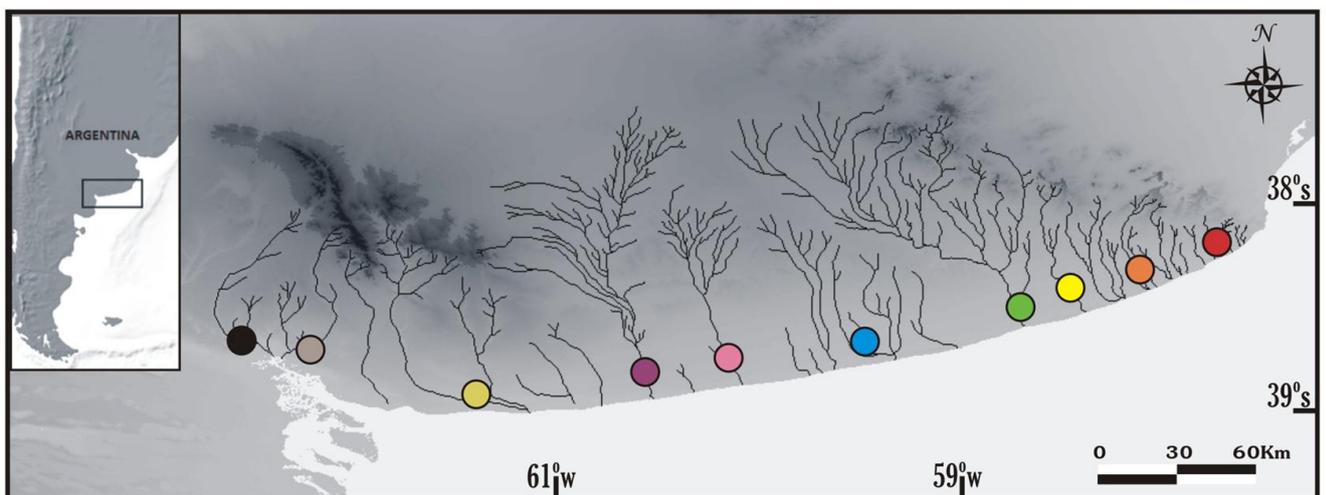
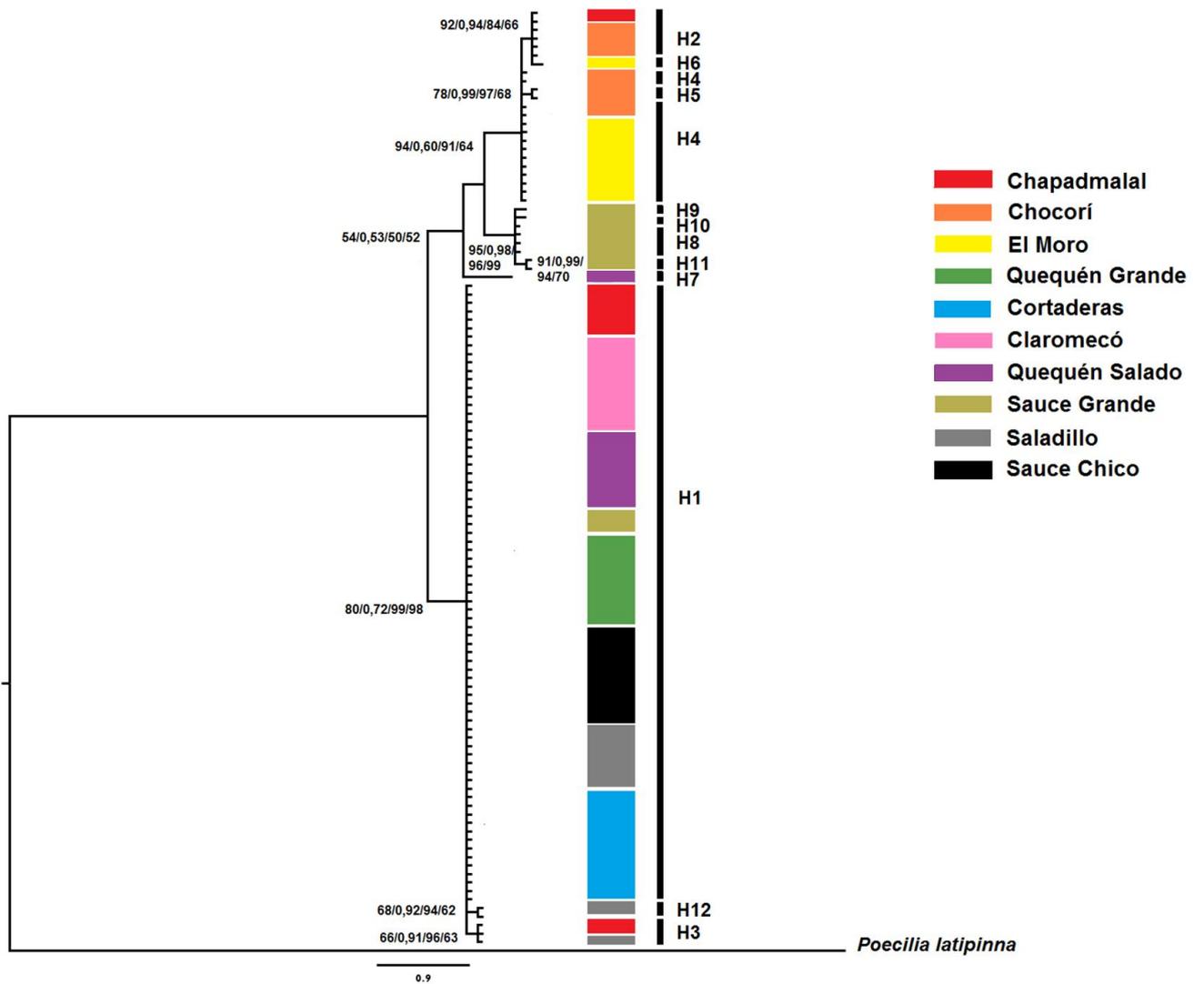


Figura 9. Árbol de consenso estricto a partir de la región control del ADN mitocondrial de *Jenynsia multidentata*. Los números sobre los nodos representan los valores de soporte de los análisis de MP, BI, ML y NJ respectivamente. H1-H12: haplotipos.

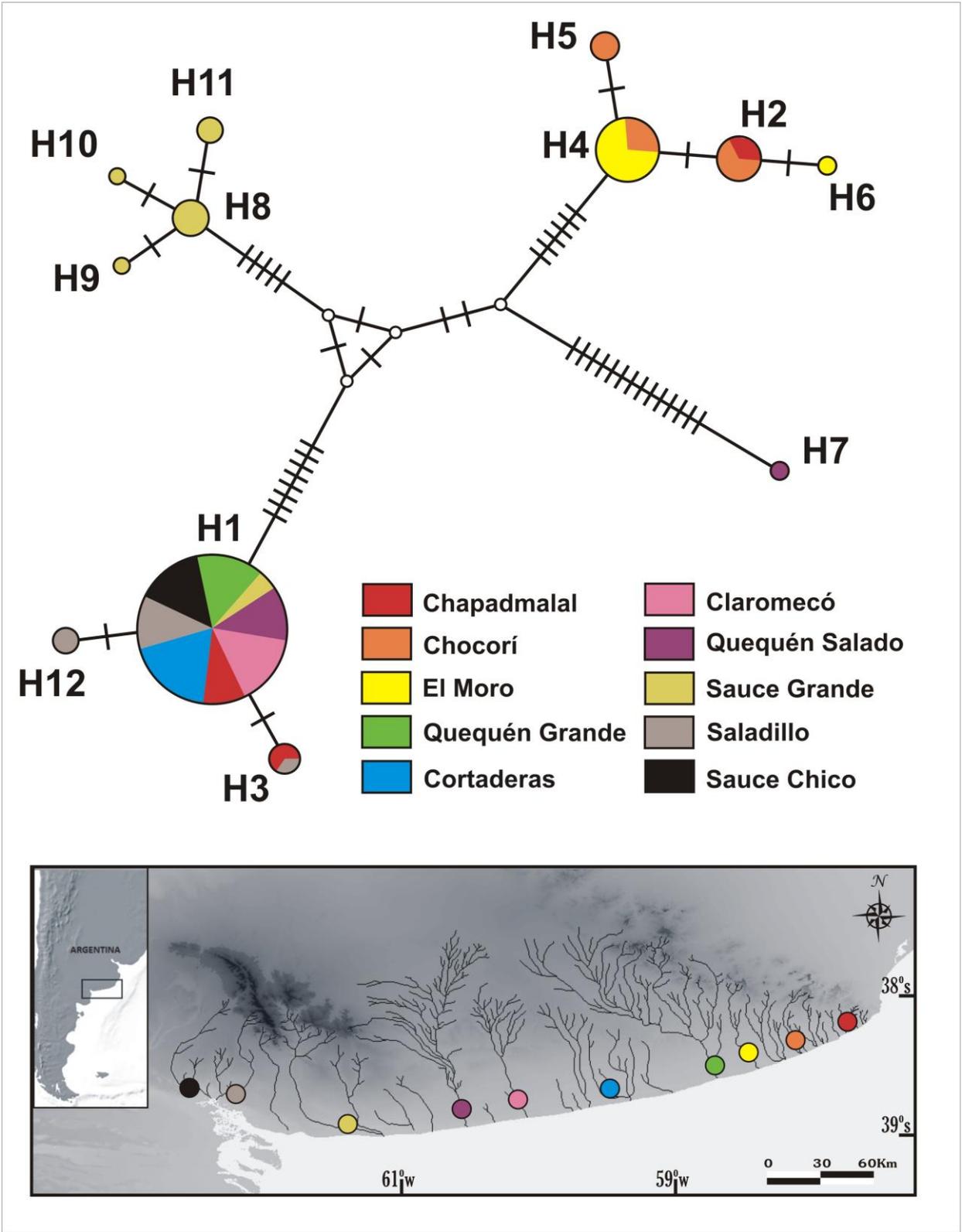


Figura 10. Red de haplotipos obtenida a partir de la región control de *Jenynsia multidentata*, mediante el algoritmo de Median Joining. Cada círculo representa un haplotipo. El tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia en el total de las muestras. El largo de las líneas que conectan a los haplotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que los separan.

haplotipo 1, y puede verse como se diferencian de él por un paso mutacional dos haplotipos, uno perteneciente a la población Saladillo, y el restante se encuentra tanto en Saladillo como en Chapadmalal.

Si bien dentro de cada linaje (a excepción del haplotipo 7, localidad Quequén Salado) pueden observarse signos de expansión demográfica locales, la población en su conjunto muestra una clara estructura poblacional.

Demografía histórica

La *mismatch distribution* para el conjunto de muestras evidenció una curva errática (Figura 11 a). Este resultado podría sugerir un tamaño poblacional constante, o bien subdivisión poblacional por un largo periodo de tiempo. Las pruebas de bondad de ajuste revelaron valores altos, aunque en el caso del Harpending's Raggedness index (r) no significativo (Tabla 2). Dichos valores corroboran que los datos no se ajustan a un modelo demográfico de expansión poblacional repentina.

En cuanto a los test de neutralidad, tanto la D de Tajima, como el F_s de Fu fueron positivos y no significativos soportando los resultados del análisis de *mismatch distribution* (Tabla 2).

La prueba de Tajima resultó positiva y significativa sólo para las localidades El Moro y Quequén Salado. La prueba de Fu resultó positiva en todas las localidades, excepto Saladillo aunque no fue significativa para dicha localidad.

De acuerdo con el análisis de *mismatch distribution* para las diferentes localidades, sólo se evidenció un patrón de expansión poblacional para las poblaciones de las localidades Chocorí y Saladillo (Figura 11 b).

Tabla 2. Demografía histórica de *Jenynsia multidentata*. D_T = D de Tajima. Fs_{FU} = Fs de Fu. r = Harpending's Raggedness index. SSD= Desvío de la suma de cuadrados. P = probabilidad < 0,05. – No estimado.

Localidad/región	D_T	P (D_T sim<obs)	Fs_{FU}	P (F_{ssim} <obs)	SSD	SSD- P	rg	$rg-P$
Chapadmalal	-0.181	0.471	5.71	0.987	0.096	0.237	0.194	0.595
Chocorí	0.830	0.813	0.253	0.479	0.030	0.306	0.217	0.271
El Moro	-1.429	0.034	0.506	0.426	0.075	0.084	0.735	0.336
Quequén Grande	-	-	-	-	-	-	-	-
Cortaderas	-	-	-	-	-	-	-	-
Claromecó	-	-	-	-	-	-	-	-
Quequén Salado	-1.999	0.006	6.348	0.992	0.057	0.036	0.720	0.670
Sauce Grande	0.697	0.762	2.831	0.922	0.130	0.216	0.150	0.323
Saladillo	-0.778	0.266	-0.658	0.115	0.014	0.317	0.169	0.595
Sauce Chico	-	-	-	-	-	-	-	-
Tandilia	1.566	0.943	7.10	0.982	0.102	0.311	0.106	0.463
Llanura Interserrana	-2.515	0.000	3.232	0.906	0.002	0.047	0.917	0.904
Ventania	0.620	0.799	3.981	0.930	0.388	0.000	0.165	0.999
Global	0.098	0.627	5.909	0.933	0.352	0.000	0.184	0.998

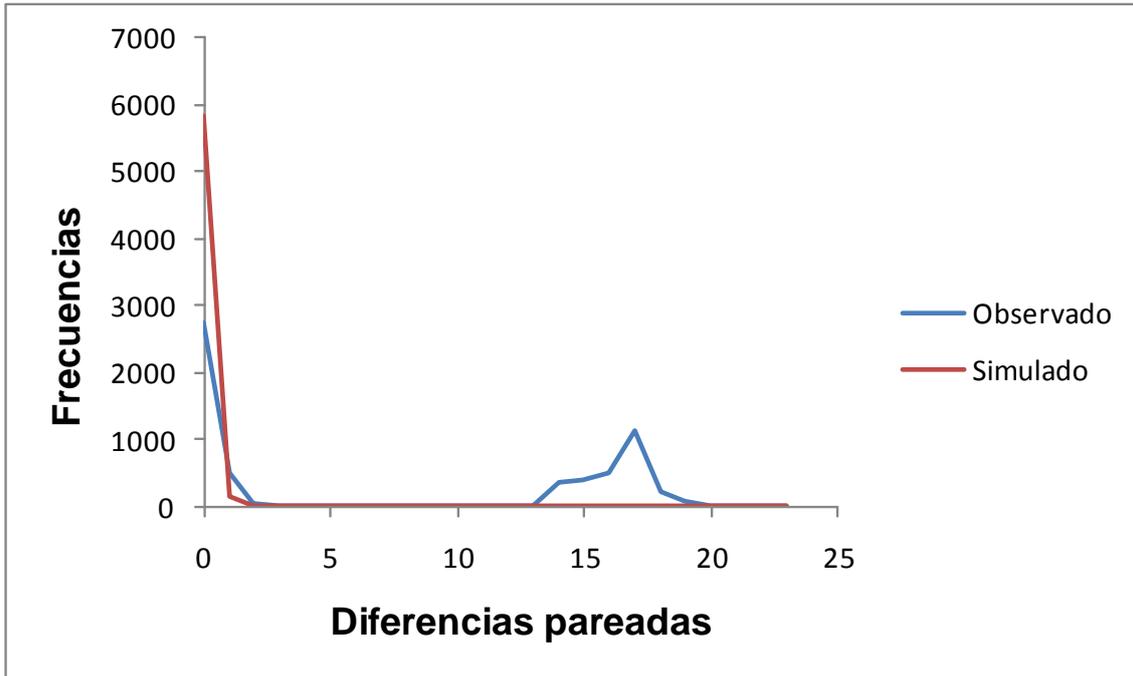


Figura 11 a. *Mismatch distribution* para el conjunto de muestras de *Jenynsia multidentata*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

En el caso de la localidad Chocorí, la curva unimodal obtenida en el análisis de *mismatch distribution* sería concordante con el patrón observado en la red de haplotipos (Ver figura 10), donde a partir de un haplotipo (H 4) se diferencian por un paso mutacional los haplotipos dos y cinco, pertenecientes a dicha población. El mismo patrón puede observarse en la localidad Saladillo, donde a partir de haplotipo 1 se diferencian los haplotipos 3 y 12. Como se ha mencionado (Ver materiales y métodos), el patrón en forma de estrella en una red de haplotipos es coherente con un proceso de expansión poblacional.

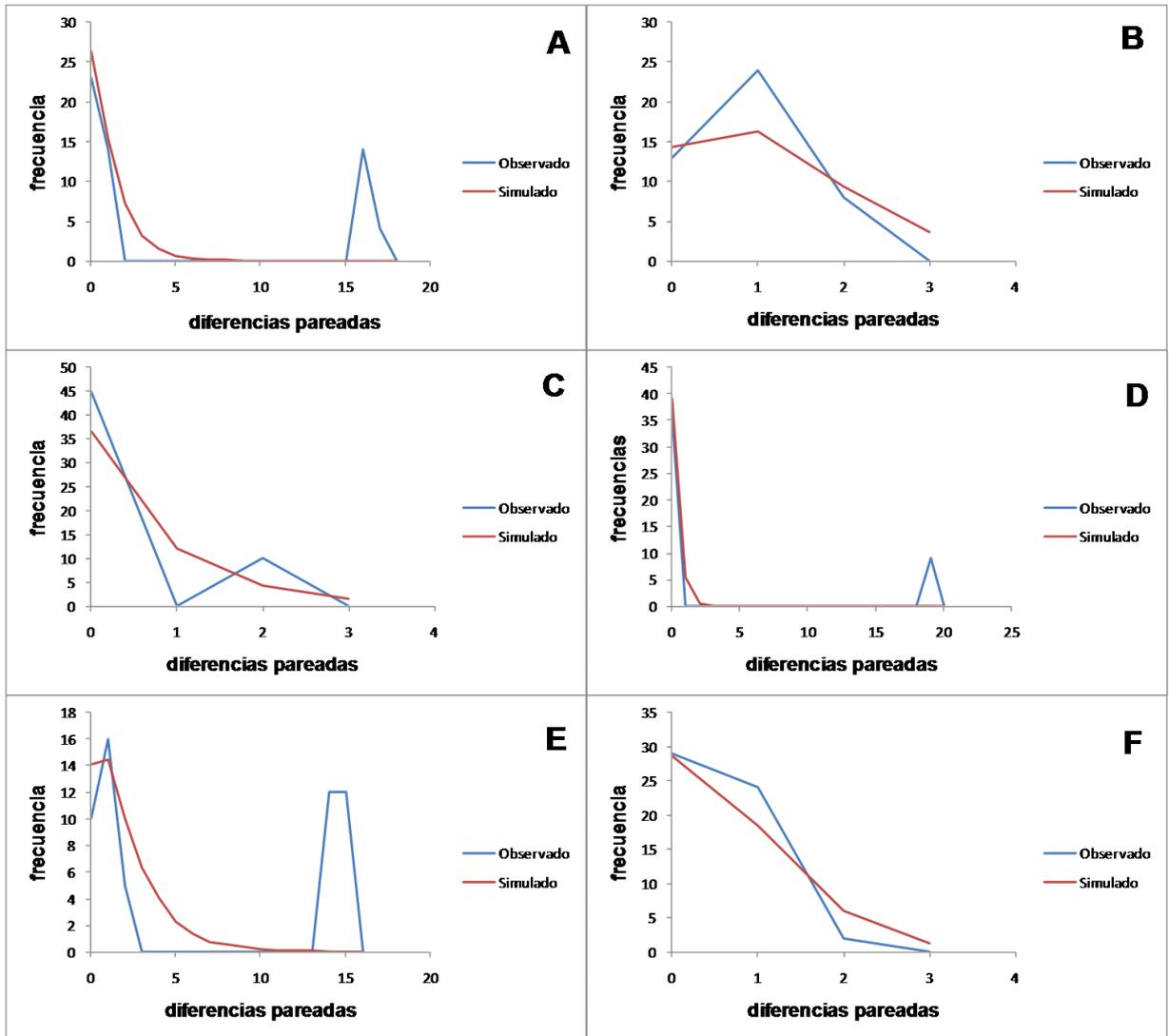


Figura 11 b. *Mismatch distribution* en las diferentes poblaciones de *Jenynsia multidentata*.

Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: Chapadmalal. B: Chocorí. C: El Moro. D: Quequén Salado. E: Sauce Grande. F: Saladillo.

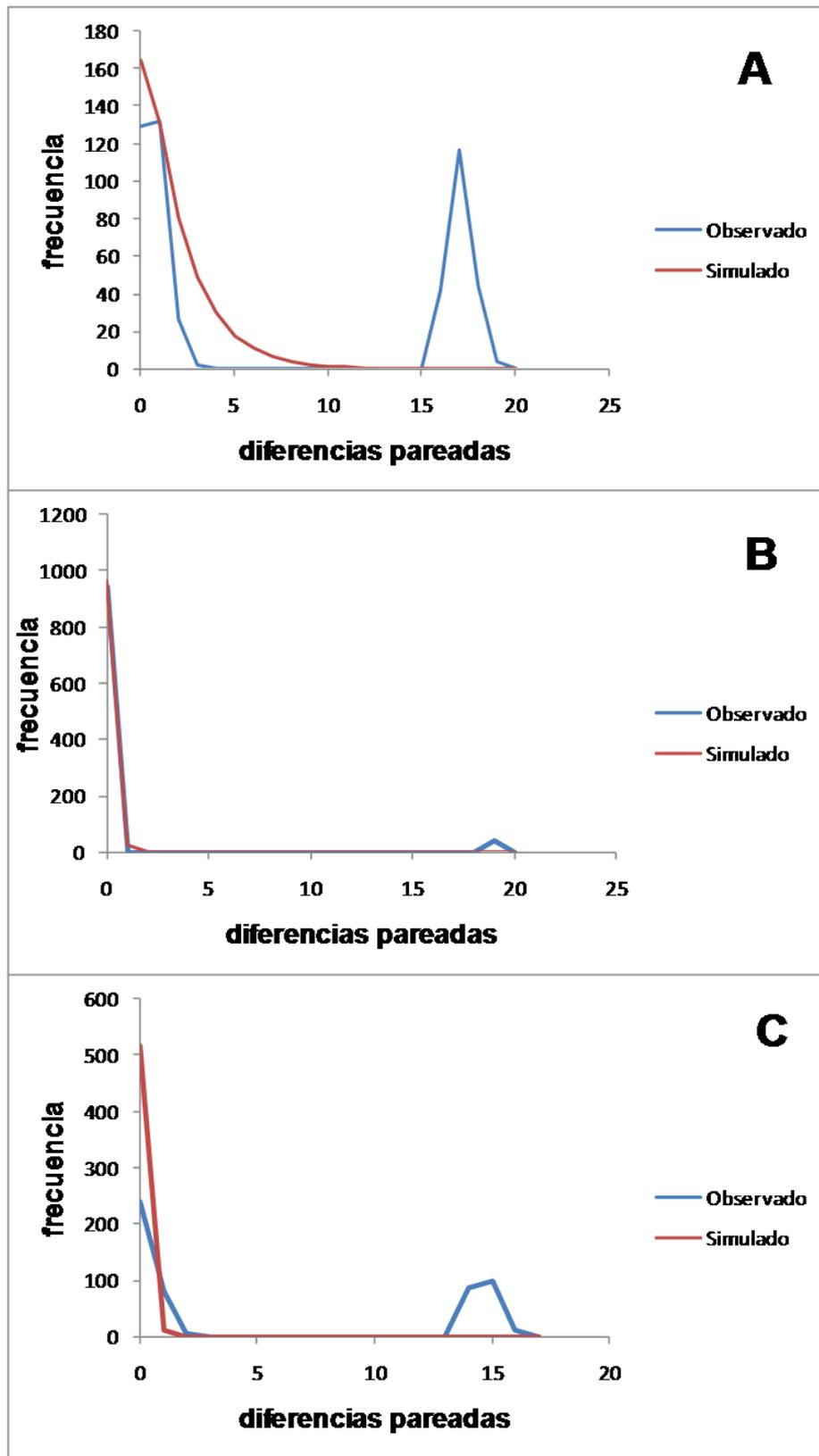


Figura 11 c. *Mismatch distribution* en las diferentes regiones geográficas de *Jenynsia multidentata*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania.

Las localidades Chapadmalal, El Moro, Quequén Salado y Sauce Grande presentaron curvas erráticas, compatible con un patrón de equilibrio demográfico (Tabla 2, Figura 11 b).

Las poblaciones de las localidades Cortaderas, Claromecó, Quequén Grande y Sauce Chico presentaron un único haplotipo, con lo cual no es posible estimar análisis de demografía histórica.

Cuando se consideraron las regiones geográficas, sólo la región Llanura Interserrana evidenció un patrón de expansión poblacional en la prueba de Tajima. Dicho análisis arrojó un valor negativo y significativo, sustentado por el valor y significancia del desvío de la suma de cuadrados (SSD). El resto de los análisis no fueron consistentes con un proceso de expansión poblacional en ninguna de las regiones consideradas (Tabla 2, Figura 11 c).

Estructura poblacional

La diferenciación genética entre pares de poblaciones medida como diferencias pareadas Φ_{ST} evidenció que los valores más altos y significativos se encuentran representados por la población del arroyo El Moro con respecto a las poblaciones de Quequén Grande (0,99), Cortaderas (0,98) y Claromecó (0,99). Asimismo, se observaron valores altos de Φ_{ST} (0,98 y 0,99) con las poblaciones Sauce Chico y Saladillo respectivamente. La población Chocorí, también presentó valores elevados de Φ_{ST} con respecto a las mismas poblaciones que El Moro (Figura 12 a) siendo estas poblaciones las más divergentes del total analizado. Por el contrario, los valores más bajos se encontraron en la localidad Quequén Salado vs. Chapadmalal (0,002) y Saladillo (0,007). De hecho la población Quequén Salado presentó los valores

más bajos de Φ_{ST} pareados a excepción de la comparación con El Moro y Chocorí (Figura 12 a).

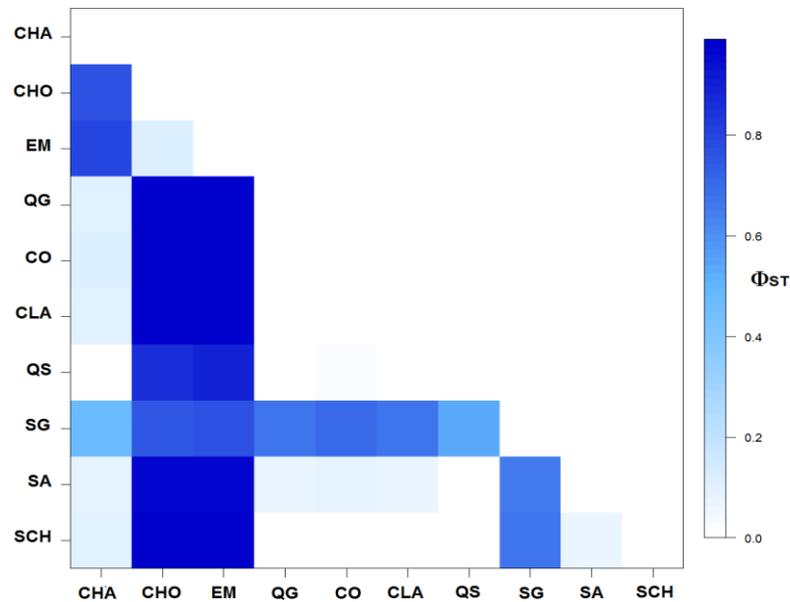


Figura 12 a. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para el conjunto de muestras calculado a partir de la región control de *Jenynsia multidentata*. CHA: Chapadmalal. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande. SA: Saladillo. SCH: Sauce Chico.

El valor del índice de fijación Φ_{ST} para el conjunto de poblaciones fue de 0,80 ($p < 0,001$). Estos valores indican un alto grado de estructura poblacional.

Cuando se compararon los valores por regiones geográficas, los valores más altos se obtuvieron entre Tandilia y Llanura Interserrana, seguido por Tandilia versus Ventania (Figura 12 b). Este patrón es consistente con el observado en los análisis locales, donde la mayor divergencia se encontró justamente en las poblaciones El Moro y Chocorí las cuales pertenecen a la región Tandilia.

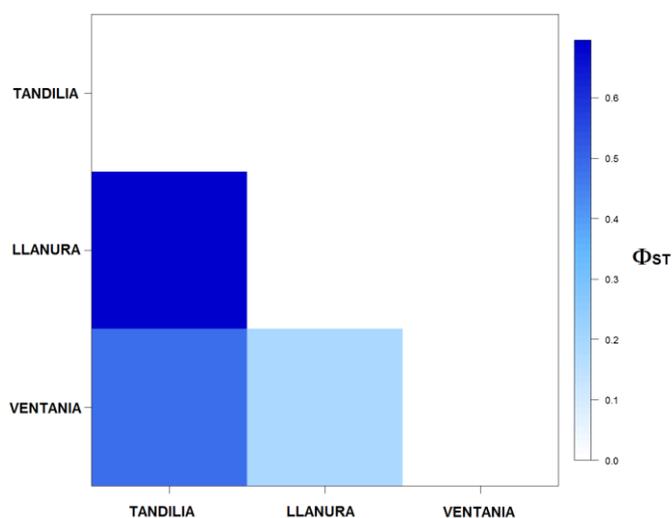


Figura 12 b. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para las distintas regiones geográficas calculado a partir de la región control de *Jenynsia multidentata*.

Por otra parte, el AMOVA reflejó que el mayor porcentaje de la varianza se explica entre grupos, mientras que el resto de la varianza se distribuye entre poblaciones dentro de grupos y, por último dentro de poblaciones (Tabla 3).

Tabla 3. AMOVA para *Jenynsia multidentata* considerando tres agrupamientos respectivos a las regiones geográficas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	181.09	1.95 Va	42.9
Entre poblaciones dentro de grupos	7	139.03	1.72 Vb	37.93
Dentro de poblaciones	100	87.28	0.87 Vc	19.17

El test de Mantel arrojó como resultado un coeficiente de correlación $r=0.28$ ($P= 0.076$). Aunque se ha demostrado que existen localidades con gran divergencia, el resultado del Test de Mantel sugiere que aún no se ha alcanzado un equilibrio flujo-deriva genética (Figura 13).

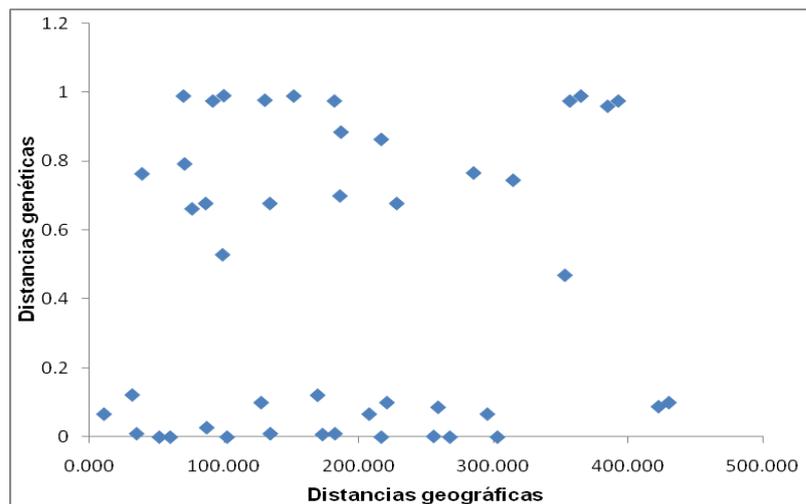


Figura 13. Relaciones entre las distancias genéticas y geográficas para las distintas poblaciones de *Jenynsia multidentata*.

Cnesterodon decemmaculatus

Variación genética

Se obtuvo un fragmento de 828 pares de bases (pb) perteneciente a la Región Control del ADN mitocondrial, a partir de 94 individuos (Tabla 4). Se identificaron 11 sitios polimórficos de los cuales 4 sitios fueron transiciones y siete fueron *indels*, los cuales se consideraron como un quinto carácter en los distintos análisis. Dichos sitios polimórficos definieron un total de 12 haplotipos.

Las poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus* presentaron dos haplotipos ampliamente distribuidos, el haplotipo 1, presente en siete poblaciones, siendo exclusivo en la población Chapadmalal. El haplotipo 4, se encontró en seis poblaciones, mientras que el haplotipo 3 estuvo presente en tres poblaciones. El resto de los haplotipos sólo se encontraron en una o dos poblaciones (Tabla 4, Figura 14 a).

Las poblaciones de las localidades Chapadmalal y Chocorí presentaron un único haplotipo. Quequén Grande, Cortaderas, Quequén Salado y Sauce Chico presentaron dos haplotipos. Mientras que, Claromecó presentó tres haplotipos, seguida por la población Sauce Grande con cuatro. Las poblaciones que presentaron mayor cantidad de haplotipos fueron El Moro y Saladillo con cinco. (Tabla 4, Figura 14 b).

Al analizar las regiones geográficas Tandilia presentó cinco haplotipos, Llanura Interserrana cuatro, y finalmente Ventania ocho de doce haplotipos. (Tabla 4, Figura 14c).

Se observó un valor alto de diversidad haplotípica (h) para el conjunto de muestras fue de 0,83 +/- 0,019 mientras que, la diversidad nucleotídica total (π) fue de 0,0038 +/- 0,002 (Tabla 4)

Tabla 4. Diversidad genética de *Cnesterodon decemmaculatus* en el Área Pampeana Austral. N= número de individuos. S= sitios polimórficos. Nhap= número de haplotipos. $h \pm SD$ = diversidad haplotípica. $\pi \pm SD$ = diversidad nucleotídica.

Localidad/Región	N	N hap	S	$h \pm DS$	$\pi \pm DS$
Chapadmalal	7	1	-	-	-
Chocorí	7	1	-	-	-
El Moro	10	5	7	0.844 ± 0.079	0.003 ± 0.002
Quequén Grande	12	2	1	0.530 ± 0.076	0.0006 ± 0.0006
Cortaderas	8	2	1	0.428 ± 0.168	0.0005 ± 0.0006
Claromecó	9	3	6	0.416 ± 0.190	0.002 ± 0.001
Quequén Salado	9	2	1	0.555 ± 0.090	0.0006 ± 0.0007
Sauce Grande	10	4	6	0.533 ± 0.180	0.002 ± 0.001
Saladillo	9	5	6	0.888 ± 0.071	0.0037 ± 0.002
Sauce Chico	13	2	5	0.153 ± 0.126	0.0009 ± 0.0008
Tandilia	24	5	7	0.695 ± 0.058	0.0024 ± 0.001
Llanura Interserrana	38	4	7	0.707 ± 0.041	0.0032 ± 0.002
Ventania	32	8	8	0.758 ± 0.059	0.0038 ± 0.002
Global	94	12	11	0.835 ± 0.019	0.0038 ± 0.002

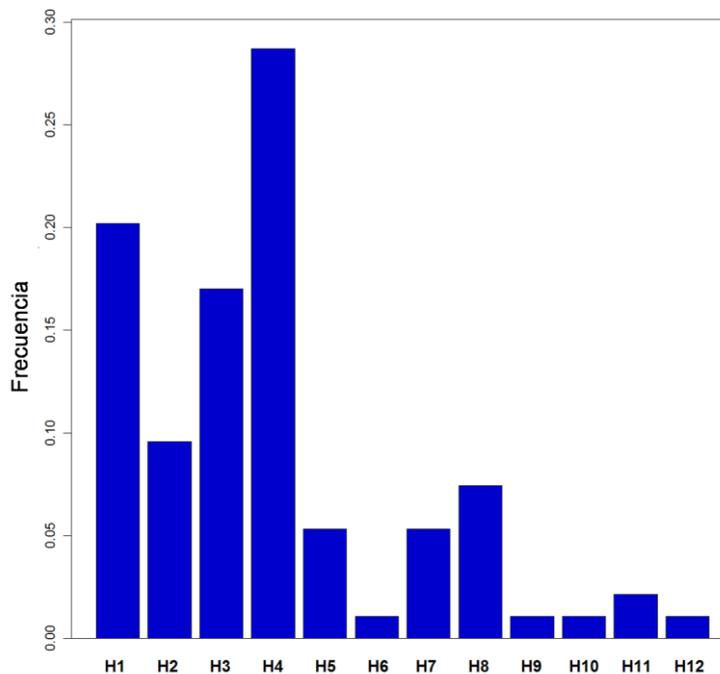


Figura 14 a. Frecuencia relativa de haplotipos en el Área Pampeana Austral para *Cnesterodon decemmaculatus*. H1-H12: haplotipos

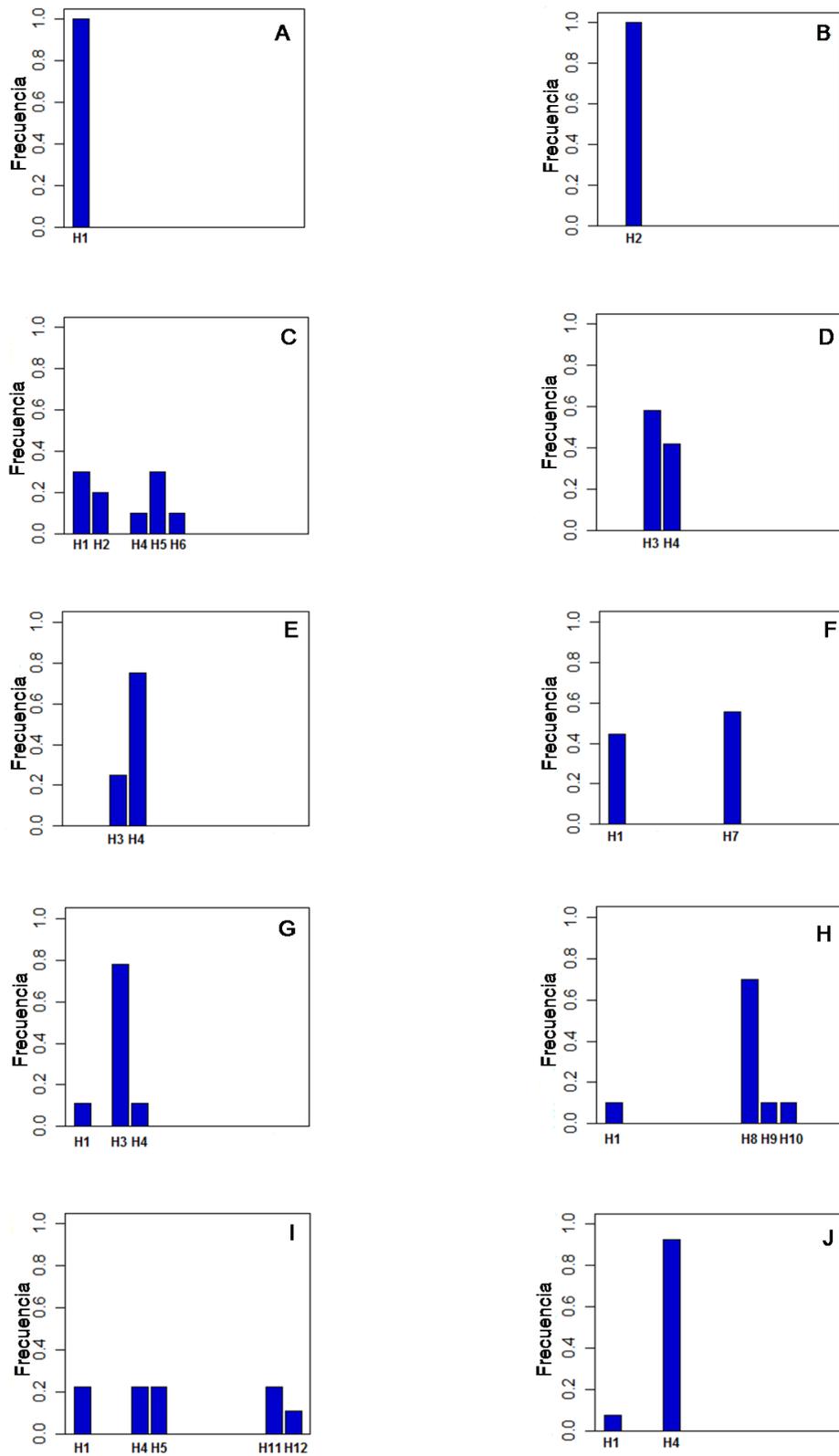


Figura 14 b. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas localidades para *Cnesterodon decemmaculatus* A: Chapadmalal. B: Chocorí. C: El Moro. D: Quequén Grande. E: Cortaderas. F: Claromecó. G: Quequén Salado. H: Sauce Grande. I: Saladillo. J: Sauce Chico. H1-H12: haplotipos.

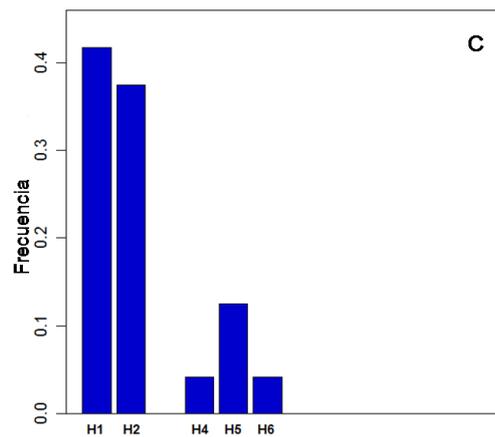
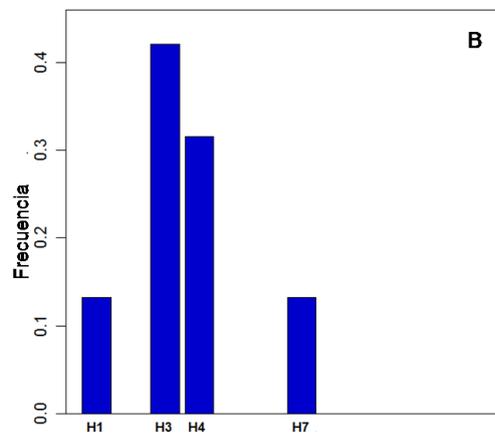
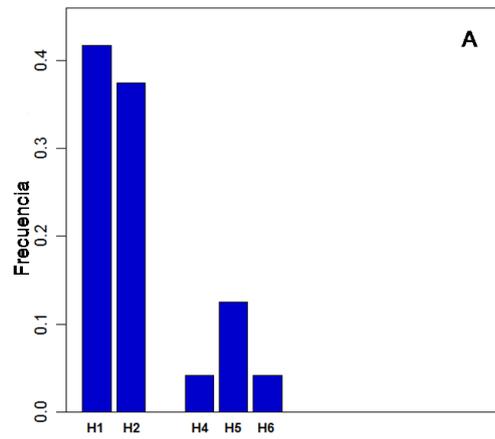


Figura 14 c. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas regiones geográficas para *Cnesterodon decemmaculatus*. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania. H1-H12: haplotipos.

Cuando se analizaron las poblaciones en forma individual, sólo las localidades El Moro y Saladillo presentaron valores altos de diversidad haplotípica, mientras que el resto presentó valores moderados. La diversidad nucleotídica fue baja en todos los casos (Tabla 4). Como se ha mencionado, dicho patrón podría estar reflejando un crecimiento demográfico repentino a partir de una población ancestral de tamaño pequeño. Este patrón sería concordante con un cuello de botella, o bien un efecto fundador con un crecimiento demográfico subsecuente.

A analizar los valores por regiones geográficas, los tres agrupamientos presentaron valores similares, siendo la diversidad haplotípica alta mientras que la diversidad nucleotídica fue baja (Tabla4).

Relaciones genealógicas entre los haplotipos

Los árboles correspondientes a los análisis de MP, ML, IB y NJ evidenciaron idénticas topologías (Figura 15). En los mismos se observaron dos grandes grupos.

En primer lugar se observa una politomía basal formada por los haplotipos 1, 2, 7 y 11 correspondientes a las poblaciones de las localidades Chapadmalal, Chocorí, El Moro, Claromecó, Quequén Salado, Sauce Grande, Saladillo y Sauce Chico. De este agrupamiento se separa el haplotipo 8 (Sauce Grande), aunque las relaciones dentro de este grupo tampoco pudieron ser resueltas.

Por último se destaca un clado/cluster formado nuevamente por dos grandes politomías. La más basal en el árbol, se encuentra formada por los haplotipos 4, 5, 6 y 12. La restante politomía contiene al haplotipo 3 (Quequén

Grande, Cortaderas, Claromecó). Los haplotipos 9 y 10 (Sauce Grande) formaron nuevamente un grupo separado. Si bien se observaron dos grupos diferenciados, los haplotipos de *Cnesterodon decemmaculatus*, se diferencian por escasos pasos mutacionales. Este patrón se evidencia en las topologías, donde en la mayoría de los casos, las secuencias se presentaron como politomías, sin poder resolver las relaciones entre dichos individuos.

La red de haplotipos describe dos grupos separados por apenas cuatro pasos mutacionales, que conecta los haplotipos 1 y 5. Cada uno de dichos grupos posee un haplotipo ampliamente distribuido (haplotipos 1 y 4), los cuales cubren el rango total de distribución de la especie dentro del área (Figura 16). Si bien se observa esta separación de los grupos, cuatro pasos mutacionales no serían suficientes para considerarlos linajes independientes.

A su vez, se evidenció una topología en forma de estrella, la cual sería consistente con un patrón de expansión demográfica. De hecho, podrían sugerirse dos eventos de expansión a partir de los haplotipos 1 y 5, donde un haplotipo central, se conecta a otros haplotipos por sólo un paso mutacional.

Por otro lado, se observa que el grupo que pertenece al haplotipo 1, no se encuentra presente en las localidades Quequén Grande y Cortaderas, mientras que el grupo perteneciente al haplotipo 5 no se encuentra presente en las localidades Chapadmalal, Chocorí y Quequén Salado. Si bien esta situación podría reflejar discontinuidad en el hábitat a lo largo de la historia de la especie en el área, también podría deberse a la falta de muestreo de dichos haplotipos en las áreas mencionadas.

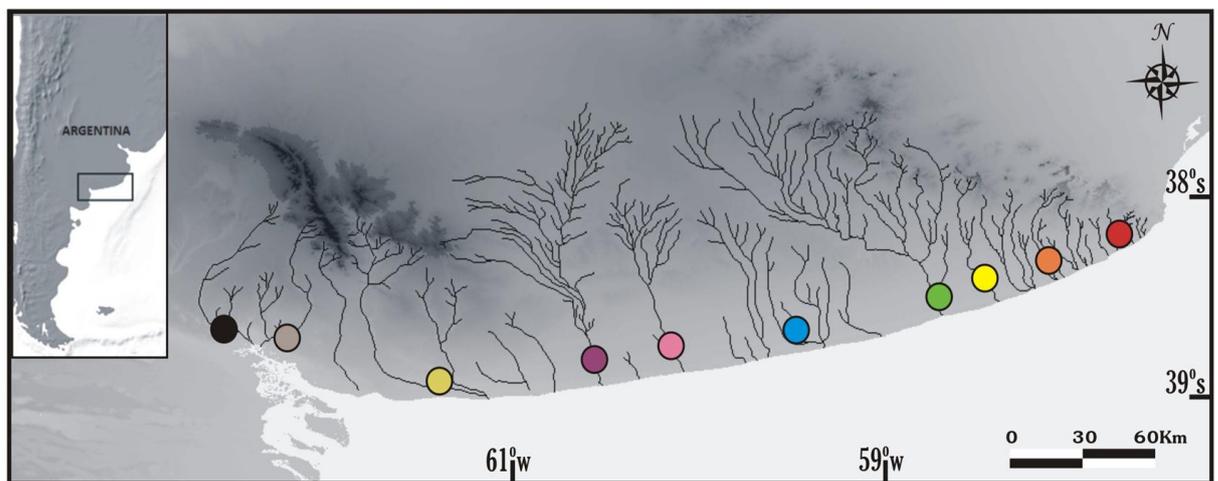
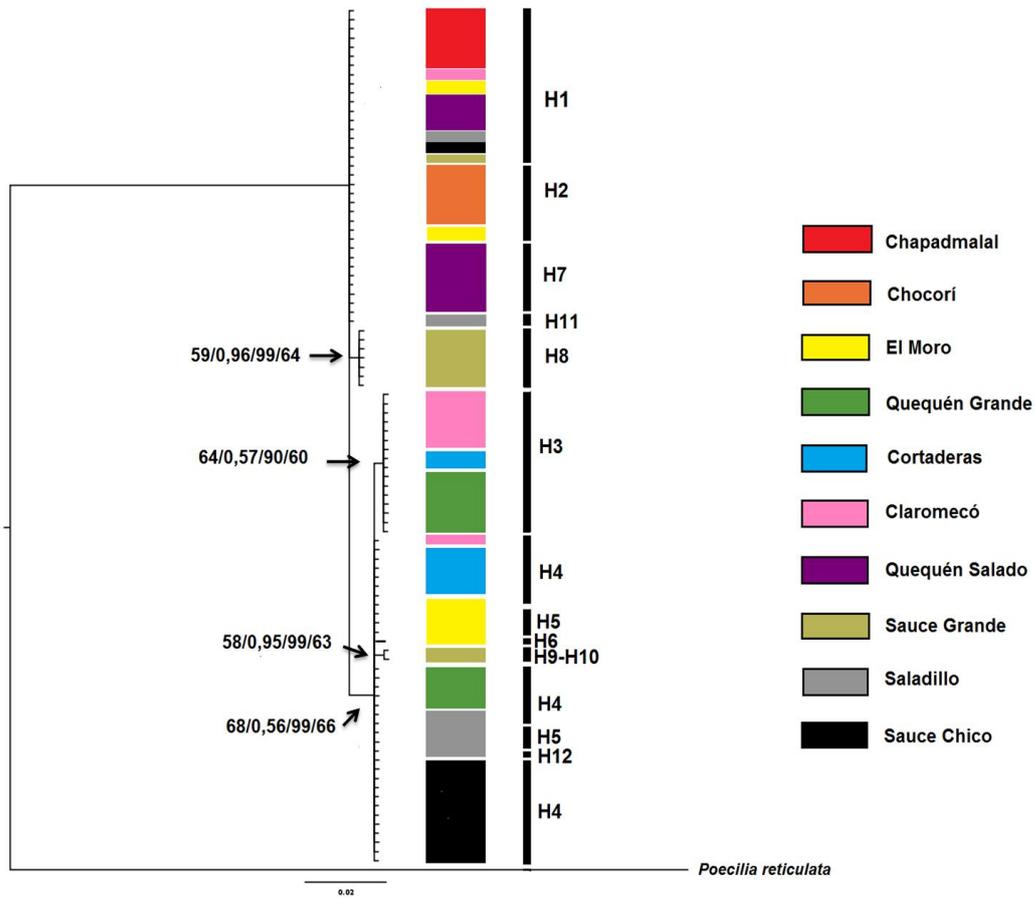


Figura 15. Árbol de consenso estricto a partir de la Región Control del ADN mitocondrial de *Cnesterodon decemmaculatus*. Los números sobre los nodos representan los valores de soporte de los análisis de MP, IB, ML y NJ respectivamente. H1-H12: haplotipos.

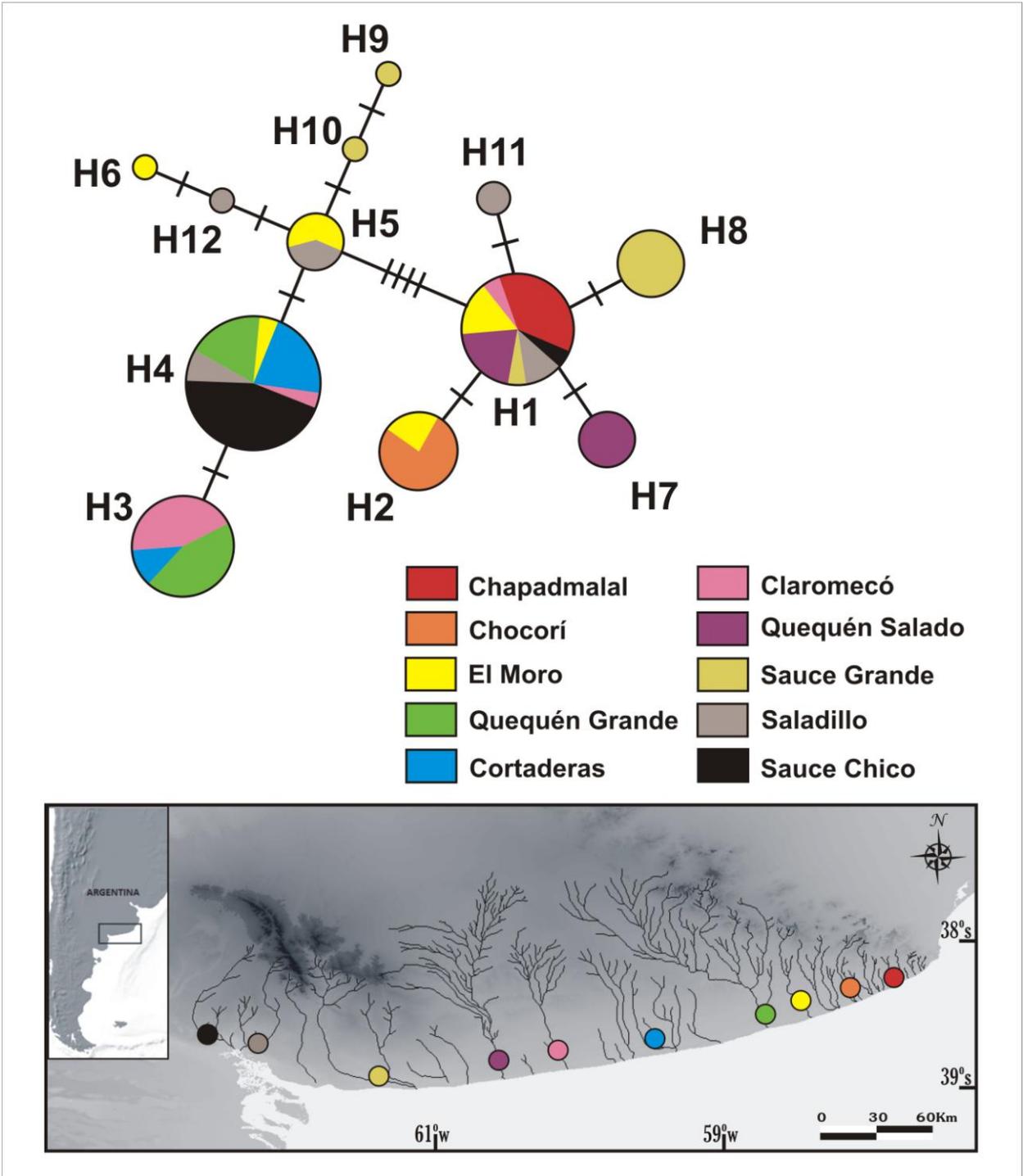


Figura 16. Red de haplotipos obtenida a partir de la Región Control de *Cnesterodon decemmaculatus*, mediante el algoritmo de Median Joining. Cada círculo representa un haplotipo, y el tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia en el total de las muestras. El largo de las líneas que conectan a los haplotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que los separan.

Demografía histórica

La *mismatch distribution* para el conjunto de muestras describió una curva claramente bimodal (Figura 17 a). Las pruebas de bondad de ajuste arrojaron valores bajos, aunque no fueron significativos (Tabla 5).

Las pruebas de neutralidad de Fu y Tajima fueron negativas aunque no significativas para el conjunto de muestras (Tabla 5).

En cuanto a los análisis por localidades, las poblaciones El Moro y Saladillo presentaron curvas bimodales (Tabla 4, Figura 17 b). El Moro obtuvo un valor negativo y no significativo de la prueba de Tajima, pero positivo y no significativo para la prueba de Fu. Saladillo por otro lado presentó valores positivos y no significativos en ambos test.

Para las poblaciones Quequén Grande, Cortaderas y Quequén Salado, se obtuvieron curvas unimodales en el análisis de *mismatch distribution*. En los tres casos las pruebas de bondad de ajuste fueron bajas aunque no significativas. En cuanto a las pruebas de neutralidad, ambos test fueron positivos y no significativos para las tres localidades (Tabla 5, Figura 17 b).

Las poblaciones de las localidades Claromecó, Sauce Grande y Saladillo presentaron curvas bimodales, aunque la segunda moda ocurre a una frecuencia de diferencias pareadas mucho menor que la primera. Este patrón se ajustaría a una población estable demográficamente, corroborado por los resultados obtenidos en las pruebas de neutralidad (Figura 17 b, Tabla 5).

Tabla 5. Demografía histórica de *Cnesterodon decemmaculatus* por localidades. D'_T = D de Tajima. Fs'_{FU} = Fs de Fu. r = Harpending's Raggedness index. SSD= Desvío de la suma de cuadrados. P = probabilidad < 0,05. – No estimado

Localidad/región	D_T	P (D_T sim<obs)	Fs_{FU}	P (Fs sim<obs)	SSD	SSD-P	rg	$rg-P$
Chapadmalal	-	-	-	-	-	-	-	-
Chocorí	-	-	-	-	-	-	-	-
El Moro	-1.400	0.082	0.390	0.576	0.042	0.39	0.093	0.527
Quequén Grande	1.381	0.956	1.152	0.662	0.029	0.160	0.284	0.166
Cortaderas	0.333	0.792	0.536	0.445	0.010	0.383	0.204	0.575
Claromecó	0.156	0.745	1.152	0.741	0.049	0.190	0.255	0.607
Quequén Salado	0.00	1.000	1.015	0.642	0.037	0.249	0.320	0.190
Sauce Grande	-1.111	0.196	0.387	0.574	0.372	0.000	0.164	1.000
Saladillo	0.986	0.908	0.126	0.503	0.072	0.170	0.160	0.381
Sauce Chico	0.000	1.000	1.907	0.779	0.034	0.069	0.763	0.748
Tandilia	-1.51	0.023	1.05	0.743	0.055	0.332	0.137	0.425
Llanura Interserrana	1.599	0.961	4.228	0.941	0.082	0.190	0.135	0.332
Ventania	0.388	0.721	0.382	0.607	0.068	0.091	0.124	0.142
Global	-5.558	0.328	-0.118	0.495	0.036	0.166	0.063	0.339

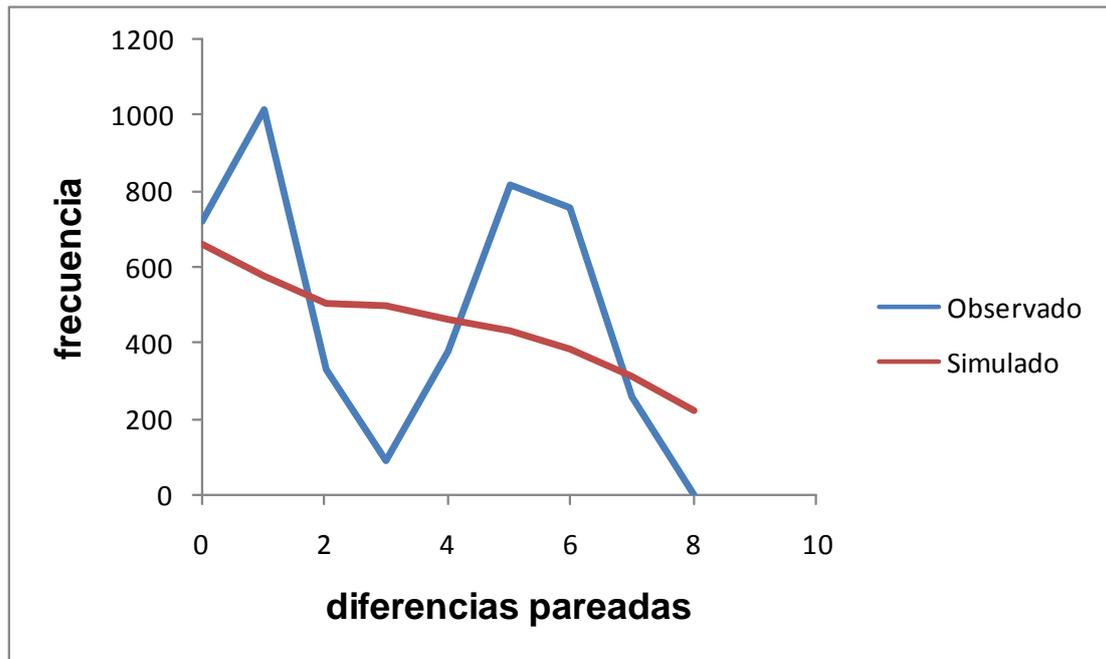


Figura 17 a. *Mismatch distribution* para el conjunto de muestras de *Cnesterodon decemmaculatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Los análisis aplicados a las regiones geográficas evidenciaron patrones semejantes para Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania. En los tres casos se observó una curva bimodal en la *Mismatch distribution* similar a la descrita para el total de las muestras.

Las pruebas de bondad de ajuste arrojaron valores bajos aunque no significativos. En tanto que sólo el test de Tajima fue negativo y significativo en la región Tandilia. No obstante no se llegó a dicho resultado con el test de Fu. Para las regiones Llanura Interserrana y Ventania ambos test resultaron ser positivos y no significativos (Figura 17 c, Tabla 5).

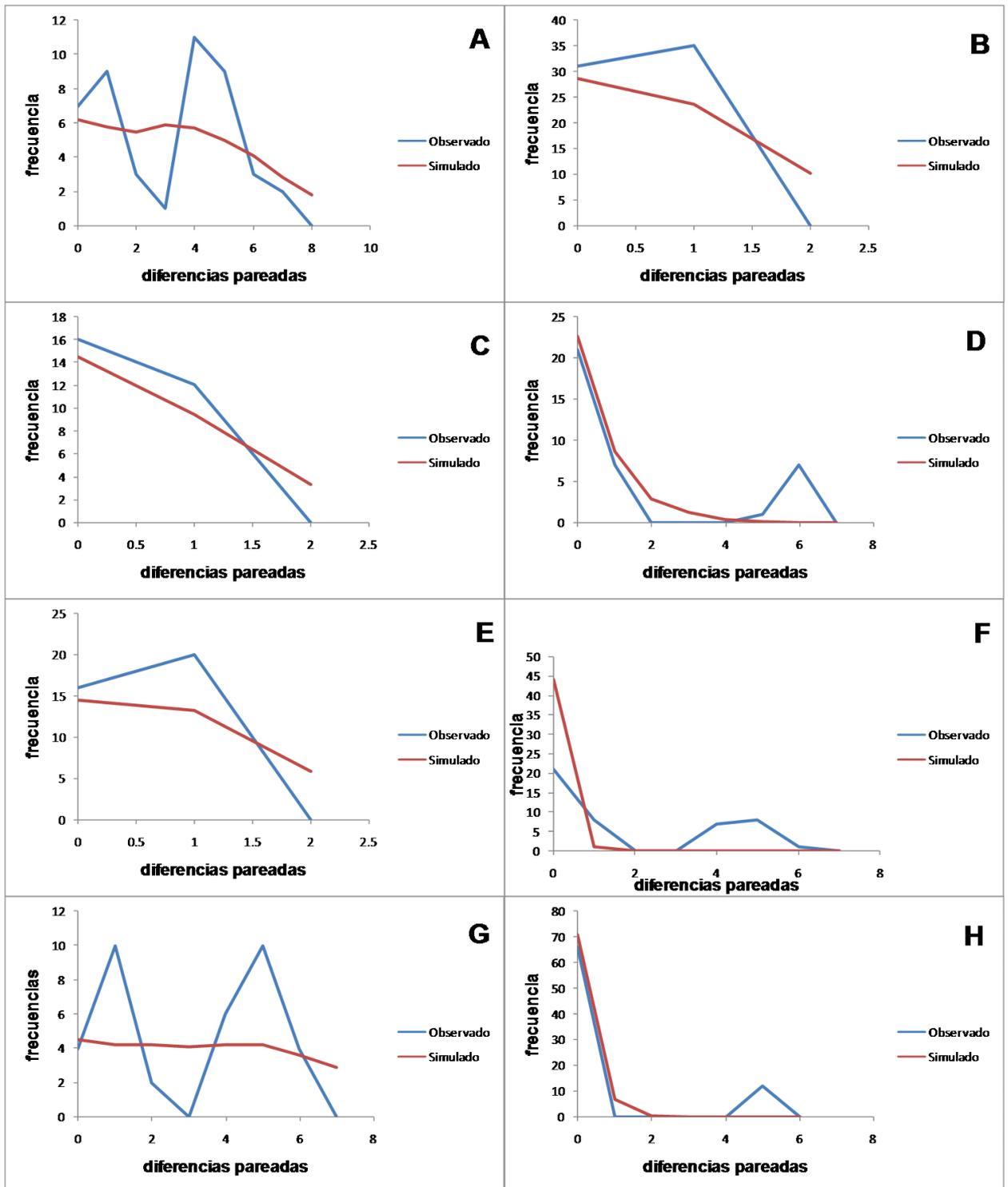


Figura 17 b. *Mismatch distribution* en las diferentes poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: El Moro. B: Quequén Grande. C: Cortaderas. D: Claromecó. E: Quequén Salado. F: Sauce Grande. G: Saladillo. H: Sauce Chico.

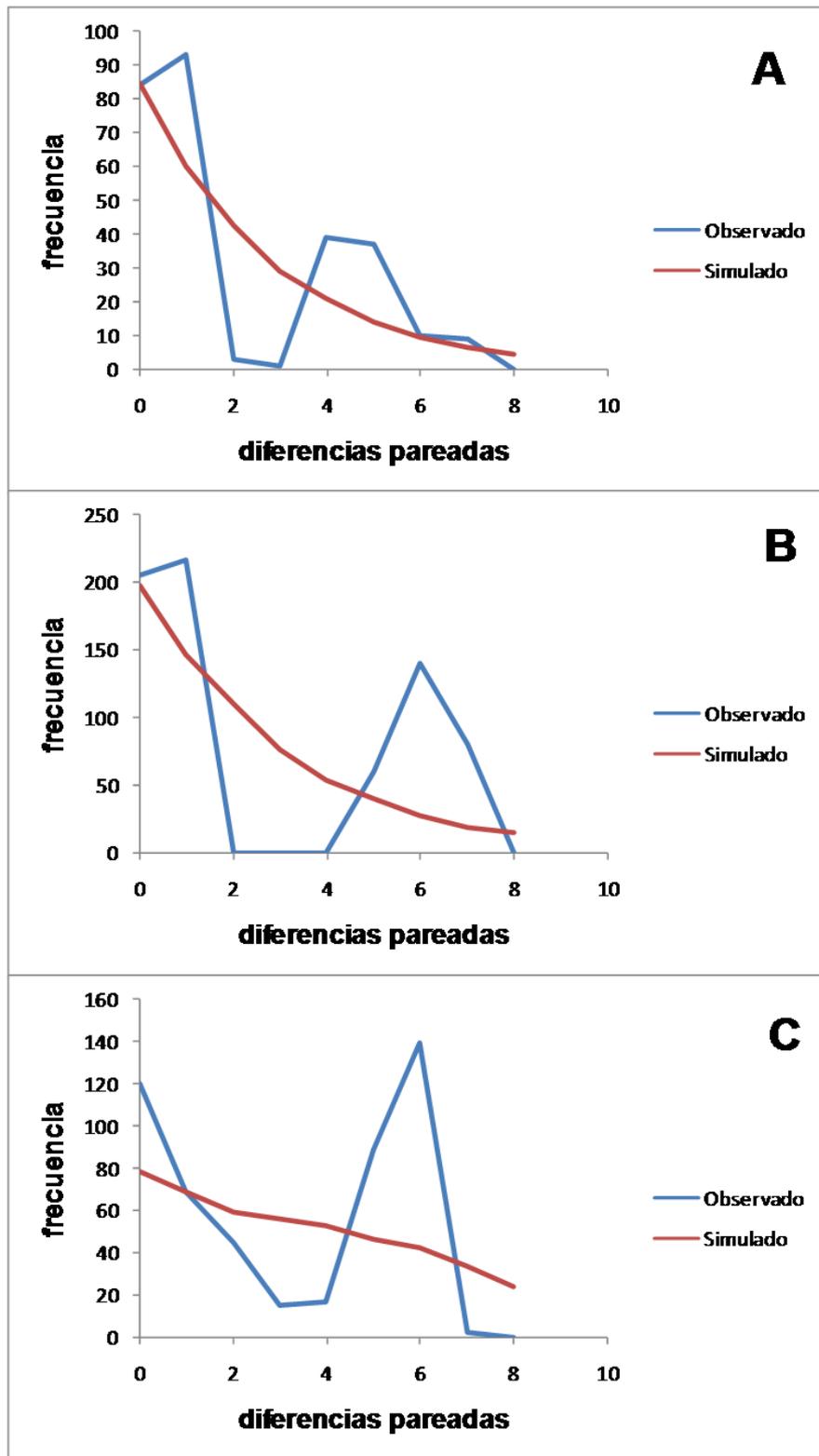


Figura 17 c. *Mismatch distribution* en las diferentes regiones geográficas de *Cnesterodon decemmaculatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania.

Estructura poblacional

Los valores de Φ_{ST} pareados tomados como una medida de distancias genéticas, muestran valores muy altos incluso en poblaciones que se ubican muy cercanas (Chapadmalal versus Chocorí) con valores de 1,00. Las poblaciones de las localidades Quequén Grande, Cortaderas, Claromecó y Saladillo demostraron ser las más divergentes con respecto a las poblaciones de Chapadmalal y Chocorí (Tandilia), y Sauce Grande (Ventania) con valores muy altos ($\pm 0,9$) y similares para dichas comparaciones. El resto de las distancias fueron moderadas a excepción de las poblaciones Quequén Grande versus Claromecó y El Moro versus Saladillo que presentaron los valores más bajos de divergencia (Figura 18 a).

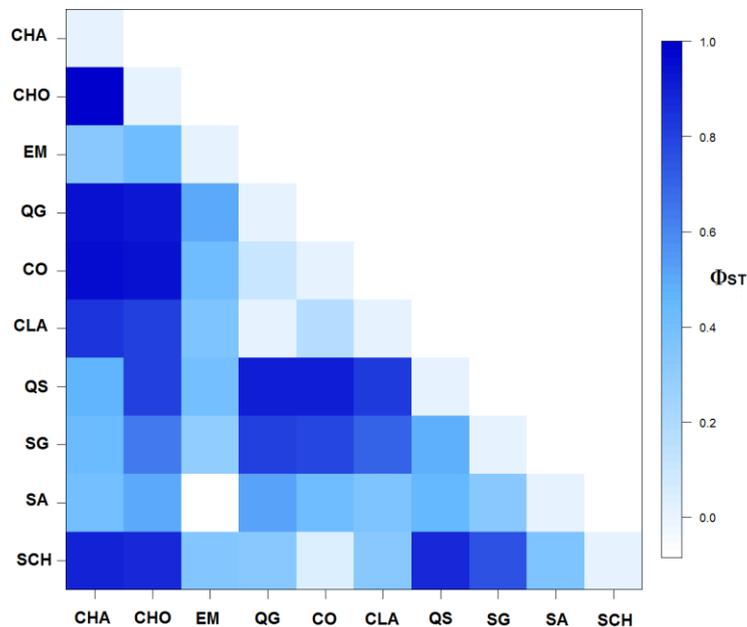


Figura 18 a. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para el conjunto de muestras calculado a partir de la Región Control de *Cnesterodon decemmaculatus*. CHA: Chapadmalal. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande. SA: Saladillo. SCH: Sauce Chico.

Al analizar los Φ_{ST} pareados por regiones geográficas, la mayor divergencia se observó entre Tandilia y la Llanura Interserrana Bonaerense con un valor de 0,35. El valor más bajo se obtuvo en Llanura Interserrana versus Ventania (Figura 18 b).

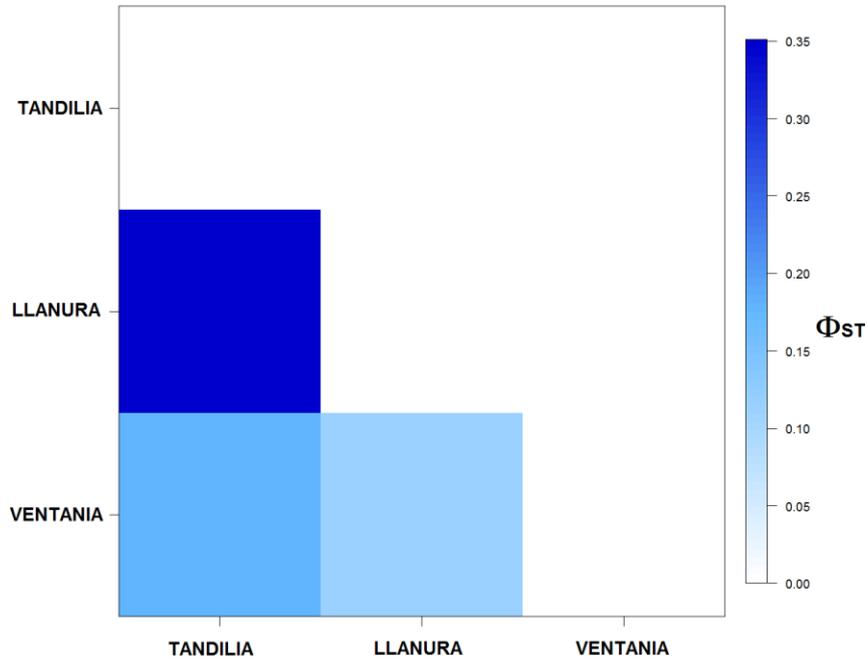


Figura 18 b. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para las distintas regiones geográficas calculado a partir de la Región Control de *Cnesterodon decemmaculatus*.

El AMOVA describió que la mayoría de la varianza molecular se encuentra entre poblaciones dentro de grupos, luego dentro de poblaciones, y por último dentro de grupos. El Φ_{ST} para el conjunto de muestras fue de 0,64. Dicho valor podría ser producto de la estructuración de las poblaciones en forma local, y no a una escala regional o grupal. Como se ha puesto de

manifiesto en los Φ_{ST} pareados, existe gran divergencia incluso en poblaciones que pertenecen al mismo agrupamiento (Tabla 6).

Tabla 6. AMOVA para *Cnesterodon decemmaculatus* considerando tres agrupamientos respectivos a las regiones geográficas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	25.19	0.069 Va	4.06
Entre poblaciones dentro de grupos	7	71.13	1.026 Vb	59.94
Dentro de poblaciones	84	51.8	0.616 Vc	36.00

El test de Mantel arrojó como resultado un coeficiente de correlación bajo y no significativo (-1,03 P=0,70) demostrando que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (Figura 19).

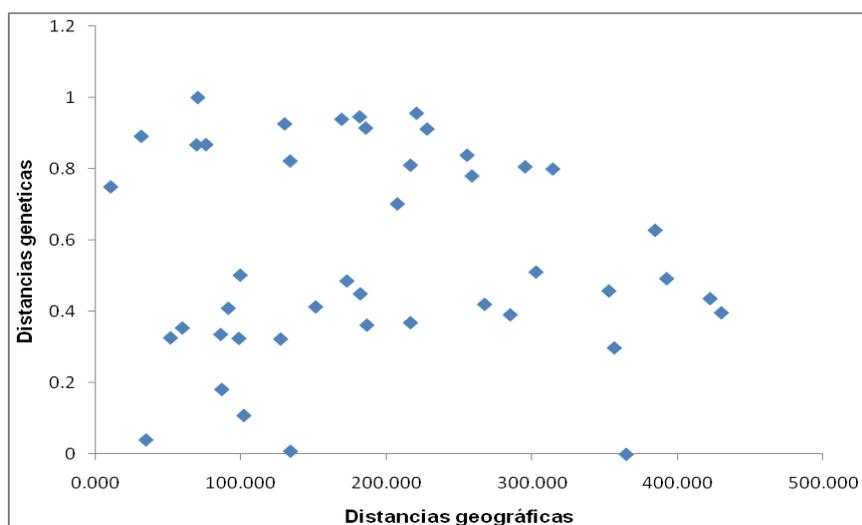


Figura 19. Relaciones entre las distancias genéticas y geográficas para las distintas poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Corydoras paleatus

Variación genética

Se obtuvo un fragmento de 923 pares de bases de la Región Control de *Corydoras paleatus* a partir de 72 individuos. Se observaron 36 sitios polimórficos de los cuales 27 fueron transiciones, dos transversiones y diez *indels*, definiendo un total 14 haplotipos (Tabla 7, Figura 20 a).

Se observó un haplotipo ampliamente distribuido (haplotipo 2) presentándose en todas las poblaciones a excepción de la población de la localidad Sauce Grande. Dicho haplotipo fue el único presente en las localidades El Durazno, Cortaderas y Quequén Grande. El haplotipo 3 se encontró en las poblaciones de las localidades Claromecó, Quequén Salado y Sauce Grande. El haplotipo 5 fue exclusivo de las poblaciones de las localidades Claromecó y Quequén Salado, mientras que el resto de los haplotipos sólo se encontraron en una localidad (Tabla 7, Figura 20 b).

Tabla 7. Diversidad genética de *Corydoras paleatus* en el Área Pampean Austral. N= número de individuos. S= sitios polimórficos. Nhap= número de haplotipos. $h \pm SD$ = diversidad haplotípica. $\pi \pm SD$ = diversidad nucleotídica

Localidad/Región	N	Nhap	S	$h \pm DS$	$\pi \pm DS$
El Durazno	9	1	-	-	-
Chocorí	9	3	2	0.416 ± 0.190	0.00048 ± 0.0005
El Moro	7	2	7	0.285 ± 0.196	0.002 ± 0.001
Quequén Grande	11	1	-	-	-
Cortaderas	8	1	-	-	-
Claromecó	9	5	27	0.805 ± 0.119	0.010 ± 0.006
Quequén Salado	10	4	22	0.777 ± 0.090	0.010 ± 0.005
Sauce Grande	9	6	7	0.833 ± 0.126	0.001 ± 0.001
Tandilia	25	4	9	0.230 ± 0.109	0.0007 ± 0.0006
Llanura Interserrana	38	6	29	0.581 ± 0.085	0.0061 ± 0.0033
Ventania	10	7	7	0.866 ± 0.107	0.001 ± 0.001
Global	72	14	36	0.579 ± 0.066	0.0048 ± 0.0026

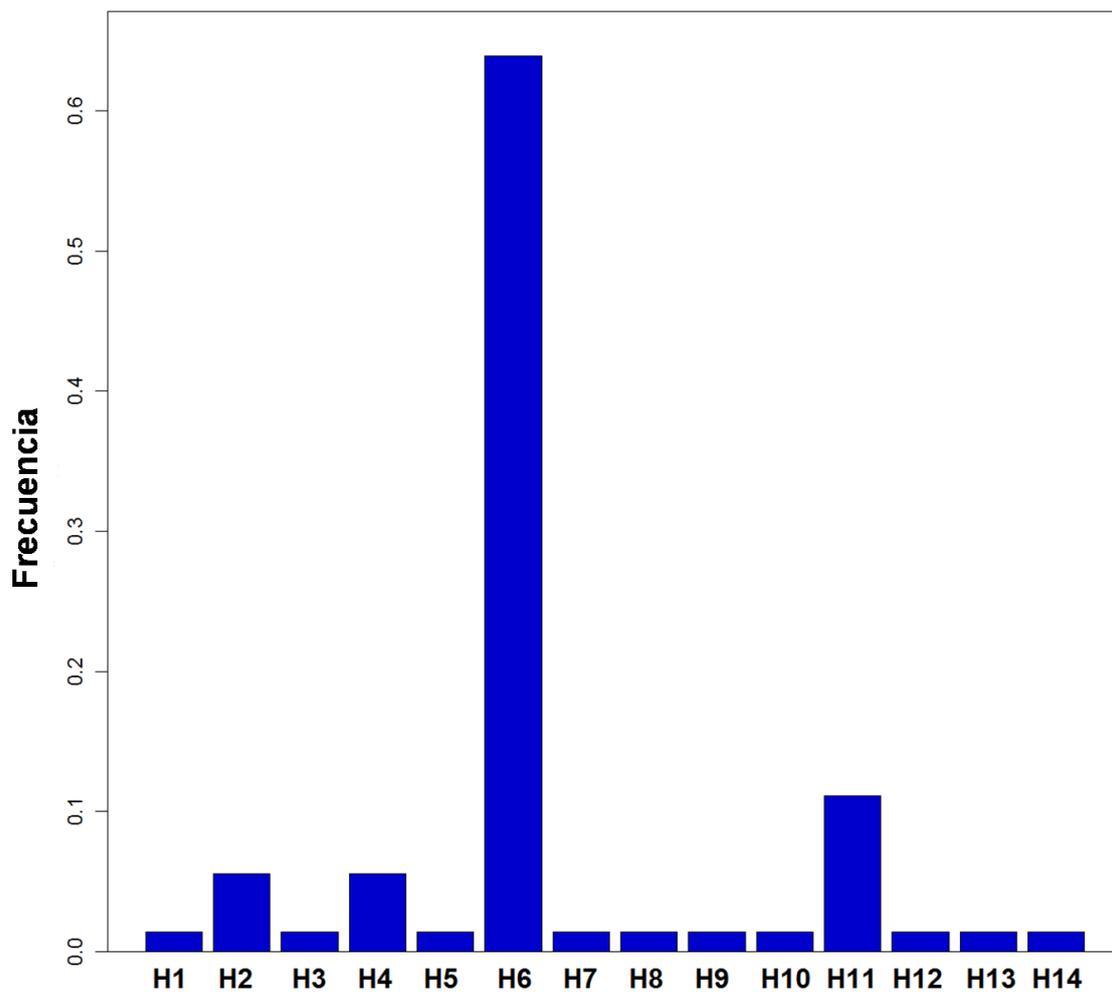


Figura 20 a. Frecuencia relativa de haplotipos en el Área Pampeana Austral para *Corydoras paleatus*. H1-H14: haplotipos

La población que presentó mayor cantidad de haplotipos fue Sauce Grande con seis. La población de la localidad Claromecó presentó cinco haplotipos, seguida por las poblaciones de Quequén Salado con cuatro, Chocorí con tres y finalmente El Moro con dos haplotipos (Tabla 7, Figura 20 b).

La diversidad haplotípica para el conjunto de muestras (Tabla 7) fue baja a moderada ($0,580 \pm 0,066$) al igual que la diversidad nucleotídica ($0,0048 \pm 0,0026$).

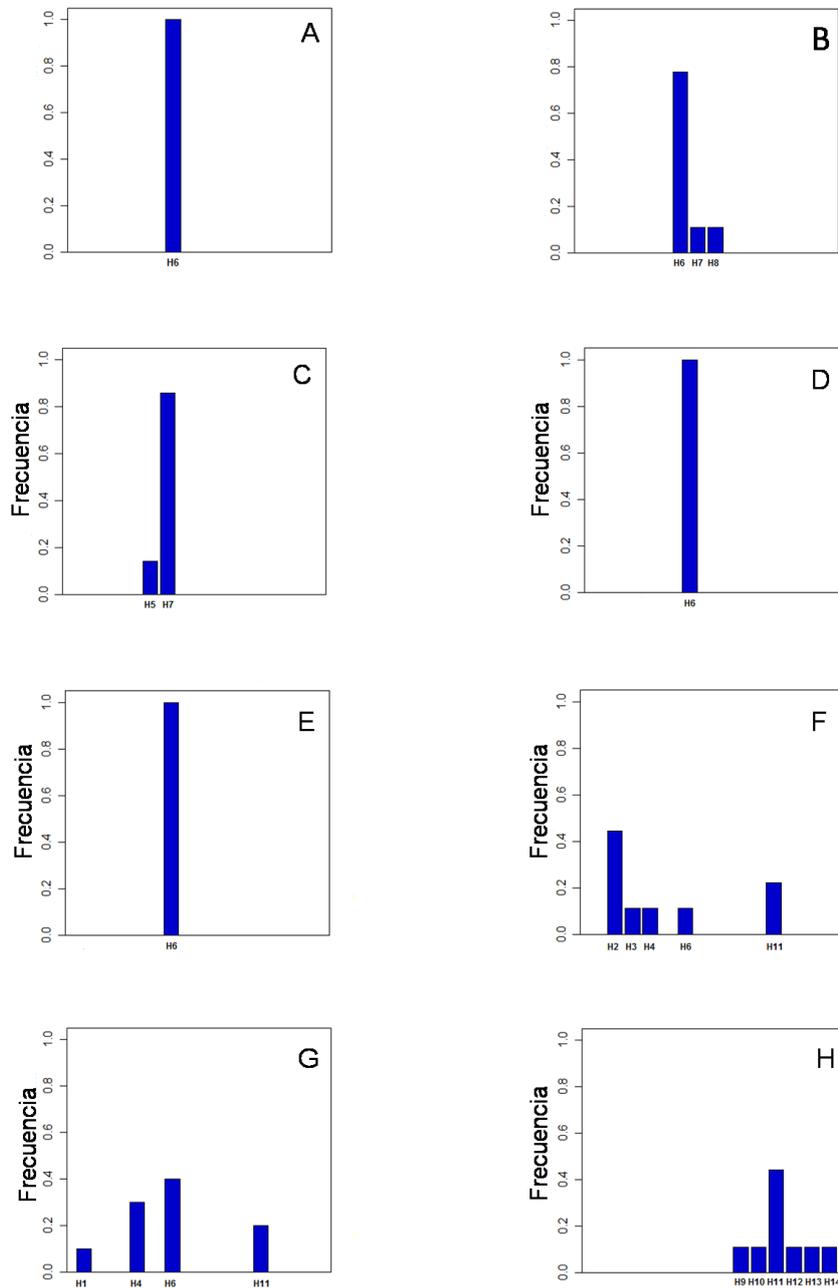


Figura 20 b. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas localidades para *Corydoras paleatus*. A: El Durazno. B: Chocorí. C: El Moro. D: Quequén Grande. E: Cortaderas. F: Claromecó. G: Quequén Salado. H: Sauce Grande. H1-H14: haplotipos.

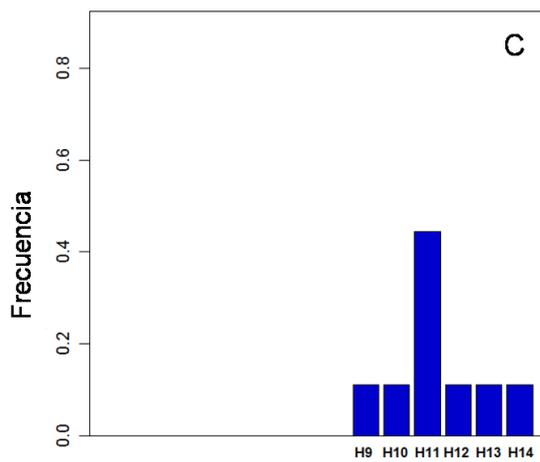
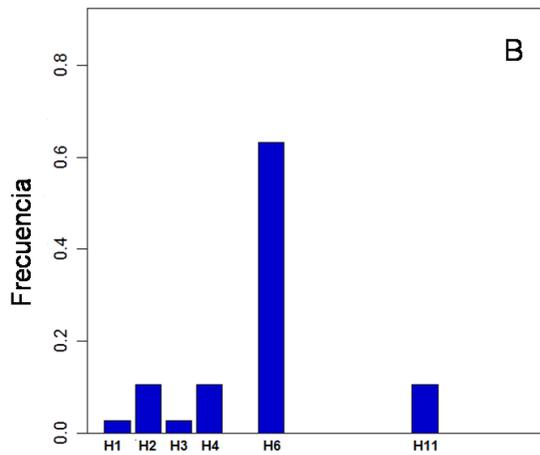
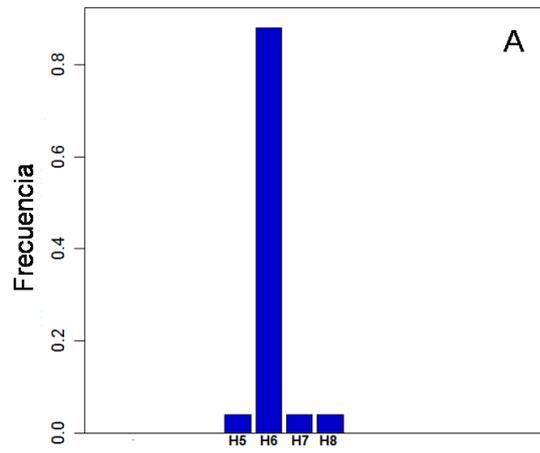


Figura 20 c. Frecuencia relativa de haplotipos en las distintas regiones geográficas para *Corydoras paleatus*. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania. H1-H14: haplotipos

En cuanto al análisis en las distintas localidades, Claromecó y Quequén Salado presentaron altos valores en la diversidad haplotípica. Si bien los valores de diversidad nucleotídica son bajos, representan los valores más altos en estas poblaciones. La población Sauce Grande registró un valor alto en la diversidad haplotípica, no así en la diversidad nucleotídica siendo este patrón consistente con un proceso de expansión demográfica. Las poblaciones de las localidades El Moro y Chocorí presentaron valores bajos de diversidad genética (Tabla 7).

Al analizar las regiones geográficas, Tandilia presentó los valores más bajos de diversidad genética, mientras que en la Llanura Interserrana Bonaerense se observaron valores moderados. Con respecto a Ventania, cabe aclarar que dicha región sólo se compone por la población de la localidad Sauce Grande. Como se mencionó, dicha localidad fue considerada el límite austral para *Corydoras paleatus* en el presente trabajo (Tabla 7, Figura 20 c).

Relaciones genealógicas entre los haplotipos

Tanto los métodos evolutivos (MP, IB, ML) como el método basado en distancias genéticas (NJ), evidenciaron las mismas topologías (Figura 21).

En la primer bifurcación el árbol muestra una politomía formada por individuos que corresponden a los haplotipos 1 (Quequén Salado), 2 (Claromecó) y 5 (El Moro). Este agrupamiento presentó altos valores de soporte. La restante bifurcación contiene una politomía la cual incluye el haplotipo 6 (el más ampliamente distribuido) y 7 (Chocorí), aunque con un valor de soporte relativamente bajo.

A partir de esta politomía, se diferencia un clado/cluster con una clara

bifurcación. Dentro de dicho clado/cluster se forma un agrupamiento dado por lo haplotipos 3 (Claromecó) y 4 (Quequén Salado). El haplotipo 3 parece ser basal en dicho agrupamiento. Por último, se formó un agrupamiento el cual contiene los haplotipos 8 a 14 pertenecientes a las localidades Quequén Salado, Claromecó y Sauce Grande. Estos agrupamientos presentaron altos valores de soporte.

En la red de haplotipos (Figura 22) se observa un linaje comprendido por un haplotipo ampliamente distribuido (H6). Dicho haplotipo se conecta por un lado con un haplogrupo conformado por las localidades Chocorí, Sauce Grande y Claromecó. Por otro lado se conecta con un segundo haplogrupo constituido por las poblaciones Claromecó, Quequén Salado y El Moro. El linaje mencionado, se conecta por un lado con el haplotipo cuatro (Quequén Salado y Claromecó) y por otro lado con el haplotipo 3 (Claromecó). Estos haplotipos difieren por numerosos pasos mutacionales de los restantes. Si bien ocupan una posición distante en la red, se conectan a la misma a partir de haplotipos intermedios, es decir, al no existir una conexión directa de dichos haplotipos, el algoritmo intenta unirlos en la red formando nodos hipotéticos o “haplotipos intermedios”. Dicha situación evidenciaría que podría tratarse de linajes independientes.

Por último, las relaciones evidenciadas en la red ponen de manifiesto una marcada estructura genético poblacional en las poblaciones Sauce Grande, Claromecó y Quequén Salado.

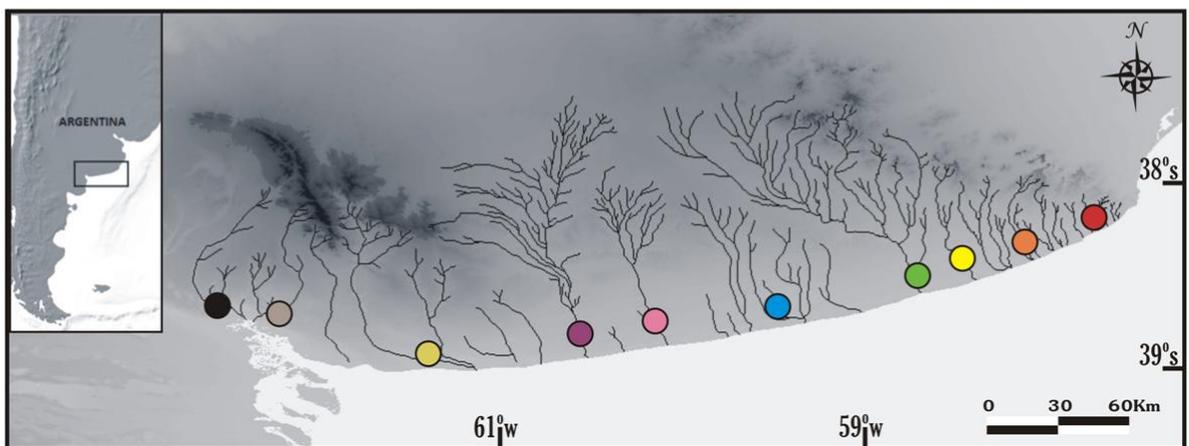
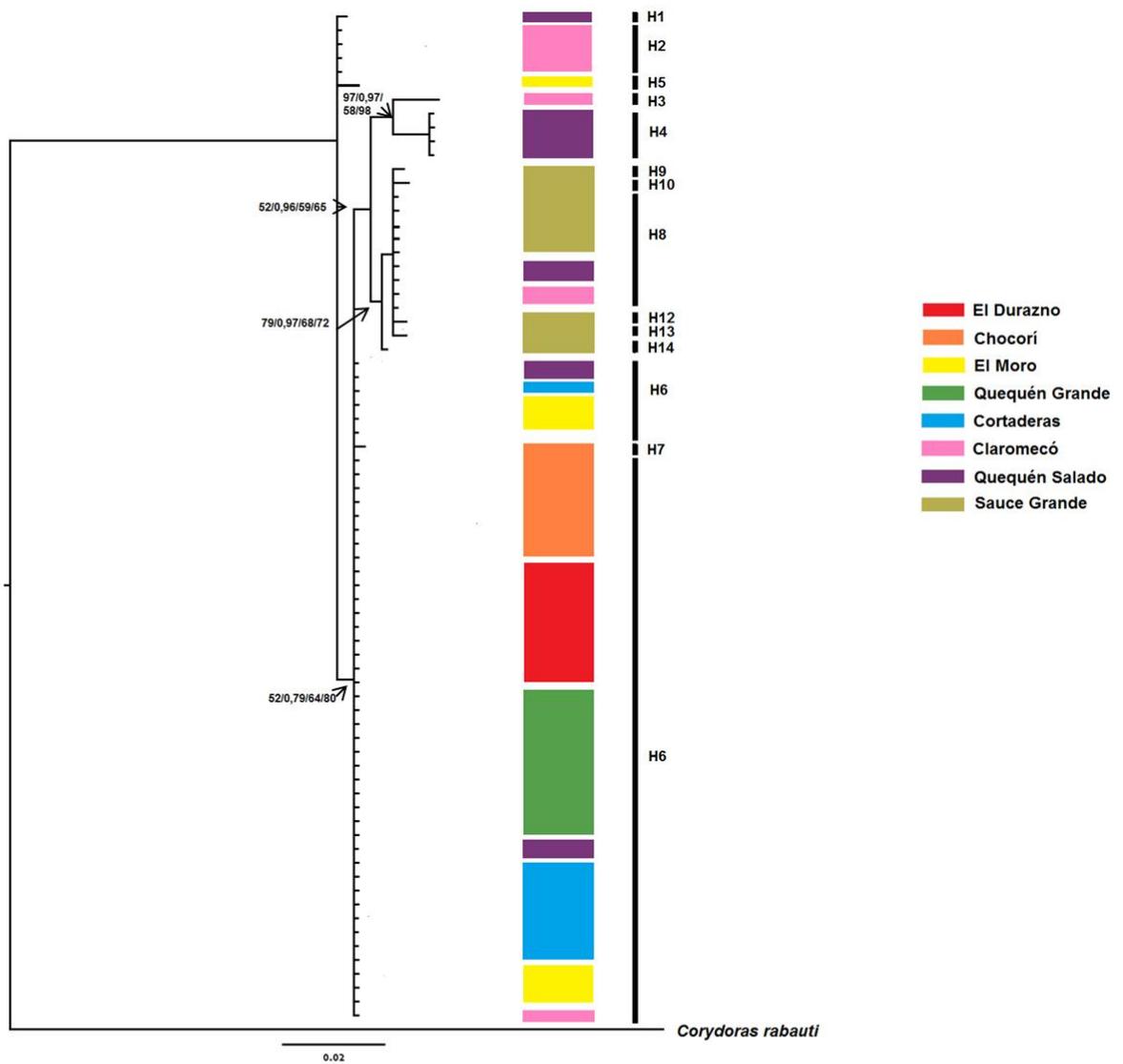


Figura 21. Árbol de consenso estricto a partir de la Región Control del ADN mitocondrial de *Corydoras paleatus*. Los números sobre los nodos representan los valores de soporte de los análisis de MP, IB, ML y NJ respectivamente. H1-H14: haplotipos.

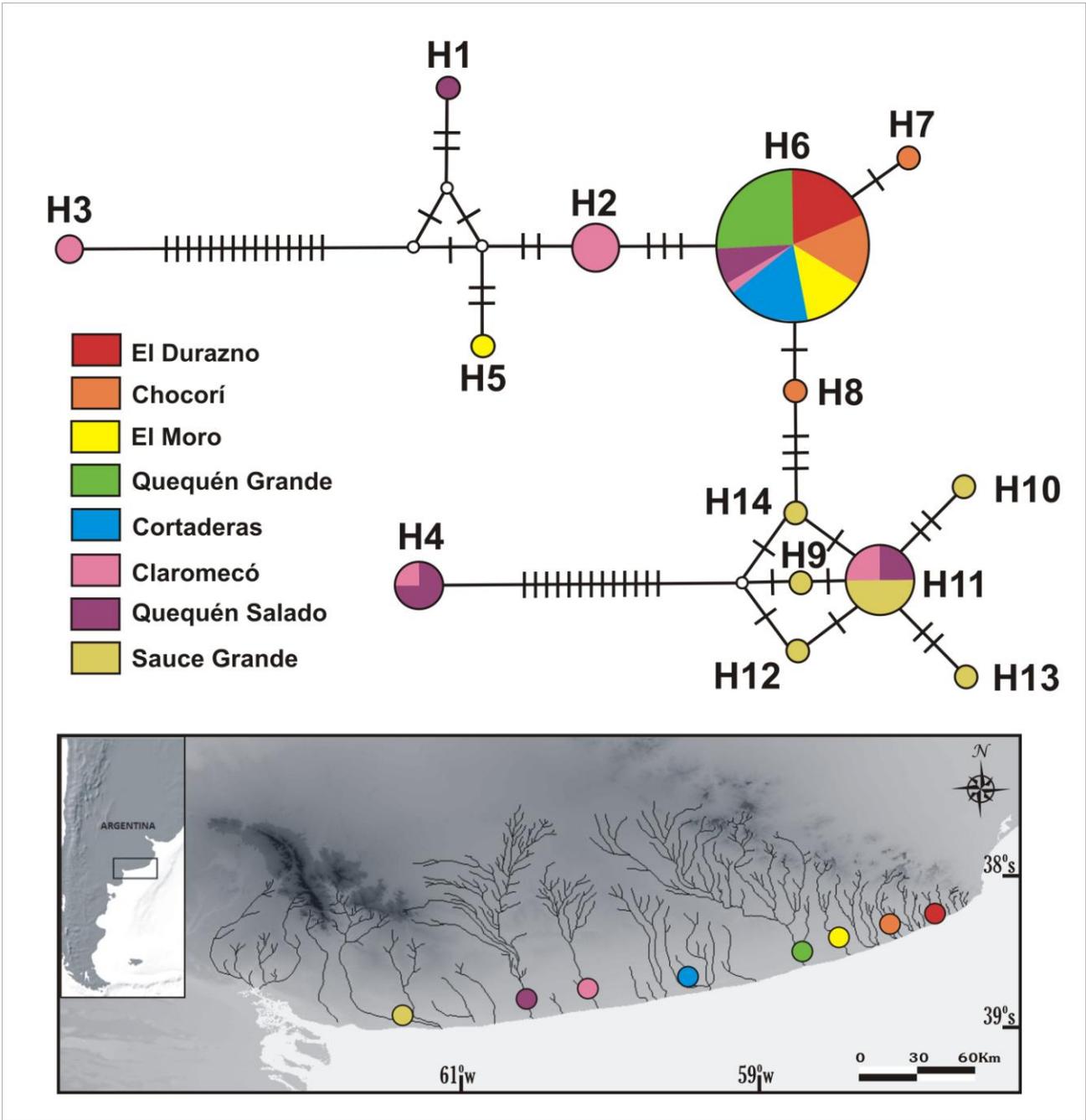


Figura 22. Red de haplotipos obtenida a partir de la Región Control de *Corydoras paleatus*, mediante el algoritmo de Median Joining. Cada círculo representa un haplotipo, y el tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia en el total de las muestras. El largo de las líneas que conectan a los haplotipos es proporcional al número de pasos mutacionales que los separan.

Demografía histórica

El análisis de la *mismatch distribution* para el conjunto de poblaciones puso de manifiesto una curva errática la cual no se ajusta al modelo esperado de expansión poblacional repentina (Figura 23 a). Este resultado podría sugerir un tamaño poblacional constante, o bien subdivisión poblacional por un largo periodo de tiempo, reflejando en definitiva, un alto grado de estructura genética poblacional.

El análisis de *Mismatch distribution* de forma local, reveló una curva unimodal para las poblaciones Chocorí y Sauce Grande. Ambas poblaciones obtuvieron resultados negativos para las pruebas de neutralidad, sin embargo sólo fueron significativas para la población Sauce Grande (Figura 23 b. Tabla 8).

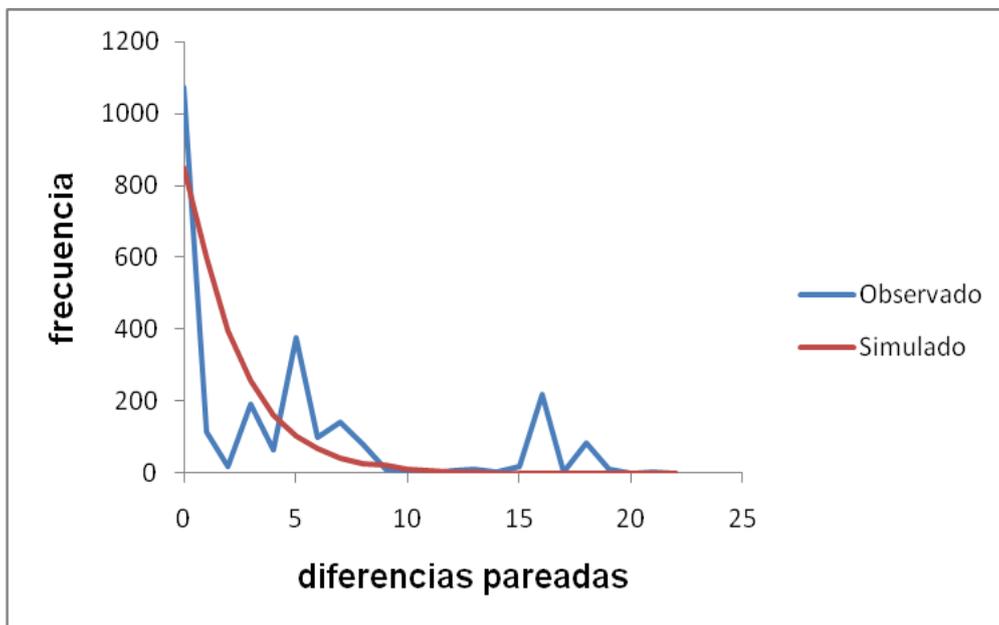


Figura 23 a. *Mismatch distribution* para el conjunto de muestras de *Corydoras paleatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Tabla 8. Demografía histórica de *Corydoras paleatus*. D_T = D de Tajima. F_s ' F_u = F_s de Fu. r = Harpending's Raggedness index. SSD= Desvío de la suma de cuadrados. P = probabilidad < 0,05. – No estimado

Localidad/región	D_T	P (D_T sim<obs)	F_s F_u	P (F_s sim<obs)	SSD	SSD-P	rg-P	rg-P
El Durazno	-	-	-	-	-	-	-	-
Chocorí	-1.088	0.182	-1.081	0.037	0.0086	0.686	0.168	0.844
El Moro	-1.434	0.055	3.295	0.937	0.115	0.023	0.673	0.644
Quequén Grande	-	-	-	-	-	-	-	-
Cortaderas	-	-	-	-	-	-	-	-
Claromecó	-0.573	0.301	2.960	0.906	0.127	0.033	0.295	0.047
Quequén Salado	0.684	0.792	5.468	0.987	0.196	0.110	0.461	0.003
Sauce Grande	-1.766	0.020	-2.871	0.008	0.004	0.872	0.067	0.794
Tandilia	-1.999	0.004	-0.539	0.292	0.0072	0.336	0.418	0.574
Llanura Interserrana	-1.012	0.158	5.771	0.969	0.129	0.115	0.322	0.087
Ventania	-1.766	0.017	-2.871	0.006	0.004	0.842	0.0679	0.761
Global	-1.540	0.034	-0.281	0.500	0.081	0.190	0.192	0.216

La población El Moro presentó una curva bimodal, con la segunda moda distante y mucho menor que la primera. Por otro lado sólo se detectó un valor negativo en la prueba de Tajima aunque no significativo, mientras que la prueba de F_u fue positiva y no significativa (Figura 23 b, Tabla 8).

Las poblaciones Claromecó y Quequén Salado describieron curvas erráticas y multimodales consistentes con un patrón de estabilidad demográfica, corroborado a su vez en los análisis de las pruebas de neutralidad (Figura 23 b, Tabla 8).

En cuanto a los análisis en forma regional, Tandilia exhibió una curva errática, sustentando un patrón de estabilidad demográfica. Las pruebas de neutralidad fueron opuestas, la D de Tajima fue negativa y significativa mientras que la prueba de F_u fue positiva y no significativa (Figura 23 c, Tabla 8).

La región Llanura Interserrana Bonaerense demostró una curva multimodal y errática. Las pruebas de neutralidad fueron no significativas, aunque la D de Tajima fue negativa en contraposición a la F_s de F_u que resultó positiva.

Como se ha mencionado, los resultados de la región Ventania son los obtenidos en la localidad Sauce Grande (Figura 23 c, Tabla 8).

Estructura poblacional

La diferenciación genética entre pares de poblaciones medida como Φ_{ST} pareados evidenció que los valores más altos y significativos ($\pm 0,6$) están representados por las poblaciones Sauce Grande y Claromecó vs. El Durazno, El Moro, Quequén Grande y Cortaderas.

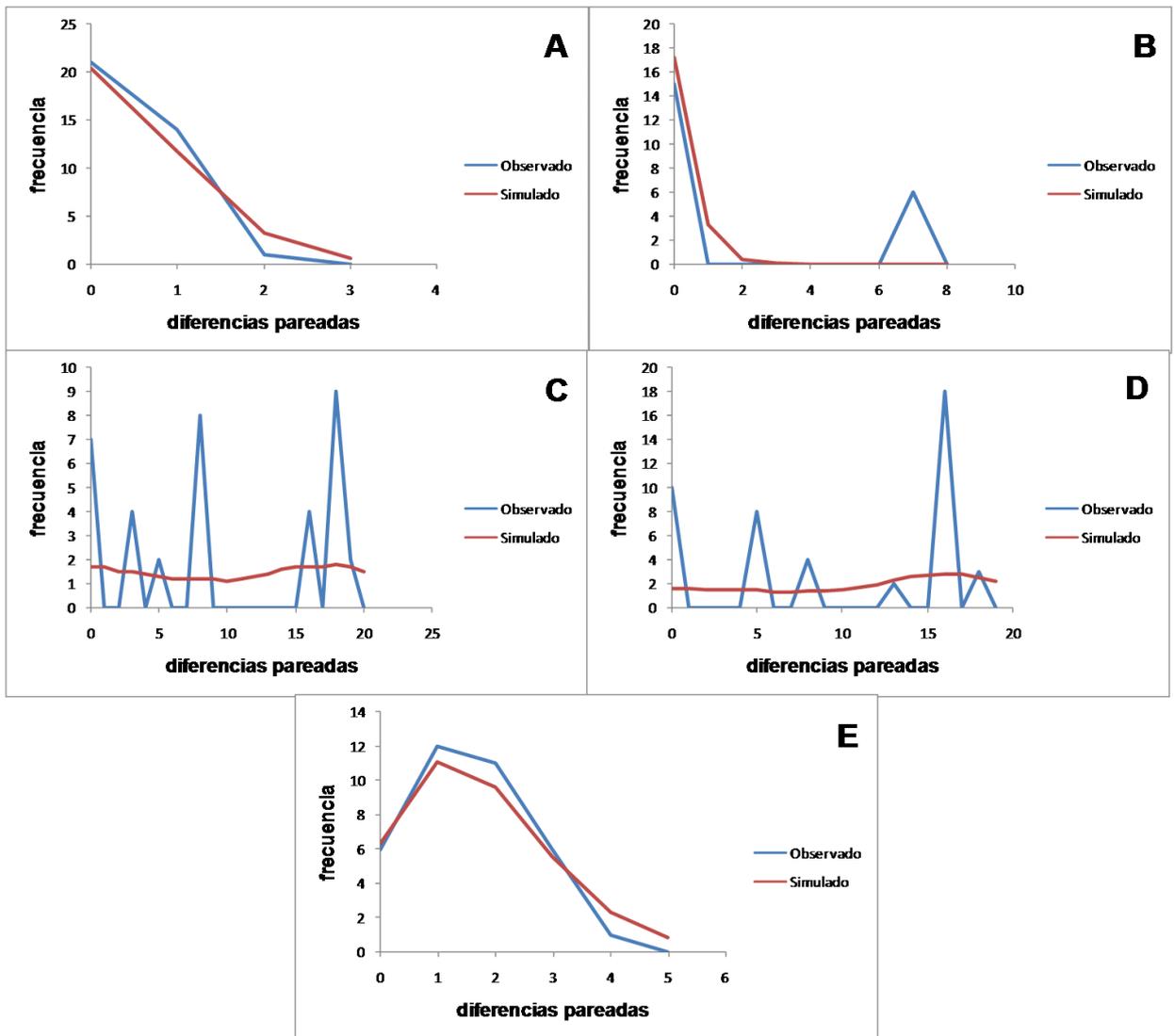


Figura 23 b. *Mismatch distribution* en las diferentes poblaciones de *Corydoras paleatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: Chocorí. B: El Moro. C: Claromecó. D: Quequén Salado. E: Sauce Grande.

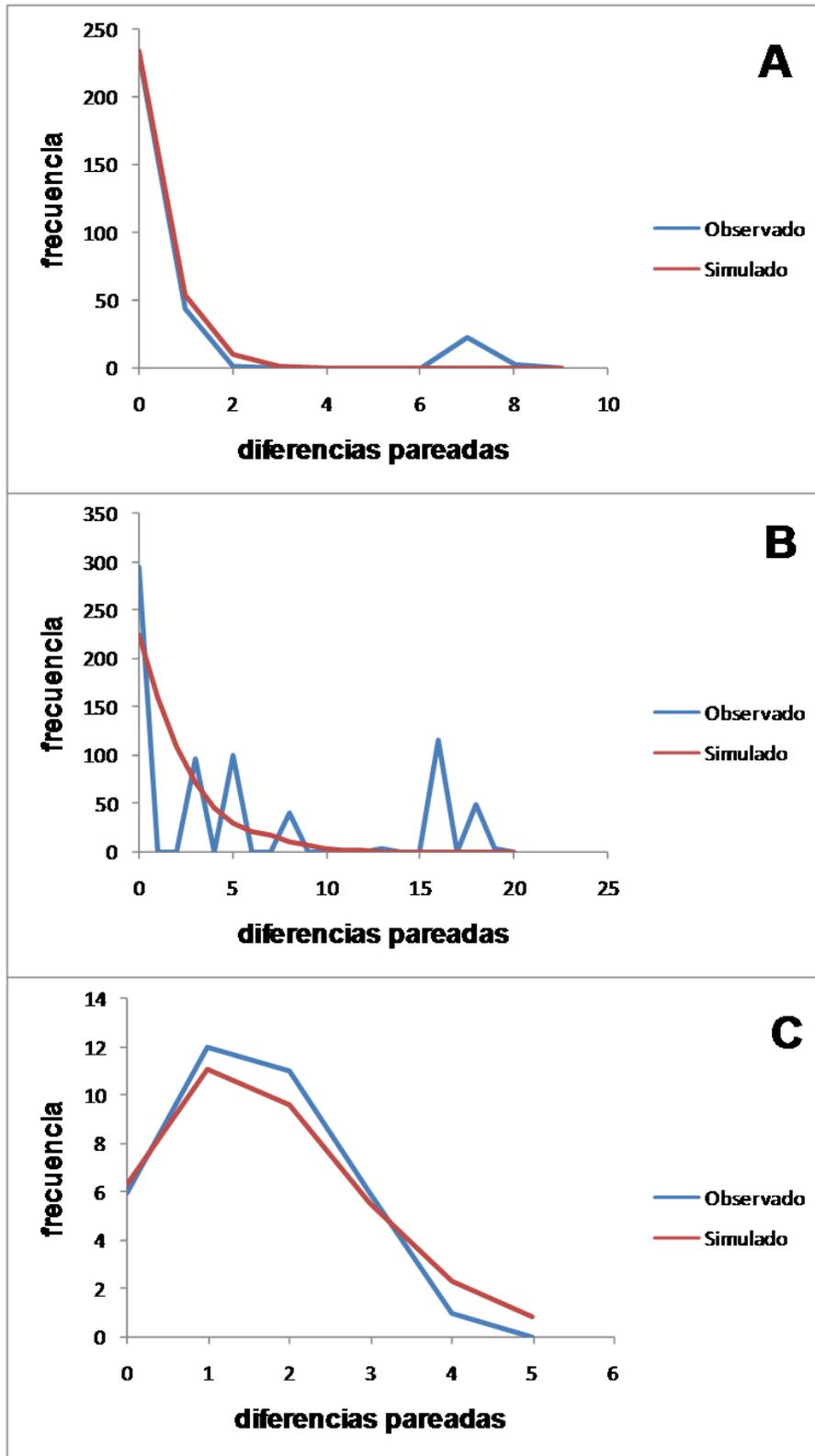


Figura 23 c. Mismatch distribution en las diferentes regiones geográficas de *Corydoras paleatus*. Línea azul: distribución observada. Línea roja: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. A: Tandilia. B: Llanura Interserrana Bonaerense. C: Ventania.

Los valores más bajos se registraron en la localidad El Durazno vs. Quequén Grande y Cortaderas, así como en Cortaderas vs. Quequén Grande. El resto de las comparaciones resultaron en valores medios a bajos (Figura 24 a).

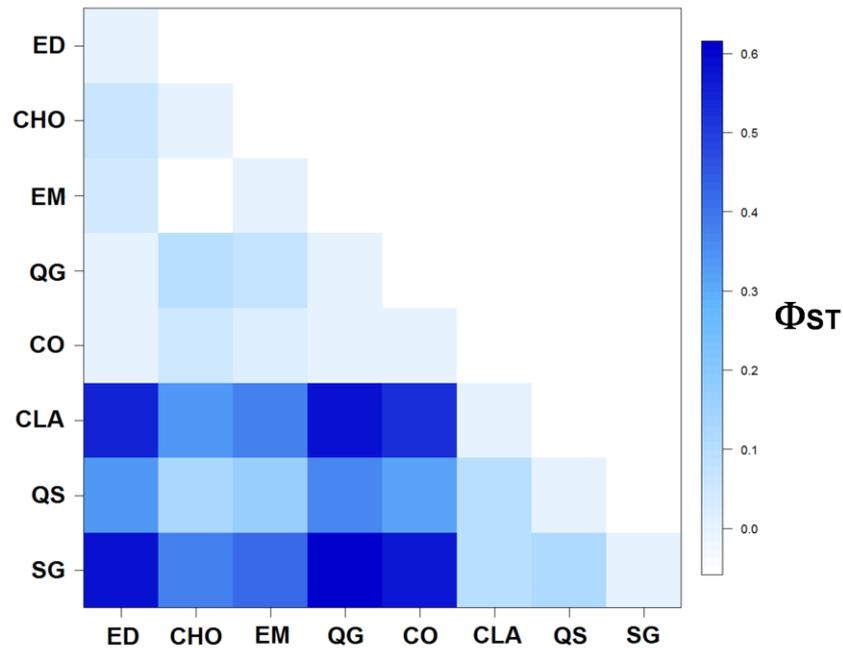


Figura 24 a. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para el conjunto de muestras calculado a partir de la Región Control de *Corydoras paleatus*. ED: El Durazno. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande.

El análisis considerando las distintas regiones geográficas evidenció que la mayor divergencia se encuentra entre Ventania y Tandilia (Figura 24 b).

El valor del índice de fijación Φ_{ST} para el conjunto de poblaciones fue de 0,38 ($P < 0,001$). Este valor indicaría un significativo grado de estructura poblacional.

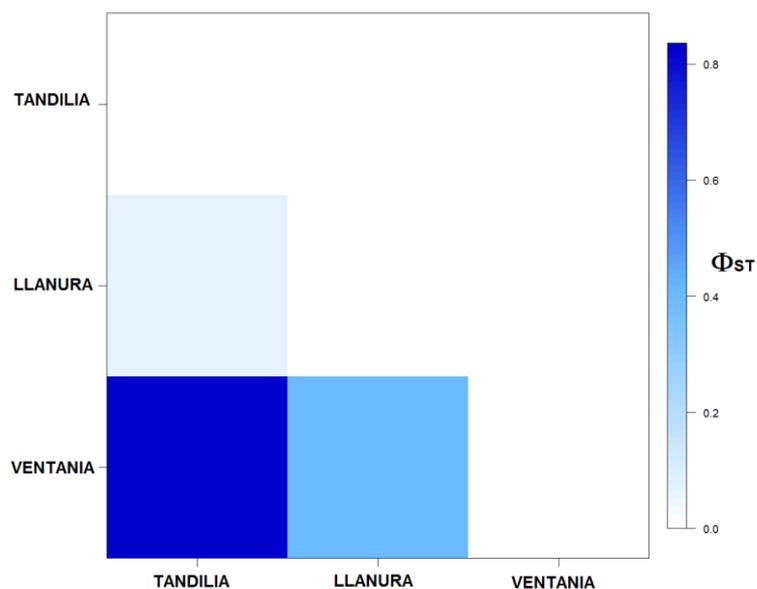


Figura 24 b. Estimaciones pareadas de Φ_{ST} para las distintas regiones geográficas calculado a partir de la Región Control de *Corydoras paleatus*.

Por otra parte, el AMOVA (Tabla 9) reflejó que el mayor porcentaje de la varianza se explica dentro de las poblaciones (61,91%). Este resultado pone de manifiesto la gran diferenciación dentro de las poblaciones de *Corydoras paleatus*, dada por haplotipos con gran divergencia dentro de una misma población (e.g. Claromecó y Sauce Grande). El resto de la varianza ocurrió entre grupos y por último entre poblaciones dentro de grupos (Tabla 9).

El test de Mantel (Figura 25) arrojó como resultado un coeficiente de correlación $r= 0.43$ ($P= 0.0038$). Si bien este resultado evidencia un ajuste a un patrón de aislamiento por distancia, el bajo valor del coeficiente de correlación, junto con la gráfica obtenida, permiten inferir que las poblaciones en forma regional aún no han alcanzado un equilibrio entre flujo y deriva genética.

Tabla 9. AMOVA para *Corydoras paleatus* considerando tres agrupamientos respectivos a las regiones geográficas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	3.713	0.047.Va	14.99
Entre poblaciones dentro de grupos	5	4.277	0.073 Vb	23.10
Dentro de poblaciones	64	12.579	0.196 Vc	61.91

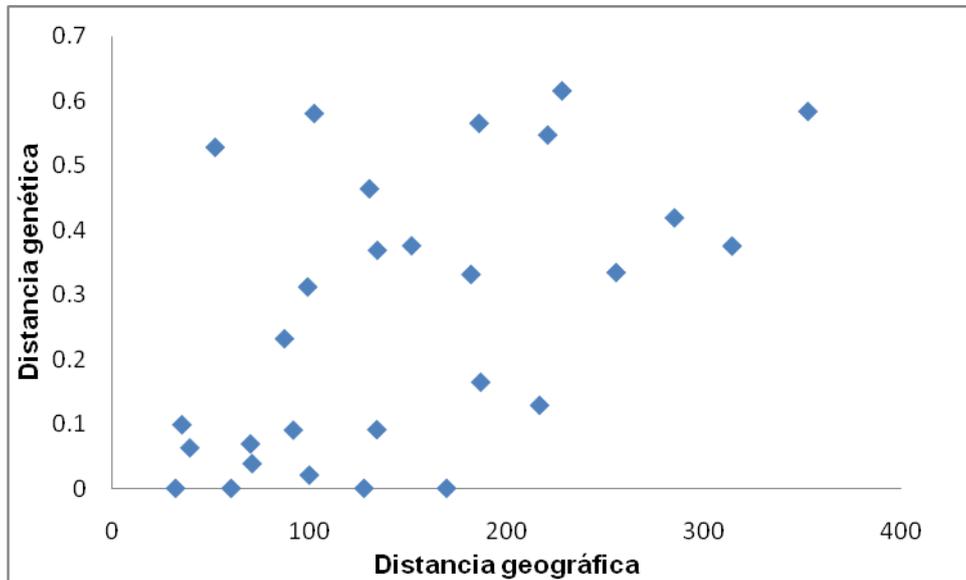


Figura 25. Relaciones entre las distancias genéticas y geográficas para las distintas poblaciones de *Corydoras paleatus*.

DISCUSIÓN

Filogeografía comparada de las especies estudiadas

La distribución de la variación genética de los organismos de agua dulce está condicionada por la configuración y la evolución geológica de las cuencas que habitan. Se ha registrado que los peces de agua dulce evidencian una marcada estructura genética resultado de su confinamiento a los sistemas hídricos que ocupan (Taylor *et al*, 2003; Faulks *et al.*, 2010). Los distintos factores que influyen en la morfología y dinámica de las cuencas, pueden ser barreras importantes que limiten la capacidad dispersiva de los organismos de agua dulce. Cuando surgen tales barreras el flujo génico se ve restringido, incrementando la diferenciación poblacional. Mientras que, en ausencia de barreras, el flujo génico tiende a homogeneizar las poblaciones (Hutchinson & Templeton, 1999; Allendorf & Luikart, 2007; Loxterman & Keeley, 2012).

Al analizar la diversidad genética, *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata* presentaron valores bajos a moderados tanto en la diversidad haplotípica como nucleotídica. De acuerdo con Avise (2000) y Grant & Bowen (1998) un valor elevado en ambos estimadores sugiere una población estable demográficamente y con un tamaño poblacional efectivo grande a lo largo del tiempo. También podría sugerir una mezcla de individuos de poblaciones que han permanecido subdivididas. Por el contrario, valores bajos en ambos estimadores podrían sugerir un severo cuello de botella o tal vez, barridas selectivas, ocasionando en definitiva, una reducción importante del tamaño poblacional. Los valores moderados hallados en ambas especies podrían sugerir que dichas poblaciones se hallarían en vías de alcanzar el equilibrio demográfico. No obstante, la presencia de haplotipos con una gran divergencia entre ellos dentro de una misma localidad podría evidenciar un contacto

secundario entre los distintos linajes encontrados, sugiriendo tal vez, la presencia o combinación de ambos procesos para estas especies.

Por otro lado, los valores altos en la diversidad haplotípica y bajos en la diversidad nucleotídica hallados en *Cnesterodon decemmaculatus*, sugieren un patrón concordante con un crecimiento demográfico repentino a partir de una población ancestral con un tamaño poblacional efectivo pequeño (Avise, 2000; Grant & Bowen, 1998).

Las relaciones genealógicas entre los individuos arrojaron resultados semejantes en las especies *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata*, no así en *Cnesterodon decemmaculatus*. Las primeras dos especies presentaron por un lado haplogrupos muy divergentes entre sí, confinados en algunos casos sólo a unas pequeñas poblaciones. Por otro lado se encontró un haplotipo ampliamente distribuido, el cual no se relaciona directamente con los haplogrupos divergentes. El análisis de los árboles filogenéticos y de distancia en *Jenynsia multidentata*, reveló un agrupamiento formado tanto por haplotipos de las regiones Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania, los cuales son lo más divergentes entre sí. La presencia de una relación ancestral para estas regiones podría sugerir que se trata de linajes que habrían estado más relacionados en el pasado, siendo independientes al haplogrupo ampliamente distribuido. Del mismo modo, los árboles obtenidos en *Corydoras paleatus* agruparon haplotipos que se encuentran entre los más divergentes en la red de haplotipos. El contraste evidenciado, podría deberse a las deficiencias de los métodos filogenéticos en representar con fidelidad las relaciones intraespecíficas. Dichos métodos fallan en representar adecuadamente la divergencia genética somera dentro de una especie (Posada & Crandall, 2001).

La gran divergencia hallada en los haplogrupos de *Corydoras paleatus*, junto con los haplotipos hipotéticos necesarios para conectarlos en la red, podría estar reflejando la existencia de linajes independientes. Asimismo, es factible que las poblaciones donde se encuentran haplotipos divergentes junto con el haplotipo ampliamente distribuido hayan tenido algún contacto secundario con la consecuente combinación de haplotipos, generando la trama compleja evidenciada.

En contraste, en *Cnesterodon decemmaculatus* se observaron dos grupos principales con escasa divergencia. Esta situación se manifestó en las topologías como grandes politomías donde no pudo establecerse claramente la relación entre los individuos, dada la escasa diferencia en sus secuencias. En todos los casos, los árboles filogenéticos y de distancia fueron altamente concordantes con la red de haplotipos. La escasa divergencia hallada entre los haplotipos de *Cnesterodon decemmaculatus* podría sugerir que su historia es relativamente reciente en el área.

Dentro de los distintos análisis de demografía histórica surgieron algunas discordancias en cuanto a la significancia estadística de las pruebas aplicadas. Fu (1997), señala que diversos factores como el flujo génico, las cantidad de muestras por localidad, o la cantidad de localidades analizadas pueden afectar el resultado y la significancia de los test aplicados. En este sentido, no se descarta que algunos de estos factores hayan influenciado los resultados obtenidos. Sin embargo, lo análisis de demografía histórica sumados a la evidencia descrita en los estimadores de la diversidad genética, junto con las topologías halladas en las distintas redes de haplotipos sustentan los patrones evidenciados: *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata* se encontrarían

cercanas al equilibrio demográfico.

La curva bimodal en el análisis de *mismatch distribution* de *Cnesterodon decemmaculatus* podría ser considerada como un contacto secundario entre poblaciones divergentes (Frankham, 2004), o bien podría deberse a dos expansiones demográficas recientes (Jalil *et al.*, 2008). Incluso algunos autores señalan este patrón como una población estable demográficamente (Viñas *et al.*, 2004). No obstante, ninguno de los análisis realizados en el presente trabajo sustenta un equilibrio demográfico en esta especie. Dada la topología obtenida en la red de haplotipos y los resultados en la diversidad genética, podría sugerirse un contacto secundario entre poblaciones que se han expandido subsecuentemente. Asimismo, la baja divergencia observada en *Cnesterodon decemmaculatus* podría ser consecuencia de una radiación reciente de la especie dentro del área (Conroy & Cook, 2000).

Un patrón concordante en *Jenynsia multidentata* y *Cnesterodon decemmaculatus* fue la falta de ajuste a un equilibrio entre flujo y deriva genética. Según Hutchinson & Templeton (1999), los patrones esperados en individuos de regiones que no han alcanzado el equilibrio pueden verse afectados tanto por el tiempo transcurrido desde que la región ha sido colonizada, como por el grado de dispersión dentro de dicha región. Considerando una región hipotética que ha sido colonizada recientemente por una población de origen homogéneo, inmediatamente después de la colonización, las diversas poblaciones establecidas probablemente serán genéticamente muy similares entre sí, lo que refleja la reciente historia evolutiva compartida de las nuevas poblaciones, donde hay poca o ninguna relación entre la distancia genética y la distancia geográfica (Caso II). Sin

embargo, otros patrones primarios pueden desarrollarse después de una colonización, dependiendo de las condiciones ambientales posteriores que afectan a las interacciones entre el flujo de genes y la deriva. Si las condiciones ambientales cambian de tal manera que la población de la región colonizada se fragmenta en poblaciones pequeñas y aisladas, la deriva se vuelve relativamente más influyente que el flujo de genes. El patrón resultante reflejaría aislamiento extremo, donde las frecuencias alélicas en cada población derivan de forma independiente y sin relación con las distancias geográficas que los separan (Caso III). Si las condiciones siguientes a una colonización permiten cierto nivel de dispersión entre las distintas poblaciones, se empezará a generar un patrón de aislamiento por distancia, con mayor divergencia entre las poblaciones más alejadas influenciadas por el efecto de la deriva genética. El patrón resultante (Caso IV) refleja los diferentes roles del flujo de genes y la deriva sobre las diferentes escalas espaciales: pequeña divergencia con poca dispersión en distancias geográficas cortas, y una mayor divergencia y dispersión en distancias geográficas mayores. Con el paso del tiempo, y condiciones estables, el caso IV tenderá cada vez más al patrón descrito en el caso I, logrando un equilibrio entre el flujo y la deriva genética (Hutchinson & Templeton, 1999). Dados los resultados obtenidos sería probable que la falta de ajuste a un equilibrio entre el flujo y la deriva genética se deba a una situación similar al caso II para *Cnesterodon decemmaculatus*. Por el contrario, en el caso de *Jenynsia multidentata*, la presencia de linajes con gran divergencia, podrían sugerir que el efecto de la deriva genética es lo suficientemente fuerte como para diferenciar las distintas poblaciones sin importar la distancia geográfica (Caso III). En *Corydoras paleatus* se observó

un bajo ajuste aunque significativo entre las distancias genéticas y geográficas, similar al caso IV. Dado los resultados, sería probable que, los linajes más divergentes ajusten a un patrón de aislamiento por distancia, pero la presencia de un haplotipo ampliamente distribuido interfiera en la manifestación de un equilibrio entre el flujo de genes y la deriva genética a escala regional.

Tres especies, dos patrones filogeográficos

Integrando la información señalada hasta el momento, se desprenden dos patrones filogeográficos contrastantes:

-*Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus* poseen haplogrupos con gran divergencia entre sí. En ambas especies uno de estos haplogrupos se halla ampliamente distribuido, mientras que el resto se encuentran confinados a unos pocos cursos de agua. Asimismo, las poblaciones en su conjunto parecen haber permanecido estables demográficamente a lo largo de su historia dentro del área.

-*Cnesterodon decemmaculatus* presenta sólo un haplogrupo constituido por dos haplotipos ampliamente distribuidos, con escasa divergencia entre sí, y en clara expansión demográfica.

Los patrones filogeográficos hallados podrían correlacionarse no sólo en el espacio, sino también en el tiempo. El hecho de encontrar haplogrupos tan divergentes para *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus* sugiere que ha transcurrido suficiente tiempo (en miles de años) como para que los linajes se hayan diferenciado en la forma hallada. Por el contrario, el patrón evidenciado en *Cnesterodon decemmaculatus* sugiere un tiempo relativamente reciente de la presencia de dicho linaje en el área de estudio. Los registros fósiles para el

área indican que *Jenynsia sp.* y *Corydoras sp.* se encontraban con anterioridad al UMG (Pleistoceno medio), sin embargo no se cuenta con registros para *Cnesterodon decemmaculatus*. Este hecho podría deberse a un defecto de muestreo o pobre preservación de restos óseos. El hallazgo de patrones demográficos compartidos en las distintas especies, sugiere que factores externos a ellas actuarían moldeando la distribución espacial de la variación genética. Los cambios geológicos y paleoclimáticos que han afectado el Área Pampeana Austral, se consideran en este caso actores fundamentales en la distribución de la variación genética de las especies de peces que habitan el área.

Para explicar un patrón como una amplia colonización de un área en peces de agua dulce, es prácticamente obligatorio hablar en términos de conectividad entre cuencas. Por el contrario, para que se establezca un proceso de estructuración de las poblaciones, es necesario que transcurra suficiente tiempo (miles de años) para que los individuos puedan acumular diferencias vía mutación y en ausencia de flujo génico, sugiriendo cierto grado de discontinuidad geográfica (Avice, 2000; Allendorf & Luikart, 2007). La existencia de los patrones filogeográficos encontrados nos aproximan a un escenario geológico y paleoclimático, que sugiere la alternancia de períodos de conexión y desconexión de las cuencas en la región. Dichos fenómenos han caracterizado gran parte del Cuaternario en el Área Pampeana Austral. A partir de numerosos estudios sobre el paleoclima durante el Cuaternario, han surgido hipótesis interesantes como La de Ciclo Climático (Fairbridge, 1972). Un Ciclo Climático comprende una Época Glacial y una Época Interglacial completas. Dentro de él, se pueden considerar fases climáticas menores que conducen a

momentos transicionales entre los extremos clásicos Glacial e Interglacial (Tonni & Fidalgo 1972). A las Épocas Glaciales en la provincia de Buenos Aires le correspondieron Épocas Interpluviales, es decir más áridas y frías, mientras que a las Épocas Interglaciales correspondieron condiciones húmedas y cálidas, similares a las actuales (Tonni & Fidalgo, 1972)

Durante los últimos milenios del Pleistoceno tardío (16.000-12.000) el sudoeste de la provincia de Buenos Aires se caracterizó por condiciones áridas con marcada influencia eólica (Zavala & Navarro, 1993; Aramayo *et al.*, 2002; Quattrocchio *et al.*, 1993 y 2008). Se desarrolló en el área una amplia plataforma sedimentaria con derrames acuosos transitorios formando amplias lagunas cuyos niveles dependieron del balance entre precipitación y evaporación. En la actualidad, la mayor parte de estas plataformas se prolongan por debajo del nivel del mar y de la cadena de médanos costeros. (Aramayo *et al.*, 2002).

El descenso del mar durante el último máximo glacial (22.000 años cal. AP, Ponce *et al.*, 2011) produjo una gran expansión de la línea de costa hacia el Este, generando una amplia plataforma continental. Esta situación habría incrementado el clima continental ya establecido en Patagonia y la región Pampeana. La gran expansión de la línea de costa favoreció cambios en la distribución de los ríos y la integración de la red de drenaje (Tonni & Cione, 1999). Ponce *et al.* (2011) sugieren que debido a la gran superficie en la plataforma continental las redes de drenaje se habrían integrado. En este sentido el río Sauce Grande habría formado parte de la cuenca del río Colorado, durante el Pleistoceno medio o incluso antes (Casciotta *et al.*, 1999; Ponce *et al.*, 2011). Para el Pleistoceno tardío (16.000-12.000 AP) Quattrocchio

et al. (1993) sugieren ríos gravosos de alta sinuosidad y un sistema de ríos entrelazados, inmersos en una amplia llanura de inundación cuando el nivel del mar se hallaba por debajo de su posición actual. Asimismo sugieren la existencia de cuerpos lagunares de baja energía y gran evaporación. Durante períodos de sequía los cauces principales presentaron discontinuidad en su actividad, habiéndose establecido redes de drenaje accesorias asociadas a cuerpos de agua lacustres someros, permanentes a semipermanentes, con marcadas fluctuaciones estacionales en su extensión (Zavala *et al.*, 2005).

Estas condiciones geológicas y climáticas adversas pudieron llevar a extinciones locales, y a la supervivencia de ciertas poblaciones en los cauces que permanecieron activos durante las fluctuaciones climáticas. Bajo este escenario paleoclimático, es posible que las poblaciones de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus* altamente diferenciadas genéticamente, hayan habitado ambientes que permanecieron activos a lo largo de su evolución. Dichas poblaciones podrían haber alcanzado la diferenciación poblacional en ausencia de flujo génico o con flujo génico restringido, en una red de drenaje parcialmente desintegrada, debido a la desactivación de ciertos cauces. No obstante, a pesar de haber persistido hasta la actualidad, es posible que estos linajes hayan disminuido drásticamente su tamaño poblacional debido a las condiciones desfavorables. Prueba de ello sería el escaso número de individuos que poseen estos haplotipos en la totalidad de las muestras analizadas. Dichos ambientes podrían corresponderse con refugios ambientales, tal es el caso del río Quequén Salado, donde ambas especies poseen linajes divergentes con respecto a los restantes linajes evidenciados.

Hacia los 9.000 años AP, durante la secuencia holocena, se sugiere un

mejoramiento climático (Prieto & Quattrocchio, 1993; Quattrocchio & Borromei, 1998; Zavala & Quattrocchio, 2001; Aramayo *et al.*, 2002). Debido al aumento de la temperatura y el consecuente incremento en las precipitaciones se eleva el nivel de agua en los cuerpos de agua litorales con el desarrollo de lagunas interconectadas de mediana extensión, desarrolladas en una morfología de médanos móviles (Aramayo *et al.*, 2002). Entre los 6.900 y 6.500 años AP, comienza a definirse un ambiente mixto debido a la influencia de pulsos marinos esporádicos, generando cuerpos lagunares salobres (Quattrocchio *et al.*, 1998; Aramayo *et al.*, 2002). La culminación ocurre a los 6.500 años AP con una amplia transgresión marina que ocupa el extenso frente costero. En las etapas finales del óptimo climático postglacial, entre los 5.300 y los 4.800 años, los bordes de esta plataforma continental holocena, cuya extensión era más amplia que los afloramientos actuales, fueron transgredidos por el mar. Este episodio está bien documentado en las localidades Sauce Grande y Sauce Chico (Aramayo *et al.*, 2002; Olivera *et al.*, 2006). Durante el Holoceno tardío, los registros de polen, así como evidencia geológica y paleontológica, reflejan un mayor variabilidad climática, de episodios cortos semiáridos a condiciones húmedas y cálidas (Quattrocchio *et al.*, 2008).

Las inferencias paleoclimáticas para las localidades representadas en las áreas aledañas a la provincia geológica de Tandilia describen ambientes lacustres con amplias llanuras de inundación para el intervalo Pleistoceno inferior-Holoceno (Gómez *et al.*, 1999; Cenizo, 2011).

La caracterización geológica y paleoclimática para gran parte del Holoceno en el Área Pampeana Austral describe lagunas interconectadas. Estos sistemas interconectados podrían haber sido la vía de dispersión

mediante la cual unas pocas poblaciones hayan atravesado un proceso de expansión poblacional, colonizando la mayor parte del área. Esta situación podría explicar la presencia de al menos un haplotipo ampliamente distribuido en las tres especies.

Un hecho interesante de remarcar, es el rol de las lagunas salobres descritas para el área durante el Holoceno medio. *Jenynsia multidentata* es una especie eurihalina, por lo cual podría haber persistido perfectamente en dichos ambientes, favoreciendo la dispersión a través de dichas lagunas. No obstante, no se ha demostrado que la salinidad afecte favorablemente a *Cnesterodon decemmaculatus* (Figueroa *et al.*, 2009). En tanto se ha demostrado que la salinidad constituye una barrera ecofisiológica importante para *Corydoras paleatus*. En este sentido, los trabajos citados anteriormente describen este tipo de ambiente en la franja litoral bonaerense. Dado que los resultados sustentan la interconexión de la red de drenaje, es posible que los ambientes salobres hayan quedado restringidos a la franja litoral. Hacia el interior del continente, habrían predominado cuerpos de agua estrictamente dulceacuícolas.

De esta forma, nos encontraríamos con linajes que han permanecido en el área bajo condiciones climáticas adversas en posibles refugios ambientales, y linajes que, con posterioridad y debido al mejoramiento climático es posible que hayan atravesado un proceso de expansión geográfica con la consecuente colonización del área, como resultado de la formación de un sistema hidrográfico moderno.

Si bien se ha podido correlacionar los patrones filogeográficos encontrados la existencia de linajes independientes en *Jenynsia multidentata* y

Corydoras paleatus, y un linaje ampliamente distribuido en las tres especies, plantea los siguientes interrogantes:

-¿Estos linajes se encontraban todos juntos en el área con anterioridad al UMG?

-La presencia de un haplotipo ampliamente distribuido en las tres especies ¿es compatible con un proceso de colonización del área de estudio?

-Si se confirma dicho proceso ¿es posible correlacionar esta situación como un único evento para las tres especies?

Considerando los casos particulares de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, si todos los linajes observados se hubieran encontrado con anterioridad al UMG, resistiendo condiciones adversas en refugios, se debería observar algún signo de discontinuidad geográfica en el haplotipo ampliamente distribuido. Es decir, las condiciones climáticas desfavorables descritas en el área habrían afectado a todas las localidades y sería poco probable encontrar un haplotipo ampliamente distribuido que no haya sido afectado por estas condiciones locales. Si partimos de la idea que los linajes que presentan estructura genética habrían sido afectados por las condiciones climáticas adversas, generando diferenciación poblacional contundente, se debería aplicar el mismo principio para aquel linaje ampliamente distribuido. Este linaje debería presentar discontinuidad en el hábitat restringiéndose a algunas poblaciones, situación que no se ha puesto de manifiesto. Por otro lado, dicho linaje presenta poca diferenciación en términos de mutaciones, si se comparan con aquellos que evidencian una marcada estructura genética. Esto evidencia una historia relativamente reciente del linaje en el área.

La evidencia descrita parecería indicar que el linaje ampliamente

distribuido no es coetáneo a los linajes diferenciados. Dicho linaje podría haber ingresado al área de estudio con posterioridad al UMG, favorecido por la integración de la red de drenaje. Posteriormente debido al mejoramiento climático ocurrido con el inicio del Holoceno, habría ampliado su rango de distribución colonizando gran parte del área. Siguiendo dicho razonamiento, se podría sugerir la presencia de linajes antiguos que han logrado diferenciarse genéticamente para *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, y un linaje reciente con gran distribución que habría colonizado el área posiblemente con posterioridad al UMG. Esto último podría correlacionarse con la situación de *Cnesterodon decemmaculatus*. Como se ha explicado, la evidencia aquí analizada sugiere que *Cnesterodon decemmaculatus* posee una historia reciente en el área. El linaje hallado en esta especie posee un patrón filogeográfico similar al los linajes ampliamente distribuidos hallados en *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*. Por lo tanto, lo más parsimonioso sería pensar que dicho evento de colonización se habría dado en simultáneo para las tres especies. Cabe destacar que, un evento de colonización del área por las tres especies, no necesariamente implica un evento repentino. Posiblemente la colonización se dio en forma paulatina durante gran parte del Holoceno, conforme se sucedían en el área condiciones climáticas favorables para la supervivencia de las especies.

De lo expuesto hasta el momento, podemos concluir que la presencia de las especies analizadas en el Área Pampeana Austral podría haber sido el producto de procesos demográficos independientes pero complementarios. Por un lado se corrobora la presencia de linajes antiguos en el área, que han subsistido a las condiciones climáticas adversas en posibles refugios

ambientales, tal es el caso de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*. Esta situación nos acerca a aceptar la *Hipótesis de Refugios* al menos para estas dos especies.

Por otro lado, se infiere la presencia de linajes recientes, que han colonizado el área gracias al mejoramiento climático y la conexión de la red de drenaje. Tal es el caso de un linaje para *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, y el único linaje hallado para *Cnesterodon decemmaculatus*. En este sentido se propone aceptar la *Hipótesis de Conectividad y colonización* para las tres especies.

Asumiendo la existencia de distintos linajes en distintos tiempos geológicos, y la conexión de la red de drenaje, la cual ha permitido la colonización de haplotipos ampliamente distribuidos, surge un interrogante. ¿Por qué los linajes que demuestran ser más antiguos en la región no han experimentado un proceso de expansión en el rango de su distribución?, es decir, si se hipotetiza que el mejoramiento climático del Holoceno favoreció el ingreso y colonización del área de un linaje independiente, ¿por qué dicha situación no favoreció también a los linajes geográficamente restringidos?.

Teniendo en cuenta que los linajes que se encontraban en el área con anterioridad al UMG sufrieron las condiciones paleoclimáticas adversas, es probable que las poblaciones, aún aquellas que lograron persistir en refugios ambientales, hayan disminuido drásticamente su tamaño poblacional, atravesando un posible cuello de botella. Como ha sido señalado (Wright, 1942; Avise, 2000; Allendorf & Luikart, 2007) la deriva génica tiende a ser más fuerte en poblaciones con tamaño poblacional pequeño. Sin embargo, poblaciones como Sauce Grande tanto para *Jenynsia multidentata* como para

Corydoras paleatus evidencian una expansión demográfica. Esta localidad ha albergado a los linajes más divergentes. Dadas estas evidencias, es posible que los efectos en la disminución del tamaño poblacional sean los responsables del patrón observado. Esta inferencia, llevaría a pensar que los linajes ampliamente distribuidos deberían haber tenido tamaños poblacionales suficientemente grandes como para lograr el éxito en la colonización del área. Cabe destacar que, los resultados obtenidos en la actualidad reflejan en definitiva la historia demográfica de las poblaciones. Los resultados que evidencian una marcada estructura genética en el presente, son la consecuencia de miles de años de evolución de las poblaciones. En este contexto, es posible pensar que dichas poblaciones no estuvieron en equilibrio demográfico en el lapso que comprende el mejoramiento climático posterior al UMG, siendo más susceptibles a fenómenos como la deriva genética o barridas selectivas de ciertos individuos.

Particularidades de los cauces del Área Pampeana Austral

Considerando las distintas regiones geográficas de Tandilia, Llanura Interserrana Bonaerense y Ventania, las tres especies arrojaron resultados contrastantes. En primer lugar *Cnesterodon decemmaculatus*, presentó valores similares de diversidad genética en las tres regiones, dicho patrón es esperado dada una reciente colonización del área, donde no hubo tiempo suficiente como para llegar a diferenciación poblacional somera. En contraste, *Corydoras paleatus*, y *Jenynsia multidentata* evidencian la mayor diversidad genética en las regiones donde se encuentran los haplotipos más divergentes.

Otra diferencia se observó en el análisis jerárquico de la varianza

molecular (AMOVA). La única especie que evidenció un mayor porcentaje de la varianza entre las regiones geográficas fue *Jenynsia multidentata*. En *Cnesterodon decemmaculatus* gran parte de su varianza es explicada por diferencias entre las distintas poblaciones, patrón que se traduce en escasa diferenciación genético poblacional. Por último, en *Corydoras paleatus* se observó que el mayor porcentaje de la varianza es explicado dentro de poblaciones. Dicho resultado sería esperado dada la presencia de linajes con gran divergencia dentro de una misma localidad, los cuales tienden a aumentar la variabilidad intrapoblacional, más que a nivel regional. De hecho, *Corydoras paleatus* evidenció las secuencias más divergentes de las tres especies analizadas.

Si bien las distintas regiones exhiben diferencias en sus rasgos geológicos como se ha expuesto previamente (ver introducción), los registros paleoclimáticos sugieren los mismos ambientes y condiciones para el área en general. Por lo tanto, es posible que las historias demográficas de las especies hayan sido influenciadas mayormente por las características paleoclimáticas más que por las condiciones geológicas de las regiones geográficas. No obstante, se han podido establecer patrones similares en las especies, los cuales podrían atribuirse a características particulares de las cuencas analizadas.

Dentro de la Llanura Interserrana, un patrón concordante para las tres especies se evidenció en las localidades Quequén Grande y Cortaderas, donde *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata* presentaron sólo un haplotipo, mientras que *Cnesterodon decemmaculatus* presentó dos, separados por sólo un paso mutacional. Para las tres especies los haplotipos fueron los mismos en

ambas localidades. La existencia de tan baja diversidad sugiere un efecto muy fuerte de la deriva génica, o bien una historia reciente de colonización. Este hecho resultó llamativo debido a que el río Quequén Grande es el más importante dentro de la Llanura Interserrana Bonaerense y de cauce permanente (Cenizo, 2011). En el caso de *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, el haplotipo hallado en estas cuencas coincide con el haplotipo distribuido ampliamente. La presencia de un único haplotipo o a la sumo dos aunque muy poco diferenciados, como en el caso de *Cnesterodon decemmaculatus*, podría explicarse por tres factores principales: 1- estos cauces tuvieron una actividad discontinua en su historia geológica, quedando inactivos durante algún lapso temporal, y hayan sido colonizados recientemente, 2- por el contrario tuvieron un gran caudal de régimen permanente sin grandes discontinuidades geográficas, donde el flujo génico sería mayor a la deriva génica, o bien, 3- deberse a un defecto de muestreo. El primer caso parece poco factible debido a las características señaladas para la cuenca. Asimismo los trabajos realizados en el área no infieren discontinuidad en la evolución de dichos cauces (Lanzelotti, 2008). Dadas las características de los cauces, el segundo caso parecería ser el más plausible. Con respecto a un defecto de muestreo, si bien no puede descartarse, es llamativo que se refleje el mismo patrón en las tres especies. Si se tiene en cuenta que la continuidad en el hábitat favorece el intercambio de genes manteniendo homogeneizada la población, no es difícil pensar que un río de gran porte que ha permanecido activo, sin grandes discontinuidades geográficas, posiblemente haya favorecido una población homogeneizada genéticamente. Por otro lado el río Quequén Grande atraviesa un ambiente de llanura, con una

pendiente del orden del 0,3% (Kruse *et al.*, 1997; Lanzelotti, 2008), en contraste con otros cauces del área que evidencian una topografía mucho más discontinua.

Dentro de la Llanura Interserrana se ha encontrado a su vez un patrón contrastante al mencionado anteriormente en las poblaciones de las localidades Claromecó y Quequén Salado. En el caso de la localidad Claromecó tanto *Corydoras paleatus* como *Cnesterodon decemmaculatus* han presentado haplotipos divergentes. Esto es más evidente en *Corydoras paleatus* donde se encuentran cinco haplotipos, separándose algunos por más de 15 pasos mutacionales con la presencia incluso de haplotipos intermedios. La alta diversidad genética hallada en esta cuenca sugiere cierta estabilidad del sistema. Asimismo, esta situación podría explicarse debido al contacto de distintos linajes dentro del mismo cauce. Esta explicación parecería ser la más probable de acuerdo a lo planteado con respecto a la ingesión al sistema de otro linaje. En este sentido, la localidad Claromecó podría haber funcionado como un refugio ambiental para los linajes con mayor antigüedad de *Corydoras paleatus* en el área. En el caso de *Cnesterodon decemmaculatus*, los tres haplotipos encontrados presentan escasas diferencias en términos de mutaciones como para considerarlos linajes independientes.

La cuenca del arroyo Claromecó presenta ciertas características hidrográficas que resulta interesante destacar. En esta región existe un relieve residual constituido por afloramientos discontinuos de depósitos pliocenos (Martínez *et al.*, 2011), conformados por sedimentitas loésicas que rematan en una potente costra calcárea (Zarate y Rabassa, 2005). Estos afloramientos constituyen un relieve moderadamente ondulado con desniveles relativos que

pueden alcanzar los 20-30 m. En general, presentan contornos sinuosos y están profundamente disectados por procesos de incisión fluvial. En otros sectores en cambio, dichos afloramientos presentan frentes de baja sinuosidad y están controlados por escarpes rectilíneos. Estos rasgos se suman a otros indicios geomorfológicos tales como capturas y control del sistema de drenaje, que serían indicadores de actividad tectónica cuaternaria (Martínez *et al.*, 2011). Asimismo Cortizo & Isla (2007) reconocen que los sedimentos más antiguos corresponden al Pleistoceno medio, donde se pueden reconocer innumerables paleocanales. Tanto en el acantilado del faro de Claromecó como en el cauce del arroyo, se han identificado arenas gruesas correspondientes a una transgresión (Belgranense *sensu* Frenguelli 1928) y asignable al estadio isotópico 5e de hace 120.000 años AP según dataciones U/Th (Isla *et al.*, 2000). La transición entre los sedimentos continentales y marinos correspondientes al emplazamiento de esta barrera pleistocena se reconoce en los acantilados del faro de Claromecó como conchillas incluidas en limos que fueron asignadas a ambientes de marisma para constituir el Prebelgranense de Frenguelli (1928). Los últimos tiempos del Pleistoceno están registrados como sedimentos de relleno del actual arroyo en facies fluviales, lacustres y de llanura de inundación. Finalmente el Lujanense culmina en un paleosuelo de desarrollo regional (paleosuelo Puesto Callejón Viejo (*sensu* Fidalgo *et al.*, 1973) que ha sido repetidamente fechado en la región en 10.000 años AP (Zárate *et al.*, 1998, Isla, 2002). Hacia el mar, hacia el sur, y siempre en las barrancas del arroyo Claromecó, afloran limos estuarinos muy ricos en materia orgánica que Frenguelli (1928) atribuyó a su Querandinense. Esta secuencia de limos en transición a arenas ha sido materia de estudios sedimentológicos y

micropaleontológicos que indicaron que su porción superior abarca entre 2.200 y 800 años AP (Stutz, 2000; Hassan *et al.*, 2004). Existe un paleosuelo (Puesto Berrondo *sensu* Fidalgo *et al.* 1973) que culmina el relleno postpampeano de este pequeño valle, y que es la base sobre la que se desplazaron los médanos y se emplazó la barrera medanosa austral.

Esta situación paleoambiental sugiere que el cauce del arroyo Claromecó podría haber tenido cierta discontinuidad, favoreciendo la diferenciación poblacional. Estas características en la cuenca sumado a la presencia de los haplotipos con mayor divergencia, sugeriría que la misma ha actuado como un refugio ambiental en el caso de *Corydoras paleatus*.

La localidad Quequén Salado presentó haplotipos con gran divergencia para *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata* donde se podría aplicar el mismo razonamiento seguido anteriormente. Es posible que la divergencia observada en los haplotipos de estas localidades sea producto de la existencia de linajes independientes con una marcada discordancia temporal. En este sentido, la localidad Quequén Salado parece haber funcionado como refugio ambiental para las especies *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata*.

El río Quequén Salado se caracteriza por la presencia de barrancas de hasta 20 metros de altura en su cuenca media, y numerosas cascadas de hasta seis metros de altura en su cuenca inferior (Marini & Piccolo, 2005). Se destacan sedimentos de origen fluvio-lacustres durante el Pleistoceno-Holoceno predominando en el sector un ambiente lagunar de baja energía, concordante con el paleoclima descrito para el área. Madrid *et al.* (2002) sugieren que la formación de las cascadas que caracterizan la cuenca inferior son consecuencia de deformación de estratos por movimientos neotectónicos,

producidos durante el Holoceno. No obstante, habría explicaciones más sencillas para explicar la formación de las cascadas desde el punto de vista geomorfológico (Zárate, com. pers). La existencia de este ambiente particular podría favorecer la diferenciación poblacional, dada principalmente por la dificultad de atravesar barreras tales como las cascadas características de este cauce.

La localidad Sauce Grande ha sido particular en cuanto a sus resultados. Las tres especies poseen haplotipos exclusivos para dicho cauce. La topología en forma de estrella observada en las redes de haplotipos de las tres especies sugiere una expansión demográfica para dicha localidad. Este patrón se sustenta aún más en los análisis de *mismatch distribution* en *Corydoras paleatus* y *Cnesterodon decemmaculatus*. Asimismo, las tres especies han evidenciado los valores más altos de distancias genéticas medidos como Φ_{ST} pareados. Evidentemente dicha localidad presenta características que han conducido a la diferenciación poblacional de las especies.

El río Sauce Grande se encuentra confinado en un amplio valle que data desde el Pleistoceno. Se destaca la presencia de barrancas cuyas paredes verticales encajonan y controlan el cauce del río (Luque *et al.*, 1979). Zavala & Quattrocchio (2001) señalan que parte del valle fluvial del río Sauce Grande se habría comportado como una zona geomorfológicamente deprimida y de curso esporádico en su evolución geológica. Asimismo sugieren que sobre el valle medio y alto de río existen numerosas angusturas que podrían haber funcionado como diques naturales. De esta forma, al aumentar la cantidad de agua, durante un período interglacial, pueden formarse verdaderos diques que limiten cuerpos de agua (Zavala & Quattrocchio, 2001). Esta situación

conduciría a la fragmentación del hábitat limitando en definitiva, la capacidad dispersiva de las especies. Tales barreras al flujo génico, podrían haber determinado la diferenciación del linaje exclusivo observado en las tres especies. Este punto es de particular interés debido a la gran diversidad haplotípica que presenta esta localidad. Sería interesante estudiar si dicho patrón se manifiesta en otras especies, ya que se podría pensar en un área de alta diversidad genética, y por lo tanto sería importante realizar un adecuado manejo y protección del área con el fin de conservar dicha diversidad.

En definitiva, estos ambientes podrían no sólo haber actuado como refugios ambientales durante el Cuaternario para *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, sino también moldeando la distribución de la variación genética durante tiempos más recientes como en el caso de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Otro signo de estructura genética con haplotipos divergentes se observó en la localidad El Moro para las especies *Cnesterodon decemmaculatus* y *Corydoras paleatus*. Asimismo, esta localidad presento valores negativos y significativos o marginales para las tres especies. Por otro lado, la presencia de haplotipos exclusivos en la localidad Chocorí para la especie *Jenynsia multidentata* junto con los resultados evidenciados en las relaciones genealógicas, sugerirían que esta localidad pudo haber funcionado como un refugio para esta especie. Por último *Cnesterodon decemmaculatus* presentó los haplotipos con mayor divergencia en la localidad Saladillo. Si bien no hay estudios profundos acerca de la dinámica de dichas cuencas en el Cuaternario, los trabajos realizados en el área (Quattrocchio *et al.*, 1993; Quiroz Londoño *et al.*, 2006; Isla & Espinoza, 2009) sugieren las mismas condiciones

paleoclimáticas descritas. Evidentemente, estas cuencas han presentado cierta estabilidad a lo largo del tiempo, permitiendo en ciertos casos la diferenciación poblacional. No obstante, las diferencias halladas para las especies en dichas localidades podrían deberse, a historias de colonización propias de cada una, así como de las respuestas que podrían haber dado a los distintos cambios paleoclimáticos. Como se ha sugerido, las condiciones de aridez que han caracterizado el Cuaternario del Área Pampeana Austral pudieron haber conducido a extinciones locales y procesos de recolonización dado un posterior mejoramiento climático. En este contexto, es interesante pensar en las respuestas particulares que las especies pudieran brindar a tales cambios, determinando en definitiva su persistencia y continuidad dentro del área.

Consideraciones finales

La variabilidad en la diversidad genética puede ser afectada por diversos factores. En el presente estudio, se ha explorado ampliamente sobre los factores extrínsecos a las especies. Sin embargo también existen factores intrínsecos a los organismos que pueden afectar la diversidad genética. Entre estos se destacan la tasa de mutación y el fenómeno de “Hitchhiking” donde un gen neutral unido a un gen bajo selección cambia sus frecuencias y disminuye su variabilidad. Lamentablemente no se cuenta con trabajos previos sobre el marcador utilizado en las especies seleccionadas que puedan confrontarse con el presente estudio. En este sentido, no pudo establecerse una comparación que permita discernir si algunos de estos procesos estarían operando sobre la Región Control del ADN mitocondrial, afectando los valores de diversidad genética. En este contexto, el presente trabajo es la primera

aproximación sobre la variación en la diversidad genética y los factores que la moldean en el área de estudio para las especies seleccionadas.

Estudios futuros que profundicen los aspectos aquí señalados, son necesarios para obtener un mejor entendimiento sobre la distribución de los linajes de genes en el tiempo y en el espacio. El análisis de diversos marcadores moleculares, por ejemplo genes nucleares, así como la inclusión de mayor cantidad de especies de peces que habitan el área contribuiría a lograr una aproximación más acabada sobre la forma en que los fenómenos paleoclimáticos afectaron la distribución de los linajes de la ictiofauna del área pampeana Austral.

Conclusiones

De lo expuesto en el presente trabajo se concluye que la presencia de las especies analizadas en el Área Pampeana Austral es el resultado de procesos demográficos independientes pero a su vez complementarios.

Se corroboró la presencia de linajes antiguos para las especies *Jenynsia multidentata* y *Corydoras paleatus*, conforme a lo evidenciado en el registro fósil para el área. Dichos linajes habrían soportado las condiciones climáticas adversas sucedidas durante gran parte del Cuaternario en refugios ambientales. Estos refugios serían los ríos Quequén Salado y Sauce Grande para ambas especies, así como el arroyo Claromecó para *Corydoras paleatus* y Chocorí para *Jenynsia multidentata*. La presencia de *Cnesterodon decemmaculatus* dentro del área parece haber tenido una historia demográfica reciente, concordante con ciertos linajes de *Corydoras paleatus* y *Jenynsia multidentata*. En este sentido se respaldan las dos hipótesis planteadas en el presente estudio.

Si bien los patrones descritos son altamente concordantes con la historia demográfica y paleoclimática de la región para las tres especies estudiadas, las diferencias encontradas pueden ser atribuidas a características particulares de las especies. En este sentido se destacan las distintas tasas a las cuales se suceden los cambios evolutivos en las secuencias de ADN. Contar con futuros estudios moleculares sobre dichas especies sería fundamental para lograr un mejor entendimiento de los procesos que operan sobre la distribución de la variación genética.

La historia geológica y paleoclimática de la región ha influenciado en gran parte la distribución de la variación genética en las especies estudiadas, promoviendo en ciertos casos la diferenciación poblacional. Ciertos cauces

como el del río Sauce Grande albergan una diversidad genética sustancial que debería ser tomada en cuenta a la hora de establecer planes de conservación de la biodiversidad dentro del área.

El presente trabajo constituye una primera aproximación sobre los patrones de distribución de los linajes de genes de las especies estudiadas en el Área Pampeana Austral. Estudios futuros incluyendo mayor cantidad de especies de peces que habitan el área, así como mayor número de marcadores moleculares podría contribuir a ampliar el conocimiento sobre la distribución de la variación genética en los linajes de peces dentro del Área Pampeana Austral. Asimismo sería importante contar con representantes de la ictiofauna perteneciente a las cuencas por fuera del área a fin de inferir procesos a escala regional que pudieran haber moldeado la distribución y diversidad de la ictiofauna en el límite austral de la subregión Brasílica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, pretenden contribuir con una disciplina reciente en nuestro país, pero que sumada a otras disciplinas conforman potenciales herramientas para discernir las causas históricas que han moldeado la distribución en el espacio y en el tiempo de los linajes de genes.

Apéndice

Soluciones utilizadas en los protocolos de laboratorio

EDTA:

P.M: 372, 24 grs.

Para 200 ml 0, 5 M :

-37,2 grs de EDTA

-180 ml de agua destilada

-Llevar a pH 8,0 con NaOH (7 grs. Aprox.)

-Completar hasta 200 ml con agua destilada.

-Agitar hasta disolver completamente.

EDTA SALINA :

-150 ml EDTA 0,5 M

-150 ml ClNa 0, 5 M (PM 58, 44 grs)

-200 ml agua destilada

ClNa 0,5 M :

Para 500 ml

-14,61 grs ClNa

-agua destilada hasta completas 500 ml

Agitar hasta disolver completamente.

SDS (dodecil sulfato sódico):

20% - Para 500 ml

-100 grs SDS en polvo

-llevar a 500 ml con agua destilada

-Agitar

Buffer TE :

Para 1 lt.

-Tris Cl 0,01 M (10 ml de Tris 1 M pH 8,0 en 1 lt de solución)

-EDTA 0,001 M (20ml de EDTA 0,5 M en un lt de solución)

- 10 ml Tris 1 M pH 8, 0

-2 ml EDTA 0, 5 M

-900 ml agua destilada

Purificación de fenol (sólido):

Para 500 grs. De fenol

-Fundir a 68 °C. Colocar el fenol líquido en un erlenmeyer de 2 lts de capacidad.

-Agregar 0,5 grs de 8- hidroxiquinoleína

-Agregar 1 volumen de Tris-Cl 0,5 M pH 8,0 (1º lavado), agitar en agitador magnético 15 minutos.

-Pipetear el Tris- Cl lo más que se pueda.

-Agregar 1 volumen de Tris- Cl 0,1 M pH 8,0 (2º lavado), agitar en agitador magnético 15 minutos.

-Descartar el Tris-Cl.

-Repetir el 2º lavado hasta llegar al pH deseado (mayor a 7,8). Generalmente el 2º lavado se repite 3 veces. Si no se llega al pH deseado agregar unas perlas de NaOH en el último lavado

Tris -Cl 1M:

Para 500 ml pH 8,0

-60, 57 grs de Tris

-Agregar 400 ml de agua destilada.

-Agitar hasta disolver.

-Agregar aproximadamente 33ml de HCl para llegar a pH 7,8

-Completar hasta 500 ml con agua destilada

Acetato de sodio 3M:

-123,06 grs de acetato de sodio (PM 82,04)

-Agregar agua destilada hasta completar 500 ml

-Agitar hasta disolver en agitador magnético

Gel de agarosa 1%:

-1gr de agarosa

-100ml de TBE 0,5 X o 1X .Llevar 2 minutos a microondas o hasta que esté cristalino

-Agregar 1,5 µl de bromuro de etidio

-Enfriar 10 minutos.

-Verter en la cuba.

Proteinasa K.

-10 mg. De proteinasa K.

-10 ml de agua estéril.

La concentración final es de 1 mg/7ml o 1000 µg por ml o 1000 µl.

TBE: (para hacer 1 lt.)

- 54 grs de tris.
- 27.5 de ácido bórico.
- 20 ml de EDTA 0.5 M a ph 8.
- llevar a 1 lt. con agua destilada.

BUFFER DE LISIS:

- Tris HCl 1M (pH 8,0) 5ml
- EDTA 0,5 M (pH 8,0) 10 ml
- SDS 10 % 10 ml (o al 20 % 5 ml)
- ClNa 5M 1 ml
- agua destilada
- Mezclar todo y llevar a 100 ml con agua destilada

EDTA 0.5 M (PH 8.0):

- 186 g de EDTA
- agua destilada
- Preparar y agitar con 800 ml de agua destilada
- Ajustar el pH con NaOH (aprox 20 ml) sólo se termina de disolver cuando se ajusta el pH
- Llevar a 1 lt
- Autoclavar

TBE 5X:

- 54 gr de tris base

- 27,5 gr de ácido bórico
- 20 ml de 0,5 EDTA (pH 8,0)
- Preparar y agitar con 800 ml de agua destilada
- Completar a 1 lt
- trabajar con solución 1X

TE 1X:

- 10 mM de Tris- HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- Autoclavar

TRIS- HCl 1M (pH 8,0):

- 121,1 gr de Tris base
- Agua destilada
- Preparar y agitar con 800 ml de agua destilada
- ajustar el pH con HCl concentrado (40 ml o más) antes de llevar a 1 lt
- autoclavar
- descartar la solución si toma color amarillo

Protocolos seguidos para extracción de ADN y amplificación de la región control del ADN mitocondrial

Extracción de ADN con cloruro de sodio

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% de SDS y 50 mM de ClNa), Proteinasa K (10 mg/ml), ClNa (5 M), TE 1X pH 8,0 (autoclavado), etanol o isopropanol absolutos a -20 °C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

- 1- Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un eppendorf de 1,5 µl.
- 2- Enjuagar brevemente con d H₂O.
- 3- Agregar 500 µl de buffer de lisis 100 µl de proteinasa K
- 4- Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 hs o hasta toda la noche.
- 5- Opcional: Una hora antes de finalizar, agregar 5 µl de RNasa
- 6- Centrifugar al máximo (por ejemplo 13.000 rpm) por 20 min.
- 7- Pipetear 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiera).
- 8- Agregar 300 µl de cloruro de sodio 5 M, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 minutos.
- 9- Pipetear 500-600 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a -20°C o el doble de volumen de etanol absoluto a -20°C. Agitar levemente primero, luego mezclar completamente.
- 10- Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20°C por 2 hs

o toda la noche.

11- Centrifugar al máximo por 15 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.

12- lavar breve y cuidadosamente con unos 750 µl de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.

13- descarte el alcohol. Secar en estufa a 37°C (lleva unas 2 hs).

14- Resuspender en 100 µl 1XTE. Agitar, y opcionalmente incubar a 55°C (o menos) por 2 hs.

15- Guardar a -20°C.

16- Cuantificar por fluorescencia. Diluir alícuotas de trabajo y guardar stock cuantificado en el Banco de ADN,

Electroforesis de los productos de PCR

Geles de agarosa

Preparación

- Es importante que la cuba esté limpia. Si hubiera buffer, se retira y se reserva para usar durante la corrida (sólo si está limpio).
- Se prepara la cuba colocando la placa inferior y los topes laterales, previamente lavados con agua.
- En un vaso de precipitado, se mezclan 1 g de agarosa con 100 ml de Buffer TBE 1X (agarosa 1 %), se revuelve y se lleva al microondas hasta que se disuelva bien (asegurarse que no queden grumos incoloros).
- Incorporar 1,5 µl de Bromuro de etidio en 100 ml de gel, o para la cuba de 170 ml agregar 2,5 µl de bromuro de etidio.
- Cuando la mezcla se haya entibiado de la coloca en la placa inferior de

la cuba, evitando que queden burbujas. Se coloca el peine y se deja enfriar hasta que gelifique.

- Una vez gelificado, se retira el peine y se cubre con el mismo buffer con el que se preparó el gel (en ese caso TBE 1X).

Electroforesis

- Se mezclan 5 μ l de producto de PCR y 2 μ l de 6X
- Como referencia, cargar 1 μ l de estándar de tamaño (ladder) con 2 μ l .
- Se cargan en los pocillos del gel, con cuidado de no perforar la parte inferior y en el último se coloca el estándar de tamaño.
- Se corren los productos hasta que el marcador azul esté en el borde del gel. El voltaje se ajusta asegurándose que la cuba no levante demasiada temperatura. Probar en una primera instancia a 75 V, y subir si es posible (demasiado calor derrite el gel). Controlar el tiempo de la corrida

Protocolo de purificación de productos de PCR

- Microcentrifugar los tubos con el ADN 1 minuto a 12.000 RPM
- Agregar 15/20 μ l de ADN purificado y los llevo a un eppendorf de 1,5 ml
- Le agrego el doble de volumen (\pm 40 μ l) del volumen extraído de amplificación de isopropanol (es mejor porque tiene menos agua) o de etanol.
- Llevo a -70° aprox. 30 minutos.
- Centrifugar 10 minutos, vuelco el alcohol y deajo el pellet.
- Agregar alcohol 70° aproximadamente el mismo volumen para enjuagar. Sin mezclar, tiro el alcohol por las paredes, para luego descartarlo por

inversión directamente.

- Dejo el tubo boca abajo más o menos 20 minutos sobre papel absorbente
- Agrego agua miliq o buffer TE (disolver muy bien) hasta reconstituir el volumen original (\pm 15-20 μ l)
- Se puede guardar en freezer o en heladera
- Sembrar en el gel de agarosa al 2 % (5 μ l de la muestra precipitada + 1 μ l de loading)

Valores de Φ_{ST} en las distintas especies

Tabla A. Φ_{ST} pareados de *Jenynsia multidentata* en el Área Pampeana Austral. * = Probabilidad asociada significativa al 0,05. CHA: Chapadmalal. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande. SA: Saladillo. SCH: Sauce Chico.

	CHA	CHO	E M	QG	CO	CLA	QS	SG	SA	SCH
CHA	0									
CHO	0.764*	0								
EM	0.80*	0.12	0							
QG	0.1	0.97*	0.98*	0						
CO	0.12*	0.97*	0.99*	0	0					
CLA	0.1	0.97*	0.98*	0	0	0				
QS	0.002	0.86*	0.88*	0.01	0.03	0.01	0			
SG	0.47*	0.75*	0.76*	0.68*	0.70*	0.67*	0.52*	0		
SA	0.08	0.95*	0.97*	0.06	0.08	0.06	0.007	0.66*	0	
SCH	0.1	0.97*	0.98*	0	0	0	0.01	0.67*	0.066	0

Tabla B. Φ_{ST} pareados de *Cnesterodon decemmaculatus* en el Área Pampeana Austral. * = Probabilidad asociada significativa al 0,05. CHA: Chapadmalal. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande. SA: Saladillo. SCH: Sauce Chico.

	CHA	CHO	E M	QG	CO	CLA	QS	SG	SA	SCH
CHA	0									
CHO	1.00*	0								
EM	0.32*	0.40*	0							
QG	0.93*	0.92*	0.50*	0						
CO	0.95*	0.94*	0.41*	0.10	0					
CLA	0.83*	0.81*	0.36*	0.008	0.18	0				
QS	0.45*	0.79*	0.39*	0.91*	0.91*	0.82*	0			
SG	0.43*	0.62*	0.29*	0.80*	0.78*	0.70*	0.48*	0		
SA	0.40*	0.50*	0.08	0.51*	0.42*	0.36*	0.45*	0.33*	0	
SCH	0.89*	0.86*	0.35*	0.32*	0.04	0.32*	0.86*	0.74*	0.36*	0

Tabla C. Φ_{ST} pareados de *Corydoras paleatus* en el Área Pampeana Austral. * = Probabilidad asociada significativa al 0,05. CHA: Chapadmalal. CHO: Chocorí. EM: El Moro. QG: Quequén Grande. CO: Cortaderas. CLA: Claromecó. QS: Quequén Salado. SG: Sauce Grande. SA: Saladillo. SCH: Sauce Chico.

	D	CHO	EM	QG	CO	CLA	QS	SG
D	0							
CHO	0.062	0						
EM	0.038	0	0					
QG	0	0.090	0.068	0				
CO	0	0.463	0.020	0	0			
CLA	0.546*	0.331*	0.375*	0.580*	0.527*	0		
QS	0.334*	0.128	0.164	0.368*	0.231*	0.098	0	
SG	0.583*	0.375*	0.418*	0.615*	0.564*	0.090	0.116*	0

Correlación y edades propuestas para los depósitos neógenos según Folguera & Zárate (2009).

	Cuenca del Colorado	Bloque de Chadileuvú	Cuenca de Macachín	Positivo Bonaerense	Bloque de San Rafael	Edad Mamífero
Holoceno	Loess					
Pleistoceno	Calcrete	Calcrete	Calcrete	Calcrete	Calcrete	Chapadmalalense
	Depósitos fluviales gruesos					
Plioceno	Fm. Río Negro	Fm. Cerro Azul	Fm. Epecuén	Fm. La Toma	Fm. Barker	Montehermosense
				Fm. La Norma	Fm. Irene	Fm. Chapadmalal
Mioceno tardío	Fm. Arroyo Chasicó	Fm. Cerro Azul	Fm. Epecuén	Fm. La Norma	Fm. Cerro Azul	Huayqueriense
	Fm. Río Negro			Fm. Irene		
Mioceno medio	Fm. Barranca Final	Fm. Barranca Final	Fm. Barranca Final	Fm. Barranca Final	Fm. Cerro Azul	Chasicuense
	F. Colorado					
Jurásico-Precámbrico	Rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias pre-Jurásicas					

Referencias

- Aguirre, M. L. & E. A. Farinati. 1999. Paleobiogeografía de las faunas de moluscos marinos del Neógeno y Cuaternario del Atlántico sudoccidental. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 12 (1): 93-112.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE, Transactions*. 19: 716-723.
- Aljanabi, S. M. & I. Martínez .1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCRbased techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4692-4693.
- Allendorf, F. W. & G. Luikart. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 642.
- Aramayo, S. A., R. A. Schillizi & B. M. Gutierrez Téllez. 2002. Evolución paleoambiental del cuaternario en la costa Atlántica del sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 15 (1-2): 95-104.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers: natural history and evolution*. Chapman & Hall.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C. 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.

- Avise, J. C., C. Giblyn-Davidson, J. Laerm, J. C. Patton, & R. A. Lansman. 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys oinetis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 76: 6694–6698.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb & N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18:489–522
- Avise, J.C. 1996. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. *Ibis*, 138: 16-25.
- Bandelt, H-J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Bermingham, E., & A. P. Martin.1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7(4): 499-517.
- Bermingham, E., & J. C. Avise. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113(4): 939-965.
- Bermingham, E., S. Rohwer, S. Freeman & C. Wood. 1992. Vicariance biogeography in the Pleistocene and speciation in North American wood warblers: a test of Mengel's model. *Proceeding of the Natural Academy of Science*. 89: 6624-6628.
- Bermingham, E., S. S. McCafferty & A. P. Martin. 1996. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus, pp. 113-

128. En: T. D. Kocher y C. A. Stepien (eds.), Molecular systematics of fishes, California Academic Press, San Diego.
- Bistoni M. A., A. Hued, M. Videla & L. Sagretti. 1999. Water quality effects on fish communities of the central part of Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 72:325-335.
- Bogan, S., M. L. de los Reyes & M. M. Cenizo .2009. Primer registro del género *Jenynsia* Günther, 1866 (Teleostei: Cyprinodontiformes) en el Pleistoceno Medio tardío de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Papéis Avulsos de Zoología*, 49 (5): 81-86.
- Brown, G. G., G. Gadaleta, G. Pepr, C. Saccone, & E. Sbisfi. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 192: 503-511.
- Burnham, K.P. & D. R. Anderson. 2003. Model selection and multimodel inference. a practical information-theoretic approach. New York: Springer.
- Campo de Ferreras, A. M. & M. C. Piccolo. 1999. Hidrogeomorfología de la cuenca del río Quequén Grande. Argentina. *Papeles de geografía*, 29: 35-46.
- Casciotta, J. R., A. E. Almirón & M. M. Azpelicueta. 2005. *Astyanax pampa* (Characiformes, Characidae), a new species from the southernmost boundary of the Brazilian subregion, Argentina. *Revue Suisse de Zoologie*, 112: 401-408.
- Casciotta, J., A. Almirón, A. Cione & M. Azpelicueta. 1999. Brazilian freshwater fish assemblages from southern Pampean area, Argentina. *Biogeographica*, 75: 67-78.

- Cenizo, M. M. 2011. Las sucesiones sedimentarias continentales expuestas en Centinela del Mar, provincia de Buenos Aires, Argentina (Pleistoceno Inferior-Holoceno). *Estudios Geológicos*, 67(1): 21-39.
- Cingolani C. 2005. Unidades morfoestructurales (y estructuras menores) de la provincia de Buenos Aires. En De Barrio et al. (eds.) *Geología y recursos minerales de la Provincia de Buenos Aires*. Pp. 21-30
- Cione, A. & M. Barla. 1997. A new locality for the synbranchid eel *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Percomorpha) in southern Buenos Aires Province, Argentina. *Neotropica*, 43: 113-115.
- Cione, A. L. & A. López Arbarello. 1995. Los peces fósiles del Cenozoico tardío de la región pampeana. *En: ALBERDI, M.T., G. LEONE, y E.P TONNI. Registro continental de la evolución climática y biológica de los últimos 5 millones de años en el Hemisferio Norte (SO de Europa) y el Hemisferio Sur (Argentina). Monografías CSIC 12: 129-142. España.*
- Conroy, C. J. & J. A Cook. 2000. Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Rodentia: Muridae). *Molecular Ecology*, 9(2): 165-175.
- Cortizo, L. C. & I. F. Isla. 2007. Evolución y dinámica de la barrera medanosa entre los arroyos Zabala y Claromecó, Partidos de San Cayetano y Tres Arroyos, Buenos Aires. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 62 (1): 3-12.
- De Luna, E., J. A. Guerrero & T. Chew-Taracena. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética *Systematic biology: advances and directions in theory and methods of phylogenetic reconstruction. Hidrobiológica*, 15(3): 351-370.

- Deschamps, C. M. 2005. Bio-cronoestratigrafía de mamíferos del Cenozoico tardío en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Ameghiniana*, 42(4): 733-750.
- Eguiarte L, E., V. Souza & X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. Semanrant, Conabio, Instituto de Ecología UNAM. DF, México.
- Escalante, A. 1983. Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área Platense. III. Otras especies. *Limnibios* 2:453-463.
- Ewens, W. J. 1979. *Mathematical populations genetics*. Springer-Verlang, New York.
- Excoffier, L. & L. Hel. 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.
- Excoffier, L. 2001. Analysis of population subdivision. *Handbook of statistical genetics*.
- Excoffier, L., P. Smouse & J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Farris J.S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology*, 19, 83–92.
- Faulks, L. K., D. M. Gilligan & L. B. Beheregaray. 2010. Islands of water in a sea of dry land: hydrological regime predicts genetic diversity and dispersal in a widespread fish from Australia's arid zone, the golden perch (*Macquaria ambigua*). *Molecular ecology*, 19(21): 4723-4737.

- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual review of genetics*, 22(1): 521-565.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fidalgo, F., F. O. De Francesco & R. Pascual. 1975. Geología superficial de la llanura bonaerense. *Relatorio VI Congreso Geológico Argentino, Bahía Blanca*: 103-138.
- Fidalgo, F., J. C. Riggi, R. Gentile, H. Correa & N. Porro. 1991. Los "Sedimentos postpampeanos" continentales en el ámbito sur bonaerense. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 46: 239-256.
- Fidalgo, F., U. Colado, & F. De Francesco. 1973. Sobre intrusiones marinas cuaternarias en los partidos de Castelli, Chascomús y Magdalena (provincia de Buenos Aires). *5º Congreso Geológico Argentino, Actas 3*: 227-240, Córdoba.
- Figuerola, R., M. L. Suarez, A. Andreu, V. H. Ruiz & M. R. Vidal-Abarca. 2009. Caracterización ecológica de humedales de la zona semiárida en Chile central. *Gayana* 73(1): 76-94.
- Filatov, D. A. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2: 621-624.
- Folguera, A. & M. Zárata. 2009. La sedimentación Neógena continental en el sector extraandino de Argentina central. *Revista de la asociación Geológica Argentina*, 64 (4): 692-712.

- Ford, M. J. 2002. Applications of selective neutrality tests to molecular ecology. *Molecular Ecology*, 11:1245–1262.
- Forster, P. 2004. Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442): 255-264.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press.
- Frenguelli, J. 1928. Observaciones Geológicas en la región costanera sur de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias de la Educación, *Anales 2*, 145 p., Paraná.
- Frenguelli, J. 1950. Rasgos generales de la morfología y geología de la provincia de Buenos Aires. *LEMIT, Serie 2(33)*: 1-72
- Fu, Y. X. 1996. Estimating the age of the common ancestor of a DNA sample using the number of segregating sites. *Genetics*, 144(2): 829-838.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Genetics* 105:437-460.
- Gómez, G., J. L. Prado & M. T. Alberdi. 1999. Micromamíferos del sitio Arroyo Seco 2 (provincia de Buenos Aires, Argentina). Sus implicaciones tafonómicas y paleoambientales. *Estudios geológicos*, 55:273-281.
- Gómez, SE. 1993. Concentración letal de oxígeno disuelto para *Corydoras paleatus* y *Pimelodella laticeps* (Pisces, Siluriformes). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Hidrobiología*, 7:31-45.

- Grant, W. A. S., & B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Harpending, R. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Hartl, D.L. & A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Hassan, G., M A. Espinosa. & F. I. Isla. 2004. Análisis paleoambiental de una secuencia del Holoceno tardío del arroyo Claromecó (Provincia de Buenos Aires, Argentina) basado en diatomeas. *Ameghiniana* 41(2): 161-170.
- Hood, G. M. 2010. PopTools version 3.2.5. Available on the internet. URL <http://www.poptools.org>.
- Hrbek, T., J. Seckinger & A. Meyer. 2007. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43(3): 986-998.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford surveys in evolutionary biology*, 7: 1-44.
- Hued, A. C. & M. A. Bistoni. 2005. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543:279-298.

- Huelsenbeck, J. P., B. Larget, R. E. Miller, & F. Ronquist. 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic biology*, 51(5): 673-688.
- Hutchison, D. W., & A. R. Templeton. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 1898-1914.
- Iriondo, M. H. 2010. *Geología del Cuaternario en Argentina*. Editorial Moglia, Corrientes, Argentina.
- Isla, F. I., N. W. Rutter; E. J. Schnack & M. A. Zárate. 2000. La transgresión Belgranense en Buenos Aires. Una revisión a cien años de su definición. *Revista Cuaternario y Ciencias Ambientales*, Asociación Geológica Argentina1: 3-14.
- Isla, F., & M. Espinosa. 2009. Estratigrafía, tectónica y paleogeografía de la línea de costa de Lobería, sudeste de Buenos Aires. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 64(4): 557-568.
- Isla, F.I. 2002. Significado de las inundaciones lujanenses (Pleistoceno Final) en la Pampa, Argentina. 15º Congreso Geológico Argentino, Actas 2: 705-712, El Calafate.
- Jalil, M. F., J. Cable, J. Sinyor, I. Lackman-Ancrenaz, M. Ancrenaz, M. W. Bruford & B. Goossens. 2008. Riverine effects on mitochondrial structure of Bornean orang-utans (*Pongo pygmaeus*) at two spatial scales. *Molecular Ecology*, 17(12): 2898-2909.

- Joseph, L., C. Moritz, & A. Hugall. 1995. Molecular support for vicariance as a source of diversity in rainforest. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 260(1358): 177-182.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217(129):624-626.
- Kimura, M. 1984. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Kingman, J. F. 1982. The coalescent. *Stochastic processes and their applications*,13(3): 235-248.
- Kostadinoff, J., & C. Prozzi. 1998. Cuenca de Claromecó. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 53(4): 461-468.
- Kruse, E., M. Deluchi, L. Varela, & P. Laurencena. 1996. Escenarios geoambientales en la llanura interserrana de la Provincia de Buenos Aires. XIII Congreso Geológico Argentino y III Congreso de Explotación de Hidrocarburos, Actas IV: 117-130.
- Kruse, E., P. Laurencena, G. Delucchi & L. Varela. 1997. Caracterización de la red de drenaje para la evaluación hidrológica en la región interserrana (provincia de Buenos Aires). *Actas Congreso Nacional de Hidrogeología* 1: 133-134.
- Lanteri, A. A. & V. A. Confalonieri. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Jorge Llorente Bousquets y Juan José Morrone (eds.). *Una perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía*. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

- Lanzelotti, S. L. 2008. A río revuelto... Geoarqueología, resolución e integridad del registro arqueológico en el río Quequén Grande (provincia de Buenos Aires). *Intersecciones en antropología*, (9): 43-57.
- Lee, W-J., J. Conroy, W. H. Howell, & T. D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 54–66.
- Lewis, P. O. 2001. Phylogenetic systematic turns over a new leaf. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 30-37.
- Liotta, J. 2005. Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. 701 Pp. ProBiota Eds.
- Llambias, E. & C. Prozzi. 1975. Ventania. Relatorio VI Congreso Geológico de Argentina. Bahía Blanca: 79-101.
- López Cazorla, A. L., W. Durán & L. Tejera. 2003. Alimentación de la ictiofauna del río Sauce Grande, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Biología acuática*, 20: 73-79.
- Lorier, E., & N. Berois. 1995. Reproduction and Embryonary Nurture in *Cnesterodon decemmaculatus* (Teleostei: Poeciliidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55: 27-44.
- Loxterman, J. L., & E. R. Keeley. 2012. Watershed boundaries and geographic isolation: patterns of diversification in cutthroat trout from western North America. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1): 38.
- Lucinda, P. H. 2005. Systematics and biogeography of the genus *Phalloptychus* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3(3): 373-382.

- Lucinda, P. H., M. J. Ghedotti & W. J. Graça. 2006. A new *Jenynsia* species (Teleostei, Cyprinodontiformes, Anablepidae) from southern Brazil and its phylogenetic position. *Copeia*, 2006(4): 613-622.
- Lundberg, J. G., L. G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M. C. Malabarba & F. Wesselingh. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. 13-48 Pp. In: Malabarba, L. R., R.E. Reis, R.P. Vari, C.A.S. Lucena & Z.M.S. Lucena (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Lundberg, J.G. 1993. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. Pp.156-199. In: Goldblatt, P. (ed.) *Biological Relationships between Africa and South America*. Yale University Press.
- Lunt, D. H., L. E. Whipple & B. C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 7(11): 1441-1455.
- Luque, J. A., J. D. Paoloni & G. A. Bonorino. 1979. Estudio Hidrológico e hidrogeológico de la cuenca del río Sauce Grande. Publicación interna de los Dptos. de Cs. Agrarias y Cs. Naturales, Universidad Nacional del Sur, Serie Hidrológica, (3): 1-64.
- Madrid, P., G. G. Politis, M. Bonomo, & R. March. 2002. Arqueología microrregional en el sudeste de la Región Pampeana Argentina: el curso del río Quequén Salado. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología*, 27: 327-355.

- Mai, A. C., A. M. & J. P. Vieira. 2005. Salinity influence on the growth of *Jenynsia multidentata* Jenyns (Pisces). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3): 780-783.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approaches. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Marengo, H. G. 2000. Rasgos micropaleontológicos de los depósitos de la transgresión Entrerriense-Paranense en la cuenca Chaco-Paranense y noroeste argentino, República Argentina. *El Neógeno de Argentina. Serie Correlación Geológica*, 14, 29-45.
- Marini, M. F., & M. C. Piccolo. 2005. Hidrogeomorfología de la cuenca del río Quequén Salado, Argentina. *Investigaciones geográficas*, 37(20): 59-71.
- Markgraf, V. 1991. Late Pleistocene environmental and climatic evolution in southern South America. *Bamberger Geographische Schriften Band 11*, 271–281.
- Marti, G. A., M. M. Azpelicueta, M.C. Tranchida, S. A. Pelizza & J.J García. 2006. Predation efficiency of indigenous larvivorous fish species on *Culex pipiens L. larvae* (Diptera: Culicidae) in drainage ditches in Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 31(1): 102-106.
- Martínez, D. E., O. M. Quiroz Londoño, C. Dapeña, H.E. Massone, A. Ferrante & E. Bocanegra. 2007. Aportes al modelo hidrogeológico conceptual de la cuenca del río Quequén grande, provincia de Buenos Aires. V Congreso Argentino de Hidrogeología, Paraná, Entre Ríos, Argentina.
- Martínez, G. A., O. M. Quiroz Londoño, D. E. Martínez, H. E. Massone, M. Farenga & S. Grondona. 2011. Control neotectónico en la evolución del

- relieve de la Llanura Interserrana Bonaerense. XVIII Congreso Geológico Argentino, Neuquén, Argentina.
- Menni, R. C., S. E. Gómez & F. L. Armengol. 1996. Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South America. *Hydrobiologia*, 328(3): 173-197.
- Miller, R. R. 1966. Geographic distribution of Central American freshwater fishes. *Copeia*: 773-802.
- Myers, G. S. 1966. Derivation of the freshwater fish fauna of Central America. *Copeia*: 766-773.
- Nabel, P. E., A. Cione & E. P. Tonni. 2000. Environmental changes in the Pampean area of Argentina at the Matuyama-Brunhes (C1r-C1n) Chrons boundary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 162: 403-412.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. 512 Pp. New York, Columbia University Press.
- Nei, M. y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* 76:5269-5273.
- Nelson, G. 1985. A decade of challenge the future of biogeography. *Earth Sciences History*, 4(2): 187-196.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the world*. Wiley & Sons, New York.
- Oliveira, C., L. F. Almeida Toledo, L. Mori & S. A. Toledo Filho. 1990, Cytogenetics analysis of three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Cytologia*, 55: 21-26.
- Oliveira, C., L. F. Almeida Toledo, L. Mori & S. A. Toledo Filho. 1992. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the

- evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Journal of Fish Biology*, 40: 419-431.
- Olivera, D. S., Grill & C. Zavala. 2006. La transgresión Holocena en Bahía Blanca. Análisis de facies y palinología. IV Congreso Latinoamericano de Sedimentología y XI Reunión Argentina de Sedimentología. San Carlos de Bariloche, 20 - 24 de noviembre de 2006.
- Pardiñas, U. F. J. & C. Deschamps. 1996. Sigmodontinos (Mammalia, Rodentia) pleistocénicos del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina): aspectos sistemáticos, paleozoogeográficos y paleoambientales. *Estudios Geológicos*, 52(5-6): 367-379.
- Pardiñas, U.F.J., J. Gelfo, J. San Cristóbal, A. L. Cione & E. P. Tonni. 1996. Una tafocenosis de organismos marinos y continentales en el Pleistoceno superior en el sur de la provincia de Buenos Aires. 13º Congreso Geológico Argentino y 3º Congreso de Exploración de Hidrocarburos, 5: 95-111.
- Parenti, L.R. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 168:335-557.
- Ponce, J. F., J. Rabassa, A. Coronato & A. M. Borromei. 2011. Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 363–379.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817-818.

- Posada, D. & K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into Networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 35-45.
- Posada, D. & T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio test. *Systematic Biology*, 53: 793-808.
- Posada, D. 2008. *jModelTest*. Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (7): 1253-1256.
- Prieto, A. R. & M. E. Quattrocchio. 1993. Briofitas y pteridofitas en sedimentos del Holoceno de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Anales de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española*, 6: 17-37.
- Quattrocchio, M. E. & A. M. Borromei. 1998. Paleovegetational and paleoclimatic changes during the late Quaternary in southwestern Buenos Aires Province and southern Tierra del Fuego (Argentina). *Palynology*, 22(1): 67-82.
- Quattrocchio, M. E., A. B. Borromei, C. M. Deschamps, S. C. Grill & C. A. Zavala. 2008. Landscape evolution and climate changes in the Late Pleistocene-Holocene, southern Pampa (Argentina): Evidence from palynology, mammals and sedimentology. *Quaternary International*, 181: 123-138.
- Quattrocchio, M. E., S. C. Grill & C. A. Zavala. 1998. Chronostratigraphic and palynozone chronosequences charts of Népóstá Grande Creek, southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*, 11: 111-133.
- Quattrocchio, M., C. Deschamps, C. Zavala, A. Borromei, S. Grill & G.R. Guerin. 1993. Cuaternario del sur de la Provincia de Buenos Aires.

- Estratigrafía e inferencias paleoambientales. En: Iriando M. (Ed.), Cuaternario de America del Sur. Holoceno, II: 22-34. CADINQUA.
- Quattrocchio, M., C. Deschamps, D. Martínez, S. Grill & C. Zavala. 1988. Caracterización paleontológica y paleoambiental de sedimentos cuaternarios, arroyo Napostá Grande, provincia de Buenos Aires. 2º Jornada Geológica Bonaerense, 37-46.
- Quattrocchio, M., J. Kostadinoff, G. Martinez, & A. Prieto. 1994. Evidencias de neotectónica en el Río Sauce Chico, Prov. de Buenos Aires. Revista Asociación Geológica Argentina, 49, 297-305.
- Quiroz Londoño, O., D. Martínez, H. Massone, E. Bocanegra, & A. Ferrante. 2006. Hidrogeología del Área Interserrana Bonaerense: Cuencas de los Arroyos El Moro, Tamangueyú y Seco. VIII Congreso Latinoamericano de Hidrología Subterránea y EXPOAGUA.
- Ramos, V. 1999. Los depósitos sinorogénicos terciarios de la región andina. En: Geología Argentina. Caminos, R. (ed). Instituto de geología y recursos minerales, Anales 29 (22): 651-682, Buenos Aires.
- Rannala, B., & Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. Journal of molecular evolution, 43(3): 304-311.
- Reis, R. E. 1998. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). Zoological Journal of the Linnean Society, 124: 105-168.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal

- evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4(2):225-246.
- Ringuelet, R. A. 1975. Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. *Ecosur*, 2 (3): 1-122.
- Ringuelet, R. A., R. H. Arámburu & A. A. de Arámburu. 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.
- Rogers, A. R., & H. Harpending. 1992 Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rolleri, E. 1975. Provincias geológicas bonaerenses. Relatorio del VI Congreso Geológico de Argentina: 29-53.
- Rosa, R. S., & W. J. Costa. .1993. Systematic revision of the genus *Cnesterodon* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) with the description of two new species from Brazil. *Copeia*, 696-708.
- Rosso, J. J. 2006. Peces pampeanos: guía y ecología. Buenos Aires, Literature of Latin America.
- Russo, A., R. Ferello & G. Chebli. 1979. Llanura Chaco Pampeana. Segundo Simposio de Geología Regional Argentina, 1: 139-183.
- Saitou N. & M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schneider, S. & L. Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3): 1079-1089.
- Shibatta, O. A. & A. C. Hoffmann. 2005. Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 366-371.
- Shimabukuro-Dias, C. K., C. D. Oliveira & F. Foresti. 2004. Karyotype variability in eleven species of the catfish genus *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 15(2), 135-146.
- Simonsen, K. L., G. A. Churchill & C. F. Aquadro. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, 141(1): 413-429.
- Spruyt, M., & F. Buquicchio. 1994. Gene Runner Version 3.01 Hastings Software.
- Stutz, S. 2000. Historia de la vegetación del litoral bonaerense durante el último ciclo transgresivo-regresivo del Holoceno. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 127 p.
- Swofford D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell & D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference, Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 407–514.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1233: 585-595.
- Taylor, E. B., M. D. Stamford & J. S. Baxter. 2003. Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Molecular ecology*, 12(10): 2609-2622.
- Taylor, W. R. & G. C. Van Dyke. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9(2): 107-119.
- Thompson J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-80.
- Tonni, E. P. & A. L. Cionne. 1997. Did the Argentine Pampean ecosystem exist in the Pleistocene? *Current Research in the Pleistocene*, 14: 131-133.
- Tonni, E. P., A. L. Cione & A. J. Figini. 1999. Predominance of arid climates indicated by mammals in the pampas of Argentina Turing the Late Pleistocene and Holocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 147: 257-281.
- Turner, B. J., N. Diffoot & E. M. Rasch. 1992. The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid- tetraploid sibling complex. *Ichthyological. Exploration of Freshwaters*, 3: 17-23.

- Uliana, M. A. & K.T. Biddle. 1988. Mesozoic-Cenozoic paleogeographic and geodynamic evolution of southern South America. *Revista Brasileira de Geociencias*, 18: 172-190.
- Vari, R. P. & S. H. Weitzman. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. Pp. 381–393. *In*: Peters, G. & R. Hutterer (Eds.). *Vertebrates in the Tropics. Proceedings of the International Symposium on Vertebrate Biogeography and Systematics in the Tropics*, Bonn, June 5–8, 1989. Alexander Koenig Zoological Research Institute and Zoological Museum, Bonn.
- Vinas, J., J. Alvarado Bremer & C. Pla. 2004. Phylogeography of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) in the northern Mediterranean: the combined effects of historical vicariance, population expansion, secondary invasion, and isolation by distance. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(1): 32-42.
- Wainscoat, J. 1987. Human evolution. Out of the garden of Eden. *Nature*, 325(6099), 13.
- Watterson, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7:256-276
- Wright, S. 1942. Isolation by Distance. *Genetics*, 2: 114-38.
- Yrigoyen, M. 1975. Geología del subsuelo y plataforma continental. *Relatorio Congreso Geológico de Argentina, Bahía Blanca*: 139-1698.
- Zambrano, J. J. 1980. Comarca de la Cuenca cretácica del Colorado. II *Simposio Geológico de Argentina, Bahía Blanca*: 139-168.
- Zambrano, J.J. 1972. Cuenca del Colorado. *En: Geología Regional Argentina (Leanza, A.F., ed.)*. Academia Nacional de Ciencias, 419-437.

- Zárate, M. A. & J. Rabassa. 2005. Geomorfología de la Provincia de Buenos Aires. In: *Geología y Recursos Minerales de la Provincia de Buenos Aires* (de Barrio, R.E.; Etcheverry, R.O.; Caballé, M.F. & Llambías, E., eds.). Relatorio XVI Congreso Geológico Argentino, 8: 119-138.
- Zárate, M. A., M. A. Espinoza & L. Ferrero. 1998. Palaeoenvironmental implications of a Holocene diatomite, Pampa Interserrana, Argentina. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* 11:135-152.
- Zavala, C. & M. Quattrocchio. 2001. Estratigrafía y evolución geológica del río Sauce Grande (Cuaternario), provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 56(1): 25-37.
- Zavala, C., & E. Navarro. 1993. Depósitos fluviales en la Formación Monte Hermoso (Plioceno inferior-medio). Provincia de Buenos Aires. XII Congreso Geológico Argentino y II Congreso de Exploración de Hidrocarburos, Actas II: 236-244.
- Zavala, C., L. García & M. Di Meglio. 2005. Redes de drenaje y paleoclimas en el Cuaternario del sur de la provincia de Buenos Aires. XVI Congreso Geológico Argentino, CD-ROM, Artículo N° 156. 2pp. La Plata.