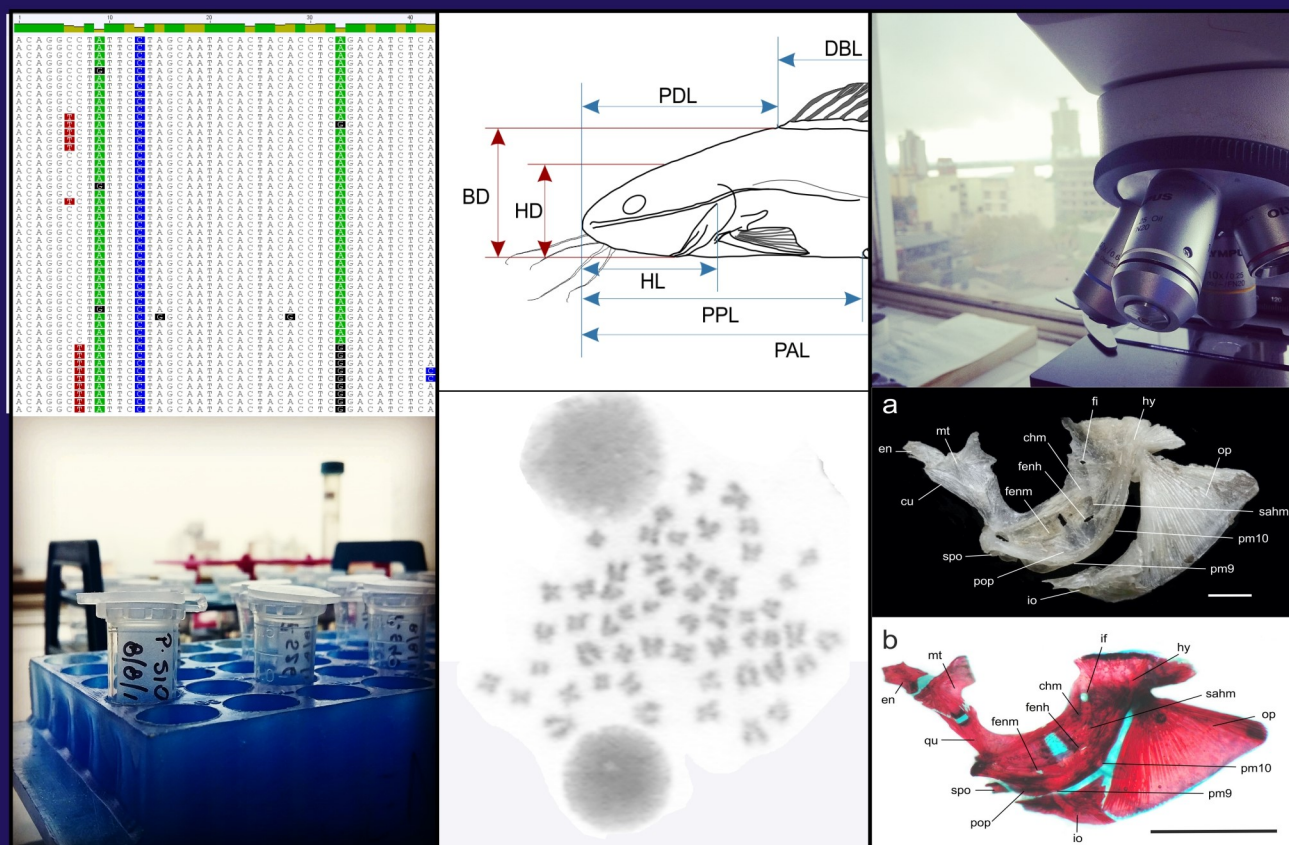


Tesis Doctoral

Revisión multidisciplinaria de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes, Heptapteridae) de las cuencas de los ríos Alto Paraná y Uruguay en Argentina: Taxonomía clásica, Citogenética y Genética molecular.



Lic. Mauricio F. Benitez



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Tesis doctoral:

REVISIÓN MULTIDISCIPLINARIA DE *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) DE LAS CUENCAS DE LOS RÍOS ALTO PARANÁ Y URUGUAY EN ARGENTINA: TAXONOMÍA CLÁSICA, CITOGENÉTICA Y GENÉTICA MOLECULAR.

Lic. Mauricio Fabián Benitez

Laboratorio de Genética Evolutiva,

Instituto de Biología Subtropical (CONICET-UNaM)

Directores:

Dra. Maria de las Mercedes Azpelicueta

Dr. Juan Diego Baldo

La Plata, Argentina

2019

*“Taxonomy is always a contentious issue because the world
does not come to us in neat little packages”*

Stephen Gould

*A vos Nani, por tu amor incondicional hasta el
último de tus días.*

AGRADECIMIENTOS

El principal y más sincero agradecimiento es a mi familia, el pilar que me sostiene en todas las decisiones que tomo. Gracias por el amor, la comprensión y el acompañamiento en este y todos los momentos de mi vida.

A Edgardo, por escucharme, cuidarme y acompañarme durante este tiempo de locura y a pesar de eso seguir eligiéndome. Claramente también debo agradecer a “la nena” que fue la única capaz de acercarse mientras escribía.

A mis directores de beca y de doctorado Mercedes, Diego y Dardo. Muchas gracias por confiar en mí, brindarme un espacio, aconsejarme y guiarme durante este proceso de formación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Evolutiva que son mi familia laboral con la que compartí y espero seguir compartiendo almuerzos, charlas, mates, muestreos, trámites, discusiones y encuentros. Agradecimiento general porque son bocha y seguro me olvido de alguno y se ofende. Pero en especial a Caro, Rosio, Taffa, Ferro, Juan, Elio, Darío, Mono, Luz y Mariano.

Al grupo de los ictiólogos Anyelo, Gastón, Guillermo, Marcos y Felipe, por el empuje, las discusiones y compartir conmigo su sapiencia.

A las instituciones cuyo apoyo ha sido fundamental en el desarrollo de esta carrera. Al CONICET, cuya beca me permitió dedicarme por completo a lo que me gusta y transitar esta etapa de aprendizaje y crecimiento. A la carrera del doctorado en Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata. A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM) y al Instituto de Biología Subtropical, que además de brindar el espacio físico en el cual desarrollé el doctorado, facilitaron la logística y movilidad durante las salidas de campo. Finalmente, al Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables de la provincia de Misiones por los permisos de colecta y brindarme alojamiento en las reservas visitadas.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
CAPÍTULO 1: Introducción general y objetivos	4
1. Introducción	5
1.1. El concepto de especie y su delimitación.....	5
1.2. Marco taxonómico general	6
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos Particulares	10
CAPITULO 2: Variación molecular en <i>Rhamdia quelen</i>	11
1. Introducción	12
1.1. El ADN y su utilidad como marcador molecular.....	12
1.2. El ADN mitocondrial	13
1.3. Citocromo B.....	14
1.4. COI: el gen código de barra	15
1.5. Filogenia molecular de <i>Rhamdia</i>	17
2. Materiales y Métodos	18
2.1. Obtención de tejidos y extracción de ADN	18
2.2. Amplificación, purificación y secuenciación.....	18
2.3. Edición y alineamiento de secuencias.....	19
2.4. Elección del Modelo de sustitución.....	20
2.5. Variación genética de las secuencias de COI y CYTB	20
2.6. Delimitación de especies hipotéticas en <i>Rhamdia</i>	20
2.7. Inferencia Filogenética	21
3. Resultados	22
3.1. Polimorfismo de los genes COI y CYTB en <i>Rhamdia</i>	22
3.2. Especies hipotéticas de <i>Rhamdia</i>	22
3.3. Inferencia filogenética.....	29
3.3.1. Relaciones basadas en COI	29
3.3.2. Relaciones basadas en CYTB	32
3.3.3 Análisis combinado.....	34
3.4. Redes haplotípicas.....	35

3.4.1. Haplotipos COI.....	35
3.4.2. Haplotipos CYTB	39
3.4.3. Consideraciones generales.....	39
4. Discusión	40
4.1. Inferencia filogenética y especies hipotéticas	40
4.2. Distribución de los linajes.....	42
4.3. Sobre distancias genéticas y el <i>DNA barcode</i>	43
4.4. Redes de haplotipos	45
4.5. Consideraciones finales.....	45
CAPÍTULO 3: Variación morfológica.....	47
1. Introducción	48
1.1. Concepto de especie, morfología y especies crípticas.....	48
1.3. Variación morfológica en <i>Rhamdia</i>	49
1.4. Antecedentes en osteología.....	51
2. Materiales y Métodos	51
2.1. Captura y procesamiento de los ejemplares.....	51
2.2. Caracteres morfológicos externos	53
2.3. Caracteres osteológicos	54
3. Resultados.....	56
3.1. Caracteres morfológicos externos	56
3.1.1. Análisis tradicionales.....	56
3.1.2. Variación en los patrones de coloración.....	58
3.1.3. Poros cefálicos.....	59
3.1.4. Análisis de componentes principales (ACP)	60
3.1.5. Análisis discriminante lineal (ADL)	61
3.2. Caracteres osteológicos	62
3.2.1. Cráneo	62
3.2.2. Aparato branquial	67
3.2.3. Mandíbula	70
3.2.4. Arco hioideo	71
3.2.6. Vértebras y complejo vertebral.....	75
3.2.7. Cintura escapular	76
3.2.8. Cintura pélvica.....	77
3.2.9. Aletas dorsal y anal	80

3.2.10. Esqueleto caudal	80
4. Discusión	82
4.1. Caracteres morfológicos externos	82
4.1.1. Caracteres morfométricos	82
4.1.2 Caracteres merísticos	83
4.1.3. Coloración	84
4.1.3. Poros cefálicos.....	85
4.2. Caracteres osteológicos	85
4.3. Consideraciones finales del capítulo	87
CAPÍTULO 4: Citogenética	89
1. Introducción	90
2. Materiales y Métodos	91
3. Resultados	92
4. Discusión	94
CAPÍTULO 5: Consideraciones finales y conclusiones.....	97
Consideraciones finales.....	98
Conclusiones	101
Referencias	102
Apéndice 1	115
Apéndice 2	121

RESUMEN

Rhamdia quelen es una de las especies taxonómicamente más discutidas del neotrópico. En la última revisión morfológica del género se sinonimizaron 48 especies nominales con este taxón, estableciéndose una distribución que se extiende desde Méjico hasta la región pampeana argentina. Este acto taxonómico fue cuestionado por sistemáticos y biólogos que consideran la existencia de aislamiento entre algunas poblaciones que la componen. *Rhamdia quelen* ha sido evaluado desde diversas disciplinas (morfolología, ecomorfolología, citogenética y genética molecular) que apoyan la hipótesis de que conforma un complejo de especies y que infieren la existencia de especies crípticas. Estudios morfológicos y moleculares más recientes, han conducido a la revalidación de algunas especies sinonimizadas con *R. quelen* y se ha constatado una gran divergencia genética entre las poblaciones cis y transandinas de este taxón.

Aunque *Rhamdia quelen* ha sido estudiada desde diferentes disciplinas, cada una de ellas fue abordada de modo independiente y sobre poblaciones distintas. En esta tesis se planteó como objetivo, incrementar el conocimiento de este taxón mediante un estudio multidisciplinario que permitiera establecer si existían diferencias entre las poblaciones de *R. quelen* de las cuencas del Paraná y Uruguay en Misiones (Argentina). Para ello se analizaron caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares, abordando un enfoque taxonómico iterativo. Se empleó como hipótesis de partida la delimitación molecular, que luego fue puesta a prueba, mediante el análisis de caracteres morfológicos y citogenéticos. Estos linajes son recuperados como clados monofiléticos en los análisis de Máxima Parsimonia y Máxima verosimilitud, definidos como especies hipotéticas por el ABGD y presentan distancias genéticas intergrupos que superan siempre el 3%. La aplicación subsiguiente de los estudios morfológicos solo permitió corroborar la distinción del linaje QUE3, endémico de la cuenca del arroyo Urugua-í. Este linaje se caracteriza por un cráneo dorsoventralmente bajo, corta longitud de su proceso supraoccipital y ausencia del poro sensorial s4. En todos los demás linajes se observó una gran plasticidad fenotípica de los caracteres morfométricos, merísticos e incluso osteológicos que no permite su diagnosis en base a este tipo de caracteres. Finalmente, la comparación de los clados en base a caracteres citogenéticos no fue posible, dado que no se consiguieron preparaciones cromosómicas de calidad en todos los clados. De todos modos se pudo constatar que las poblaciones misioneras presentan $2n= 58$ con marcada predominancia de cromosomas bibraquiados.

La correcta delimitación de una especie tan discutida como *Rhamdia quelen* representa un arduo desafío. Su gran distribución y su compleja historia taxonómica dificultan esta labor, pero el establecimiento de lazos cooperativos entre la comunidad ictiológica y la implementación de estudios integrales como el desarrollado en esta tesis, han de contribuir a su comprensión.

ABSTRACT

Rhamdia quelen is a complex taxon widely discussed on Neotropical systematics. The last morphological revision of the genus stated that the species was composed of 48 nominal species distributed from Mexico to Argentina. This taxonomical statement was controversial and systematist and biologist disagree, considering that some populations are geographically or ecologically isolated from others. Studies concerning this species include several disciplines as morphology, cytogenetics and molecular genetics that supported the hypothesis that *Rhamdia quelen* is a species complex and that it contains cryptic diversity. Since the last taxonomic review, morphological and molecular works lead to the reappraisal and redescription of some species under *R. quelen* synonymy; as well as to proposed split the complex into two markedly divergent groups, the cis-andean and tras-andean populations.

Although *Rhamdia quelen* has been studied from different disciplines, each of them was carried out independently. The aim of this work was employed a multidisciplinary approach to figure out if *R. quelen* populations from Paraná and Uruguay River basins in Misiones (Argentina) differs among themselves. Molecular, morphological and cytogenetical characters were employed following iterative taxonomy. The molecular defined lineages were employed as initial hypothesis then evaluated by the other characters sources. The molecular lineages were recovered as monophyletic clades by Parsimony and Maximum Likelihood, defined as putative species by the ABGD analysis and always had genetic distances greater than 3% among them. Subsequent morphological evaluation, only distinguished the Urugua-í endemic lineage QUE3, based on the skull depth, the short length of the supraoccipital process and the absence of the laterosensory pore s4. A remarkable phenotypic plasticity was observed in the remaining lineages which are not diagnosable from measurements, counts or even osteological characters. Finally, I could not make a comparison of cytogenetic characters due the low quality of chromosome preparations. However, based on counts and observations, I verified that populations from Misiones have $2n= 58$ with a karyotype macrostructure defined by the prevalence of biarmed chromosomes.

The delimitation of a complex species as *Rhamdia quelen* is a real challenge. Its wide Neotropical distribution and its long taxonomic history become more difficult this task but the implementation of integrative studies –as in this work- with collaborative work in Ichthyologic community, may help to understand the complexity of this group.

CAPÍTULO 1

Introducción general y objetivos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El concepto de especie y su delimitación

El concepto de especie ha sido y continúa siendo un tema controvertido dentro de la biología. Se han acuñado más de 25 conceptos de especie cuya implementación metodológica es muchas veces imposible. En la actualidad, el concepto más adoptado es el propuesto por de Queiroz (2007) que considera a las especies como “linajes poblacionales o metapoblacionales que evolucionan separadamente”. A pesar de esto, las metodologías y criterios aplicados a definir estos linajes suelen diferir. El método más utilizado en la delimitación de las especies es la morfología comparativa, aunque también se han aplicado la etología, fisiología y en los últimos años la biología molecular y la genética como disciplinas complementarias.

Los métodos morfológicos tradicionales discriminan lo que Cain (1954) denominó “morfoespecies” y en consecuencia, la taxonomía basada solamente en esta aproximación no es el estudio de la diversidad biológica en sí, sino el estudio de una de sus múltiples facetas, la diversidad morfológica. Esto no implica que las especies definidas de modo tradicional no sean válidas, en su lugar, las morfoespecies son hipótesis susceptibles de ser testadas desde diferentes disciplinas y con distintos sistemas de caracteres (Dayrat, 2005). Este proceder que sostiene la necesidad de integrar diferentes disciplinas en la delimitación de las unidades de diversidad biológica, es decir en la delimitación de las especies, ha sido implícita y ampliamente utilizado por los taxónomos tradicionales y más recientemente -asociado fundamentalmente a la aparición de la genética molecular-, algunos taxónomos lo denominaron “Taxonomía integrativa” (Dayrat; Will *et al.*, 2005). Aunque mayormente aceptado como marco teórico, la taxonomía integrativa no está libre de discusiones metodológicas (Padial *et al.*, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Schutze *et al.*, 2017) pero existe consenso en aceptar que una especie definida a partir de distintas fuentes de caracteres constituye una hipótesis más robusta que aquella definida en base a una sola (Padial *et al.*, 2010).

Se pueden distinguir dos enfoques en la aplicación de la taxonomía integrativa. El primero de ellos es un enfoque secuencial que utiliza la información de diferentes disciplinas -sin basarse en presunciones- para proponer hipótesis que luego son comparadas e interpretadas en un marco evolutivo (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). El segundo suele denominarse “taxonomía iterativa” (Yeates *et al.*, 2011) y a diferencia del anterior utiliza una hipótesis inicial basada en alguna de las metodologías (por ejemplo, morfología), que luego es puesta a prueba y continuamente evaluada por las otras disciplinas. En este trabajo he aplicado un enfoque

iterativo, considerando como hipótesis inicial cada uno de los linajes determinados en base a la información molecular e intentando corroborar esos linajes desde la morfología y la citogenética.

1.2. Marco taxonómico general

La fauna de peces neotropicales está dominada por los Ostariophysi, y dentro de ellos los Siluriformes ocupan un lugar preponderante. Su gran diversidad es el motivo por el cual, a pesar de los esfuerzos que se realizan al respecto, su conocimiento continúa siendo insuficiente. En este orden se incluyen 37 familias (Armbruster, 2011), una de las cuales - Heptapteridae- contiene especies y géneros vulgarmente conocidos como bagres. Según Bockmann & Guazzelli (2003), estos peces endémicos del Neotrópico, son uno de los miembros más representativos de los Siluriformes en pequeños cuerpos de agua y su gran abundancia en arroyos con densa vegetación y gran calidad de agua, los convierten en eficientes indicadores de salud ambiental.

La familia Heptapteridae fue concebida a principios del siglo XX (Regan, 1911), tomando diferentes denominaciones y ocupando distintas categorías taxonómicas hasta la actualidad (Gill, 1862; Lundberg *et al.*, 1991; de Pinna, 1998; Bockmann & Guazzelli, 2003). Su reconocimiento como Familia, en el sentido actual, fue propuesto por Bockmann & Guazzelli (2003), basándose principalmente en los trabajos de Lundberg *et al.* (1991) y de Pinna *et al.* (1998) quienes definieron la monofilia del clado en base a 5 sinapomorfías:

- Borde posterior del proceso transversal de la cuarta vertebra expandido lateralmente sobre la vejiga natatoria y con una o varias hendiduras.
- Espina neural del complejo de Weber unido por una lámina ósea horizontal o apenas elevada.
- Proceso de la hiomandíbula para inserción del músculo “levator operculi” muy expandido.
- Cuadrado con margen dorsal bifido y libre.
- Presencia de un proceso anterior del mesetmoides recurvado.

A pesar de que la familia *Heptapteridae* está claramente diagnosticada por sus caracteres anatómicos, carecen de rasgos morfológicos (externos) únicos que permitan su diferenciación de otros miembros de las familias *Pimelodidae* y *Pseudopimelodidae* (Bockmann & Guazzelli, 2003). Así mismo, su taxonomía está pobremente desarrollada tanto a nivel genérico como específico. Sus géneros y especies están definidos, principalmente, en base a combinaciones de caracteres no exclusivos, que ocasionalmente, generan grandes dificultades en la delimitación y categorización de las mismas. La tesis doctoral de Bockmann (1998) constituye

el primer intento de diagnóstico a partir de caracteres con valor filogenético, sin embargo sus resultados nunca fueron formalmente publicados. Entre los géneros que cuentan con diagnósticos basados en metodología cladística encontramos: *Gladioglanis* (Lundberg *et al.*, 1991), *Mastiglanis* (Bockmann, 1994), *Nemuroglanis* (Bockmann & Ferraris, 2005), *Rhamdella* (Bockmann & Miquelarena, 2008) y *Rhamdiopsis* (Bockmann & Castro, 2010). Consideración especial requiere el género *Phreatobius* cuya monofilia es aceptada pero su ubicación taxonómica a nivel supragenérico continúa irresuelta (Shibatta *et al.*, 2007).

En la actualidad, la familia Heptapteridae contiene 218 especies válidas, aunque se han descrito alrededor de 300 especies nominales (Fricke & Fong, 2018). Esta riqueza específica se distribuye en 24 géneros, entre los cuales *Pimelodella* y *Rhamdia* agrupan alrededor del 50% de las especies.

El género *Rhamdia* fue erigido por Bleeker (1858) y desde las épocas más tempranas de su historia, ha sido discutido por los taxónomos. Es un género de distribución geográfica extensa, hallándose desde México hasta la región pampeana en Argentina. Su última revisión taxonómica fue llevada adelante por Silfvergrip (1996) quien ofrece el diagnóstico aceptado hasta la actualidad, así como también una meticulosa descripción de su historia nomenclatural. En dicha publicación este autor reconoce como válidas 11 especies de *Rhamdia*, a saber: *R. foina* (Müller & Troschel 1849), *R. humilis* (Günther 1864), *R. itacaiunas* Silfvergrip 1996, *R. jequitinhonha* Silfvergrip 1996, *R. laticauda* (Kner 1858), *R. laukidi* Bleeker 1858, *R. muelleri* (Günther 1864), *R. nicaraguensis* (Günther 1864), *R. poeyi* Eigenmann & Eigenmann 1888, *R. quelen* (Quoy & Gaimard 1824) y *R. xequetepeque* Silfvergrip 1996.

La verosimilitud del acto nomenclatural de Silfvergrip ha sido cuestionada en numerosas ocasiones (Weber & Wilkens 1998, Weber *et al.*, 2003; Bichuette y Trajano, 2005; Garavello & Shibatta, 2016; Angrizani & Malabarba, 2018) y los ictiólogos en general consideran que algunas especies de *Rhamdia* constituyen complejos de especies. Numerosos trabajos aplicando técnicas citogenéticas y moleculares apoyan esta hipótesis (Perdices *et al.*, 2002; García *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011; Splendore de Borja *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017) sobre todo en relación a la especie nominal *Rhamdia quelen*. Uno de los puntos más discutidos, es la sinonimización de especies troglobíticas a especies epigeas. Silfvergrip justifica este acto basándose en la simpatria y la ausencia de caracteres morfológicos distintivos entre las poblaciones troglobíticas de *R. reddelli* Miller 1984 y *R. zongolicensis* Wilkens 1993 y las poblaciones epigeas de *R. laticauda*. Sin embargo, Weber & Wilkens (1998) argumentan la existencia de barreras reproductivas entre estas poblaciones, además de los caracteres propios de este tipo de hábito que incluyen pigmentación reducida y ojos rudimentarios cubiertos por piel.

Desde la última revisión del género, se han descrito 6 nuevas especies: *Rhamdia macuspanensis* Weber & Wilkens 1998; *Rhamdia laluchensis* Weber, Allegrucci & Sbordoni 2003; *Rhamdia guasarensis* DoNascimento, Provenzano & Lundberg 2004; *Rhamdia enfurnada* Bichuette & Trajano 2005; *Rhamdia gabriellae* Angrizani & Malabarba 2018 y *Rhamdia euricephala* Angrizani & Malabarba 2018. Así también se han revalidado 8 especies nominales: *Rhamdia guatemalensis* (Günther 1864); *Rhamdia reddelli* Miller 1984; *Rhamdia parryi* Eigenmann & Eigenmann 1888; *Rhamdia zongolicensis* Wilkens 1993; *Rhamdia saijaensis* Rendahl 1941; *Rhamdia cinerascens* (Günther 1860); *Rhamdia branneri* Haseman 1911 y *Rhamdia voulezi* Haseman 1911. Según el catálogo *on-line* de Fricke *et al.* (2018), el género *Rhamdia* actualmente presenta 27 especies válidas. En este conteo incluye a *Rhamdia parvus* Boulenger 1898, la cual se considera *Incertae sedis* en Heptapteridae y a *Rhamdia schomburgkii* Bleeker 1858, la cual es un nombre de reemplazo para *Pimelodus maculatus* (*nec* La Cépède) Jardine 1841. Según Silfvergrip (1996) dada la descripción de los ejemplares tipo de *R. schomburgkii*, esta especie no pertenecería al género *Rhamdia*, aunque su verdadera identidad y ubicación son aún inciertas.

Rhamdia quelen es la especie tipo designada para el género. Paradójicamente es una de las especies más controvertidas del mismo. Descrita originalmente como *Pimelodus quelen*, su origen (localidad tipo) no es claro, dado que la información que se brinda en la publicación original, solo establece que los ejemplares provienen de Brasil. Además, la serie tipo probablemente se ha perdido, razón por lo cual Silfvergrip (1996) designó un Neotipo, estableciendo su origen en un tributario del río Samiria, en el departamento de Loreto, Perú. Este mismo autor, basado en caracteres morfológicos y merísticos, sinonimizó 48 especies bajo la denominación *R. quelen*. Los conflictos taxonómicos en este complejo son tales que Bockmann (Tesis no publicada) incluso sugiere que el conjunto de especies reconocidas por Silfvergrip (1996) como *R. quelen* no pertenecen en su totalidad al mismo género ya que algunas de ellas (*e.g.* *R. laticauda* Kner 1857) estarían emparentadas al género *Pimelodella*.

En Argentina, Ringuelet *et al.* (1967), basándose únicamente en datos merísticos y de morfología externa, indicaban la presencia de 4 especies diferentes de *Rhamdia*: *R. quelen*, *R. hilarii* (Valenciennes 1840), *R. sapo* (Valenciennes 1835) y *R. microps* Eigenmann 1917, aunque aclaraban que no hallaron ejemplares que concordaran con *R. quelen* y que los registros hasta entonces reportados de dicha especie corresponderían en realidad a *R. sapo*. De todos modos luego de la revisión de Silfvergrip (1996) todas estas especies fueron consideradas sinónimos *junior* de *R. quelen*.

Es claro que *Rhamdia quelen* es una especie conflictiva desde un abordaje morfológico clásico. Sin embargo en las últimas décadas, la aplicación de técnicas citogenéticas y

moleculares han aportado información útil para intentar resolver las relaciones dentro de este grupo. Es así que se han publicado trabajos de citogenética (Abucarma & Martins-Santos, 2001; García *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011), otros moleculares (Perdices *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017) e incluso ecomorfológicos (Mise *et al.*, 2013). La mayoría de ellos apoyan la hipótesis de que *Rhamdia quelen* (sensu Silfvergrip) es un complejo de especies. Así mismo, las especies *R. guatemalensis*, *R. branneri*, *R. voulezi* y *R. saijaensis* sinonimizadas bajo *R. quelen* por Silfvergrip, han sido revalidadas en los últimos años basadas en estas nuevas fuentes de evidencia (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015; Garavello & Shibatta, 2016).

Finalmente, es interesante destacar que *Rhamdia quelen* constituye una especie con creciente interés en programas de piscicultura, debido a su tasa de crecimiento elevado, buen rendimiento de carne y fácil manejo reproductivo en climas subtropicales (Gomes *et al.*, 2000; Francalossi *et al.*, 2004). Este bagre constituye una de las especies nativas más comercializadas en Brasil (Scaranto *et al.*, 2018) ya sea que provengan de la pesca artesanal o emprendimientos piscícolas. En nuestro país, dos centros cultivan experimentalmente esta especie y un tercero lo cultiva a nivel de producción preindustrial. En Paraguay, se produce en la Estación de Piscicultura de Yacyretá y el Departamento de Pesca y Acuicultura de la Universidad Nacional de Asunción. Mientras que en Uruguay se lo cultiva en las zonas arroceras de Cerro Largo, Treinta y Tres y Rocha (FAO, 2010). Además debido a su explotación comercial y manejo pesquero *R. quelen* fue definida una especie prioritaria en programas de conservación (Loureiro *et al.*, 2013). En este marco, la determinación del estatus taxonómico de *R. quelen* es fundamental dado que proveerá información útil para el establecimiento de mejores programas de cría, programas de conservación de recursos ícticos y finalmente en la comprensión de su historia evolutiva.

En base a todos estos antecedentes considero que la especie nominal *Rhamdia quelen* es un modelo interesante cuyo estudio es necesario abordar desde un enfoque integrativo, en vista a resolver las complejas relaciones que se suscitan entre sus poblaciones.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo principal incrementar el conocimiento actual sobre una de las especies más discutidas y complejas de la sistemática neotropical. Mediante un enfoque multidisciplinario se intentará determinar si existen diferencias entre las poblaciones de la

especie nominal *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824 de los ríos Paraná y Uruguay a fin de evaluar la hipótesis general de que *R. quelen* constituye un complejo de especies.

2.2. Objetivos Particulares

- Describir y comparar en detalle la morfología externa de distintas poblaciones de *Rhamdia quelen* pertenecientes a las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay.
- Evaluar la existencia de variaciones osteológicas en las diferentes poblaciones analizadas.
- Caracterizar citogenéticamente distintas poblaciones de *Rhamdia quelen* en las cuencas mencionadas.
- Determinar la diversidad molecular de *Rhamdia quelen* a través del estudio de secuencias de genes mitocondriales (COI, CYTB).
- Corroborar si los datos obtenidos permiten diferenciar más de una especie de *Rhamdia*.
- Establecer las bases para futuros estudios osteológicos, cariotípicos y moleculares de géneros y especies relacionadas como *Pimelodella*, *Imparfinis* y *Heptapterus*.

CAPÍTULO 2

Variación molecular en *Rhamdia quelen*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ADN y su utilidad como marcador molecular

El estudio de las relaciones entre los organismos se basa principalmente en la similitud homóloga, es decir, aquella que tiene un origen común y que es heredable. El ADN es el medio por el cual esas características son transferidas de generación en generación, y en este contexto, los marcadores moleculares constituyen una fuente importante de información para establecer relaciones genealógicas. Su variabilidad, su evolución y modos de herencia conocidos, presentan ciertas ventajas sobre caracteres tradicionales (morfológicos y fisiológicos) cuyos estados se hallan influidos por variables ambientales y en los cuales, las bases que regulan su herencia son poco conocidas (Avice, 2004).

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediada por una polimerasa termoestable (Saiki *et al.*, 1988) y la introducción de cebadores (*primers*) universales (Kocher *et al.*, 1989), permitieron la amplificación de secuencias génicas homólogas en organismos de diferentes taxones. Facilitando su implementación como caracteres en estudios sistemáticos, los cuales resultaron efectivos en su aplicación tanto a niveles de población como en rangos taxonómicos de mayor jerarquía (Lydeard & Roe, 1997; Stepien & Kocher, 1997).

Las propiedades inherentes a las secuencias de ADN les confieren características ventajosas para su aplicación en análisis sistemáticos. La cantidad de caracteres potencialmente utilizables es de una magnitud extraordinaria, virtualmente cada posición en una secuencia de ADN puede ser utilizada como fuente de información. Por otra parte, cada gen así como cada sitio individual dentro de este, evoluciona a una tasa única dependiente de las restricciones a nivel funcional. Así, genes de evolución lenta como el 18S rDNA son útiles en estudios de taxones altamente divergentes mientras que genes de evolución relativamente rápida, como la región control del ADN mitocondrial (ADNmt), son útiles para el discernimiento de relaciones a nivel de especie y por debajo de este (Hillis *et al.*, 1987; Stepien & Kocher, 1997). No obstante ello las secuencias de ADN no son ajenas a las dificultades a la hora del establecimiento de homologías (Funk & Omland, 2003; Rubinoff *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008).

Según Meier (2008) la utilización de secuencias para la resolución de problemas taxonómicos cobra importancia durante los años 90. En un principio fueron aplicados para estudiar relaciones filogenéticas entre rangos taxonómicos por encima de especie y posteriormente demostraron ser útiles en la evaluación de la diversidad genética por debajo de este nivel. Inicialmente, los taxónomos de formación clásica y los biólogos moleculares iniciaron colaboraciones a fin de establecer los límites específicos de taxones particularmente

problemáticos (Frost *et al.*, 1998) y posteriormente, las secuencias comenzaron a aplicarse en el estudio de fenómenos al nivel de especie y poblaciones. Incluso, surgieron las primeras ideas sobre la necesidad de establecer secuencias que actúen como marcadores en un amplio rango de taxones y el desarrollo de bases de datos que se utilicen como marcos de referencias (Caterino *et al.*, 2000). Por otra parte, la mayor disponibilidad de secuencias y la disminución en los costos operativos, permitieron su aplicación en la genética de poblaciones y facilitaron los estudios filogeográficos (Avice, 1987; 2000). En la actualidad, el desarrollo tecnológico, el surgimiento de nuevas técnicas en el campo de la genética molecular y la implementación de programas bioinformáticos para el análisis de grandes volúmenes de datos, han propiciado un aumento exponencial en la aplicación de marcadores moleculares en el campo de la sistemática.

En general, existe concordancia en las relaciones obtenidas mediante morfología y secuencias a partir de “datasets” independientes (Miyamoto and Fitch, 1995; Goloboff *et al.*, 2009). Sin embargo, en algunos casos, la aplicación de estudios moleculares puso de manifiesto la existencia de mayor diversidad genética que la esperada dentro de algunas especies, empleándose el término “especies crípticas” para definir especies tradicionales que contendrían múltiples especies (Bickford *et al.*, 2007). La tendencia actual es hacia una taxonomía integrativa (Dayrat, 2005) donde las herramientas moleculares se apliquen conjuntamente a otras disciplinas en la delimitación de los taxones.

1.2. El ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial es uno de los marcadores moleculares más aplicados en los estudios filogenéticos y filogeográficos. Avice (1987) sugiere que el ADNmt de los animales cumple en gran medida con todas las propiedades deseadas en un sistema molecular ideal que se aplique a estudios filogenéticos. Tales propiedades incluyen: a) Ser distintivo y a su vez ampliamente distribuido posibilitando comparaciones homólogas entre una amplia variedad de organismos; b) Ser fácil de aislar y analizar; c) Presentar una estructura genética simple, carente de ADN repetitivo, transposones, pseudogenes e intrones; d) Exhibir un modo de transmisión directa (clonal), sin recombinación u otro tipo de rearrreglo genético (genoma haploide no recombinante); e) Proporcionar conjuntos de estados de carácter cualitativos susceptibles de ser analizados filogeográficamente y filogenéticamente; f) Evolucionar a una tasa relativamente rápida tal que los nuevos estados de carácter comúnmente surjan dentro del periodo de vida de una especie.

Sin embargo, no todas estas propiedades son siempre ventajosas. La herencia materna del ADNmt es un arma de doble filo dado que genera un sesgo genealógico. La filogenia molecular

más verosímil de los organismos, es aquella obtenida a partir del conjunto de genes que la componen y que se reciben tanto por vía materna como paterna. Las tasas de evolución por otra parte, se asocian a dos cuestiones a tener en cuenta: la homoplasia y el modelo de neutralidad. En el primer caso, si la tasa de evolución en una posición determinada es rápida respecto del tiempo de separación de los linajes -y dado que los estados de carácter asumibles son limitados- un determinado estado puede ser considerado ancestral, cuando en realidad no lo es (Aquadro *et al.*, 1983; Galtier *et al.*, 2009). En el segundo caso, no es correcto asumir que las substituciones en el ADNmt se acumulan siguiendo un modelo neutral, dado que algunas regiones de su genoma son más conservadas que otras debido a constricciones funcionales o presiones selectivas (Grivel, 1983; Ballard & Kreitman, 1995; Dowling *et al.*, 2008, Galtier *et al.*, 2009). Por otra parte, se han reportado casos de Heteroplasmia (Bermingham *et al.*, 1986), es decir que un individuo presenta más de un genotipo mitocondrial. Sin embargo, en la práctica esto parece ser la excepción y no la regla (Avise, 1987). Finalmente, las inferencias realizadas a partir de genes mitocondriales pueden verse afectadas por procesos como hibridación, separación incompleta de linajes y pseudogenes (Song *et al.*, 2008; Pereyra *et al.*, 2015).

Aún a pesar de las consideraciones antes mencionadas, el ADNmt constituye una de las herramientas más conveniente y accesible (en términos económicos y dentro de la biología molecular) para caracterizar la estructura genética de una especie. En el caso *Rhamdia*, si bien se han caracterizado algunos genes nucleares (Sullivan *et al.*, 2006; Vaz, *et al.*, 2010), el número de secuencias disponibles es muy bajo en comparación con las secuencias de genes mitocondriales. Entre los genes utilizados en estudio previos que incluyen especies del género *Rhamdia* se encuentran el Citocromo b (CYTB), las ATP sintasas 6 y 8 (ATPasa6/8) y la citocromo oxidasa 1 (COI). Estas secuencias provienen de estudios biogeográficos (Perdices *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017), estudios filogenéticos (Machordom & Doadrio, 2001) o bien son resultados de la iniciativa “barcode of life” (Valdez-Moreno *et al.*, 2009; de Carvalho *et al.*, 2011; Mabragaña *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2016; Ribolli *et al.*, 2017).

1.3. Citocromo B

El citocromo b (CYTB) es una proteína transmembrana, involucrada en el transporte de electrones y la generación de ATP en procariotas aerobios y mitocondrias de células eucariotas. Es probablemente, el gen mitocondrial mejor conocido en cuanto a estructura y función de sus productos proteicos (Esposti *et al.*, 1993). Contiene regiones que evolucionan rápidamente y otras mucho más conservadas, razón por la cual ha sido utilizada en estudios de

relaciones a diversas escalas, desde poblacionales (Perdices *et al.*, 2002) hasta sistemática de niveles superiores (Farias *et al.*, 2001; Hardman, 2005; Lydeard & Roe, 2008).

La utilización del CYTB como marcador molecular en peces precede a la de otros marcadores, siendo uno de los primeros genes aplicados a estudios filogenéticos, biogeográficos y poblacionales (Fariás *et al.*, 2001). Hasta el momento, el número de secuencias disponibles en GenBank que se asocian a especies del género *Rhamdia*, es superior al número de secuencias disponibles de cualquier otro gen.

En su estudio filogeográfico, Perdices *et al.*, (2002) aplicaron este marcador y a partir de sus resultados sugieren que los representantes de *Rhamdia quelen* en Mesoamérica son filogenéticamente distintos a los individuos Sudamericanos de esta especie, constituyendo *Rhamdia quelen* (*sensu* Silfvergrip) un grupo polifilético. Así mismo Hernández *et al.* (2015), ampliando el área muestral y anexando datos de morfología externa y morfometría, ratificaron los resultados de Perdices *et al.* (2002) y propusieron la revalidación de *Rhamdia guatemalensis*, *Rhamdia cinerascens* y *Rhamdia saijsensis*, hasta entonces sinonimizadas con *R. quelen* por Silfvergrip (1996). Recientemente Ríos *et al.* (2017) realizaron un estudio poblacional de la especie *R. quelen* a diferentes escalas biogeográficas. Sus resultados sugieren la presencia de 8 especies tentativas en el lado oeste de la cordillera de los Andes (transandino) y 8 especies tentativas entre las poblaciones del lado este (Cisandinas).

1.4. COI: el gen código de barra

La implementación de un sistema de identificación taxonómico basado en el análisis de la diversidad nucleotídica, fue formalmente propuesta por Tautz *et al.* (2003); quienes argumentaron que ante la crisis taxonómica -debido a una diversidad orgánica que supera abrumadoramente a los taxónomos tradicionales- la implementación de secuencias para la identificación de especies aceleraría el proceso de descripción, proyectando a futuro, una Taxonomía molecular basada en secuencias. Prácticamente en simultáneo a la propuesta de Tautz *et al.* (2003), Hebert *et al.* (2003 a) sugiere la utilización de las secuencias génicas que codifican la subunidad 1 de la enzima mitocondrial Citocromo Oxidasa C, como un sistema de código de barras para la identificación de las especies. La elección del mismo, se basa en la universalidad de “primers” en este gen y el rango de señal filogenética, que permite discriminar no solo especies cercanamente emparentadas sino también grupos filogeográficos dentro de la misma especie (Cox & Hebert 2001; Wares & Cunningham 2001).

A grandes rasgos la iniciativa “barcoding” consiste en la caracterización del gen COI en especies animales del mundo. Cada secuencia debe estar asociada a un “ejemplar tipo” o “voucher” identificado por un experto y conservado en un museo o colección de referencia.

Estas secuencias son entonces subidas a una base de datos global donde constituyen una etiqueta de la especie y parte de la biblioteca de secuencias disponibles como referencia para identificaciones posteriores, por mera comparación.

Bajo el modelo de código de barras, Hebert *et al.* (2003 b) proponen que el delineamiento de las especies y taxones de rango superior se base en el análisis de Neighbour Joining (NJ) y las estimaciones de la divergencia genética bajo el modelo Kimura 2 parámetros (K2P). Según estos autores, la mayoría de los taxones coespecíficos difieren en más del 2% mientras que la variación intraespecífica es menor al 1%. Establecen además que un criterio óptimo para la delimitación de una especie es el “barcode gap” o espacio entre códigos, definido como la diferencia entre la mayor distancia intraespecífica y la menor distancia interespecífica. Si este espacio existe, la menor distancia interespecífica debe ser, al menos, 10 veces mayor que la distancia intraespecífica (Hebert *et al.*, 2004a). A partir de estas premisas se han desarrollado una serie de trabajos que buscaban corroborar la efectividad del “barcoding” en distintos modelos. El primer intento por corroborar su efectividad en la discriminación de especies ícticas fue realizado por Ward *et al.* (2005). Estos autores analizaron las secuencias de 546 especies de Australasia, la mayoría de ellos de abolengo marino, aunque también se incluían algunas especies de agua dulce y otras estuarinas. Basados en las distancias genéticas (K2P) establecieron los valores medios, máximos y mínimos de variación para cada uno de los rangos taxonómicos (especies, géneros, familias, órdenes y clases) y afirmaron que la efectividad en la identificación de especies es del 100%. Estudios similares se realizaron sobre la ictiofauna neotropical, en general, acotadas a cuencas definidas (de Carvalho *et al.*, 2011; Mabrugaña *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2017). Las secuencias disponibles de este gen para *Rhamdia*, en general, son resultado de estos trabajos de relevamiento y corroboración.

El establecimiento del proyecto “Barcode of Life” (BOL), la creación del “Consortium for the barcode of life” (CBOL) y más recientemente el proyecto “International barcode of life” (iBOLD) han promovido fervorosamente la implementación del COI en los estudios taxonómicos. El éxito alcanzado por esta metodología, se refleja en el creciente número de trabajos que la aplican y otros tantos dedicados a su defensa (Hebert *et al.* 2004b; Packer *et al.*, 2009; Goldstein & DeSalle, 2011). Sin embargo, no está exento de críticas (Meyer & Paulay, 2005; Meier *et al.* 2006; Wiemers & Fiedler, 2007; Rubinoff *et al.*, 2006; Galtier *et al.*, 2009; Collins & Cruickshank, 2012; Pereyra *et al.*, 2016). Estas críticas apuntan fundamentalmente a tres cuestiones a saber:

- La utilización de secuencias mitocondriales y sus limitaciones inherentes (Ver sección anterior).
- Los criterios empleados en la delimitación de especies (distancias y gaps genéticos). Sobre todo a la implementación de métodos basados en distancias (NJ) y no en ancestralidad común.
- La implementación metodológica y conceptual de una taxonomía basada exclusivamente en secuencias.

La perspectiva actual y que se sigue en este trabajo, es considerar el gen código de barras, como una herramienta complementaria a las estrategias tradicionales empleadas en la identificación y delimitación de las especies (Dayrat, 2005; Padial *et al.*, 2010; Puillandre *et al.*, 2012; Kekkonnen & Hebert, 2014; Schutze *et al.*, 2017).

1.5. Filogenia molecular de *Rhamdia*

El conocimiento actual referente a la filogenia molecular del género *Rhamdia* se puede resumir en tres trabajos: dos de ellos se enfocan principalmente en las especies transandinas del género (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015) y solamente uno está orientado a las especies cisandinas (Ríos *et al.*, 2017). Este último trabajo es un estudio a distintos niveles geográficos, que pone énfasis en especímenes recolectados en la cuenca del río Uruguay y ríos que desembocan en la costa atlántica de la República Oriental del Uruguay. Todos difieren levemente en las metodologías aplicadas. Perdices *et al.* (2002) utilizó tres marcadores mitocondriales CYTB y las ATP sintasas 4 y 6. Estos genes fueron analizados independientemente y en conjunto por “neighbour joining” (NJ), ML y MP obteniéndose filogenias congruentes entre sí. Por su parte, Hernández *et al.* (2015) y Ríos *et al.* (2017) también utilizan el CYTB como marcador al cual aplicaron los análisis de MP, ML e inferencia Bayesiana (BI). El último autor utiliza además, dos metodologías para la delimitación de especies: “Generalized Mixed Yule Coalescent” (GMYC) y “Automatic Barcode Gap Discovery” (ABGD).

En este trabajo se decidió analizar secuencias de COI y CYTB, debido a su gran disponibilidad en bases de datos y su utilidad en los estudios poblacionales previos. Se espera que el estudio detallado de poblaciones pertenecientes a regiones geográficas no analizadas hasta el momento, pueda aportar a la resolución de los conflictos taxonómicos y contribuir a clarificar, *a posteriori*, las relaciones filogenéticas y biogeográficas del taxón.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de tejidos y extracción de ADN

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de tejido muscular conservado en alcohol 96°. Todas las muestras de tejido fueron debidamente referenciadas y se hallan asociadas a *vouchers*; los acrónimos que definen las secuencias son los mismos que para los ejemplares (Véase Apéndice 1: Material analizado). El proceso de extracción se realizó por medio de Kit Qiagen DNAeasy siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. El chequeo de ADN total se realizó mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1%.

2.2. Amplificación, purificación y secuenciación

Se amplificaron 2 genes mitocondriales: Citocromo oxidasa C (COI) y Citocromo b (CYTB). La amplificación mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se realizó a partir de 30 µl de reacción. La *mastermix* para cada reacción estuvo compuesta por:

- 17 µl de Agua ultrapura
- 3 µl de Buffer de Reacción (Genbiotech)
- 3 µl de DNTPs (2 µM)
- 2.4 µl de Cloruro de Magnesio
- 0.7 µl de cada *primer* (10 µM)
- 0.2 µl de Taq polimerasa (Genbiotech)
- 3 µl de ADN

En el caso particular del gen COI, el volumen utilizado para cada cebador fue de 0.35 µl dado que se utiliza un *cocktail* con 4 cebadores. Este *cocktail* fue propuestos por Ivanova *et al.* (2007) e incluye los cebadores (*primers*) VF2_t1; FishF2_t1; FishR2_t1; Fr1d_t1. Estos están adheridos a una cola de secuencia definida denominada M13 (Messing, 1983). La composición, longitud y referencias de estos *primers* se resumen en la tabla 1. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las propuesto por (Ward *et al.*, 2005) y consiste en un paso inicial de desnaturalización a 95°C (2 min), 30 ciclos sucesivos de desnaturalización a 94°C (30 seg), alineamiento a 54°C (30 seg) y extensión a 72°C (1 min) seguidos de un paso de extensión final a 72°C (10 min).

En el caso del gen CYTB, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1100 pb utilizando como *primer Forward* el oligonucleótido GLUDGL (Palumbi, 1996) y como *primer reverse* H16460 (Perdices *et al.*, 2002). El protocolo de PCR fue el empleado por Ríos *et al.*, 2017 y

consiste en un paso inicial de desnaturalización a 94°C (2 min), 30 ciclos sucesivos de desnaturalización a 94°C (1 min), alineamiento a 45°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min, 30 seg) seguidos de un paso de extensión final a 72°C (10 min). El resultado de la PCR fue verificado en gel de agarosa al 1%. Los productos de amplificación fueron purificados mediante el protocolo de Schmitz & Reisner (2006) con algunas modificaciones y luego secuenciados en ambas direcciones mediante secuenciador automático (Macrogen, Seoul, Korea).

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Long.	Referencia
COI	VF2_t1	TGTA AACGACGGCCAGT CAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	650 pb.	Ward <i>et al.</i> , 2005
	FishF2_t1	TGTA AACGACGGCCAGT CGACTAATCATAAAGATATCGGCAC		
	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGAC ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA		Ivannova <i>et al.</i> , 2007
	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGAC ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA		
CYTB	GluDGL	TGACCTGAARAACCAYCGTTG	1138 pb	Palumbi, 1996
	H16460	CGAYCTTCGGATTACAAGACCG		Perdices <i>et al.</i> , 2002.
Tag	M13F (-21)	TGTA AACGACGGCCAGT		Messing, 1983
	M13R-pUC (-40)	CAGGAAACAGCTATGAC		Mitchel, 2015

Tabla1: Cebadores utilizados en la amplificación de COI y CYTB

2.3. Edición y alineamiento de secuencias

Los cromatogramas fueron analizados mediante el programa Geneious V.151647451 (Technelysium Pty Ltd). Se revisaron tanto las secuencias sentido o *forward* (F) como las antisentido o *reverse* (R) en busca de discordancias, posibles errores en el establecimiento de las bases y picos dobles o dudosos. Se obtuvo la secuencia consenso para cada individuo y se editaron las mismas a fin de unificar el marco de lectura, corroborando ausencia de codones de *stop*.

Las bases de datos *Barcode of Life Database* (BOLD) y *GenBank* fueron empleadas para la búsqueda y descarga de todas las secuencias disponibles de los genes COI y CYTB para las especies del género *Rhamdia*. Así mismo se rescataron secuencias para ejemplares de *Pimelodella*, *Rhamdella* y *Heptapterus*. Estos tres géneros pertenecen a la Familia Heptapteridae y tanto *Pimelodella* como *Rhamdella* han sido utilizados como grupos externos en diferentes estudios moleculares aplicados a *Rhamdia* (Perdices *et al.*; 2002, Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017). La lista de secuencias utilizadas se expone en la tabla 2.

Las secuencias fueron alineadas por codones, utilizando los parámetros por defecto mediante la aplicación MAFFT (Kuraku *et al.*, 2013) incorporada en el software Geneious. Cuando se observaron diferencias de longitud entre las secuencias, ya sea en el extremo 3' o 5' de las mismas se decidió unificarlas tomando como parámetro la longitud de las secuencias

caracterizadas en la presente tesis. Algunas de las secuencias obtenidas de las bases de datos fueron eliminadas del alineamiento debido a su escasa longitud, presencia de numerosos nucleótidos no definidos o extrema divergencia respecto a las otras secuencias.

Cabe destacar, que entre los especímenes analizados en esta tesis, no todos los que fueron caracterizados para el gen COI lo fueron para el CYTB. Así mismo, para la descarga de las secuencias, se consideraron todas las denominaciones asociadas a *Rhamdia quelen* y otras especies del género. En el caso del COI se utilizaron todas las secuencias disponibles mientras que para CYTB se seleccionaron al azar de 3 a 5 individuos de cada una de ellas. No se analizaron todas las secuencias disponibles, ya que una gran parte de ellas, corresponden a especies de *Rhamdia* transandinas o bien a un mismo linaje como ocurre con el linaje Rq6 determinado por Ríos *et al.* (2017) que agrupa 155 secuencias.

2.4. Elección del Modelo de sustitución

El mejor modelo de sustitución para cada uno de los set de datos analizados se estableció mediante el programa JModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). La selección se basó en el criterio de selección de Akaike, considerando la verosimilitud del modelo (-lnL) y el número de parámetros (K). En el caso del gen COI el modelo seleccionado fue "General time reversible" (Tavaré, 1986) con distribución gamma y sitios invariables (GTR+I+G) (-lnL= 2799.83; K= 304). Este modelo presenta frecuencias variables de bases, tasas de transversión idénticas pero tasas de transición variables.

En el caso del CYTB el modelo seleccionado fue el de Tamura-Nei (1993) con sitios invariables y distribución gamma (TrN+I+G)(-lnL= 5200.77; k= 249). Este modelo también presenta frecuencia variable de bases, aunque aplica una matriz simétrica de sustitución.

2.5. Variación genética de las secuencias de COI y CYTB

El polimorfismo de las secuencias se estimó a partir de número de sitios variables y sitios filogenéticamente informativos. También se estimaron: la diversidad nucleotídica, entendida como el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias escogidas al azar (Nei y Li, 1979) y la diversidad haplotípica, que es la probabilidad de que dos secuencias seleccionadas al azar sean diferentes (Nei, 1987). Para ello fue empleado el programa DNAsp V5 (Librado y Rozas, 2009), desde donde se exportaron los archivos a NETWORK v.5.0.0.3 (Bandelt *et al.*, 1999) para construir las redes de haplotipos que luego fueron editadas con CorelDRAW Graphics Suite (Corel Corporation).

2.6. Delimitación de especies hipotéticas en *Rhamdia*

El método ABGD, de sus siglas en inglés “*Automatic Barcode Gap Discovery*” (Puillandre *et al.*, 2012) es un procedimiento automático que agrupa las secuencias en especies hipotéticas basados en una matriz de distancias y el supuesto de espacio entre códigos de barra (*Barcode gap*). Para ello, establece previamente un rango de divergencia intraespecífica e infiere de los datos un límite de confianza unilateral basado en el modelo.

El análisis se realizó a través del portal <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/> (Fecha del análisis 03/05/2018) utilizando las distancias K2P y estableciendo la amplitud relativa del gap en 2; los valores de divergencia mínimos y máximos (establecidos a priori) fueron 0.001 y 0.1 respectivamente. Posteriormente a partir de los grupos definidos por el ABGD se calcularon las distancias genéticas intra e intergrupos mediante el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

2.7. Inferencia Filogenética

Se aplicaron dos tipos de análisis para establecer las relaciones filogenéticas entre distintas secuencias pertenecientes a especímenes clasificados como *Rhamdia*. Un método basado en modelos probabilísticos (Máxima verosimilitud o *Maximum likelihood*) y otro no basado en modelos (Máxima Parsimonia). Los análisis se realizaron primero para cada uno de los genes por separado y luego combinados para los ejemplares con caracterización de ambos genes.

Cada análisis de Máxima verosimilitud (ML) se realizó mediante el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), aplicando el modelo seleccionado previamente por el JModelTest. Los *gaps* y entradas faltantes se trataron como deleciones parciales y el soporte fue calculado mediante el método de *bootstrap* (1000 réplicas). Todos los demás parámetros se utilizaron en su configuración por defecto.

El análisis de máxima parsimonia (MP) se llevó adelante con el programa TNT (Goloboff & Catalano, 2016). Para el análisis de los genes por separado se aplicó una búsqueda heurística (10 *random seeds* y 10000 réplicas) y como algoritmo de intercambio se seleccionó TBR (*Tree bisection reconnection*). El soporte estadístico se testeó mediante *bootstrapping* (1000 réplicas).

El análisis de los genes en conjunto incluyó 1645 caracteres (cada uno de los sitios) y 35 terminales correspondientes a cada una de las secuencias, 33 correspondientes al *in-group* y 2 al *outgroup*. Como grupo externo se utilizaron secuencias de *Pimelodella chagresi* y *Heptapterus panamensis*. Dado que no existen en las bases de datos secuencias de ambos genes para un mismo *voucher*, se seleccionaron aquellas correspondientes a ejemplares topotípicos. En este caso se llevó adelante una búsqueda exacta para el árbol más parsimonioso.

En todos los casos, las secuencias de *Heptapterus* fueron empleadas para enraizar los árboles. Los cladogramas obtenidos por ambas metodologías fueron editados con los programas TreeGraph2 (Stöver *et al.*, 2010) y CorelDRAW Graphics Suite (Corel Corporation).

3. RESULTADOS

3.1. Polimorfismo de los genes COI y CYTB en *Rhamdia*

El gen COI fue secuenciado en 69 especímenes determinados como *Rhamdia quelen*. Dichos ejemplares provenían de distintas cuencas de los ríos Paraná y Uruguay. Adicionalmente se secuenciaron especímenes de los ríos Iguazú y Bermejo (Tabla 2; Véase también Mapa Capítulo 3) con fines comparativos. Todas estas secuencias fueron analizadas en conjunto con otras 78 obtenidas de bases de datos (GenBank, BOLD) y que corresponden a diferentes especies de *Rhamdia*, *Pimelodella* y *Heptapterus*. De los 618 sitios analizados en este gen, 88 fueron polimórficos y 80 resultaron filogenéticamente informativos. Se detectaron 34 haplotipos en el género *Rhamdia* y la diversidad haplotípica calculada fue alta 0.9277.

En el caso del CYTB, se analizaron 117 secuencias correspondientes al género *Rhamdia*. Sin embargo, solo 35 corresponden a especímenes estudiados en este trabajo y 87 provienen de GenBank. La disminución en el número de ejemplares secuenciados para CYTB en relación a COI se debió a una cuestión presupuestaria y a que muchos de los especímenes analizados para el gen COI presentaban secuencias idénticas. El análisis de este gen detectó 209 sitios polimórficos para el género, 174 de ellos filogenéticamente informativos. Así también, se determinaron 63 haplotipos con diversidad haplotípica de 0.977 y diversidad nucleotídica 0.06.

El análisis de ambos genes en conjunto detectó 147 sitios polimórficos de los cuales 139 resultaron filogenéticamente informativos y la diversidad haplotípica fue de 0.966 con 21 haplotipos detectados. Los haplotipos de COI y CYTB a los que pertenecen cada uno de los ejemplares analizados, pueden observarse en la Tabla 2.

3.2. Especies hipotéticas de *Rhamdia*

El método ABGD (“Automatic Barcode Gap Discovery”) fue aplicado a las secuencias de cada gen por separado y a la matriz combinada. En todos los casos, los especímenes caracterizados durante esta tesis conformaron los mismos agrupamientos, hallándose 5 linajes o especies hipotéticas en la región estudiada. La delimitación de los mismos se realizó a partir del alineamiento que luego fue utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos, incluyendo especímenes de *Rhamdia* cisandinos, transandinos y los grupos externos. En la Tabla 2 se pueden observar el linaje y el origen geográfico de cada uno de los ejemplares

analizados. Así mismo, en las Figuras 1, 2 y 3 se pueden distinguir qué clados (definidos por Parsimonia y ML) resultaron definidos como especies hipotéticas.

Tabla 2: Secuencias analizadas. Se indican el nombre de la especie, cuenca o localidad de la que provienen, acrónimo de identificación (ID), linaje al cual fue asignado y haplotipo al que pertenece. Los números de Referencias (REF) se indican al final de la tabla.

ESPECIE	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO		
					COI	CYTB	
<i>R. quelen</i>	Ar. San Juan; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP56		QUE-1	H4	H33	
		LGEP77		QUE-1	H4	H37	
	Ar. Tabay; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP118		QUE-2	H17		
		LGEP123		QUE-1	H1	H35	
	Ar. Garupá; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP129		QUE-4	H11	H19	
		LGEP130		QUE-4	H11		
		LGEP131		QUE-1	H1	H38	
		LGEP139		QUE-2	H13	H22	
		LGEP161		QUE-4	H11	H19	
		LGEP162		QUE-4	H18	H21	
		Ar. Concepción; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP175		QUE-1	H2	H39
	LGEP176			QUE-1		H37	
	LGEP178			QUE-1	H2		
	LGEP189			QUE-1	H1	H36	
	LGEP190			QUE-1	H1	H36	
	LGEP191			QUE-1	H2	H33	
	LGEP198			QUE-1	H1	H36	
	Ar. Cuña Pirú; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP198		QUE-1	H1	H36	
	Ar. Isla chico; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP210		QUE-1	H1		
		LGEP211		QUE-1	H1	H40	
		LGEP212		QUE-1	H1		
		LGEP213		QUE-1	H1	H40	
		LGEP214		QUE-1	H1		
		LGEP224		QUE-1	H1	H40	
		LGEP260		QUE-1	H2	H41	
	Ar. Panambí; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP260		QUE-1	H2	H41	
	Ar. Ramos; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP298		QUE-1	H2	H41	
	Ar. Bonito; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP299		QUE-1	H10	H41	
		LGEP300		QUE-1	H1	H42	
		LGEP302		QUE-1	H2		
		LGEP303		QUE-1	H2		
		LGEP341		QUE-1	H3	H37	
	Ar. 3 de Mayo; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP341		QUE-1	H3	H37	
		Ar. Uruzú; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP375		QUE-3	H12	
			LGEP376		QUE-3	H12	
			LGEP377		QUE-3	H12	H47
			LGEP378		QUE-3	H12	H47
	LGEP379		QUE-3	H12			
	Ar. Melo; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP389		QUE-1	H1	H42	

Tabla 2 (Cont.)
ESPECIE

ESPECIE	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO	
					COI	CYTB
<i>R. quelen</i>	Ar. Portera; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP406		QUE-1	H1	
		LGEP412		QUE-4	H18	
	Ar. Cuña Pirú; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP414		QUE-2	H17	H23
	Ar. Garupá; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP430		QUE-4	H11	
	Ar. El Rey; Cuenca del Paraná (Sta Fe)	LGEP447		QUE-4	H11	
	Ar. San Juan; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP478		QUE-2	H13	H22
		LGEP492		QUE-4	H18	H21
		LGEP493		QUE-4	H11	H25
	Ar. Acaraguá; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP510		QUE-1	H2	
	Ar. Melo; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP526		QUE-1	H1	H42
		LGEP527		QUE-1	H1	
	Ar. Isla chico; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP540		QUE-1	H1	
	Ar. Santa Rita; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP598		QUE-1	H1	
		LGEP599		QUE-1	H1	
		LGEP606		QUE-1	H1	
	Ar. Santa Rita; Cuenca del Uruguay (Mnes)	LGEP607		QUE-1	H1	
		LGEP608		QUE-1	H1	
		LGEP609		QUE-2	H19	H24
	Ar. Tabay; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP614		QUE-4	H11	H19
	Ar. El Rey; Cuenca del Paraná (Sta Fe)	LGEP713		QUE-3	H12	
	Ar. Uruzú; Cuenca del Paraná (Mnes)	LGEP714		QUE-3	H12	
		LGEP715		QUE-3	H12	
		LGEP716		QUE-3	H12	
		LGEP717		QUE-3	H12	
		LGEP734		QUE-4	H31	
	Río Paraná (Sta Fe)	LGEP764		QUE-4	H11	
		LGEP777		QUE-4	H18	H21
		LGEP778		QUE-4	H18	
	Río Bermejo	FML		QUE-4	H11	
	Ar. Tateto; Cuenca río Iguazú (Mnes)	MB1		QUE-5	H14	
		MB7		QUE-5	H14	
		TAT1		QUE-5	H14	
		TAT2		QUE-5	H14	
	Río Bermejo	TUC24		QUE-4	H11	H20
	Guyana	AY036739	1	QUE-13		H18
	Cuenca Amazonas (Perú)	AY036740	1	QUE-12		H17
		AY036741	1	QUE-12		H17
	Cuenca Paraná (Ctes. ARG.)	AY036742	1	QUE-4		H55
	Cuenca Iguazú (Mnes, ARG.)	AY036743	1	QUE-8		H29
		AY036744	1	QUE-8		H29
	México	BACQ095	2	GUA-2	H20	
	Cuenca São Fransisco (MG, BR.)	BSB006	3	QUE-1	H5	
		BSB025	3	QUE-1	H6	
		BSB062	3	QUE-1	H5	
		BSB108	3	QUE-1	H5	

Tabla 2 (Cont.)
ESPECIE

	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO	
					COI	CYTB
<i>R. quelen</i>	Cuenca São Fransisco (MG, BR.)	BSB209	3	QUE-1	H5	
		BSB377	3	QUE-1	H5	
	No informa	DQ119395	4	QUE-13		H18
	Ar. El divisorio (BsAs, ARG.)	FARGB235	5	BRA	H22	
		FARGB236	5	BRA	H22	
		FARGB250	5	BRA	H21	
	Río Paraná, (BsAs, ARG.)	FARGB297	5	BRA	H21	
		FARGB365	5	BRA	H21	
	Cuenca Paraiba do Sul (SP, BR.)	FPSR094	6	QUE-6	H23	
		FPSR095	6	QUE-6	H23	
		FPSR096	6	QUE-6	H23	
		FPSR097	6	QUE-6	H23	
		FPSR098	6	QUE-6	H23	
	Paraná Superior (GO, BR.)	FUPR777	7	QUE-1	H7	
	Paraná Superior (GO, BR.)	FUPR778	7	QUE-1	H8	
		FUPR779	7	QUE-1	H5	
	SP, BR.	GBGCA7590	8	QUE-1	H9	
	Cuenca Amazonas (Bolivia)	KT952435	9	QUE-7	H32	
	Río Cuareim, Cuenca Uruguay (UY)	KP798651	10	QUE-1		H32
	Río Queguay, Cuenca Uruguay (UY)	KP798663	10	QUE-1		H33
	Villa Constitución, Uruguay River (UY)	KP798673	10	QUE-4		H58
		KP798676	10	QUE-4		H20
	Laguna Rocha, Costa Atlantica (UY)	KP798682	10	QUE-11		H31
	Laguna Castillo, costa atlantica (UY)	KP798702	10	QUE-11		H31
		KP798717	10	QUE-11		H53
		KP798719	10	QUE-11		H31
		KP798727	10	QUE-11		H53
	Río Queguay, Cuenca Uruguay (UY)	KP798737	10	QUE-1		H37
	Laguna Merín (UY)	KP798746	10	QUE-11		H34
	Río Arapey, cuenca Uruguay (UY)	KP798755	10	QUE-11		H54
	Laguna Blanca, Costa Atlantica (UY)	KP798760	10	QUE-11		H34
	Río Queguay, Cuenca Uruguay (UY)	KP798762	10	QUE-4		H19
	Laguna Castillo, costa atlantica	KP798767	10	QUE-11		H31
	Laguna Castillo, costa atlantica (UY)	KP798769	10	QUE-11		H31
	Laguna sauce, cuenca del Plata (UY)	KP798773	10	QUE-11		H31
		KP798775	10	QUE-11		H30
		KP798805	10	QUE-11		H31
	Río Iguazú (PR, BR)	KR423989	11	QUE-10		H57
		KR423990	11	QUE-10		H43
		KR423991	11	QUE-9		H52
		KR423992	11	QUE-9		H51
		KR423993	11	QUE-9		H56
		KR423994	11	QUE-9		H50
		KR423995	11	QUE-11		H31

Tabla 2 (Cont.)

ESPECIE	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO		
					COI	CYTB	
<i>R. quelen</i>	Río Iguazú (PR, BR)	KR423997	11	QUE-10		H44	
		KR423998	11	QUE-11		H31	
		KR423999	11	QUE-10		H62	
		KR424000	11	QUE-10		H43	
		KR424001	11	QUE-10		H48	
		Caraguata, río Negro (UY)	KX379742	10	QUE-11		H31
		Laguna Merín (UY)	KX379743	10	QUE-1		H37
		Río Cuareim, Cuenca Uruguay (UY)	KX379745	10	QUE-1		H37
		Laguna Merín (UY)	KX379746	10	QUE-1		H49
		Rincón del Bonete, Río Negro (UY)	KX379748	10	QUE-1		H37
		Río Arapey, cuenca Uruguay (UY)	KX379753	10	QUE-1		H37
			KX379754	10	QUE-1		H42
			KX379755	10	QUE-1		H37
			KX379756	10	QUE-1		H36
			KX379757	10	QUE-1		H33
	KX379758		10	QUE-1		H37	
	Río Queguay, Cuenca Uruguay (UY)	KX379762	10	QUE-1		H33	
		KX379763	10	QUE-1		H33	
	Cuenca río Itapecuru (MA, BR.)	ITAPE403	12	QUE-7	H15		
		ITAPE404	12	QUE-7	H16		
	Cuenca Paraná inferior (Ros, ARG.)	LARI368	13	BRA	H21		
	México	MEFM470	14	GUA-2	H20		
	México	MEFM471	14	GUA-2	H20		
		MEFM472	14	GUA-2	H20		
		MEFM473	14	GUA-2	H20		
		MEFM474	14	GUA-2	H20		
		MEFM475	14	GUA-2	H20		
	Guatemala	MEFM528	14	GUA-1	H24		
		MEFM529	14	GUA-1	H25		
		MEFM655	14	GUA-1	H24		
	Cuenca del Mucurí (MG, BR.)	MUCU033	15	QUE-6	H30		
		MUCU083	15	QUE-6	H30		
	<i>R. branneri</i>	Río Iguazú (PR, BR.)	BRH001	16	BRA	H21	
BRH002			16	BRA	H21		
BRH003			16	BRA	H21		
BRH004			16	BRA	H21		
BRH005			16	BRA	H21		
BRH006			16	BRA	H21		
BRH007			16	BRA	H21		
BRH008			16	BRA	H21		
BRH009			16	BRA	H21		
BRH010			16	BRA	H21		
BRH011			16	BRA	H21		
BRH012			16	BRA	H21		
<i>R. aff. cabreræ</i>	Guatemala	AY036717	1	CAB-1		H12	

Tabla 2 (Cont.)

ESPECIE	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO	
					COI	CYTB
<i>R. aff. cabreræ</i>	Honduras	AY036725	1	CAB-2		H8
		AY036726	1	CAB-2		H8
<i>R. cinerascens</i>	Ecuador	AY036735	1	CIN		H60
		AY036736	1	CIN		H60
<i>R. guatemalensis</i>	Guatemala	AY036632	1	GUA-1		H63
		AY036642	1	GUA-3		H16
	Costa Rica	AY036672	1	GUA-4		H46
	Cuenca Magdalena (Colombia)	KM489091	17	GUA-2		H26
		KM489101	17	GUA-2		H14
	Cuenca Catatumbo (Colombia)	KM489102	17	GUA-2		H28
	Guatemala	MEFM531	14	GUA-2	H26	
<i>R. guatemalensis</i>	México	HBGM265	18	GUA-2	H28	
		HBGM266	18	GUA-2	H20	
		HBGM267	18	GUA-2	H20	
		HBGM269	18	GUA-2	H20	
		HBGM270	18	GUA-2	H20	
		HBGM271	18	GUA-2	H20	
		HBGM272	18	GUA-2	H29	
		HBGM273	18	GUA-2	H20	
		HBGM274	18	GUA-2	H20	
		HBGM275	18	GUA-2	H20	
		HBGM276	18	GUA-2	H20	
		HBGM277	18	GUA-2	H20	
		HBGM278	18	GUA-2	H20	
		HBGM279	18	GUA-2	H20	
		HBGM280	18	GUA-2	H20	
		<i>R. laticauda</i>	México	AF287456	19	LAT-2
Guatemala	AY036708		1	LAT-1		H4
	AY036709		1	LAT-1		H3
<i>R. laukidi</i>	Cuenca Orinoco (Colombia)	KM489084	17	LAUK		H45
	Cuenca Orinoco (Venezuela)	AY036737	1	LAUK		H45
		AY036738	1	LAUK		H45
<i>R. nicaraguensis</i>	Costa Rica	AY036718	1	NIC		H6
		AY036719	1	NIC		H5
<i>R. parryi</i>	Guatemala	AY036702	1	PAR		H11
		AY036703	1	PAR		H2
<i>R. reddelli</i>	México	AY036697	1	LAT-2		H13
<i>R. aff. rogersi</i>	Nicaragua	AY036713	1	ROG-1		H10
	Panamá	AY036730	1	ROG-2		H9
		AY036734	1	ROG-3		H1
<i>R. saijaensis</i>	Costa Pacífica (Colombia)	KM489075	17	SAI		H61
		KM489076	17	SAI		H59
		KM489077	17	SAI		H59
<i>R. sape</i>	Lag. Mar Chiquita (BsAs, ARG.)	FARG317	20	BRA	H21	

Tabla 2 (Cont.)

ESPECIE	LOCALIDAD/ CUENCA	ID	REF	LINAJE	HAPLOTIPO	
					COI	CYTB
<i>Rhamdia sp</i>	Cuenca Amazonas (Bolivia)	KT952454	9	QUE-7	H33	
	Cuenca Amazonas (Perú)	KT952455	9	QUE-7	H34	
<i>R. voulezi</i>	Río Iguazú (PR, BR.)	BRH013	16	VOU	H27	
		BRH014	16	VOU	H27	
		BRH015	16	VOU	H27	
		BRH016	16	VOU	H27	
		BRH018	16	VOU	H27	
		BRH019	16	VOU	H27	
<i>R. aff. wagneri</i>	Cuenca Magdalena (Colombia)	AY036693	1	GUA-2		H27
	Lago Maracaibo (Venezuela)	AY036694	1	GUA-2		H15
		AY036695	1	GUA-2		H14
<i>Rhamdella sp</i>	Costa Atlántica (BR)	KF273107	21	COI		
<i>Rhamdella eriarcha</i>		KX379765	10	CYTB		
<i>Rhamdella longiuscula</i>		KX379764	10	CYTB		
<i>Pimelodella chagresi</i>	Panamá	AY036751	1	CYTB		
<i>Pimelodella gracilis</i>	Cuenca Paraná inferior (Ros, ARG.)	KU288913	13	COI		
		KU289024	13	COI		
<i>Heptapterus panamensis</i>	Panamá	MG936981	22	COI		
<i>Heptapterus multiradiatus</i>	Paraná Superior (PR, BR.)	GU701750	7	COI		
<i>Heptapterus sp</i>	Cuenca Iguazú (Mnes, ARG.)	AY036749	1	CYTB		

Referencias (REF): **1)** Perdices *et al.*, 2002; **2)** Gutierrez *et al.*, 2018; **3)** de Carvalho *et al.*, 2011; **4)** Hardman, 2005; **5)** Rosso *et al.*, 2012; **6)** Pereira *et al.*, 2011; **7)** Pereira *et al.*, 2013; **8)** Ferreira *et al.* (no pub); **9)** García-Dávila *et al.*, 2016; **10)** Ríos *et al.*, 2017; **11)** Tscha *et al.*, 2016; **12)** Barros *et al.* (no pub); **13)** Díaz *et al.*, 2016; **14)** Valdéz-Moreno *et al.*, 2009; **15)** Pompeu & Pimenta (no pub); **16)** Bombardelli (no pub); **17)** Hernández *et al.*, 2015; **18)** Soto-Galera (no pub); **19)** Machordam & Doadrio, 2001; **20)** Mabrugaña *et al.*, 2011; **21)** Reis *et al.*, 2014; **22)** Bermingham *et al.* (No pub).

En el caso particular del gen COI, se hallaron 11 linajes dentro del género *Rhamdia*. Dos de estos corresponden a ejemplares transandinos identificados como *R. guatemalensis*, mientras que los 9 restantes corresponden a especímenes cisandinos. Entre los últimos se encuentran ejemplares identificados en las bases de datos como *R. quelen*, *R. branneri*, *R. voulezi*, *R. sapo* y *Rhamdia sp*. Algunas de estas especies hipotéticas parecen ser endémicas y otras están ampliamente distribuidas. Si se consideran únicamente los límites geográficos de la provincia de Misiones, podemos encontrar 2 especies hipotéticas distribuidas en las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (QUE1 y QUE4), una hallada únicamente en la cuenca Paraná (QUE2) y otra que pareciera ser endémica de la cuenca del arroyo Urugua-í (QUE3). Además 4 individuos (MB1, MB7, TAT1 y TAT2) provenientes del arroyo Tateto, tributario del río Iguazú, constituyen

otro linaje (QUE5) que difiere de *R. branneri* (BRA) y *R. voulezi* (VOU), especies que se consideran endémicas del río Iguazú. Lamentablemente estos últimos ejemplares no pudieron ser secuenciados para el gen CytB.

Al analizar las secuencias de CytB el ABGD definió 26 especies hipotéticas dentro del género; entre éstas, 15 serían transandinas y 11 cisandinas. Dentro del grupo cisandino, uno de los linajes se corresponde con la especie *R. laukidi* (LAUK), mientras que los 10 restantes pertenecen a la especie nominal *R. quelen*. Como en el caso anterior algunas de estas especies tentativas tienen distribución amplia y otras parecen estar restringidas a ciertas cuencas. En los límites de la provincia de Misiones se pudieron identificar 5 linajes distintos (QUE1, QUE2, QUE3, QUE4 y QUE8). Por su parte el grupo de especies transandinas es bastante complejo. El ABGD reconoce las especies *R. saijaensis* (SAI), *R. cinerascens* (CIN), *R. nicaraguensis* (NIC) y *R. parryi* (PAR); sin embargo la especie *R. reddelli* que actualmente se considera válida no fue reconocida como tal, agrupándose dentro del linaje LAT-2 (*R. laticauda*). Así mismo se detectaron cuatro especies hipotéticas dentro de la especie nominal *R. guatemalensis* y cada una de las secuencias identificadas como *R. cabreræ* (CAB) conformó un linaje distinto, aún cuando este nombre se considera sinonimia de *R. laticauda* (LAT). Al igual que en *R. cabreræ*, cada una de las secuencias identificadas como *R. rogersi* (ROG) fue definido como un linaje diferente por el ABGD. Finalmente la especie *R. laticauda* parece estar constituida por dos linajes diferentes (LAT1 y LAT2).

3.3. Inferencia filogenética

La topología de los árboles obtenidos por MP y ML resultaron semejantes, ya sea en el caso del COI como del CYTB (Fig. 1-3). Ambas metodologías alcanzaron los mismos agrupamientos entre las secuencias estudiadas y los valores de soporte de cada uno de estos clados fueron semejantes independientemente de la metodología aplicada. En la tabla 2 y en las figuras indicadas se puede observar cómo los linajes QUE1, QUE2, QUE3 y QUE4 incluyen los mismos individuos para COI que para CYTB. Sin embargo, aunque cada uno de los clados se halla bien soportado, las relaciones entre ellos no están totalmente resueltas y en algunos casos difieren según el método de reconstrucción filogenética aplicado.

3.3.1. Relaciones basadas en COI

Mediante el análisis de parsimonia se obtuvieron 36 árboles de 442 pasos; el Índice de consistencia (IC) fue de 0.595 y el índice de retención (IR) de 0.938. Por su parte el árbol de máxima verosimilitud presentó $-\ln L = 2794.47$.

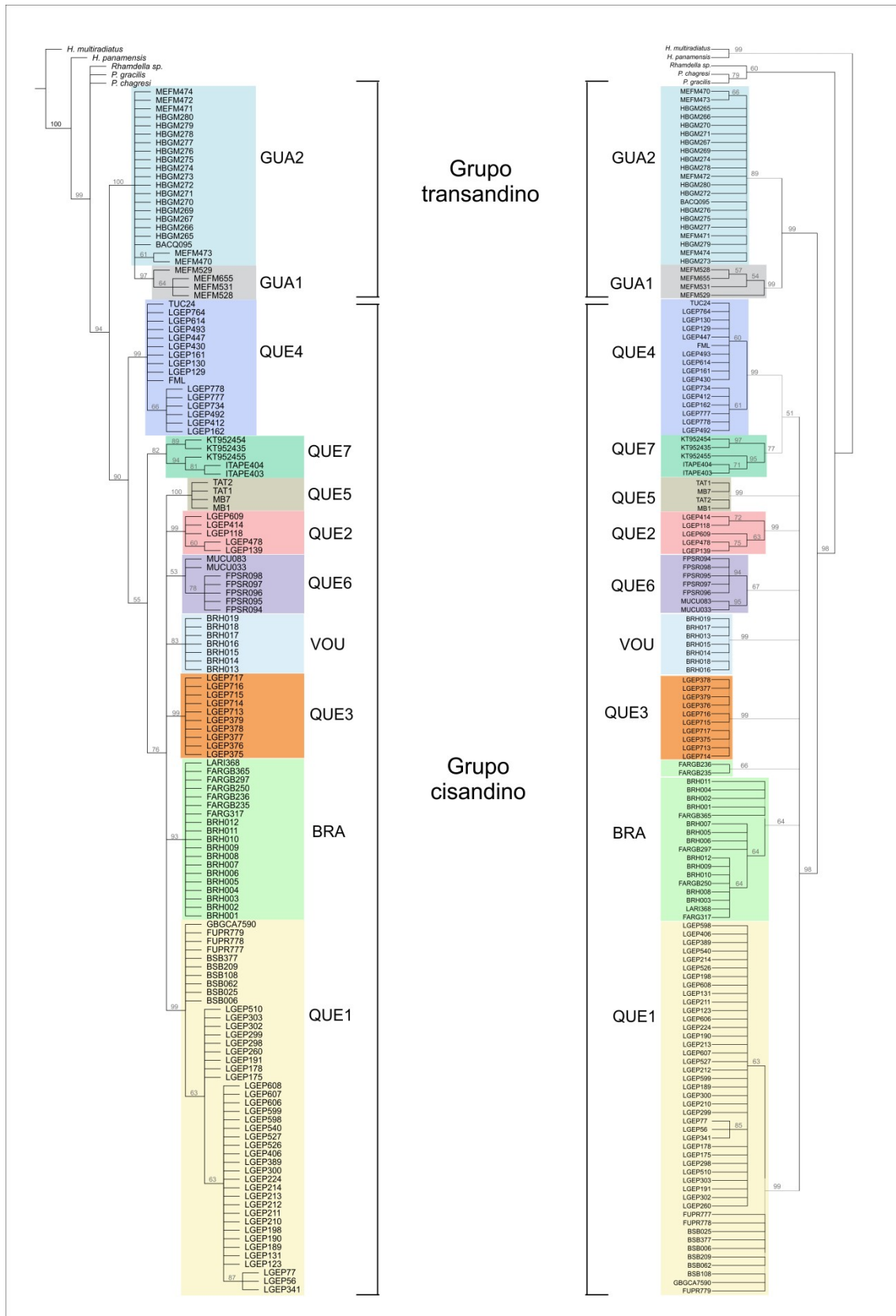


Figura 1: Árboles filogenéticos obtenidos a partir del gen COI. A la izquierda MP y a la derecha ML. Los valores de bootstrap se indican sobre los nodos. Los recuadros de color indican los agrupamientos reconocidos por el ABGD como especies hipotéticas. GUA= *R. guatemalensis*, QUE= *R. quelen*, BRA= *R. branneri*, VOU= *R. voulezii*.

Ambas reconstrucciones filogenéticas sugieren la monofilia del género *Rhamdia* y la división más basal, separa los linajes correspondientes a las especies cisandinas de los linajes transandinos. Además, la mayoría de las especies hipotéticas o linajes definidos por el ABGD se corresponde con un clado monofilético, razón por la cual se denominaron de la misma manera. Existen 2 excepciones, una en el clado cisandino y otra en el transandino. Entre las secuencias del grupo cisandino, FARGB235 y FARGB236 conforman un clado independiente con un valor de soporte de 66 en la reconstrucción obtenida mediante ML, pero estas secuencias forman parte del clado monofilético “branneri” (BRA) en el análisis de MP. Dado que el valor de soporte del clado BRA por MP es de 93, que el ABGD no distingue estas secuencias como diferentes al resto de este linaje y que la distancia intragrupal de este clado es de 0.03% se decidió considerar estas secuencias como parte del linaje BRA. En el clado transandino en cambio, el árbol de MP, reúne las secuencias MEFM528, MEFM529, MEFM531 y MEFM655 en un clado monofilético (linaje GUA1) pero todas las demás secuencias de *R. guatemalensis* conforman una politomía; mientras que la reconstrucción por ML, reconoce el linaje GUA1 como hermano de un clado monofilético constituido por todas las demás secuencias de *R. guatemalensis* (GUA2). Así como en el caso anterior, el ABGD reconoce ambos clados como linajes distintos aunque las distancias genéticas (K2P) entre ambos clados es de 1.59% mientras que la variación intraespecífica es de 0.11 (GUA1) y 0.22% (GUA2). Fuera de las excepciones expuestas, los otros clados siempre presentan la misma constitución de secuencias y se rescatan como clados monofiléticos por ML y MP.

Las relaciones internas entre los linajes, en general no están resueltas. El clado cisandino incluye 9 linajes, de los cuales QUE1, QUE2, QUE3, QUE5, QUE6, BRA y VOU siempre forman parte de una politomía. Las diferencias entre los árboles de ML y MP se dan en cómo se relacionan los clados QUE4 y QUE7. En el árbol de ML, estos dos son linajes hermanos que se asocian a todos los demás linajes en un clado politómico. Aunque el valor de soporte para esta agrupación (QUE4-QUE7) es relativamente bajo (51). Por otra parte en el caso de MP QUE7 es el clado hermano de la politomía descrita al principio y QUE 4 se ubica por fuera de esta asociación (Fig. 1).

En cuanto a las distancias genéticas entre los distintos linajes, en general superan el 2% (Tabla 3), excepto para las relaciones entre QUE6-BRA (1.84%), QUE6-VOU (1.26%) y BRA-VOU (1.59%), aunque sus distancias intragrupos son de 0.28% (QUE6); 0.03% (BRA) y 0% (VOU). Por otra parte, aunque QUE7 se diferencia de todos los otros clados en más del 3% su variación intragrupal es la más alta (1.89%).

Con respecto a los grupos externos, las especies de *Heptapterus* constituyen las secuencias más divergentes. En la reconstrucción filogenética por MP, el género *Rhamdia* conforma una

politomía con las secuencias de *Rhamdella sp.*, *Pimelodella gracilis* y *Pimelodella chagresi*. Sin embargo en el árbol de ML, cada uno de los géneros es reconocido como un clado monofilético.

3.3.2. Relaciones basadas en CYTB

Mediante el análisis de MP se obtuvieron 4 árboles de 947 pasos; el índice de consistencia fue de 0.44 y el índice de retención de 0.856. Por su parte el árbol de ML presentó $-\ln L = 5344.20$.

La monofilia entre los ejemplares analizados de *Rhamdia* se corrobora mediante ML pero no por MP. Este último análisis muestra una politomía conformada por 5 clados: I= especies de *Rhamdella*, II= especies de *Pimelodella* -ambas utilizadas como grupos externos-, III= especímenes de *Rhamdia laukidi* y IV= especímenes de *Rhamdia* cisandinos. Por su parte, aunque la reconstrucción por ML corrobora la monofilia de *Rhamdia*, las relaciones internas tampoco se hallan resueltas. Este clado se divide en 3 subclados: A) Especies transandinas del género; B) *Rhamdia laukidi* (especie cisandina) y C) Todas las demás especies cisandinas de *Rhamdia*. A pesar de estas diferencias en las topologías, cada uno de estos clados y subclados presentan la misma constitución de especímenes ya sea que se hayan obtenido por MP o ML.

Como en el caso del gen COI, la denominación de cada uno de los clados se basó en las especies hipotéticas definidas por el ABGD. Dado que los organismos analizados en este trabajo de tesis, conforman los mismos agrupamientos para CYTB y COI, se mantuvo la nominación de los mismos y se decidió utilizar acrónimos consecutivos entre las especies del clado cisandino. De este modo, en el análisis de CYTB aparecen los linajes QUE1, QUE2, QUE3 y QUE4, pero los siguientes linajes fueron nombrados como QUE8-QUE13. Lo que no significa que constituyan linajes diferentes a los obtenidos con COI, sino simplemente que no se conoce la caracterización de dicho gen para esos clados.

El clado transandino está constituido por 15 linajes, algunos de ellos conformados por secuencias únicas, que sin embargo, difieren $D = 2.57-9.2\%$ entre sí. Los linajes reconocidos a partir de una única secuencia son GUA1, GUA3, GUA4, ROG1, ROG2, ROG3 y CAB1; mientras que los clados formados por más de una secuencia fueron GUA2, CIN, SAI, CAB2, NIC, PAR, LAT1 Y LAT2.

Todas las especies cisandinas exceptuando *Rhamdia laukidi* conformaron el clado IV o el subclado C según se analice el árbol de MP o ML respectivamente. En total se determinaron 10 linajes dentro de este grupo. En el árbol MP este clado está dividido en 4 subclados QUE4, QUE12, QUE13 y un subclado politómico constituido por los linajes QUE1, QUE2, QUE3, QUE8, QUE9, QUE10 y QUE11. Este subclado politómico también aparece en la reconstrucción filoge-

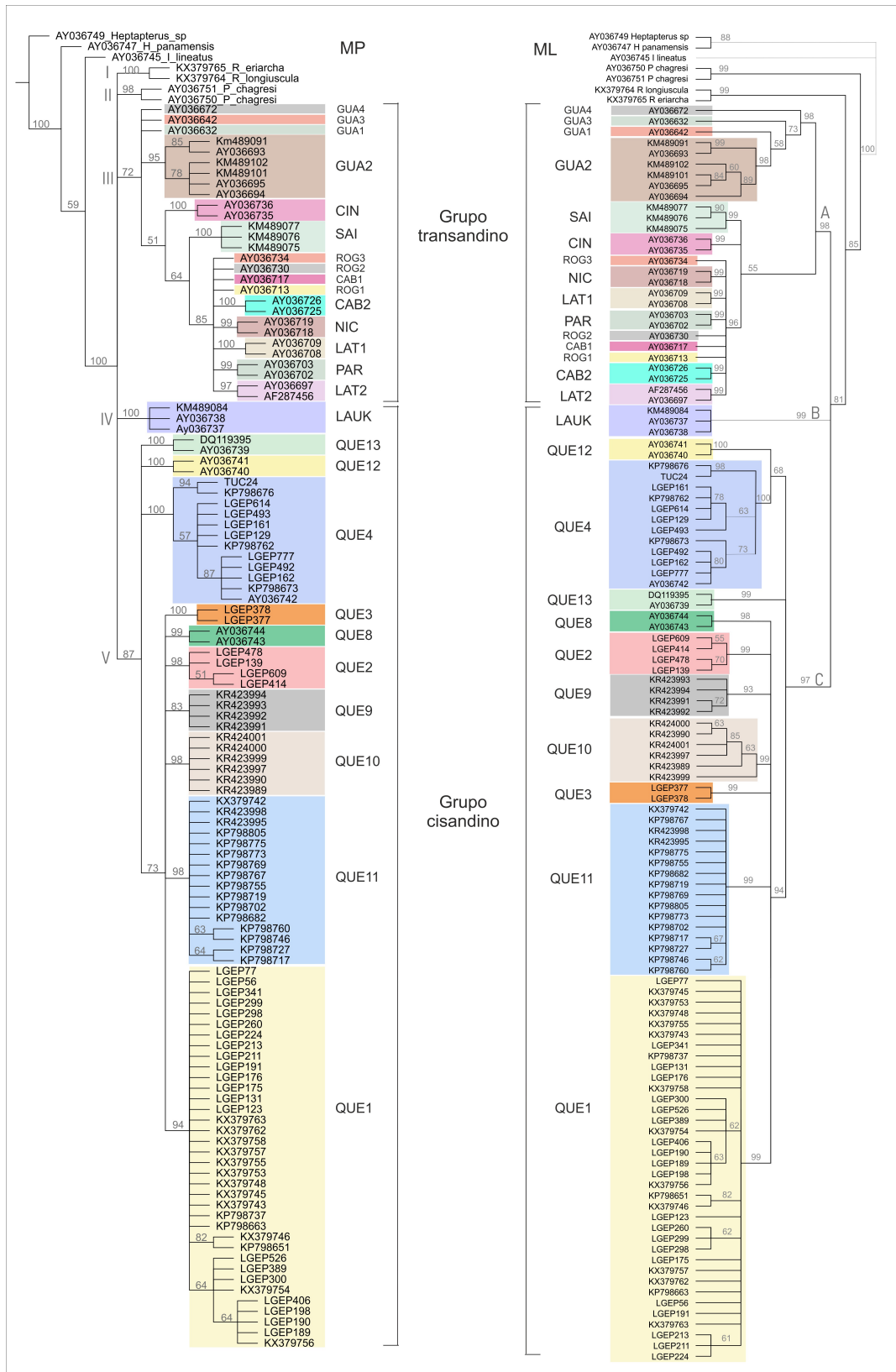


Figura. 2: Árboles filogenéticos obtenidos a partir del gen *CYTB*. A la izquierda MP y a la derecha ML. Los valores de bootstrap se indican sobre los nodos. Los recuadros de color indican los agrupamientos reconocidos por el ABGD como especies hipotéticas. GUA= *R. guatemalensis*, QUE= *R. quele*, LAUK= *R. laukidi*, SAI= *R. saijaensis*, ROG= *R. rogersi*, CAB= *R. cabrae*, NIC= *R. nicaraguensis*, PAR= *R. parryi*, LAT= *R. laticauda*.

-nética obtenida por ML. Sin embargo, la última metodología reúne a QUE12 y QUE4 como clados hermanos por lo que el subclado C es una politomía formada por 3 subclados menores: QUE13, (QUE12+QUE4) y (QUE1+ QUE2+QUE3+QUE8+QUE9+QUE10+QUE11). Las distancias genéticas entre los linajes variaron entre 2.47% y 7.23%.

3.3.3 Análisis combinado

Dado que en este caso se trataba de pocas secuencias se realizó una búsqueda exacta obteniéndose un árbol de 577 pasos. Por su parte el árbol de ML presentó $-\ln L = 4819.34$. Tal y como se esperaba, el análisis combinado reconoció los mismos linajes que se obtuvieron al analizar las secuencias por separado. Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, existen diferencias en las relaciones entre los clados.

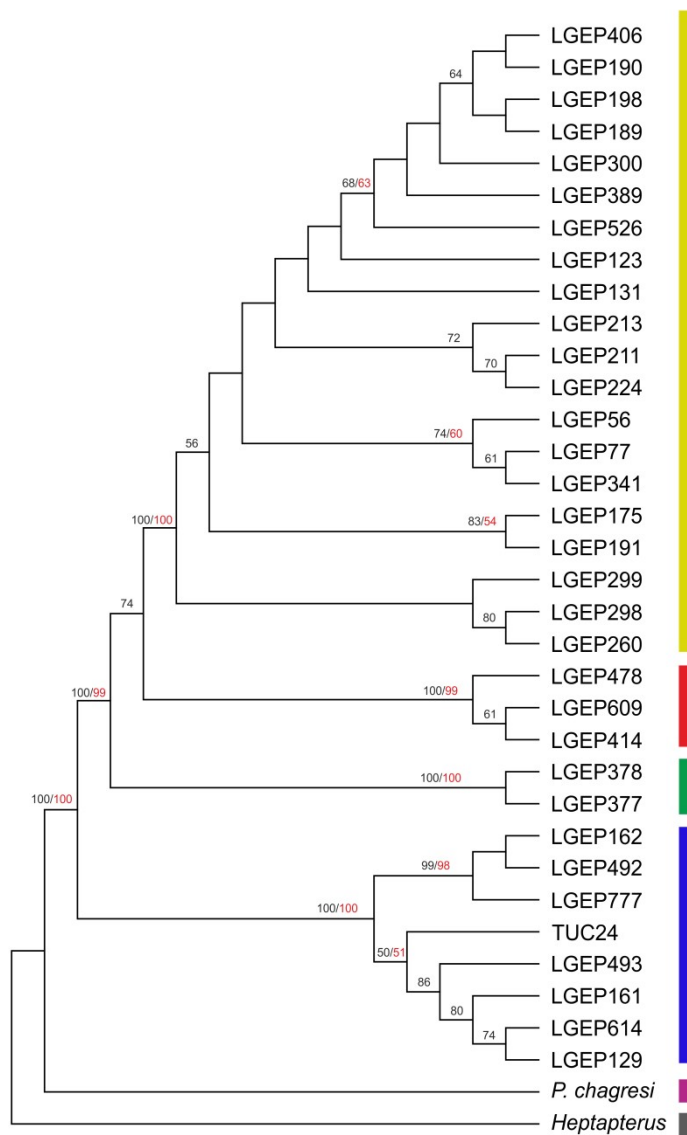


Figura 3: Árbol consenso para la combinación de los genes COI y CYTB. En rojo se indican los valores de bootstrap hallados por MP y en negro los obtenidos por ML. Las líneas de colores indican las especies hipotéticas establecidas mediante ABGD.

El análisis de MP no resuelve estas relaciones formando una politomía entre QUE1, QUE2 y QUE3; mientras que la reconstrucción por ML si lo hace. Las distancias genéticas muestran muy poca variación intralinaje (0 a 0.3%), mientras que las distancias interlinajes varían entre 3.03% y 6.39%.

3.4. Redes haplotípicas

Aunque las redes haplotípicas se construyeron con las secuencias de especímenes cis y transandinos, solo se analizan y discuten aquellas relativas a los ejemplares cisandinos y en particular las provenientes del área de estudio definida en este manuscrito.

3.4.1. Haplotipos COI

Se detectaron 34 haplotipos de este gen en el género *Rhamdia*, 6 de ellos corresponden a ejemplares transandinos y 28 a ejemplares cisandinos. La topología de la red obtenida por NETWORK (Fig. 4) refleja cómo los haplotipos se agrupan constituyendo los linajes descritos previamente. Algunos linajes están representados por un solo haplotipo, mientras que otros se conforman de 2 o más. En general los haplotipos de un linaje dado están separados por 1 o 2 mutaciones como máximo. La excepción la constituyen los haplotipos que conforman el linaje QUE7 los cuales exhiben una gran divergencia; los más próximos se hallan a 3 pasos mutacionales, mientras que los más diferentes lo hacen en 16 pasos. Esto es llamativo ya que linajes como QUE6 y VOU presentan haplotipos que divergen muy poco (4 pasos) entre sí. Sin considerar estos casos particulares, las distancias entre un linaje y otro oscilan entre 7 y 28 mutaciones.

El mayor número de haplotipos se agrupa en el linaje QUE1, aunque también es el linaje más representado en los muestreos. La distribución de este linaje incluye las cuencas de los ríos Paraná (tanto superior como medio), Uruguay y São Francisco. Además, 5 haplotipos (H1, H2, H3, H4 y H10) se detectaron únicamente en Misiones. El haplotipo H1 incluye especímenes distribuidos tanto en el río Paraná como en el río Uruguay y los haplotipos H2 y H10 se distribuyen exclusivamente en la cuenca del río Uruguay.

El linaje QUE2 está conformado por 3 haplotipos, todos ellos provenientes de cursos de agua que conforman la cuenca del río Paraná en Misiones. Es interesante destacar que solo 5 ejemplares de este linaje fueron analizados y a pesar de ello se detectaron 3 haplotipos. El ejemplo contrapuesto es el linaje QUE3 donde los 10 especímenes caracterizados mostraban el mismo haplotipo. Este linaje fue hallado exclusivamente en la cuenca del arroyo Urugua-í, tributario del río Paraná. Tres haplotipos conformaron el linaje QUE4, el cual se distribuye en los ríos Bermejo, Uruguay y Paraná. En este último curso de agua, fue colectado tanto en

Misiones como al norte de la provincia de Santa Fe. Tanto QUE5 como VOU están representados por un único haplotipo cada uno; el primero fue establecido en ejemplares colectados en el arroyo Tateto -tributario del río Iguazú- y el último corresponde a la especie *R. voulezi*, la cual se considera endémica del río Iguazú. También considerada endémica de este

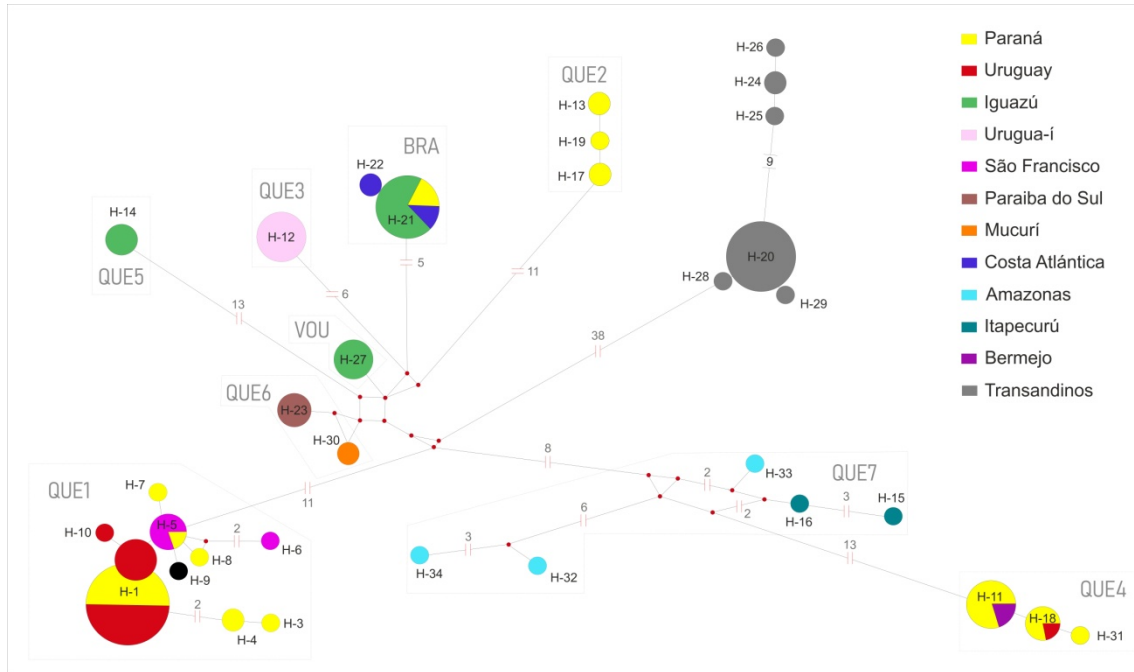


Figura 4: Red haplotípica de *Rhamdia quelen* a partir de secuencias de COI. Cada círculo representa un haplotipo distinto y su color de relleno la o las localidades en las cuales se distribuyen. A la derecha del gráfico se observan las referencias de cada color. Los puntos rojos corresponden a haplotipos perdidos y las líneas que los conectan las relaciones entre ellos. Cuando existe más de una mutación se indica con dos líneas rojas paralelas. Con líneas punteadas se definen cada uno de los linajes.

INTRAGRUPPO	QUE1	QUE2	QUE3	QUE4	QUE5	QUE6	QUE7	BRA	VOU	GUA1
0.27	QUE1									
0.20	QUE2	3.86								
0.00	QUE3	4.06	3.44							
0.12	QUE4	6.45	5.28	5.44						
0.00	QUE5	4.25	4.30	3.59	5.99					
0.28	QUE6	3.04	2.98	2.29	4.65	2.81				
1.89	QUE7	5.16	4.95	4.57	3.73	5.80	4.27			
0.03	BRA	4.19	3.42	2.17	4.89	3.08	1.84	4.95		
0.00	VOU	3.31	2.71	2.02	4.33	2.89	1.26	4.21	1.52	
0.11	GUA1	10.25	10.45	10.28	8.30	9.75	9.08	10.35	9.75	
0.23	GUA2	9.57	9.03	9.45	8.00	9.08	8.06	9.33	9.30	1.59

Tabla 3: Distancias genéticas del gen COI intra e interlinajes. Los valores están expresadas como porcentajes.

INTERGRUPOS

INTRAGRUPPO	QUE1	QUE2	QUE3	QUE4	QUE8	QUE9	QUE10	QUE11	QUE12	QUE13	GUA1	GUA2	GUA3	GUA4	ROG1	ROG2	ROG3	CAB1	CAB2	LAUK	SAI	CIN	NIC	PAR	LAT1	
0.31	QUE1																									
0.25	QUE2	2.86																								
0	QUE3	4.18	4.14																							
0.64	QUE4	6.81	6.68	7.12																						
0	QUE8	3.40	3.52	3.52	5.87																					
0.87	QUE9	3.75	3.87	3.63	6.43	2.47																				
0.59	QUE10	4.99	4.30	3.87	6.70	3.36	3.46																			
0.11	QUE11	3.52	4.09	3.39	6.45	3.24	3.27	2.96																		
0	QUE12	6.59	6.41	7.23	6.11	6.25	6.28	6.53	6.75																	
0	QUE13	5.53	5.84	6.41	6.95	6.10	6.37	6.63	5.94	6.27																
*	GUA1	10.80	10.51	10.75	10.26	8.95	9.79	10.98	9.73	11.48	10.08															
0.82	GUA2	10.60	10.05	10.83	10.64	9.09	9.95	10.40	9.39	10.66	10.72	4.05														
*	GUA3	10.51	10.05	10.82	10.69	9.09	9.95	11.05	9.79	11.56	10.33	3.97	3.33													
*	GUA4	10.04	9.97	10.12	10.35	9.10	9.96	11.07	10.15	10.13	10.34	4.44	7.33	4.80												
*	ROG1	12.18	11.67	11.55	11.55	9.97	10.70	11.75	10.51	11.20	11.23	7.19	4.45	7.75	7.42											
*	ROG2	12.25	11.78	11.47	11.67	9.97	10.75	11.64	10.95	11.67	10.78	6.91	7.22	6.96	7.32	3.69										
*	ROG3	11.85	11.40	10.82	11.37	9.44	10.21	10.70	10.15	11.02	11.41	7.04	7.63	7.43	7.10	3.97	3.37									
*	CAB1	11.84	11.19	11.70	11.71	10.12	10.85	11.91	11.38	11.90	12.30	7.51	7.37	8.07	7.06	2.88	3.68	3.34								
0	CAB2	11.66	10.97	10.85	10.49	9.82	10.14	11.08	10.18	11.05	11.26	7.21	7.52	7.60	7.95	3.83	2.91	3.19	3.50							
0	LAUK	9.33	9.34	9.58	9.22	9.09	9.11	9.78	8.39	8.74	8.74	11.12	9.54	9.24	11.40	11.38	10.94	10.84	11.72	10.15						
0.3	SAI	12.62	12.12	12.92	12.44	11.52	12.10	12.01	11.28	13.13	11.86	8.73	8.66	8.51	8.52	6.93	6.49	6.09	6.58	6.28	11.09					
0	CIN	10.93	10.06	11.56	11.10	10.25	10.90	10.89	9.93	11.40	12.54	7.86	6.70	6.56	6.90	7.42	8.53	8.10	7.91	8.65	11.19	7.32				
0.3	NIC	11.53	11.40	11.28	11.28	10.06	10.79	11.84	10.96	11.11	11.69	7.36	8.18	7.58	7.25	2.58	3.85	3.50	2.57	3.04	11.38	6.43	8.19			
0.45	PAR	11.53	11.21	11.82	12.01	11.14	10.70	11.54	10.78	12.21	12.61	7.78	8.10	8.18	7.50	3.90	4.09	3.42	3.11	3.27	11.47	6.85	8.19	3.59		
0.45	LAT1	11.82	11.31	11.56	11.74	10.24	10.80	11.76	10.51	12.03	11.79	6.94	7.08	6.49	7.51	3.59	3.29	3.27	3.58	3.43	11.12	7.02	8.02	3.75	3.35	
1.8	LAT2	13.12	12.64	12.61	11.97	10.65	11.75	12.57	11.65	11.98	12.84	8.01	8.20	8.76	8.07	4.13	3.52	3.96	3.73	3.18	12.07	7.24	9.20	3.42	4.05	3.74

Tabla 4: Distancias genéticas del gen CYTB intra e interlinajes. Los valores estan expresadas como porcentajes.

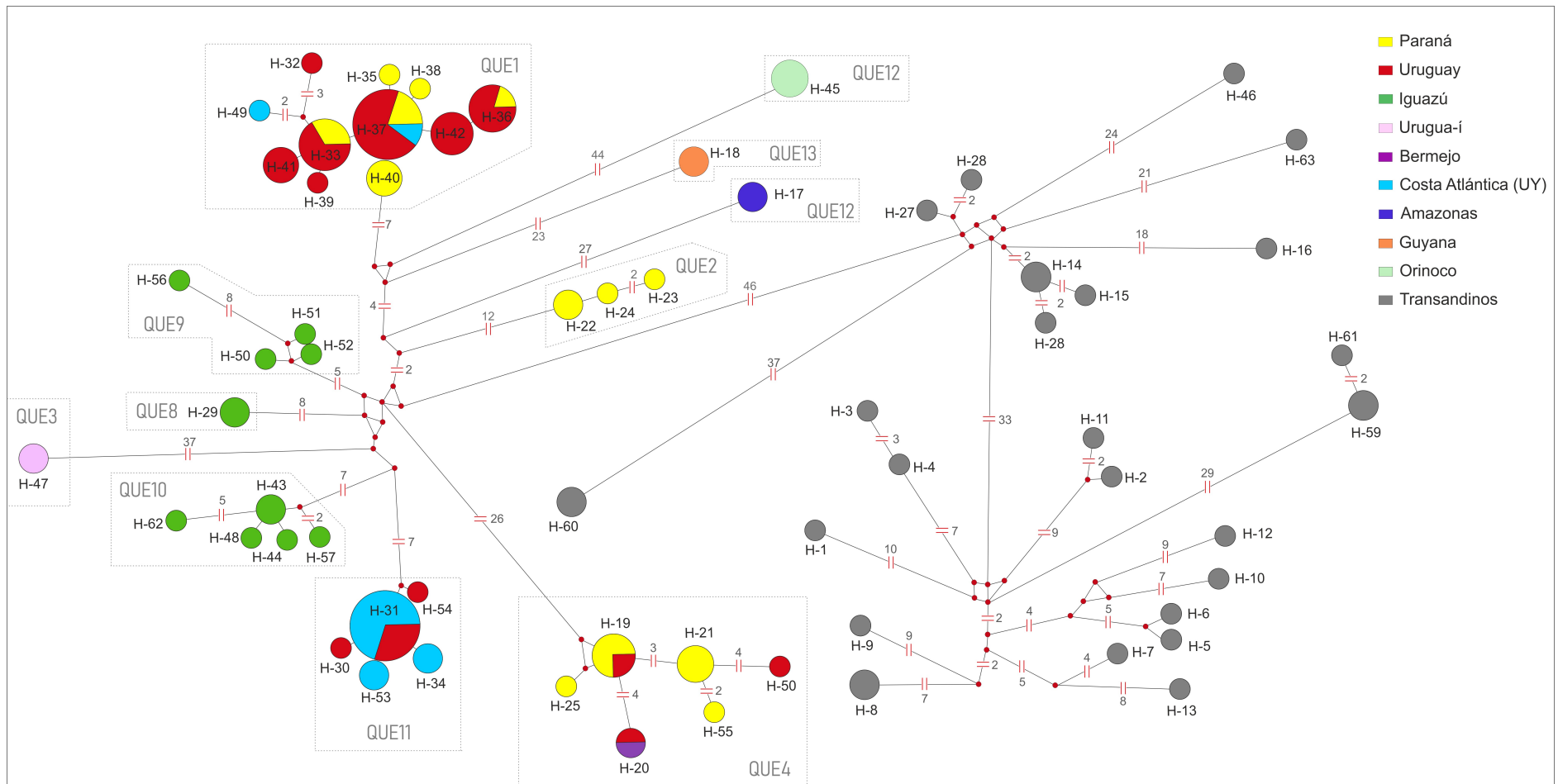


Fig. 5: Red haplotípica de *Rhamdia quelen* a partir de secuencias de CYTB. Cada círculo representa un haplotipo distinto y su color de relleno la o las localidades en las cuales se distribuyen. A la derecha del gráfico se observan las referencias de cada color. Los puntos rojos corresponden a haplotipos perdidos y las líneas que los conectan las relaciones entre ellos. Cuando existe más de una mutación se indica con dos líneas rojas paralelas. Con líneas punteadas se definen cada uno de los linajes.

río, la especie *R. branneri* (BRA) incluyó 2 haplotipos que se localizaron principalmente en el río Iguazú pero también pudieron ser detectado en el Paraná bajo (Rosario y Buenos Aires, Argentina) y la costa atlántica argentina (laguna Mar chiquita y arroyos próximos). El linaje QUE6 está constituido por 2 haplotipos H23 que se encuentra en el río Paraibá do Sul y H30 que se halla en el río Mucurí, ambos desembocan en el Océano Atlántico pero el primero se ubica en el sudeste de Brasil y el segundo en el nordeste. El linaje QUE7 incluye haplotipos que pertenecen a la cuenca amazónica (Bolivia y Perú) y otros que pertenecen a la cuenca del río Itapecurú, un río que desemboca en la costa atlántica en el Nordeste de Brasil y que se halla en la misma región hidrográfica que el río Mucurí.

3.4.2. Haplotipos CYTB

Las secuencias estudiadas de este gen se diferenciaron en 63 haplotipos, 39 cisandinos y 24 transandinos. La topología de la red también refleja los linajes discutidos en los puntos anteriores (Fig. 5). Del mismo modo que en la red haplotípica del gen COI, aquí, el linaje con mayor riqueza haplotípica es QUE1 mientras que otros como LAUK, QUE8, QUE12 Y QUE13 están representados por un solo haplotipo. Los linajes QUE2, QUE4, QUE9, QUE10 y QUE11 exhiben entre 3 y 6 haplotipos cada uno. En general los haplotipos dentro de los linajes varían entre 1 y 8 pasos entre sí, mientras que los linajes se separan por 14 a 45 mutaciones.

Si tenemos en cuenta la distribución de los linajes, QUE1 y QUE4 son los que presentan mayor dispersión. El primero se halla en las cuencas del Paraná, Uruguay y ríos de la costa atlántica uruguaya; mientras que el último se encuentra en las cuencas de los ríos Paraná, Uruguay y Bermejo. Los haplotipos del linaje QUE11 provienen de tributarios del río Uruguay y de lagunas que se relacionan a la costa atlántica en Uruguay. Los linajes QUE8, QUE9 y QUE10 por otra parte cohabitan la cuenca del Iguazú en el estado de Paraná (Brasil). Finalmente los haplotipos H17 y H18 se definieron para la cuenca del Amazonas y ríos de las Guyanas respectivamente.

Los haplotipos H22, H23, H24, H29 y H47 se encontraron exclusivamente en la Provincia de Misiones. Los 3 primeros conforman el linaje QUE2 y se hallaron en el río Paraná; el cuarto representa el linaje QUE3 que parece ser exclusivo del arroyo Urugua-í.

3.4.3. Consideraciones generales

En ambas redes haplotípicas los linajes obtenidos mediante inferencia filogenética se pueden percibir como agregados de haplotipos o haplotipos únicos distantes. La información obtenida a partir de cada gen es complementaria, ya que, parte de los individuos estudiados se repiten en ambas redes de haplotipos y las secuencias complementarias obtenidas de bases de

datos difieren según el gen analizado, lo que permite ampliar las localidades muestreadas. Así se puede inferir que el linaje QUE1 tendría una amplia distribución, hallándose en las cuencas de los ríos Paraná, Uruguay, São Francisco y lagos relacionados a la costa atlántica uruguaya. El linaje QUE2 es exclusivo del Paraná y no se detectaron secuencias adicionales que pertenezcan al mismo. El linaje QUE3 parece ser endémico del arroyo Urugua-í, mientras que QUE4 se distribuye en las cuencas del Paraná, Uruguay y Bermejo. Por otra parte los linajes QUE8, QUE9 y QUE10 provienen del río Iguazú y ha sido caracterizado solamente para el gen CYTB pero en este río se identificaron con COI 3 linajes: BRA, VOU y QUE5; por lo que no se desestima que estos linajes se correspondan entre sí.

4. DISCUSIÓN

4.1. Inferencia filogenética y especies hipotéticas

El empleo de los términos “linaje” o “especie hipotética” se debe a que considero que una especie no puede definirse atendiendo únicamente a sus diferencias genéticas, sino que debe realizarse de acuerdo a los principios de una “taxonomía integrativa” (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005) empleando el mayor número de caracteres y disciplinas posibles en el delineamiento de la misma. En este capítulo se revisaron distintas poblaciones y especies de *Rhamdia* desde una enfoque exclusivamente molecular, prestando principal atención a los especímenes que constituyen la especie nominal *R. quelen*. Por un lado se aplicaron técnicas de inferencia filogenética y por otro se trabajó con metodologías relacionadas al concepto de “barcode gap”. En este último caso se utilizó el algoritmo denominado “Automatic Barcode Gap Discovery” (ABGD) que permite delinear especies hipotéticas a partir de la existencia de un *gap* genético entre los grupos de secuencias analizadas (Puillandre *et al.*, 2012). La elección de esta herramienta, se basó en lo propuesto por Kekkonnen & Hebert (2014), quienes sugieren que el empleo de estas técnicas de agrupamiento molecular, constituyen excelentes puntos de partida para la detección de especies crípticas y disminuyen el riesgo de sinonimias. Si bien existen otros algoritmos para la detección de linajes moleculares (BIN, CMYC), nuestra elección se basó también en los resultados alcanzados por Ríos *et al.* (2017).

Tanto las inferencias filogenéticas como la aplicación del ABGD, revelan que *Rhamdia quelen* está constituido por varios linajes genéticamente diferentes. En su sentido actual, *R. quelen* es una especie nominal distribuida en la región cisandina de América del Sur y que se halla en simpatría con otras especies del género incluidas: *R. branneri*, *R. voulezi*, *R. gabrielae*, *R. eurycephala*, *R. laukidi* y la especie troglobiótica *R. enfunada*. No todas estas especies han podido ser revisadas o disponen de secuencias en las bases datos y en vista de que existen

actos nomenclaturales recientes, algunas de los linajes determinados en este capítulo puede corresponder a una de estas especies previamente identificadas bajo la denominación *R. quelen*.

Hasta el momento se han publicado solo tres estudios de filogenia molecular sobre el género *Rhamdia* (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017) y solamente uno de ellos está enfocado en especies del clado cisandino. Dicho trabajo, desarrollado por Ríos *et al.* (2017), constituye un importante aporte para la comprensión de este clado, aunque se enfoca principalmente en especímenes colectados en diferentes cursos de agua de la República Oriental del Uruguay, incluidos los ríos, Uruguay, Negro, de la Plata, laguna Merín, laguna Rocha y otros cursos que conforman la costa atlántica de ese país. En esta tesis se amplía el rango de distribución estudiado, al caracterizar el gen CYTB en ejemplares cisandinos provenientes de los ríos Paraná, Uruguay, Iguazú y Bermejo en Argentina e incorporando además, secuencias de especímenes próximos a la cabecera del río Iguazú (Tscha *et al.*, 2017) en las inferencias filogenéticas.

Exceptuando a Perdices *et al.* (2002) todas las filogenias de *Rhamdia* publicadas hasta el momento, emplean CYTB como marcador molecular. En esta tesis, se brinda además una filogenia basada en el gen COI y dado que los individuos aquí estudiados fueron caracterizados para ambos genes, los árboles obtenidos contienen secuencias comunes que nos permiten hacer inferencias sobre las topologías y la distribución de cada uno de los linajes.

Las filogenias moleculares previas (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2017) indican que *Rhamdia* constituye un clado monofilético dividido en 2 subclados que agrupan, por un lado, las especies denominadas transandinas y por otro, las cisandinas. Estos resultados coinciden con los obtenidos para ambos genes a partir de las metodologías aplicadas (ML y MP). La única excepción la constituye la filogenia basada en CYTB, obtenida por máxima parsimonia (MP), donde el árbol consenso exhibe una politomía basal constituida por los géneros *Rhamdella*, *Pimelodella* y las especies cis y transandinas de *Rhamdia* como clados separados. A pesar de esto, en los otros 3 casos, los árboles filogenéticos exhiben un patrón general semejante al obtenido por Perdices *et al.* (2002), Hernández *et al.* (2015) y Ríos *et al.* (2017) y con valores de soporte altos (≤ 90) para cada uno de los clados. Si bien este patrón general con dos subclados bien definidos se repite en los árboles obtenidos, las relaciones internas entre los linajes no siempre se resuelven, existiendo politomías internas en los clados cis y transandinos. Estas variaciones en las relaciones pueden deberse al set de datos y variables de análisis utilizadas, en relación a las utilizadas por otros autores. Por ejemplo, para poder incorporar las secuencias de Tscha *et al.* (2016) a mis análisis, debí eliminar al menos 300pb que sí fueron consideradas en el análisis de Ríos *et al.* (2017).

A partir de mis resultados y considerando los estudios previos, se podría presumir la monofilia del género *Rhamdia*; sin embargo como bien indican Hernández *et al.*, (2015) no se puede ser concluyente al respecto, ya que estos análisis no incluyen la totalidad de las especies nominales y no cubren toda el área de distribución del género. Así mismo para tener un testeo fuerte de monofilia en *Rhamdia* habría que incluir una mayor diversidad de géneros y grupos de especies de otros géneros relacionados. Hasta el momento la monofilia del género *Rhamdia* no ha sido probada de modo fehaciente desde ningún enfoque.

En su análisis filogenético Perdices *et al.* (2002) no realiza ninguna inferencia respecto al clado cisandino, utilizando las secuencias de unos pocos especímenes provenientes de los ríos: Orinoco (Venezuela), Essequibo (Guyana), Amazonas (Perú) y Paraná (Argentina). Estas mismas secuencias han sido utilizadas en las reconstrucciones filogenéticas posteriores e incluso en esta tesis. Los clados monofiléticos que rescatan Perdices *et al.* (2002) y Hernández *et al.* (2015) se corresponden con los clados que aquí se definen como los linajes QUE4, QUE8, QUE12 y QUE13 y definidos por Ríos *et al.* (2017) como Rq2, Rq5a Rq3 y Rq1 respectivamente. Cabe destacar que los últimos autores identifican 2 linajes adicionales a los previamente establecidos, Rq4 y Rq6, los cuales en este trabajo se han denominado QUE1 y QUE11. Mi trabajo ha permitido detectar todos los linajes previamente definidos y revelar además, la existencia de 4 linajes adicionales basados en CYTB: QUE2, QUE3, QUE9 y QUE10. Finalmente, los análisis filogenéticos basados en COI, revelaron 4 linajes conformados exclusivamente a partir de las secuencias obtenidas en este trabajo (QUE4, QUE2, QUE3 y QUE5), 2 clasificados como *R. branneri* (BRA) y *R. voulezi* (VOU) (Ribolli *et al.*, 2017), 2 obtenidos a partir de secuencias en bases de datos (QUE6 y QUE7) y un último constituido por secuencias en bases de datos y secuencias originales (QUE1). En total este trabajo ha permitido detectar entre los *Rhamdia* cisandinos 10 linajes basados en CYTB y 9 basados en COI.

4.2. Distribución de los linajes

Al observar la distribución de los linajes moleculares hay dos cuestiones que llaman la atención: la simpatría entre algunos de ellos y sus rangos de distribución. En el primero de éstos, el caso más llamativo es el del río Iguazú, en el cual se han detectado 4 linajes a partir de CYTB (QUE8-QUE11) y 3 a partir de COI (QUE5, BRA y VOU). Es probable que algunos de los linajes detectados con CYTB se correspondan con los hallados en COI, sin embargo sería necesario secuenciar ambos genes en los mismos ejemplares para poder establecerlo. Cualquiera sea el caso, al menos 4 linajes habitan simpátricamente esta cuenca. La presencia de linajes simpátricos también se registra en la cuenca de los ríos Paraná (QUE1, QUE2, QUE4 y BRA) y Uruguay (QUE1, QUE4 y QUE11). Con respecto a los rangos de distribución, existen

linajes que parecen ser endémicos y otros que se encuentran ampliamente distribuidos. Hasta el momento *Rhamdia voulezi* y *R. branneri* son consideradas especies endémicas del río Iguazú (Garavello & Shibatta, 2016; Ribolli *et al.*, 2017) pero la evidencia genética indica que *R. branneri* tiene una distribución más extensa, hallándose también en el río Paraná y cauces que desembocan en la costa atlántica en Argentina. El linaje QUE1 (Rq4) es el de mayor distribución entre todos los detectados, ubicándose en tributarios de los ríos Paraná, Uruguay, São Francisco y laguna Merín. Del mismo modo el linaje QUE11 (Rq6) fue hallado en tributarios del río Uruguay, en el río Iguazú y en varias lagunas que desembocan en la costa atlántica de Uruguay. Entre los linajes que parecen ser endémicos podemos encontrar a QUE5 en el arroyo Tateto (río Iguazú), QUE3 en el arroyo Uruzú (Cuenca Urugua-í) y VOU en el Iguazú.

La ocurrencia de especies o linajes simpátricos dentro del género *Rhamdia* parece ser una situación frecuente. Tanto Perdices *et al.* (2002), como Hernández *et al.* (2015) hallaron linajes simpátricos entre las especies transandinas de *Rhamdia*. Y en la contraparte cisandina, Ríos *et al.* (2017) reportó simpatría entre los linajes Rq4 (QUE1) y Rq6 (QUE11).

Las especies de agua dulce presentan, con frecuencia, una fuerte estructuración de sus poblaciones como resultado de su confinamiento a una cuenca hidrográfica determinada. El aislamiento de las cuencas por barreras geográficas difícilmente superables, impiden el flujo génico entre las poblaciones permitiendo la acumulación de diferencias genéticas (Faulks *et al.*, 2010; Loxterman & Keeley, 2012; Bruno *et al.*, 2015). Este escenario de especiación alopatrica suele ser el más aceptado pero no es el único posible, existiendo numerosos ejemplos de procesos de aislamiento que ocurren en simpatría (Seehausen & Wagner, 2014). Es claro que la historia evolutiva del clado cisandino es compleja y requiere un análisis mucho más extenso para inferir el origen de estos linajes genéticamente distinguibles en la actualidad. Cualquiera sea el caso, determinar los procesos que condujeron a la aparición de estos linajes genéticamente distinguibles está fuera de los objetivos de esta tesis.

4.3. Sobre distancias genéticas y el *DNA barcode*

Las distancias genéticas han sido aplicadas frecuentemente como medidas de diferenciación entre las poblaciones. Sin embargo, con el advenimiento del *barcoding* su empleo se intentó estandarizar y emplear para determinar distancias promedios que permitieran la delimitación de especies y otras categorías taxonómicas (Hebert *et al.*, 2003-b). Como ya se ha comentado en la introducción esto fue bastante discutido, en especial porque las distancias máximas y mínimas frecuentemente se solapan. Si bien, las distancias genéticas no pueden emplearse para la delimitación de especies, continúan siendo útiles para establecer la existencia de grados de diferenciación entre las poblaciones.

Las tablas 3 y 4 muestran las distancias intra e interlinajes calculadas para COI y CYTB respectivamente. Las distancias intralíneas, en general, no superaron el 0.28% dentro del clado cisandino. El único caso que se desvía de esta media es el linaje QUE7, cuya variación intraespecífica fue de 1.89%. Este clado es particularmente interesante dado que está conformado por 5 secuencias, 3 de ellas provenientes de la cuenca amazónica en Bolivia y Perú y 2 de ellas corresponden al río Itapecurú, un río que desagua en la costa nordeste de Brasil y baña el estado de Maranhão. A pesar de esta distancia considerable, el ABGD reconoce este agrupamiento como una especie hipotética y la misma conforma un grupo monofilético. De hecho, las secuencias más similares ($D=0.5$) se hallan entre un ejemplar del río Itapecurú y otro del Amazonas en Perú; la variación entre las secuencias amazónicas es siempre $D \leq 1$. Probablemente este linaje sea resultado de un muestreo deficiente y la obtención de más secuencias del Amazonas y ríos del nordeste brasileño sean necesarios para su corroboración.

El caso contrapuesto, donde los linajes presentan variación por debajo del 2% se observa entre BRA, VOU y QUE6. Los dos primeros linajes son simpátricos y la distancia entre ellos es $D=1.52$, un valor muy próximo al hallado por Ribolli *et al.* (2017), quienes sostienen que un umbral fijo puede subestimar o sobreestimar el número correcto de unidades taxonómicas moleculares y aplican el programa SPIDER para establecer el valor de umbral óptimo (Brown *et al.*, 2012). Por otro lado QUE6 incluye ejemplares de Paraíba do Sul (São Paulo, Brasil) y del Mucurí (Minas Gerais, Brasil), ríos que desembocan en la costa atlántica brasileña pero que conforman cuencas distintas. En todos los casos el ABGD reconoció a estos linajes como especies hipotéticas. Esto probablemente se deba a que la variación intralínea es mínima o nula en relación a la variación entre los linajes, por lo cual el programa detecta *gaps* con escasa variación interlinajes. Aumentar el número de ejemplares caracterizados y los puntos de colecta entre las localidades podrían brindar un marco más amplio para la elaboración de inferencias respecto a estos linajes.

En América del sur se han realizado algunos relevamientos ictiofaunísticos en los que se definieron rangos de variación (Pereira *et al.*, 2011 y 2013; de Carvalho *et al.*, 2011, Mabrugaña *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2016). En todos estos trabajos se establecen distancias promedio intra e interespecíficas que oscilan entre 0.13% y 0.5% y 1.7% y 10.36% respectivamente. Sin embargo los valores mínimos y máximos de variación van de 0 a 14.08% para las distancias intraespecíficas y de 0 a 24.8% para las interespecíficas. Si bien en cada uno de estos trabajos se argumentan los casos particulares que llevan a los valores extremos, el solapamiento entre las distancias intra e interespecíficas es uno de los tópicos más discutidos de esta práctica. Mi objetivo sin embargo, no es delimitar especies u otorgar

categorías taxonómicas a partir de las distancias genéticas, sino simplemente, estimar el grado de diferenciación entre los linajes.

4.4. Redes de haplotipos

Las redes haplotípicas exhibieron topologías similares a las de los árboles de MP y ML, rescatándose los mismos linajes determinados por estos métodos. En el caso de la red haplotípica de COI todos los linajes se originan a partir de una red de haplotipos centrales faltantes. Se observa la proximidad entre QUE6 y VOU que también se manifiesta en las distancias genéticas. Así mismo, es evidente la falta de cohesión del linaje QUE7, en el cual cada una de las secuencias que lo conforma constituye un haplotipo diferente y separados por varios pasos mutacionales entre sí, además exhibe la mayor cantidad de haplotipos faltantes dentro de un linaje. Como se explicó anteriormente un muestreo más completo de la región amazónica podría aclarar las relaciones internas de este linaje, que también es confuso en cuanto a las distancias genéticas.

Tanto en el caso de la red haplotípica de COI como de CYTB, el linaje QUE1 es el que presenta mayor número de haplotipos y ha sido el linaje más frecuente en el área muestreada (Misiones). Cabe aclarar que para facilitar los análisis filogenéticos, no se utilizaron todas las secuencias empleadas por Ríos *et al.* (2017). De haberlo hecho, el linaje Rq6 (QUE11) sería el que presente el mayor número de haplotipos, puesto que según estos autores, lo componen 41 haplotipos.

Claramente a partir de los resultados alcanzados en esta sección no es posible proyectar hipótesis consistentes sobre patrones de evolución o relaciones filogeográficas. Estos estudios requieren un número de secuencias a analizar muy por encima de las aquí estudiadas y un área muestral que refleje el área de distribución del taxón analizado. Sin embargo, he decidido construir una red de haplotipos, porque a pesar de las falencias, permite una exploración de la constitución de cada linaje y sus posibles relaciones.

4.5. Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que desde el enfoque molecular, la especie nominal *Rhamdia quelen* incluye a varios linajes genéticamente diferentes. Se pudieron detectar al menos 4 linajes adicionales a los previamente establecidos, elevando a 11 el total inferido para el clado cisandino. Es llamativo que varios linajes son simpátricos y están extensamente distribuidos mientras otros parecieran ser endémicos. En la cuenca de los ríos Paraná, Uruguay e Iguazú se pudieron establecer 5 de estos linajes, de los cuales 2 serían endémicos. El análisis de genes nucleares en los ejemplares analizados es recomendable para

corroborar posibles casos de introgresión y un análisis filogeográfico es fundamental para poder comprender los patrones observados en la actualidad.

La correcta delimitación de una especie tan discutida y estudiada como *Rhamdia quelen* presenta un desafío ingente, que puede ser alcanzado en la medida de que se establezcan lazos cooperativos entre la comunidad ictiológica. No solamente para poder cubrir la extensa área en la que se distribuye esta especie, sino también para analizar los especímenes desde un enfoque integrativo.

CAPÍTULO 3

Variación morfológica

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de especie, morfología y especies crípticas

El concepto de especie es transversal al trabajo taxonómico. Sin embargo, actualmente no existe un acuerdo unánime sobre cómo debe definirse ni delimitarse. Las discusiones sobre los conceptos de especie (biológico, filogenético, ecológico, evolutivo, fenético, etc) abundan en la bibliografía (Mayr 1942, Simpson 1951, Nelson & Platnick 1981, Cracraft 1983; Nixon & Wheeler 1990, Mayden 1997, de Queiroz 1998, entre otros) y un resumen conciso de estos es brindado por de Queiroz (2007). Este autor advierte, que la mayoría de estas definiciones, discrepan en los criterios empleados para la delimitación de las especies (aislamiento reproductivo, monofilia, nicho ocupado, diferenciación morfológica), pero concuerdan en que ellas son resultado del proceso evolutivo y que los organismos dentro de una especie comparten una historia evolutiva más próxima entre sí que con otros (Hey, 2006). La definición brindada por de Queiroz (2007) se conoce como el concepto unificado y reconoce a la especie como “linajes metapoblacionales que evolucionan separadamente, o bien segmentos de esos linajes. Siendo un linaje una serie ancestro descendiente”. Dado que la evolución es un proceso continuo, la adquisición de diferentes propiedades por parte de un linaje es progresiva. Así, su delimitación por alguno de ellos, dependerá del momento evolutivo en el cual se encuentre. Por otra parte, aclara que la precisa delimitación de una especie requiere múltiples líneas de evidencia, una concepción congruente con el concepto de taxonomía integrativa.

Más allá del debate sobre el concepto de especie o el criterio adoptado para su delimitación, la realidad es que en la práctica habitual, la mayoría de las especies son definidas en base a caracteres morfológicos (Wheeler, 2008). A modo de ejemplo, en los últimos 10 años se han descrito 16 especies pertenecientes a la familia Heptapteridae (Fricke *et al.*, 2018-a; 2018-b), todas ellas están basadas en caracteres morfológicos; de las 16, solo 2 han sido evaluadas empleando metodología cladística (Bockmann & Miquelarena, 2008; Reis *et al.*, 2014) y solo dos consideran caracteres morfológicos y moleculares en su delimitación (Angrizani & Malabarba, 2018). Las diagnós de todas ellas se basan en análisis tradicionales de morfología comparada, empleando caracteres morfométricos y merísticos y algunas son discutidas en un marco filogenético basado en estudios previos o más generales.

La implementación de las técnicas moleculares y antes de estas, los estudios ecológicos y citogenéticos, entre otros, permitieron detectar taxones indistinguibles morfológicamente que

mostraban mucha variación en estos caracteres alternativos. Bickford *et al.*, (2007) emplea el término especies crípticas, para definir dos o más especies que han sido descritas como una única especie nominal dada la incapacidad de diferenciarlas en su morfología externa. Una distinción de las mismas es sugerida por Pérez-Ponce de León & Nadler (2010), quienes diferencian entre crípticas en sentido estricto y en sentido práctico. En el primer caso refiere a especies que son realmente indistinguibles desde la perspectiva morfológica; mientras que en el segundo, alude a aquellas que permanecen ocultas en exámenes de rutina pero que un análisis morfológico exhaustivo puede llevar a su distinción.

El concepto de especies crípticas se ha extendido ampliamente tras la aplicación de las técnicas de genética molecular al campo de la taxonomía (Bickford *et al.*, 2007, Katz *et al.*, 2015, Thielsch *et al.*, 2017). Pero como ya se mencionó, no solo los caracteres moleculares permiten inferir la existencia de estos complejos. Desde la citogenética y la ecomorfología se ha sugerido la existencia de especies crípticas en taxones nominales como *Astyanax scabripinnis* (Souza *et al.*, 1995; Vicari *et al.*, 2008), *Hoplias malabaricus* (Bertollo & Mestriner, 1998; Pazza & Ferreira Jr, 2003), *Gymnotus carapo* (Milhomem *et al.*, 2007) y *Rhamdia quelen* (García *et al.*, 2010; Mise *et al.*, 2013), entre otros. En algunos casos, estos trabajos llevan a revisiones morfológicas más detalladas que permiten una correcta diagnosis de esas especies y en otros casos, estos complejos permanecen nomenclaturalmente inalterados.

En este tipo de complejos es indispensable la implementación de un enfoque sintético, que emplee líneas de evidencia independientes a fin de inferir las propiedades biológicas que operan en la divergencia entre linajes (Katz *et al.* 2015).

1.3. Variación morfológica en *Rhamdia*

Rhamdia ha sido históricamente un taxón conflictivo, las primeras descripciones afines al género datan de 1648 en textos e ilustraciones de Marcgravius; la especie tipo fue descrita en 1824 como *Pimelodus quelen* (Quoy & Gaymard) y el género fue erigido como tal por Bleeker en 1858 (una revisión histórica completa es brindada por Silfvergrip, 1996). Dada su larga historia, muchas de las diagnosis originales de especies pertenecientes a *Rhamdia* son generales o vagas. Por otra parte, algunas diagnosis han sido elaboradas considerando únicamente especies próximas al área de distribución del nuevo taxón, una práctica poco recomendable pero bastante extendida, incluso actualmente (Wheeler, 2008).

En una revisión taxonómica cabalmente morfológica, Silfvergrip (1996) sinonimizó 48 especies nominales bajo la denominación *Rhamdia quelen*. Este acto taxonómico ha sido bastante cuestionado (Weber & Wilkens, 1998; Perdices *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003; Bichuette & Trajano, 2005; Hernández *et al.*, 2015; Garavello & Shibatta, 2016; Angrizani &

Malabarba, 2018), sin embargo, su trabajo constituye la única revisión moderna y completa del género que adopta un concepto de especie y un criterio explícito de delimitación. La revisión se desarrolló bajo el concepto filogenético de especie basado en la diagnosticabilidad (Nelson & Platnick, 1981; Cracraft, 1983; Nixon & Wheeler, 1990; de Queiroz, 2007) que considera que un linaje histórico debe compartir una combinación única de ciertos estados de caracteres que permita su distinción de otros linajes. Silfvergrip (1996) argumenta su decisión de sinonimizar tantas especies nominales, en la incapacidad de establecer diagnósticos objetivos de dichos taxones. Si bien ciertas poblaciones pueden diagnosticarse entre sí, la existencia de poblaciones intermedias en cualquier ubicación geográfica, falsean estas diagnósticos. Por otro lado, establece que existen estados de carácter raros que pueden emplearse para identificar ciertas poblaciones pero no las toma en cuenta debido a que las poblaciones con estados raros son invariables en combinación con estados que están ampliamente distribuidos. En la cuenca del Plata y arroyos de la cuenca del Paraná e Iguazú, se reportan diferencias morfológicas relacionadas a estructura corporal, número de radios de las aletas dorsales, número de poros cefálicos y mandibulares, así como patrones de coloración de la aleta dorsal (Silfvergrip, 1996; Azpelicueta obs. pers.).

La diagnosis de *Rhamdia quelen* provista por Silfvergrip (1996) propone una combinación de caracteres que incluyen:

- Sierras en ambas caras de la espina pectoral.
- Lóbulos caudales subiguales o alguno ligeramente más largo y con la membrana interrredial E1/H1 no superando 2/3 de la longitud de estos radios.
- Presencia, o no, de múltiples poros sensoriales en la cabeza.
- Velo de la nariz posterior abierto posterolateralmente.
- Longitud de la barbilla maxilar entre 28.8% y 137% del largo estándar (SL) y entre 145% y 580% del largo de la cabeza (HL).
- Rastrillos branquiales entre 5 y 16, llegando hasta 20 en algunas poblaciones.
- De 36-44 vértebras post-weberianas, de 41-49 vértebras totales.
- Ojos de tamaño medio (12.1%- 33% de HL).
- Banda lateral presente o ausente.
- Patrón de coloración moteado presente o ausente.
- Con o sin marca oscura sobre la nuca.

Claramente ninguno de estos caracteres es exclusivo y la diagnosis es muy general para ser útil. Estudios moleculares en *Rhamdia* (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015; Ríos *et al.*,

2017) y mis resultados del capítulo anterior, demuestran que la especie nominal *R. quelen* está conformada por varios linajes genéticamente distantes.

En este capítulo se analizan caracteres morfológicos y merísticos de ejemplares de los ríos Paraná y Uruguay por medio de estadísticos uni y multivariados. Estos se discutirán teniendo en consideración los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

1.4. Antecedentes en osteología

Los caracteres osteológicos constituyen una importante fuente de información y aunque su empleo está muy difundido en estudios filogenéticos, también resulta útil en las descripciones de especies (Campello & Bemvenuti 2002; Díaz de Astarloa, 2005). Algunas especies como las pertenecientes al género *Diplomystes*, por ejemplo, son prácticamente indistinguibles a partir de su morfología externa y solo pueden ser determinadas correctamente a partir de caracteres osteológicos (Arratia & Quezada-Romegialli, 2017).

La única descripción osteológica detallada de *Rhamdia quelen* es la brindada por Silfvergrip (1996), pero en la literatura se puede encontrar información parcial sobre algunos caracteres osteológicos de la especie. Estos datos provienen de análisis más generales, ya sean estudios filogenéticos (Mo, 1991; Lundberg *et al.*, 1991; de Pinna *et al.*, 1998; Bockmann & Miquelarena, 2008) o relacionados a la evolución de determinadas estructuras osteológicas (Lundberg & Baskin, 1969; Arratia & Gayet, 1995; Arratia *et al.*, 2003). Es importante aclarar, que la descripción osteológica de Silfvergrip está basada principalmente en el ejemplar NRM 25658 (106.0 mm SL). Este ejemplar proviene del Río Samiria, en el amazonas peruano, la localidad del neotipo de *R. quelen* designado por Silfvergrip (1996). Así mismo, utilizó los ejemplares NRM 25659 (101.8 mm SL) del río Atrato en la costa pacífica de Colombia y NRM 25657 (119.7 mm SL) del río Meta en la cuenca del Orinoco como material comparativo, a los cuales anexó más de 800 radiografías de ejemplares de diferentes puntos que cubren la distribución de la especie según su concepción. En este capítulo se ofrece una detallada descripción osteológica de algunos ejemplares de *R. quelen* de los ríos Paraná y Uruguay.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Captura y procesamiento de los ejemplares

Las artes de pesca fueron variadas incluyendo redes de espera, cañas, trampas y pesca eléctrica. Los ejemplares colectados fueron eutanatizados con una solución anestésica de benzocaina. La fijación se realizó en una solución de Formaldehído al 4% y posteriormente fueron conservados en alcohol 70%. Todo el material colectado fue depositado en la colección

ictiológica del Laboratorio de Genética Evolutiva (LGEP) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM).

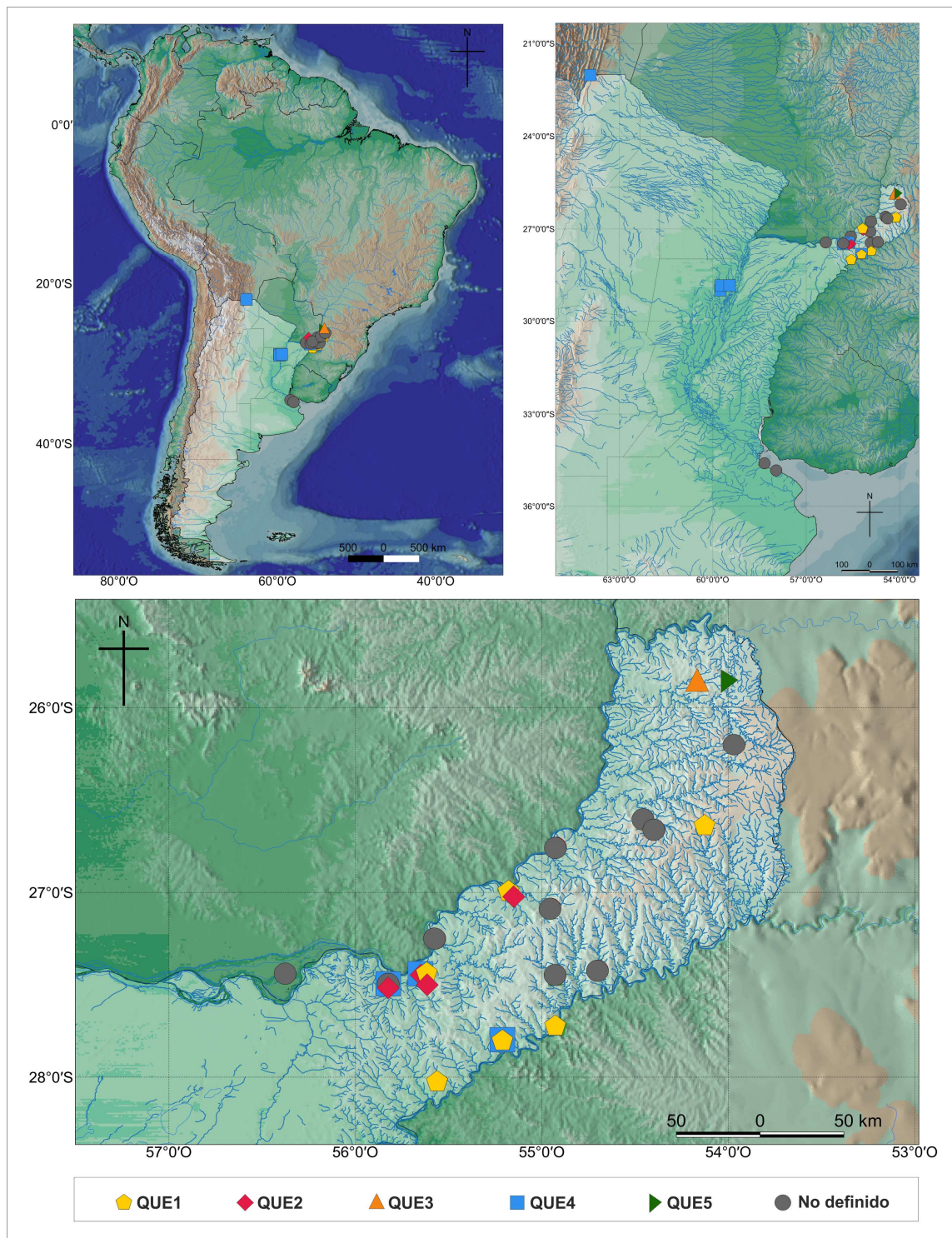


Figura 3.1: Puntos de colecta del material analizado. Las referencias indican los clados moleculares hallados en cada localidad.

Fueron colectados 92 ejemplares en distintos afluentes de los ríos Paraná y Uruguay. La mayoría de ellos ubicados dentro de los límites de la provincia de Misiones, a excepción de unos pocos que pertenecen a la localidad de Moussy, provincia de Santa Fe. Para el análisis de caracteres morfológicos se contó adicionalmente, con material del Río de la Plata (Bs. As.); un ejemplar de *R. quelen* del lote MACN-6191 donado por el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia y cuatro ejemplares cedidos por la Dra. Mercedes Azpelicueta que conforman el lote LGEP055. Información más completa relativa a los colectores, fechas y puntos georeferenciados se brindan en el Apéndice 1 (Material examinado). Los puntos de colecta del material están referenciados en los mapas de la figura 3.1. Estos mapas fueron diseñados empleando datos geoespaciales tomados del Instituto Nacional Geográfico (ING), Argentina.

2.2. Caracteres morfológicos externos

La morfología externa fue evaluada por medio de caracteres morfométricos y merísticos tradicionales. Las medidas fueron tomadas de punto a punto utilizando un calibre digital de 150 mm. Siempre que fue posible se realizaron del lado izquierdo del cuerpo. Cuando las barbillas maxilares o mentonianas eran desiguales se consideró siempre la más larga.

La terminología y metodología utilizada para la toma de medidas se basó en los criterios propuestos por Lundberg & Mc Dade (1986) y Bockmann & Castro (2010). Se tomaron 38 medidas morfométricas; Largo estándar: desde el extremo anterior del hocico a la placa hipural; altura del cuerpo: tomado frente a la inserción de la espina dorsal; ancho del cuerpo: tomado a nivel de la inserción de la espina pectoral; distancia predorsal: desde el extremo anterior del hocico al punto de inserción de la espina dorsal; distancia prepectoral: desde el extremo anterior del hocico al punto de inserción de la espina pectoral; distancia prepélvica: tomada desde la punta del hocico a la porción anterior de la base de la aleta pélvica; distancia preanal: tomada desde la punta del hocico a la porción anterior de la base de la aleta anal; distancia preadiposa: tomada desde la punta del hocico al origen de la aleta adiposa; distancia interdorsal: entre el extremo posterior de la base de la aleta dorsal y el inicio de la aleta adiposa; altura del pedúnculo caudal: la menor altura; longitud del pedúnculo caudal: desde el extremo posterior de la base de la aleta anal al punto medio de la placa hipural; distancia hocico-ano: tomada desde el hocico hasta la porción anterior interna del ano; distancia hocico-papila urogenital: tomada desde el hocico hasta la porción anterior de la papila urogenital; distancia entre los orígenes de las aletas dorsal y pectoral; distancia entre los orígenes de las aletas dorsal y pélvica; distancia entre los orígenes de las aletas pectoral y pélvica; base de la aleta adiposa; base de la aleta anal; base de la aleta dorsal; longitud de la espina dorsal: desde

su base hasta su extremo osificado; longitud del primer radio dorsal: desde su base hasta su extremo, incluida su porción no osificada; longitud de la espina pectoral; longitud del lóbulo dorsal de la caudal: tomada desde el punto medio de la placa hipural al extremo posterior del radio caudal dorsal más largo; longitud del lóbulo ventral de la caudal: tomada desde el punto medio de la placa hipural al extremo posterior del radio caudal ventral más largo; longitud de la barbilla maxilar; longitud de la barbilla mentoniana externa; longitud de la barbilla mentoniana interna; longitud de la cabeza: no incluye la porción carnosa del opérculo; ancho de la cabeza; alto de la cabeza; distancia interorbital: entre los márgenes óseos de la órbita; diámetro orbita: la mayor distancia horizontal entre los bordes carnosos de la órbita; longitud del hocico: desde la región anterior carnosa de la órbita al extremo anterior del hocico; ancho intranarinas: la distancia entre la base de la narina anterior y posterior; distancia entre narina anteriores; distancia entre narinas posteriores; distancia hocico, narina posterior; ancho de la boca: tomado desde el interior de los labios.

Las medidas corporales y la longitud de la cabeza (**HL**) fueron expresadas como proporciones del largo estándar (**SL**) y todas las medidas tomadas en la cabeza como proporciones de su longitud. Los conteos de radios, en las diferentes aletas, se realizaron bajo microscopio estereoscópico Leica Stereozoom S9E y cada radio fue contabilizado como un elemento independiente, aun cuando en el caso de la aleta anal y dorsal los últimos 2 radios comparten pterigóforo.

El análisis estadístico de los datos morfométricos se realizó por medio del programa PAleontological STatistics (PAST) versión 3.19 (Hammer *et al.*, 2001). Se aplicaron los análisis de Componentes principales (PCA) y discriminante lineal (AD). Para el PCA las variables fueron transformadas a logaritmos a fin de igualar la varianza de relaciones alométricas (Bookstein, 1985). Para el AD, en cambio, fueron utilizadas en su escala real (no estandarizadas), ya que los resultados no se ven afectados de modo importante por la escala de las variables individuales (Manly, 1994). Las categorías de agrupación para AD se basaron en los clados moleculares descritos en el capítulo anterior. Dado que no todos los ejemplares fueron caracterizados molecularmente, los “no definidos” fueron codificados como incógnita.

Los estadísticos se aplicaron a dos matrices diferentes, ambas contenían las 38 variables independientes (cada una de las medidas morfométricas) pero diferían en el número de variables dependientes o nominales (cada uno de los ejemplares). La primera incluía todos los ejemplares medidos (n=92), mientras que la otra estaba acotada a los ejemplares que contaban con caracterización molecular (n=62).

2.3. Caracteres osteológicos

Las observaciones osteológicas se realizaron sobre ejemplares transparentados y con doble tinción de acuerdo a Taylor & Van Dyke (1985) y preparados esqueléticos obtenidos mediante el empleo de derméstidos. La terminología aplicada a los caracteres osteológicos y de los canales laterosensoriales cefálicos siguió las propuestas de Bockmann & Miquelarena (2008) y Northcutt (1989) respectivamente. Para la descripción y homología del sistema de canales infraorbital y supraorbital se aplicó la nomenclatura de Arratia & Huaquín (1995) y para el sistema de canales preoperculomandibular a Bockmann & Miquelarena (2008). Los conteos de vertebras corresponden al total, incluyendo las primeras cinco que conforman la vertebra compleja y el centro caudal compuesto (pu1+u1) que se contó como un solo elemento. La cintura pectoral está conformada por el cleitro y la fusión del coracoides, mesocoracoides y escápula, lo cual Bockmann y Miquelarena (2008) denominan “complejo óseo de la cintura pectoral”. Así mismo, sostienen que la articulación de la cintura escapular al cráneo se da por medio de un complejo óseo que ha sido denominado “posttemporal” (Silfvergrip, 1996) o “posttemporosupracleitro” (Arratia, 1987) y por ellos definido como supracleitro, denominando a sus procesos anterior, posterior y ventromedial como brazos ventrolateral, ventromedial y ligamento de Baudelot. El empleo de esta terminología se debe a su empleo habitual en las descripciones recientes de Heptapteridae.

Lista de abreviaturas en figuras de anatomía: **am**–arco mesocoracoideo, **an**–antorbital, **ap**–autopalatino, **ar**–ángulo-artículo-retroarticular, **bb1-4**–basibranquiales 1 al 4, **bo**–basioccipital, **bs**–basipterigio, **ca**–ceratohial anterior, **cb1-5**–ceratobranquiales 1 al 5, **chm**–canal del tronco nervioso hioideo-mandibular, **ci**–cartílago inter-ceratohial, **cle**–cleitro, **co**–hueso coronomeckeliano, **cp**–ceratohial posterior, **cu**–cuadrado, **de**–dentario, **eb1-5**–epibranquiales 1 a 5, **ec**–cartílago etmoides, **el**–etmoides lateral, **en**–entopterigoides, **enhm**–foramen de entrada del tronco neural hioideo-mandibular, **enVC**–espina neural de la vértebra compleja, **ep**–epioccipital, **epu**–epural, **es**–extrascapular, **ex**–exoccipital, **fa**–fontanela anterior, **fb1-4**–faringobranquiales 1 al 4, **fc**–foramen de la arteria caudal, **fd**–foramen dorsal, **fenh**–foramen de entrada de la rama hioidea del tronco neural hioideo-mandibular, **fenm**–foramen de ingreso de la rama mandibular del tronco nervioso hioideo-mandibular, **fh**–faceta hiomandibular, **fi**–foramen de salida del tronco nervioso infraorbital, **fn**–foramen nervioso, **fo**–foramen óptico, **fp**–fontanela posterior rudimentaria, **fr**–frontal, **ft**–foramen trigeminofacial, **ha+has**–complejo hipurapófisis, **hb1-3**–hypobranquiales 1 al 3, **hd**–hipohial dorsal, **hu1-hu5**–hipurales 1 al 5 (el signo + indica co-osificación), **hv**–hipohial ventral, **hy**–hiomandibular, **i1**–rama sensorial infraorbital 1, **i2**–rama sensorial infraorbital 2 (antorbital), **i3-7**–ramas sensoriales infraorbitales 3 a 7, **ih**–interhial, **io**–interopercular, **lb**–ligamento de Baudelot, **li**–labio interno, **ln**–lamina neural, **mc**–cartílago de Meckel,

me–mesetmoides, **mt**–metapterigoides, **mx**–maxilar, **na**–nasal, **nca**–nódulo cartilaginoso accesorio, **op**–opérculo, **os**–orbitoesfenoide, **pa**–paraefenoides, **pae**–proceso anterior externo (o brazo anterolateral), **pai**–proceso interno anterior (o brazo anteromedial), **paVC**–rama anterior del proceso transverso de la vértebra compleja, **pca**–proceso cleitral articular, **pcb**–complejo óseo posterior de la cintura pectoral (coracoides, mesocoracoides y escápula fusionadas), **pcp**–proceso postcleitral, **pd**–placa faríngea dentígera, **ph**–parhipural, **pl**–proceso lateral, **pm1-10**–poros de salida de las ramas sensoriales preopérculomandibulares 1 a 10, **pna**: placa nugal anterior, **pnm**: placa nugal medial, **pnp**: placa nugal posterior, **po1+po11**–rama sensorial del complejo preopérculomandibular (rama postótica 1 + rama preopérculomandibular 11), **po2**– rama sensorial postótica 2 (pterótica o temporal), **pop**–preopérculo, **ppr**–proceso posterior, **ppVC**–rama posterior del proceso transverso de la vértebra compleja, **pre**–premaxilar, **pro**–proótico, **ps**–pteroesfenoide, **psl**–pestaña lateral, **pt**–pterótico, **ptV5**–proceso transverso de la vértebra 5, **ptVC**–proceso transverso de la vértebra compleja, **pu1+u1**–centro compuesto (preural 1 y ural 1), **pu2**–centrum preural 2, **pun**–proceso uncinado, **rb**–radios branquiostegos, **s1-s4**–rama sensorial supraorbital 1 al 4, **s6**–rama sensorial supraorbital 6 (epifiseal), **s7**–rama sensorial supraorbital 7 (postorbital), **s8**–rama sensorial supraorbital 8 (parietal), **sahm**–foramen de salida del tronco neural hioideo-mandibular, **soc**–supraoccipital, **sp**–esfenótico, **spn**–supraneural, **spo**–subpreopercular, **sup**–supracleitro, **ta**–túbulo antorbital, **ts1-4**–túbulos suborbitales 1 a 4, **uh**–urohial, **ur**–uroneural, **vl**–brazo ventrolateral del supracleitro, **vm**–brazo ventromedial del supracleitro, **vo**–vómer.

3. RESULTADOS

3.1. Caracteres morfológicos externos

3.1.1. Análisis tradicionales

El empleo de análisis tradicionales no permitió detectar caracteres exclusivos que diferenciaron los clados entre sí y los rangos de variación para la mayoría de los caracteres se superponen entre los grupos (Tabla 3.1). El clado QUE1 es uno de los más variables (también es el más representado y ampliamente distribuido), mientras que el clado QUE3 es el que presenta menor variación (todos sus ejemplares corresponden a una única localidad; n=10). El único clado que de algún modo puede ser distinguido de otros es QUE3. Esta distinción es parcial pues se diferencia de QUE2 y QUE4 pero presenta rangos de variación solapados con QUE1. QUE3 puede distinguirse de QUE2 en el diámetro orbital (13,8-16,9% vs 16,4-19,6%) y

se diferencia de QUE4 por presentar la base de la aleta dorsal más corta (13,3-15,2% vs 16-20,9%), al igual que la longitud de su barbilla maxilar (35-51,6% vs. 51,8-82,5%).

	GENERAL				QUE1				QUE2				QUE3				QUE4			
	Rango	M	SD	n	Rango	M	SD	n	Rango	M	SD	n	Rango	M	SD	n	Rango	M	SD	n
Long estándar (SL; mm)	20.5–27.3	152.2	49.7	94	89.2–27.3	161.0	45.6	35	111.1–24.0	159.5	52.1	5	118.2–220.5	155.4	31.5	10	139.1–234.4	183.1	28.9	9
Porcentajes de SL																				
Altura corporal	12.9–25.7	17.4	2.6	94	14.2–23.7	16.8	2.1	35	16.0–19.7	17.2	1.6	5	12.9–19.4	15.2	2.2	10	17.1–25.7	19.9	2.7	9
Ancho corporal	16.3–25.0	19.5	1.5	94	16.3–24.0	19.0	1.4	35	17.4–19.8	18.5	0.9	5	18.4–20.7	19.6	0.7	10	18.2–25.0	21.0	2.2	9
Dist predorsal	30.7–39.4	34.8	1.7	93	32.3–36.6	34.8	1.1	35	31.7–35.1	33.5	1.5	5	32.5–37.2	34.1	1.3	10	30.7–38.3	34.9	2.3	9
Dist prepectoral	21.2–30.0	24.4	1.7	93	22.3–29.1	24.3	1.3	35	21.7–23.9	22.9	0.9	5	21.2–25.0	23.0	1.1	10	21.6–27.4	24.5	1.7	9
Dist prepelvica	43.2–74.4	49.2	4.1	93	45.1–52.5	49.5	1.7	35	45.2–50.9	48.1	2.3	5	46.2–51.8	49.1	1.8	10	43.2–55.2	49.2	3.4	9
Dist preanal	57.8–75.0	69.0	2.8	93	65.4–74.5	68.9	2.0	35	57.8–73.7	66.1	5.8	5	65.5–72.5	69.4	2.5	10	61.2–75.8	69.4	4.2	9
Dist preadiposa	51.3–64.2	57.5	2.5	92	54.6–62.9	58.6	1.8	35	53.8–60.5	56.9	2.5	5	53.3–60.4	56.9	2.2	10	49.8–64.2	56.2	3.6	9
Dist interdorsal	0.1–11.2	6.0	2.2	92	2.9–11.2	6.9	1.8	35	5.8–10.7	8.2	1.9	5	5.4–9.9	8.2	1.6	10	1.5–8.1	4.5	2.2	9
Altura pedúnculo caudal	8.3–14.4	11.3	1.1	93	9.4–14.4	10.8	1.0	35	10.3–12.8	11.4	1.2	5	10.7–12.6	11.4	0.7	10	11.0–13.6	12.6	0.7	9
Long pedúnculo caudal	14.3–22.4	18.8	1.7	93	14.8–22.0	18.9	1.7	35	17.2–20.3	19.0	1.1	5	14.3–20.5	17.6	2.1	10	16.7–20.3	18.2	1.0	9
Dist hocico—ano	49.5–63.3	56.6	2.3	93	52.5–59.9	56.5	1.7	35	50.9–59.0	55.1	3.1	5	52.0–59.2	55.4	1.9	10	49.5–63.3	56.5	3.9	9
Dist hocico—papila urog.	53.8–66.6	56.1	3.7	92	55.7–64.1	60.0	1.7	35	55.7–62.2	58.5	2.7	4	56.5–63.0	59.4	2.0	10	53.8–66.6	60.1	3.9	9
Dist dorsal—pectoral	14.3–22.9	19.0	1.4	93	14.3–21.9	18.4	1.3	35	18.1–20.8	18.9	1.1	5	18.2–20.3	19.2	0.8	10	17.8–22.9	20.2	1.5	9
Dist dorsal—pelvic	18.8–29.5	22.9	2.2	93	19.5–27.9	22.4	1.8	35	21.0–29.5	24.6	3.9	5	19.6–23.1	21.3	1.4	10	22.5–29.0	25.2	2.2	9
Dist pectoral—pelvica	22.8–31.6	27.2	2.0	93	23.4–31	27.2	1.8	35	24.5–28.3	26.1	1.5	5	26.3–30.8	28.6	1.4	10	24.1–31.6	27.6	2.4	9
Long aleta adiposa (base)	28.7–44.1	35.7	2.7	92	31.4–41.1	35.1	2.4	35	33.1–39.4	35.9	2.3	5	33.9–37.4	36.0	1.2	10	34.1–44.1	38.2	2.9	9
Long aleta anal (base)	9.9–18.0	13.1	1.5	93	10.6–15.4	13.0	1.3	35	10.4–14.5	12.0	1.8	5	12.4–15.7	14.0	1.1	10	12.1–16.4	13.6	1.3	9
Long aleta dorsal (base)	12.0–20.9	16.6	1.7	93	14.3–19.5	16.8	1.4	35	12.0–17.5	15.4	2.2	5	13.3–15.2	14.4	0.6	10	16.0–20.9	17.8	1.4	9
Long espina dorsal	5.6–12.7	9.3	1.4	91	6.9–12.4	9.2	1.2	35	7.4–11.6	9.5	1.7	5	6.5–10.6	8.3	1.1	10	8.6–12.5	10.6	1.2	8
Long del 1º radio dorsal	10.5–19.2	13.8	2.0	87	11.2–17.4	14.1	1.5	35	10.7–16.9	13.5	2.9	5	10.5–14.3	12.1	1.2	10	11.9–17.1	14.0	1.7	7
Long espina pectoral	8.6–15.6	11.5	1.7	91	9.7–15.4	11.7	1.1	35	9.3–13.5	11.3	1.9	5	8.7–12.7	10.3	1.3	10	11.1–15.6	13.8	1.7	7
Long. lóbulo caudal dorsal	16.1–30.3	27.2	2.7	89	16.8–28.9	22.3	2.2	35	20.6–27.2	23.1	2.6	5	17.4–24.9	20.9	2.7	10	18.0–27.5	24.0	3.0	7
Long lóbulo caudal ventral	16.2–33.0	23.0	3.1	88	16.2–28.7	23.2	2.5	35	21.7–29.1	24.3	2.9	5	18.1–25.4	21.4	2.9	10	19.3–28.4	24.6	3.2	7
Long barbilla maxilar	28.1–106.6	56.9	14.4	90	36.8–90.4	58.1	12.8	35	28.1–76.5	48.4	19.9	4	35.0–51.6	43.4	5.9	10	51.8–82.5	64.6	10.8	8
Long barbilla mentoniana ext.	14.5–44.1	23.7	6.5	90	14.5–35.0	22.5	4.6	35	14.9–32.1	23.0	7.6	5	16.1–24.3	20.3	2.9	10	19.3–44.1	31.0	8.1	8
Long barbilla mentoniana int.	10.0–28.8	15.4	4.3	90	10.0–21.4	14.3	2.6	34	10.1–21.0	15.1	4.9	5	10.9–16.4	13.8	1.9	10	13.2–28.8	20.7	5.4	8
Long de la cabeza (HL)	21.5–30.6	25.1	1.7	94	23.3–26.9	25.0	1.0	35	21.5–25.0	23.7	1.4	5	22.2–25.4	23.6	1.0	10	22.2–28.1	25.4	1.9	9
Porcentajes de HL																				
Ancho de la cabeza	64.1–99.8	76.9	6.8	93	64.1–89.1	74.7	5.4	35	71.7–80.2	76.6	3.1	5	77.0–85.3	81.9	2.5	10	73.6–87.6	81.1	5.1	9
Altura de la cabeza	43.7–103.1	54.8	8.0	94	43.7–64.5	51.7	5.1	35	51.9–59.0	55.4	2.9	5	48.2–57.4	50.6	2.6	10	50.2–65.3	59.5	4.0	9
Dist interorbital	21.8–61	30.6	4.9	94	21.8–38.2	28.6	3.7	35	24.9–32.3	30.3	3.1	5	30.1–36.4	32.4	2.0	10	29.3–41.4	35.4	3.3	9
Diámetro orbital	11.3–23.0	16.6	2.0	94	13.8–22.1	17.2	1.8	35	16.4–19.6	17.5	1.4	5	13.8–16.9	15.2	1.0	10	13.4–19.0	15.9	1.4	9
Long del hocico	24.7–48.7	40.4	2.8	93	24.7–48.7	40.6	3.3	35	37.0–42.5	40.3	2.1	5	40.2–42.4	41.7	0.8	10	38.6–42.1	40.0	1.2	9
Ancho intranarinas	12.7–20.2	16.7	1.5	92	14.3–19.1	17.0	1.2	35	12.7–19.6	15.9	2.8	5	15.6–18.7	17.6	0.9	10	13.2–17.2	15.5	1.2	9
Dist internarinas anteriores	17.6–24.5	21.3	1.5	92	17.6–24.4	20.7	1.3	35	19.5–22.8	21.6	1.3	5	19.8–23.5	22.0	1.1	10	19.3–24.0	22.1	1.6	9
Dist internarinas posteriores	17.1–24.5	20.2	1.7	92	17.4–22.3	19.5	1.4	35	17.1–22.5	20.5	2.2	5	19.7–22.6	20.9	0.9	10	19.0–24.0	21.4	1.6	9
Dist hocico—narina posterior	21.4–28.2	24.5	1.6	92	22.0–28.2	24.8	1.4	35	22.1–27.6	25.1	2.6	5	21.9–28.1	25.1	1.6	10	21.7–23.5	22.7	0.7	9
Ancho de la boca	35.2–55.7	47.9	4.0	92	35.2–53.6	45.7	3.7	35	48.3–52.3	50.1	2.0	5	48.1–53.7	50.5	2.1	10	39.98–55.7	49.1	4.8	9

Tabla 3.1: Caracteres morfométricos de *Rhamdia quelen*. Se consideran todos los ejemplares en conjunto y discriminados por grupo. M=media, SD= desvío estándar, n= número de observaciones.

Con los caracteres merísticos ocurre lo mismo, ya sea que se considere a todo el conjunto o a cada uno de los clados por separados, existe una gran variación. La tabla 3.2 muestra las variantes encontradas y sus frecuencias. Según qué carácter se considere, hay clados que presentan mayor o menor variación o diferencias en el estado más frecuente. Sin embargo, ninguno de ellos es exclusivo de algún clado.

La aleta dorsal presentó de 7 a 10 radios totales y todos los clados excepto QUE3 varían en el número (entre 1,6 e 1,9), siendo 1,6 la moda en QUE2, QUE3, QUE4 y 1,8 en QUE1. El único de

los clados que presentó un número constante de radios dorsales fue QUE3. Los radios pectorales ramificados varían entre 6 y 10 siendo 8 y 9 los conteos más frecuentes. Los caracteres más variables son el número de radios anales y la formula caudal. Esta última refleja el número de radios principales en los lóbulos dorsal y ventral de la aleta caudal. Por otra parte, la formula anal fue establecida únicamente en el material diafanizado o en los preparados esqueléticos presentando las combinaciones: iii,8- iii,11- iv,9 (2); v,8 (2); v,9 (2); vi,7; vi,8; vi,9. Los números entre paréntesis indican su frecuencia; el valor modal del número total de radio en los conteos osteológicos es 13.

	GENERAL	QUE1	QUE2	QUE3	QUE4	GENERAL	QUE1	QUE2	QUE3	QUE4	
Radios dorsales	n=92	n=35	n=4	n=10	n=13	Rad. anales totales	n=92	n=31	n=4	n=10	n=13
I+6	28	3	2	10	9	11	34	9	1	5	3
I+7	32	12	1		3	12	35	18	3	2	7
I+8	29	18	1		1	13	7				2
I+9	3	2				14	1				
I+10						15	1				
Radios pectorales	n=92	n=35	n=4	n=10	n=13	Radios caudales	n=88	n=35	n=4	n=10	n=12
I+7	9	3	1	2	2	i7 + 8,i	23	7	2	4	2
I+8	46	15	1	6	7	i7 + 9,i	54	22	2	5	6
I+9	35	15	2	2	4	i7 + 10,i	2	1			1
I+10	2	2				i8 + 8,i	1	1			
Radios pélvicos	n=94	n=35	n=4	n=10	n=13	i8 + 9,i	3	1			2
6	93	34	4	10	13	i8 + 10,i	2	1			1
7	1	1				i7 + 7,i	2	2			
Rad. anales totales	n=92	n=31	n=4	n=10	n=13	i6 + 8,i	1			1	
8	2	1									
10	12	3		3	1						

Tabla 3.2: Caracteres merísticos de *Rhamdia quelen*. Se consideran todos los ejemplares en conjunto y discriminados por grupo. En cada caso se indican la frecuencia de los distintos estados y el número de observaciones (n).

3.1.2. Variación en los patrones de coloración

Los ejemplares mostraron una notable variación en cuanto a la coloración. El color de fondo puede ser amarillo, marrón, oliváceo, distintas tonalidades de gris e incluso negro. En algunos se observan pequeñas máculas oscuras distribuidas irregularmente. Cuando presentes, podían ser escasas y estar distribuidas laxamente o ser numerosas y ocupar gran parte del cuerpo, incluso superponerse. El dorso, a la altura de la aleta dorsal y la porción cefálica tienden a ser ligeramente más oscuras que el resto del cuerpo. Así mismo, la coloración se torna más clara hacia la región ventral, hasta volverse amarilla pálida o blanquecina. En algunos casos esta transición es más abrupta que en otros y hay ejemplares en los que la zona ventral clara se reduce a la porción abdominal. La aleta dorsal presenta una banda hialina que la atraviesa transversalmente, el ancho de esta banda es variable y en algunos especímenes es más notoria que en otros. Luego del proceso de fijación, la coloración se torna más opaca y uniforme pero continúa siendo variable. Finalmente es interesante destacar las variaciones que ocurren

durante la manipulación de los ejemplares, sobre todo en aquellos con coloración amarilla u olivácea. Una vez capturados y transferidos a los baldes tendían a volverse mucho más oscuros, pero si el balde o la pecera permanecía en reposo y con adecuada aireación, los ejemplares recuperaban su coloración inicial. Este oscurecimiento también ocurría cuando se los sometía a la solución anestésica.

3.1.3. Poros cefálicos

La distribución de los poros cefálicos se muestra en la figura 3.2. El canal supraorbital suele presentar siete poros, el infraorbital cinco o seis y el preoperculomandibular 10 u 11. En todos los clados, los poros pueden ser simples o múltiples (agregados, dendríticos); en este último

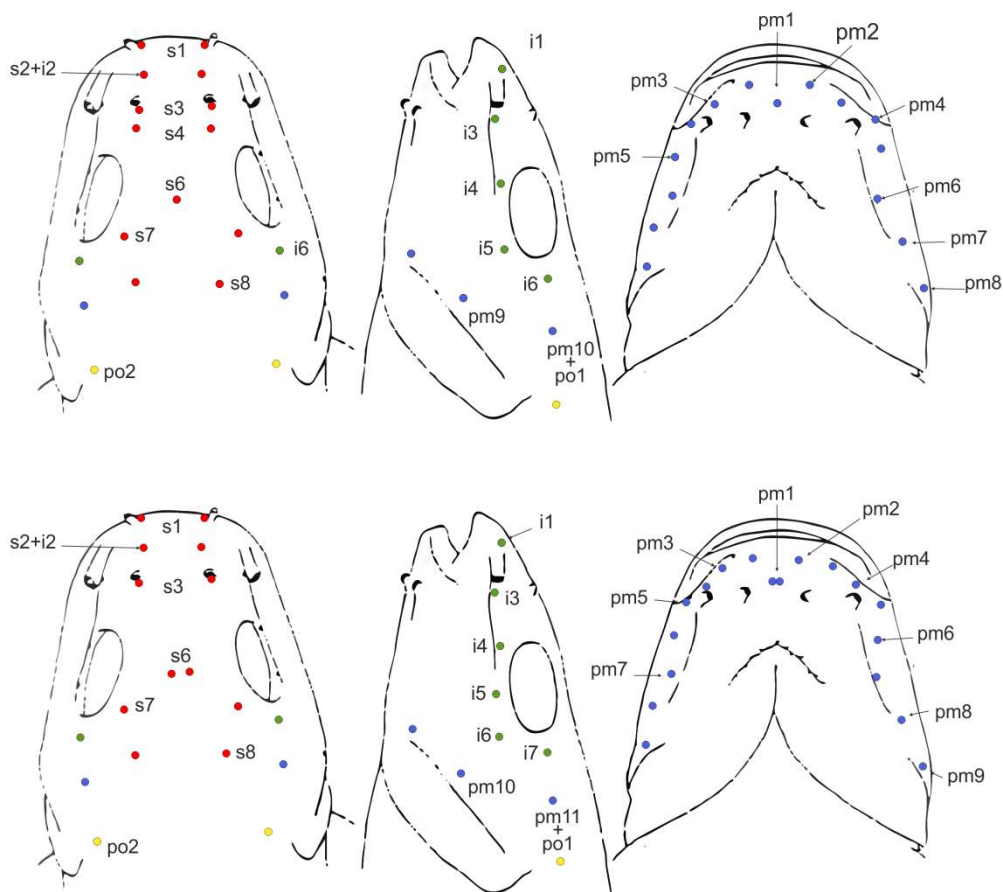


Figura 3.2: Patrones de distribución de los poros cefálicos (modificada de Silfvergrip, 1996)

caso, refiere a que cada poro central tiene más de un orificio interconectado. En algunos ejemplares la distribución de los poros no es simétrica, pudiendo encontrarse más orificios de un lado que de otro e incluso, cuando simples, puede no aparecer de uno de los lados.

Los clados QUE1 y QUE4 son los que más variaciones presentan, hallándose ejemplares con hasta 6 orificios por poro (en el caso de QUE4 nunca se contaron más de tres por poro). El

clado QUE3 generalmente presenta poros simples y cuando múltiples, no son más de dos orificios. Los clados QUE1, QUE4 y ejemplares no caracterizados molecularmente, presentaron un poro infraorbital extra; el cual deriva de una rama que atraviesa la porción media del túbulo suborbital 3. Por otra parte, se observó que la rama i2 está conectada a s2 y su poro se ubica posterior a la narina anterior.

El clado QUE3 presenta algunas peculiaridades. Mientras que en la mayoría de los ejemplares y clados, la rama epifisial se fusiona medialmente y alcanza la piel como un único canal, en este grupo casi todos los especímenes presentaban dos poros s6 notoriamente separados. Por otra parte, en los ejemplares analizados, se observó la ausencia de uno de los poros supraorbitales, aparentemente s4. Dado que solo se revisaron externamente ejemplares de este clado, no se puede saber cómo es la relación de S6.

3.1.4. Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística exploratoria cuya aplicación nos permite detectar la existencia de grupos o *clusters*, inferir la similitud entre los ejemplares analizados y establecer los aportes de cada una de las variables originales a las componentes, relacionándolas con la posición que ocupa cada ejemplar en la nube de dispersión.

En este caso, las 38 variables morfométricas reducidas a dos componentes principales (CP), explicaron el 79.39 % de la variabilidad. Sin embargo, la CP1 acumuló 78.53% de esa variación y todas las demás componentes aportan muy poco. Como puede observarse en la figura 3.3, los ejemplares de distintos clados se solapan tanto en el eje x (CP1) como en el eje y (CP2). Las variables que más contribuyeron a la variación sobre CP1 fueron: distancia hocico-papila urogenital (0.2), distancia interdorsal (0.2), altura del pedúnculo caudal (0.19), distancia entre orígenes de las aletas dorsales y pélvicas (0,19), distancia entre orígenes de las aletas pectoral y pélvica (0.18). En general se observa que la contribución de cada variable sobre esta componente es más o menos similar para gran parte de los caracteres. En el caso de CP2, en cambio, la variable que más contribuye es la distancia interdorsal (0.85), seguida por la distancia hocico-papila urogenital y longitud de las barbillas maxilares, mentonianas externas y mentonianas internas (entre 0.27 y 0.19).

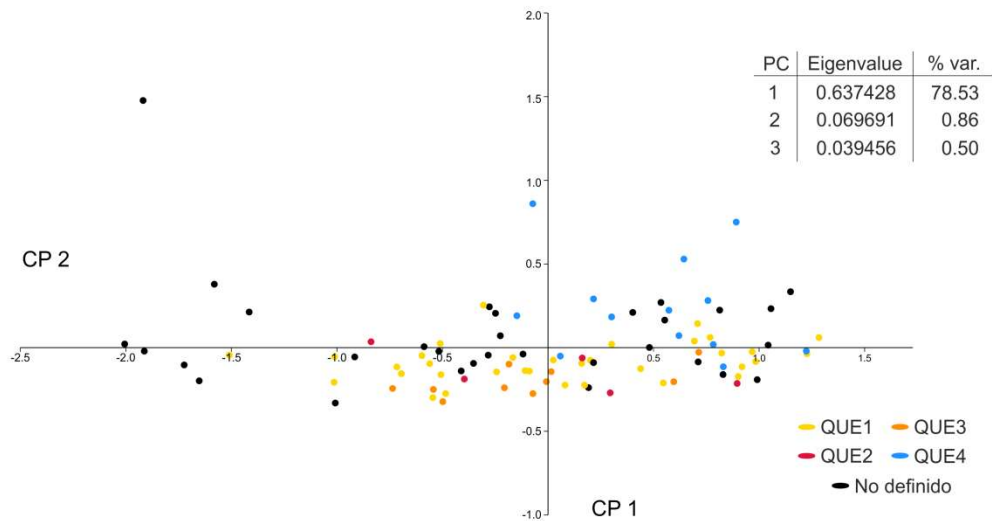


Figura 3.3. Análisis de Componentes Principales. Cada punto es un individuo y su color refleja el clado molecular al que pertenece.

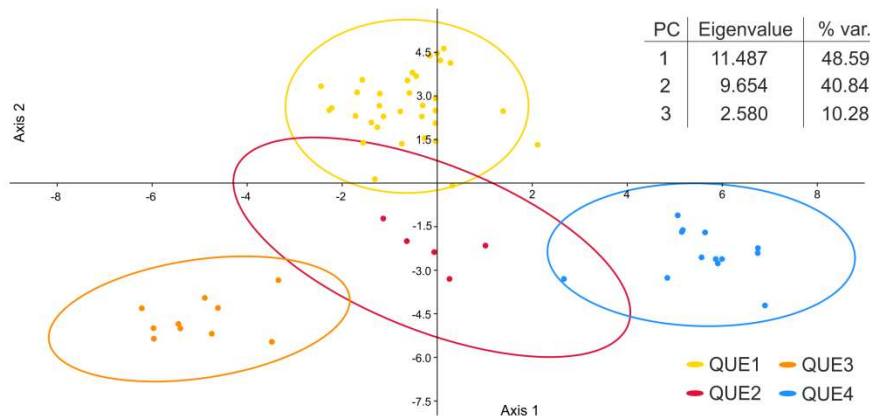


Figura 3.4. Análisis discriminante. Los grupos están construidos en base a los clados moleculares. Las elipses establecen un intervalo de confianza del 95%.

3.1.5. Análisis discriminante lineal (ADL)

Este análisis permite identificar una combinación lineal de características y establecer funciones que permitan la diferenciación o discriminación de dos o más grupos generados *a priori*. Su objetivo es explicar la pertenencia de un individuo dado a uno u otro grupo preestablecido, en función de sus variables y a la vez cuantificar el peso de cada una de estas en la discriminación. En este caso ADL se aplicó al conjunto total de datos y a una matriz acotada que contenía solo las medidas de ejemplares con caracterización molecular. Dado que

los resultados fueron muy similares y que los individuos incógnita solo se clasifican “a posteriori”, solo se presentan los gráficos y resultados de la matriz acotada (Figura 3.4).

El ADL recuperó los 4 grupos definidos *a priori*. Sin embargo, las elipses de confianza de los mismos entran en contacto en algunos casos. Sobre el eje X se diferenciaron QUE3, QUE4 y el conjunto formado por QUE1 y QUE2. Estos últimos se superponen en el eje X pero se distinguen en el eje Y. La elipse del grupo QUE2 es mucho más extensa que la de los otros y probablemente se deba a su bajo número de ejemplares (n=5) lo que podría afectar la sensibilidad del análisis.

Los caracteres que contribuyen a la variación sobre el eje X fueron: longitud de la barbilla maxilar (4.34) y mentoniana externa (2.46), longitud estándar (2.66), distancia preanal (1.89) y la distancia prepélvica (1.69). Los que contribuyen sobre el eje Y fueron: longitud de la barbilla maxilar (1.33), mentoniana interna (0.67), mentoniana externa (0.68), longitud de la base de la aleta adiposa (0,56) y el ancho de la cabeza (0.43).

El proceso de validación de los resultados se realizó a través de un método de remuestreo (Jackknife). Este estadístico mostró que los ejemplares eran asignados correctamente a su grupo de pertenecía solo en el 62.9% de los casos.

3.2. Caracteres osteológicos

3.2.1. Cráneo (Figura 3.5)

El techo craneal es duro, densamente osificado y muy ornamentado, presentando surcos, estrías y hoyuelos que irradian desde los centros de osificación. En vista lateral, el perfil dorsal es prácticamente liso y ascendente desde el extremo medial de los premaxilares al final del proceso supraoccipital. En vista dorsal, el neurocráneo es trapezoidal con 3 muescas laterales: la generada por los procesos anterior y posterior del etmoides lateral, la región orbital y otra ubicada a la altura de la sutura esfenótico-pterótico. Posterodorsalmente el supraoccipital se extiende en un proceso medio cuya longitud nunca alcanza la placa nugal anterior pero tiene extensión variable. La altura del neurocráneo también es variable, en general los ejemplares que conforman el clado QUE3 tienen un neurocráneo más bajo en sentido dorsoventral.

El premaxilar es rectangular, largo y delgado y ambos se unen medialmente por cartílago. Su margen anterior es continuo y sin proyecciones y su porción distal se curva posteriormente. Su superficie ventral presenta de 6 a 8 hileras de dientes viliformes ordenados irregularmente e inclinados ligeramente hacia atrás. En su superficie dorsal se distingue un reborde triangular orientado de modo oblicuo, delante del cual articula el cornete del mesetmoides. En su margen lateroposterior se articula al maxilar, un hueso pequeño que forma un túbulo óseo

completo alrededor de la base de la barbilla maxilar. Los dos procesos articulares del maxilar tienen superficies redondeadas en vista dorsal y planas en vista lateral siendo el ventral más largo.

El mesetmoides es un hueso alargado que se bifurca anteriormente dando lugar a dos cornetes delgados de punta roma. La bifurcación genera una notable depresión anteromedial y los cornetes se ubican sobre los premaxilares ocupando aproximadamente $\frac{3}{4}$ de su superficie. Posteriormente, el mesetmoides contacta a los frontales mediante suturas interdigitadas y cierra la porción anterior de la fontanela. Posterolateralmente se conecta al etmoides lateral y ventralmente contacta con la porción más anterior del vómer. La porción posteroventral del mesetmoides se proyecta anterolateralmente formando unos ganchos, cuyos bordes posteriores se unen al cartílago etmoideo que se continúa hasta el margen anterior del etmoides lateral.

En vista dorsal los etmoides laterales son rectangulares y se encuentran ornamentados en su porción dorsal, posterior al hueso nasal; en este punto descienden formando un escalón y se continúan anteriormente en la placa cartilaginosa que contacta con los ganchos ventrales del mesetmoides. Presentan 2 procesos, uno anterior (articular del palatino) y uno posterior (antorbital), este último fuertemente curvado hacia abajo. Suturan con los frontales posterodorsal y lateralmente, con el mesetmoides lateralmente, con los frontales, el orbitoesfenoides, las alas laterales del vómer y la porción más anterior del parasfenoides ventralmente.

El hueso nasal es hueco y dorsoventralmente deprimido, su porción anterior es más ancha. Se encuentra sobre el etmoides lateral, su margen medial es convexo y el lateral externo cóncavo, siguiendo la curvatura que experimenta el mesetmoides. Presenta 3 poros: uno anterior, que es la apertura de ingreso de la rama 1 del sistema de canales laterosensoriales (s1). Una apertura medial en la porción anterior ensanchada de la cual sale la rama antorbital (s2) y una posterior para la salida del canal laterosensorial supraorbital de la cual deriva la rama s3.

El antorbital es una lámina triangular pobremente osificada con una larga varilla que se extiende a lo largo de su borde posteromedial. Tanto el túbulo antorbital como el suborbital 1 están co-osificados en la superficie dorsal del antorbital. El túbulo antorbital se orienta transversalmente sobre la porción anteromedial del antorbital. El suborbital 1 es oblicuo sobre la porción anterolateral del antorbital. El suborbital 2 se asocia al proceso posterolateral del etmoides lateral y los suborbitales 3 y 4 definen el margen ventral de la órbita; el suborbital 4 se asocia al proceso esfenótico.

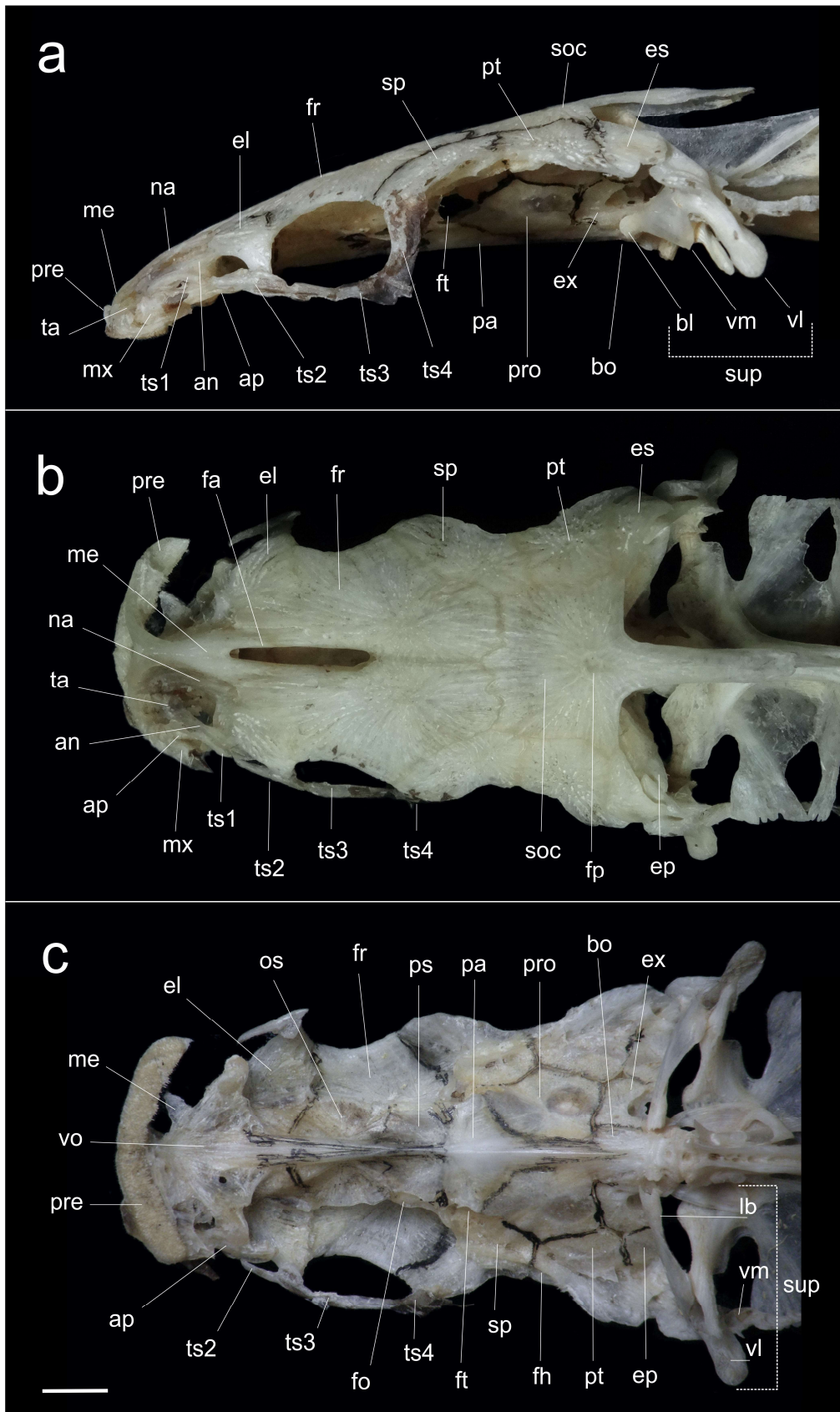


Figura 3.5: Neurocráneo de *Rhamdia quelen*, LGEP 493 (204,0 mm): **a-** Vista lateral, **b-** Vista dorsal, **c-** Vista ventral. Longitud de la barra= 5 mm.

El autopalatino es un hueso cilíndrico con una superficie articular dorsomedial para el etmoides lateral. Su extremo anterior es bien cilíndrico y ligeramente más ancho que su porción media, su extremo posterior es lateralmente comprimido con dos crestas. Ambos extremos son cartilagosos siendo el cartílago posterior más pequeño que el anterior.

Los frontales se hallan separados anteriormente por la fontanela, entrando en contacto a partir su mitad posterior. Ventralmente se conectan con el orbitoesfenoides por una sutura lisa que se interrumpe por un foramen y con el pteroesfenoides. Tanto dorsal como ventralmente se une al esfenótico. Ambos frontales se suturan posteriormente con el supraoccipital, en un punto intermedio entre el margen posterior de la fontanela anterior y la fontanela posterior rudimentaria. Sus márgenes laterales externos son lisos, sin ningún tipo de proceso. El frontal tiene un canal y cuatro aperturas visibles para el canal laterosensorial supraorbital y sus ramas. La primera, es una gran apertura en el margen anterior del frontal por el cual ingresa el canal laterosensorial supraorbital. La segunda es una apertura elíptica situada sobre el margen medial del frontal casi a mitad de la fontanela, es la salida de la rama epifisial (s6). El tercer orificio es pequeño y se ubica aproximadamente a la altura del extremo posterior de la fontanela anterior, esta abertura puede estar a la misma altura de la apertura anterior, sobre el eje longitudinal, o desplazada lateralmente hacia la órbita; constituye la salida de la rama postorbital (s7). La cuarta apertura se ubica posteriormente en la misma línea longitudinal o algo desplazada medialmente, próxima a la sutura fronto-esfenótica; constituye la salida de la rama parietal (s8). Existe una quinta apertura entre el frontal y el esfenótico a través de la cual pasa el canal supraorbital pero no es visible externamente.

La fontanela anterior está bien desarrollada; inicia en el margen posterior del mesetmoides a la altura del margen anterior del frontal y se extiende posteriormente no superando el margen posterior de la órbita. La fontanela posterior es sólo un foramen rudimentario en ejemplares pequeños y está totalmente cerrada en ejemplares de mayor porte. Se sitúa en el supraoccipital, ligeramente anterior al nacimiento del proceso supraoccipital.

El supraoccipital es un hueso impar y complejo formado por la co-osificación de los parietales y el supraoccipital (Arratia & Huaquin, 1995). De forma cuadrangular (sin considerar su proceso) y bien ornamentado; se ubica en la porción posterior del cráneo, limitando anteriormente con los frontales, lateralmente con el esfenótico, pterótico y escapular y posteroventralmente con el exoccipital y el epioccipital. El proceso supraoccipital es ligeramente más ancho en su base que en su extremo posterior, el cual no es aguzado sino más bien romo, aunque puede encontrarse levemente bifurcado. Se extiende hasta sobrepasar el margen anterior del proceso transversal posterior de la vertebra compleja en la mayoría de los ejemplares, excepto en los ejemplares que constituyen el clado molecular QUE3 en los

cuales nunca supera este punto. Dorsalmente se observan ornamentaciones sólo en su porción basal. Ventralmente presenta una lámina que se extiende distalmente, su altura es prácticamente constante excepto en su porción distal donde asciende abruptamente.

El esfenótico es alargado y más o menos rectangular en vista dorsal. Se ubica lateralmente a los frontales y limita posterodorsalmente con el pterótico y el supraoccipital. Su margen anterior se curva hacia abajo formando parte de la órbita. Ventralmente se asocia al proótico, pterótico y al pteroesfenoides y presenta parte de la región articular del suspensorio. Se encuentra atravesado por la porción posterior de los canales laterosensoriales supra e infraorbitales y por gran parte del canal ótico. Presenta 3 aperturas, una anteromedial, una lateral y una posterior que constituyen el foramen de entrada del canal supraorbital, el ingreso del canal infraorbital y la salida del canal ótico respectivamente.

El pterótico es cuadrangular ubicado posteriormente al esfenótico, paralelo al supraoccipital y anterior a la extraescápula. Ventralmente se asocia al proótico, al exoccipital y al epioccipital y en su porción anteroventral se forma la carilla articular para la recepción del hiomandibular; su margen posterolateral se proyecta posteroventralmente. En su porción lateral presenta el orificio de salida de la rama postótica fusionada al canal preoperculomandibular (po1+pm11). En su porción posterolateral casi sobre la zona de sutura con el escapular se encuentra una segunda abertura para la rama pterótica o temporal (po2).

El extraescapular es triangular con su extremo delgado dirigido hacia el supraoccipital. Se ubica en la esquina posterolateral del techo craneal y contacta medialmente al supraoccipital, anteriormente al pterótico y posteriormente al epioccipital. Se halla atravesado por el final del canal postótico. Forma parte de la articulación con el supracleito. El epioccipital se une al hueso extraescapular en su superficie dorsal y ventralmente se asocia al exoccipital y al pterótico. Forma el piso de la cavidad donde se ubica el proceso anterior del supracleito. El exoccipital se encuentra posterior al proótico, entre el basioccipital y el epioccipital y presenta los forámenes de los nervios glosofaríngeo (IX) y vago (X). En los ejemplares QUE3 son ligeramente más notorios en vista dorsal dada la compresión dorsoventral del cráneo.

El orbitoesfenoides es un hueso impar, triangular en su sección transversal, su contacto anterior con el etmoides lateral está cubierto en vista lateral por el proceso antorbital de dicho hueso. El proótico es el hueso más grande de la pared lateral del neurocráneo, tiene forma pentagonal con su vértice más agudo en posición anterior, los márgenes ventrales suturan con el paraesfenoides y el basioccipital, sus márgenes dorsales con el esfenótico y pterótico y su margen posterior con el exoccipital. El paraesfenoides es largo y se extiende desde el etmoides lateral hacia la porción media del basioccipital. Su unión al pteroesfenoides se restringe al área que separa el foramen del nervio trigeminofacial del foramen del nervio óptico. Anteriormente

está cubierto por el vómer, el cual carece de dientes y presenta su característica forma de saeta; su extremo anterior alcanza el mesetmoides y sus alas son relativamente cortas, su extremo posterior es ligeramente variable pudiendo o no alcanzar la sutura entre el orbitoesfenoides y el paraesfenoides. El paraesfenoides tiene una pestaña lateral que divide al hueso en una porción dorsal y una ventral. La porción ventral constituye gran parte del margen dorsal de los forámenes óptico y trigémino-facial. La porción dorsal es parte de una cavidad que queda oculta en vista ventral por la pestaña y en vista lateral oculta por la bóveda craneana. La pestaña se continua posteriormente hasta la porción anterior de la superficie articular de esfenótico con el hiomandibular. Dorsalmente sutura con los frontales y el esfenótico, anterior y ventralmente con el orbitoesfenoides y posterodorsalmente con el esfenótico.

El foramen del nervio óptico es ovalado y pequeño, su margen ventral lo constituye el paraesfenoides y su margen dorsal el pteroesfenoides. El orbitoesfenoides a penas contacta el margen anterior del foramen. El foramen del nervio trigémino-facial es ovalado, posterior y mucho más grande que el foramen orbital; está constituido anterodorsalmente por el pteroesfenoides, posterodorsalmente por el esfenoides, anteroventralmente por las alas del paraesfenoides y posteroventralmente por el proótico. Los forámenes trigémino-facial y óptico se separan mediante la extensión del pteroesfenoides hacia el paraesfenoides.

3.2.2. Aparato branquial (Figura 3.6)

El aparato branquial está constituido generalmente por 3 basibranchiales (bb), 3 pares de hipobranchiales (hb), 5 pares de ceratobranchiales (cb), 5 pares de epibranchiales (eb) y 3 pares de faringobranchiales (fb). Los basibranchiales se ubican ventromedialmente; el 1º bb está ausente en casi todos los ejemplares analizados, aunque uno de los diafanizados (del clado QUE1) lo presentaba. Los basibranchiales 2º y 3º están osificados y el 4º es cartilaginoso. El bb2 es una barra algo aplanada dorsoventralmente, su margen anterior es a penas más ancho que el posterior y ambos extremos son cartilaginosos; el bb3 es similar aunque ligeramente más corto, su extremo posterior se ubica ventralmente al par de hipobranchiales 3. Tanto bb2 como bb3 se unen ventralmente a la lámina del urohial. El bb4 es aplanado en vista dorsal y tiene una cresta medial delgada y alta en su superficie ventral. Esta cresta está bordeada por las placas cartilaginosas del 4º par de ceratobranchiales.

Los hipobranchiales (hb) se ubican entre los basibranchiales y los ceratobranchiales. El primer y segundo par de hipobranchiales (hb1, hb2) son huesos planos, bien osificados cuyos extremos mediales, laterales y posteriores son cartilaginosos. De forma más o menos rectangular sus márgenes externos se asocian mediante cartílago a cb1 y cb2 respectivamente.

Sus márgenes mediales se aproximan a la porción cartilaginosa anterior de bb2 y bb3. Los hb3 son totalmente cartilagosos contactándose entre sí medialmente por debajo del bb3 y por encima del bb4; en su margen externo se asocia al cb3.

Los primeros 4 ceratobranquiales son huesos alargados y planos cuyos margenes laterales se curvan ventralmente formando un surco que alberga los filamentos branquiales. Sus extremos cartilagosos se asocian ventromedialmente a los hipobranquiales y dorsolateralmente a los epibranquiales. El 5º par de ceratobranquiales 5 (cb5) se expande en su porción media y tiene cartílagos anteromediales que se unen a la porción dorsal y posterior del bb4. Su superficie ventral no es excavada y su superficie dorsal consta de una placa de dientes faríngeos que se extiende desde su extremo antero medial hasta $\frac{3}{4}$ de su extensión posterior.

Los epibranquiales (eb) se unen a los ceratobranquiales por su margen externo y a los faringobranquiales en su margen medial. Los primeros 4 están osificados y tienen forma más o menos cilíndrica, mientras que el ep5 es simplemente un nódulo cartilaginoso. Todos los epibranquiales presentan un surco en su superficie dorsal, sobre el cual se ubican los filamentos branquiales. Los eb1 y eb2 se asocian en su extremo medial; eb1 exhibe una pequeña cresta laminar. El eb3 presenta un notorio proceso uncinado que en la mayoría de los ejemplares se apoya sobre el eb4, aunque también puede encontrarse sobre este sin entrar en contacto (visto en 2 ejemplares) como suele ocurrir en pimelódidos y pseudopimelódidos; por otro lado se observó que este proceso puede variar en su longitud anteroposterior. El eb4 se encuentra expandido siendo sus crestas anteriores y posteriores más notorias. Los eb3 y eb4 se ubican dorsalmente sobre la placa faringobranquial dentífera superior. El eb3 se articula con el faringobranquial 3 (fb3) y el eb4 con el fb4.

El faringobranquial 1 tiene forma laminar y se ubica anterodorsalmente en paralelo al primer epibranquial. Silfvergrip (1996) describe al fb2 como un pequeño hueso que contacta los extremos cartilagosos del 1º y 3º fb y del 1º y 2º eb; este hueso no ha sido constatado en el material analizado, aunque se ha encontrado en esa posición una estructura cartilaginosa que ha sido denominado nódulo cartilaginoso accesorio (siguiendo a Bockmann & Miquelarena, 2008). El faringobranquial 3 se encuentra expandido en su extremo posterior ubicándose sobre la placa de dientes faríngeos, luego se comprime considerablemente y su porción anterior es más bien cilíndrica (semejante a una pala). El fb4 en cambio, es semicircular y se articula anteriormente con el fb3 y posteriormente con el eb4. El fb4 presenta un proceso en su margen dorsomedial el cual varía entre una lámina curvada que se dirige hacia arriba a una cresta relativamente baja.

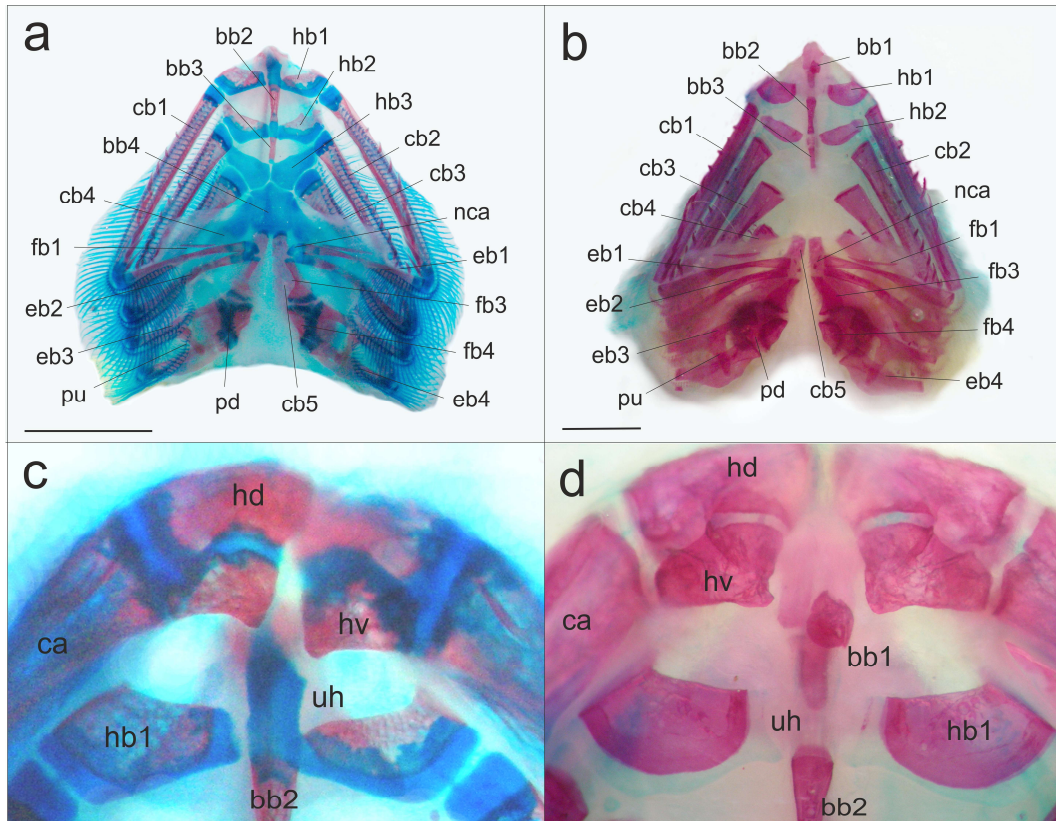


Figura 3.6: Arcos branquiales y porción anterior del arco hioideo en *Rhamdia quelen*. **a** y **c**: LGEP302 (89,2 mm); **b** y **d**: LGEP011 (114,8 mm). Longitud de la barra= 5 mm.

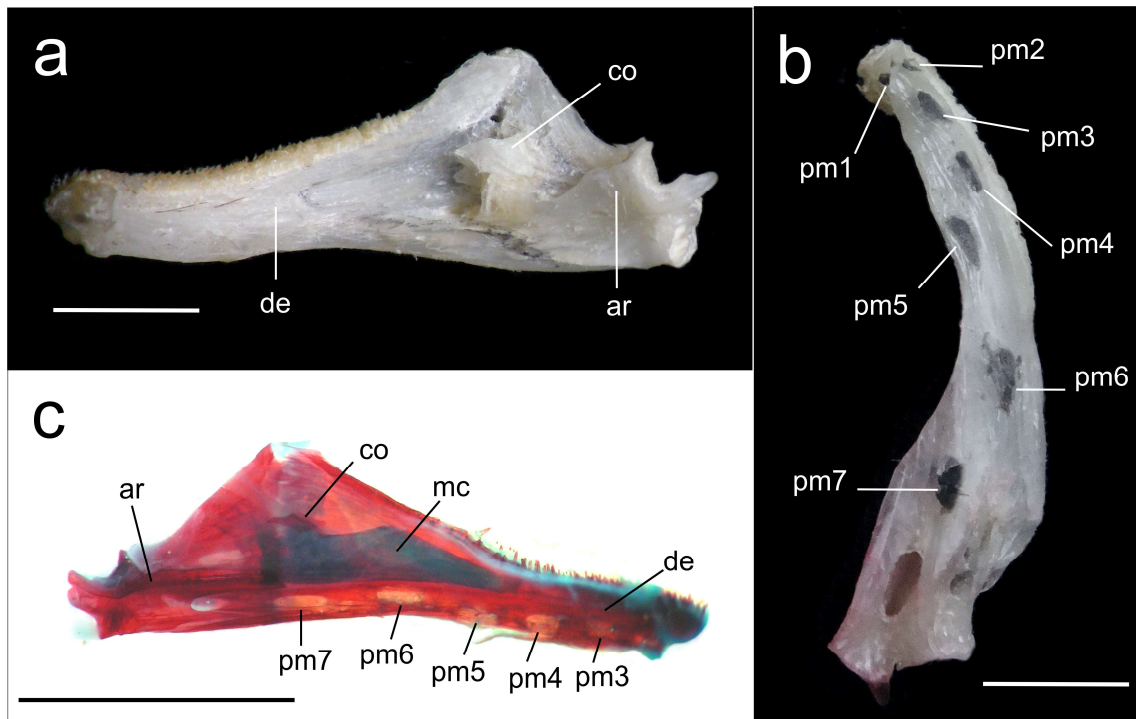


Figura 3.7: Mandíbula de *Rhamdia quelen*, LGEP 493 (204,0 mm) y LGEP555 (C&S) (81,8 mm). **a**- Vista interna mandíbula derecha; **b**- Vista ventral; **c**- Vista interna mandíbula izquierda. Longitud de la barra= 5 mm.

	GENERAL (n=16)	QUE1(n=4)	QUE2 (n=1)	QUE3 (n=2)	QUE4 (n=3)	Clado no def. (n=6)
Vertebras	42-48	45-47	47	42*-46	44-46	44-48
Costillas	10-12	11-12	11	10	11	10-12
Inicio arco hemal	V13-V16	V14-V16	V14	V16	V13-V14	V15-V16
Ultima esp neural bifidas	V11-V13	V11-V13	V13	V11	V11	V12-V13
Pter. Dorsales	7-9	8-9	8	7	7	7-9
R. Dorsales	1,6-1,9	1,7-1,8	1,7	1,6	1,6-1,7	1,6-1,9
R. Caudales	Tabla 3.2	(i,7+8,i)-(i,7+9,i)	(i,7+9,i)	(i,7+9,i)	(i,7+9,i)	(i,7+8,i)-(i,7+9,i)
R. Anales totales	9-15	13-14	14	13	13-15	9-14
Pter. Anales	10-12	11-12	11	11	11-12	10
R. Pectorales	1,9-1,10	1,9-1,10	1,9	1,9	1,9	1,9
Conf. sierras pect.	A,B,C	A,B	C	B	A,C	A,B,C
S. Pec. internas	9-29	10-29	19	15	19-29	9-15
S. Pec. externas	8-21	11-14	9	12	12-21	8-13
R. branquiostegos	6-7	6-7	6	7	6-7	7
Dientes 1º arco branquial	8-15	9-14	11	10-13	8-11	12-15

Tabla 3.3: Variación en conteos osteológicos. (*) LGEP375 presenta algunas deformaciones anatómicas. A= sierras de tamaño equivalente; B= sierras externas más grandes; C= sierras internas más grandes; V= vértebras.

El primer y segundo arco branquial portan en la porción externa del arco una hilera de dientes inclinados anteriormente (rastrillos branquiales), en cambio el tercer y cuarto arco presentan una línea externa y una interna. El quinto arco branquial tiene una línea uniforme de 8 a 10 dientes en la porción externa mientras que la porción medial se expande originando la placa faríngea inferior. La serie más interna de dientes faríngeos cuenta con aproximadamente 30 a 36 dientes viliformes. El número de rastrillos branquiales en el primer arco puede variar entre nueve y 15 (Tabla 3.3) y estar distribuidos de diferentes modos, el eb1 nunca porta más de tres rastrillos y siempre se halla uno en la unión entre cb y eb.

3.2.3. Mandíbula (Figura 3.7)

La mandíbula está compuesta de elementos óseos y cartilagosos. Los dentarios se unen entre sí a través de una sínfisis anteromedial. El dentario es un hueso alargado y curvo, que en su superficie dorsal lleva una placa de dientes viliformes, organizados irregularmente. La placa se torna más delgada hacia posterior presentando de 5 a 8 dientes en las hileras anteriores y entre 2 a 5 en las más posteriores; dorsalmente tanto externa como internamente se forman pliegues que presentan denticulos en su superficie dorsal. El dentario presenta una serie de canales y aperturas en sus porciones ventral y lateral por los cuales transcurren la rama principal de canal sensorial preperculomandibular y sus ramas secundarias (pm). Anteriormente se encuentran 2 orificios circulares y pequeños, el más ventral es la salida de pm1 y el lateroventral de pm2, a estos les siguen una serie de 5 orificios ovalados bastante más notorios en posición ventral y lateroventral, que constituyen los forámenes de salida de pm3 a pm7.

El extremo posteroventral del dentario se proyecta posteriormente hasta alcanzar el hueso ángulo-artículo-retroarticular. El cartílago de Meckel es bastante grande extendiéndose del tercio posterior de la superficie dentada del dentario, hasta la región de contacto con el ángulo-artículo-retroarticular. Presenta además, un proceso ascendente, la porción más alta del dentario, que articula con el margen dorsal anterior del ángulo-artículo-retroarticular. El pequeño hueso coronomeckeliano es romboidal en vista lateral interna, su extremo anterior se extiende hacia el dentario, su margen ventral se ubican sobre el cartílago de Meckel y su extremo posterior llega al hueso ángulo-artículo-retroarticular.

3.2.4. Arco hioideo (Figura 3.8)

En vista lateral pueden observarse el hipohial ventral, el ceratohial anterior y su pestaña lateral, el cartílago interceratohial, el ceratohial posterior y el interhial. En vista dorsal es posible observar el hipohial dorsal, este presenta un pequeño proceso que se extiende sobre el urohial. En la región de contacto entre los hipohial dorsal, ventral y el ceratohial anterior se encuentra el foramen dorsal para la arteria hioidea. El hipohial ventral presenta un surco en su porción interior en el cual se ubica la porción anterior del urohial.

El ceratohial anterior tiene una forma más o menos trapezoidal. Su porción posterior contacta al ceratohial posterior mediante una unión sincondral y otra región de suturas dentadas e inferiormente se relaciona mediante el cartílago interhial. El ceratohial posterior es más corto que el anterior y tiene forma triangular. Dorsalmente articula con el interhial, un pequeño hueso que articula con el hiomandibular. La superficie lateral externa del arco es convexa en vista lateral y cóncava en vista medial. A lo largo de su superficie media se observa un reborde muy marcado que establece una trayectoria cóncava hacia posterior con su punto más ventral justo encima del cartílago interhial. El ceratohial anterior porta 5 radios branquiostegos, el sexto se halla a la altura de la unión interceratohial y el último a la del ceratohial posterior. Los extremos posteriores de los dos últimos radios branquiostegos, están unidos por tejido conectivo al opérculo.

El hipohial dorsal no es visible lateralmente y forma un foramen para el paso de la arteria hioidea en su unión con el hipohial ventral. El urohial tiene forma trapezoidal en vista ventral, con una lámina medial larga que se extiende hasta el límite anterior del bb3 y 2 alas laterales que se apoyan sobre un surco ligero de los ceratohiales posteriores.

3.2.5. Suspensorio y serie opercular (Fig 3.9)

El hueso más anterior del suspensorio es el entopterigoides, un pequeño hueso plano de forma trapezoidal a triangular. Su margen anterior se une mediante ligamentos al proceso

lateral del vómer, mientras que su porción posterior está unida al metapterigoides y su margen lateral se asocia al etmoides lateral.

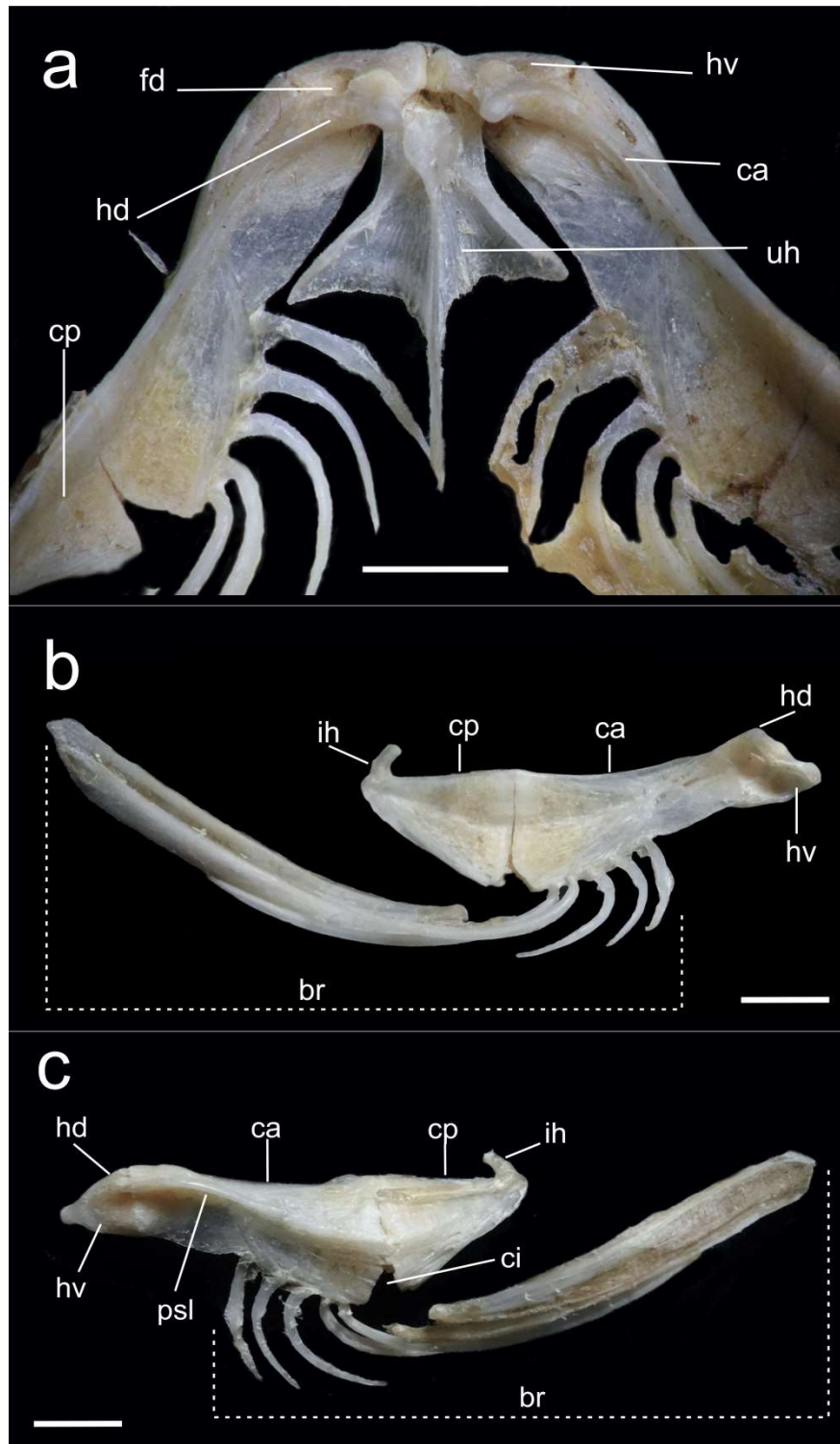


Figura 3.8: Arco hioideo de *Rhamdia quelen*, LGEP 493 (204,0 mm). **a-** Vista dorsal de la porción anterior del arco branquial; **b-** Vista interna del arco hioideo izquierdo; **c-**Vista lateral del arco hioideo izquierdo. Longitud de la barra= 5 mm.

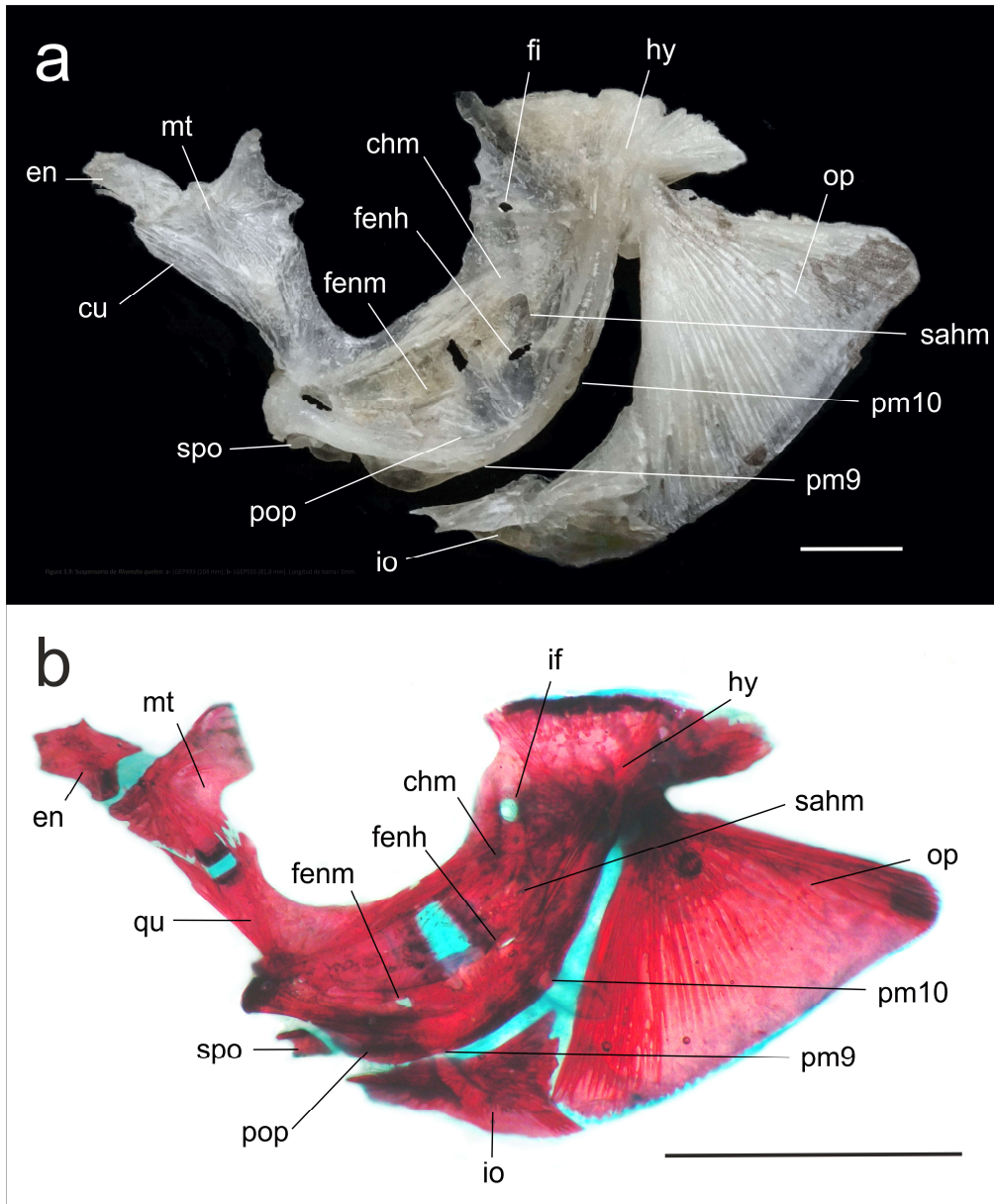


Figura 3.9: Suspensorio de *Rhamdia quelen*: a- LGEP493 (204 mm); b- LGEP555 (81,8 mm). Longitud de barra= 5mm.

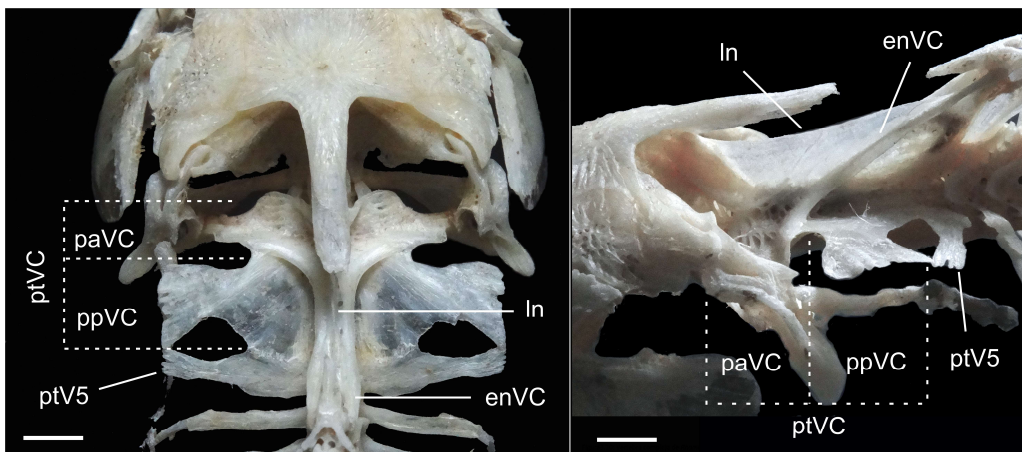


Figura 3.10: Vertebra compleja de *Rhamdia quelen*, LGEP 493 (204 mm). Longitud de la barra= 5 mm.

El metapterigoides es un hueso más o menos cuadrangular. Dorsalmente presenta 2 procesos unidos por una lámina media. El proceso anterior es más alto y el borde de la lámina puede ser recto o más bien cóncavo en vista lateral. Su borde posteroventral está firmemente unido al cuadrado, la porción más dorsal se asocia mediante suturas onduladas, en su porción media a través de un bloque cartilaginoso y en posición ventral por una unión solapada con el proceso anterior del cuadrado. En su margen anterior, el metapterigoides presenta una apertura que se continúa como un pequeño túnel en el hueso, abriéndose justo en la base del proceso dorsal más alto.

El cuadrado es mayormente alargado; anteroventralmente presenta una cabeza articular y una cavidad para el hueso subpreopercular. Su articulación anterior con el metapterigoides es cóncava y sostenida por un pedúnculo anterodorsal comprimido, esto genera la gran concavidad del margen dorsal del hueso. Su lado ventral se asocia al preopérculo y su margen posterior está firmemente adherido al hiomandibular mediante suturas dentadas, así como también mediante un bloque cartilaginoso. La porción anterior del cuadrado presenta un gran foramen inmediatamente posterodorsal a la cabeza articular del cuadrado para el hueso anguloarticular. Presenta otro foramen próximo a su articulación con el hiomandibular, el foramen de ingreso de la rama mandibular del tronco nervioso hiomandibular (mfen) también denominado canal simpléctico.

El hiomandibular, es un hueso delgado con un margen anterodorsal mayormente liso y sin procesos discernibles. En su cara posterodorsal presenta un proceso triangular para la inserción del músculo *levator operculi*. En su porción media más baja, la hiomandibula presenta un corto túnel, el canal hioideomandibular (hmc; denominado canal facial por Lundberg & McDade, 1986), que es atravesado por el tronco nervioso hioideomandibular. Este tronco nervioso ingresa a este canal mediante un foramen (hmen) en la pared medial del hiomandibular, ubicado anteriormente en posición media (foramen medial del canal facial). El nervio recorre una corta distancia a través del hmc y sale a través del foramen de salida en la pared lateral inferior de la hiomandíbula, justo a nivel de la unión interopercular-opercular (hmex; foramen lateral del canal facial). Próximo a este foramen el tronco nervioso se divide en sus ramas hioidea y mandibular. La rama mandibular se extiende hacia el cuadrado, quedando lateralmente expuesta hasta su reingreso en el suspensorio a través del foramen para la rama mandibular del tronco nervioso hioideomandibular (mfen). La rama hioidea se orienta ventralmente, queda expuesta lateralmente hasta ingresar en el foramen de entrada de la rama hioidea (hfen), una apertura en la unión de la hiomandíbula y el preoperculo en la esquina inferior del hueso hiomandibular, justo bajo hmex. Existe otro pequeño foramen que se abre en la porción superior del hmc, adyacente a hmen y a través de él transcurre el tronco

nervioso que inerva el canal laterosensorial infraorbital, por ello se denomina foramen infraorbital (if). Este se ubica al final de una cresta que se extiende horizontalmente a lo ancho de la porción media del hueso hiomandibular. El hiomandibular articula con el neurocráneo a través del esfenótico y pterótico.

El preopérculo es cóncavo en su perfil dorsal y su porción ascendente y ventral no difieren demasiado en longitud. La rama ascendente finaliza en la unión del hiomandibular con el opérculo y la rama ventral a la altura del foramen del cuadrado. El preopérculo presenta 4 aperturas. La primera es grande y se sitúa en el extremo anterior, sirviendo de paso para el canal laterosensorial preoperculomandibular. La segunda apertura es una gran hendidura ventral situada al medio del brazo ventral del hueso sobre el interopérculo y debajo de la placa cartilaginosa entre hy y cu; constituye la salida de la rama pm9. La tercera es de tamaño medio localizada ventralmente, en el vértice entre la rama ascendente y ventral, es la salida de pm10. La cuarta es pequeña situada justo antes de la unión entre el opérculo y el hiomandibular, es el paso del canal preoperculomandibular principal.

El opérculo es un hueso triangular con una superficie lateral plana y ornamentada con estrías y surcos longitudinales pero sin crestas o fosas conspicuas para la acomodación del músculo *levator operculi*. Sus márgenes anterior y dorsal son rectos, aunque este último puede ser ligeramente cóncavo. El vértice dorsal es la zona articular con el hiomandibular, el vértice anteroventral es redondeado y se articula al interopérculo y su vértice posterodorsal es libre y redondeado. El margen posterior del opérculo es oblicuo y presenta una leve concavidad en su mitad dorsal. En algunos ejemplares existen pequeñas sierras próximas a los vértices pero no presentan un patrón claro.

El interopérculo es casi triangular, con una cresta longitudinal ornamentada con hoyos y estrías en su superficie lateral. La superficie medial del hueso es lisa y cóncava; su margen posterior es dos veces más alto que el anterior. Se extiende desde el borde anterior del opérculo, bajo el preopérculo hasta debajo del cuadrado.

3.2.6. Vértebras y complejo vertebral (Figura 3.10)

El número total de vértebras (V) es variable entre 44 y 48 (Tabla 3.3). Las cinco vértebras anteriores constituyen el complejo vertebral (Weber). La vertebra compleja (VC) articula anteriormente con el basioccipital; las suturas se aprecian mejor en vista ventral, aunque también pueden notarse en la base de los procesos transversos posteriores de V4 y los procesos transversos V5; no hay suturas entre V5 y V6. La lámina dorsal es delgada, baja y sutilmente cóncava; con la espina neural de VC dirigida oblicuamente hacia atrás, cubriendo la espina neural de V5 en vista dorsal. El proceso transversal de VC se divide en una rama anterior

y una rama posterior con la presencia de una gran muesca lateral. La rama anterior es ancha en su base y se aguja lateralmente curvándose fuertemente, hacia la región ventral. La rama posterior es una lámina ancha, lateralmente expandida con pequeñas muescas en su margen distal. En vista rostral es prácticamente horizontal, al igual que el proceso transversal de V5. Este último es más delgado que los anteriores y se articula en su margen anteromedial y anterolateral con la rama posterior del proceso transversal V4, generando un gran orificio entre ellos. Los osículos de la línea lateral se ven asociados al supracleito pero no a los procesos transversales.

Desde V6 hasta V15, V16 o V17 (Tabla 3.3) se observan costillas pleurales dirigidas posterior y ventralmente. Las espinas neurales desde V6 a V11, V12 o V13 son bífidas, aunque se observa como la amplitud de la apertura decrece en sentido caudal; las últimas espinas están apenas divididas en su extremo distal. En el surco que forman se alojan los pterigóforos dorsales proximales de la aleta dorsal. A partir de V14, V15 o V16 las parapófisis desaparecen y las apófisis ventrales dan lugar a los arcos y espinas hemales. La altura de la lámina neural es variable y en algunos ejemplares se detectó la presencia de un hueso supraneural entre la lámina neural y la lámina ventral del supraoccipital (Figura 3.11).

3.2.7. Cintura escapular (Fig 3.12)

La cintura escapular se une al cráneo mediante su articulación entre el proceso cleitral-articular (acp) y los brazos ventrolateral, ventromedial y el ligamento de Baudelot correspondientes al supracleito. Está formada por un ancho puente horizontal compuesto por los cleitros y el complejo óseo posterior de la cintura pectoral (pcb). Este hueso complejo es la fusión del coracoide, mesocoracoide y escapula. Los cleitros presentan borde liso y se unen anteromedialmente. Los márgenes laterales se ensanchan posteriormente. El proceso post-cleitral alcanza aproximadamente la mitad de la espina pectoral rígida (en reposo) y su extremo es más bien romo. Al menos $\frac{3}{4}$ del proceso se encuentra ornamentado en su margen lateral externo, siendo su extremo distal liso. La unión entre los cleitros es ligamentosa y posterior a ésta se observa una sínfisis dentada medial entre los extremos coracoides del pcb. Silfvergrip (1996) indica que existen cuatro dientes en cada margen de la unión, sin embargo en los ejemplares aquí analizados se observan tres y cuatro dientes, la mayoría de los ejemplares (73%) presentaban tres. La quilla coracoidea presenta un proceso posteroventral laminar muy delgado distalmente, adquiriendo forma de espina. Los radiales proximales 1 y 2 tienen forma de barra, su porción proximal se apoya sobre el arco mesocoracoideo, mientras que su porción distal se asocia a la base del 3º radio ramificado, en el caso del radial proximal 1

y a los últimos radios en el caso del radial proximal 2, ambos presentan extremos cartilaginosos. El complejo radial distal también es notorio en la base de los primeros radios.

La espina pectoral es ligeramente convexa en vista dorsal. Tiene una región fuertemente osificada y rígida desde su base, aunque en su tercio distal puede ser flexible y segmentada, en algunos casos pueden observarse uno o dos elementos óseos no fusionados. La parte sólida se encuentra ornamentada con estrías longitudinales y presenta sierras internas y externas que son muy variables en su tamaño y número entre los diferentes ejemplares (Figura 3.13). Las sierras en la cara interna pueden ser de igual tamaño a las externas, más pequeñas o más grandes. El número de sierras internas va de 10 a 29 y el de sierras externas de 9 a 21. Las sierras en la cara interna ocupan $\frac{3}{4}$ de la extensión de la espina y nacen bastante próximas a la base, en general son perpendiculares al eje de la espina. Las de la cara externa inician un poco más distales y suelen estar curvadas hacia la base de la espina. En algunos ejemplares es más notoria la presencia de un surco en el margen externo, dentro del cual se alojan las sierras. La porción proximal de la espina se divide en 3 procesos, el más ventral que es el de mayor tamaño articula con la carilla articular del cleitro, mantiene a la espina trabada contra la superficie lateroventral del coracoides y actúa como palanca para el músculo abductor.

3.2.8. Cintura pélvica (Figura 3.14)

Los basipterigios son ligeramente arqueados dorsalmente y excavados ventralmente. Las contrapartes izquierda y derecha se encuentran unidas medialmente por cartílago. Cada hueso presenta dos procesos anteriores bastante largos. El proceso externo o anterolateral se afina distalmente y son casi paralelos entre sí. El proceso interno o anteromedial es más corto y más ancho en su base, aunque se aguza distalmente, posee una dirección anteromedial y su extremo distal alcanza su contraparte, a la cual se une a través de una sínfisis corta. Cada basipterigio presenta además, un proceso lateral y un proceso posterior. Ambos procesos tienen márgenes cartilaginosos que no entran en contacto entre sí, aunque el cartílago del proceso posterior se continúa medialmente en la unión entre ambos basipterigios. El proceso posterior tiene un margen óseo angular y la porción ósea y cartilaginosa del proceso son prácticamente equivalentes. Los radios pélvicos se articulan a los radiales cartilaginosos y los procesos laterales del basipterigio. Los forámenes neurales se localizan próximos a la cresta que se extiende en el proceso posteromedial.

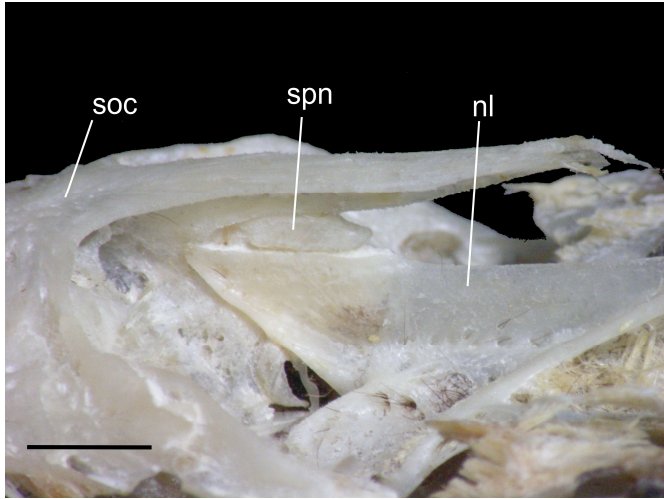


Figura 3.11: Detalle del supraneural (spn), LGEP 198 (260,1 mm). Longitud de barra= 5 mm.

Figura 3.12: Cintura escapular de *Rhamdia quelen*, LGEP493 (202,0 mm). Longitud de la barra= 10 mm.

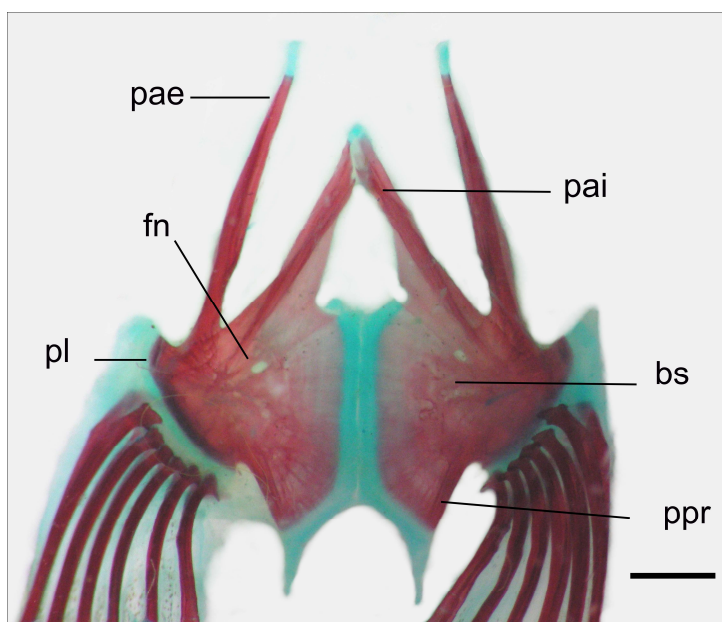
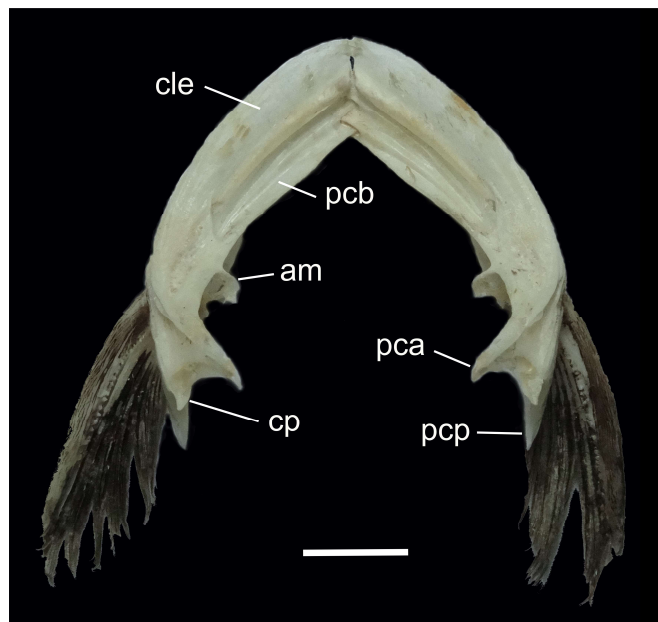


Figura 3.14: Cintura pélvica de *Rhamdia quelen*, LGEP 555 (81,8 mm.). Longitud de la barra= 1 mm.

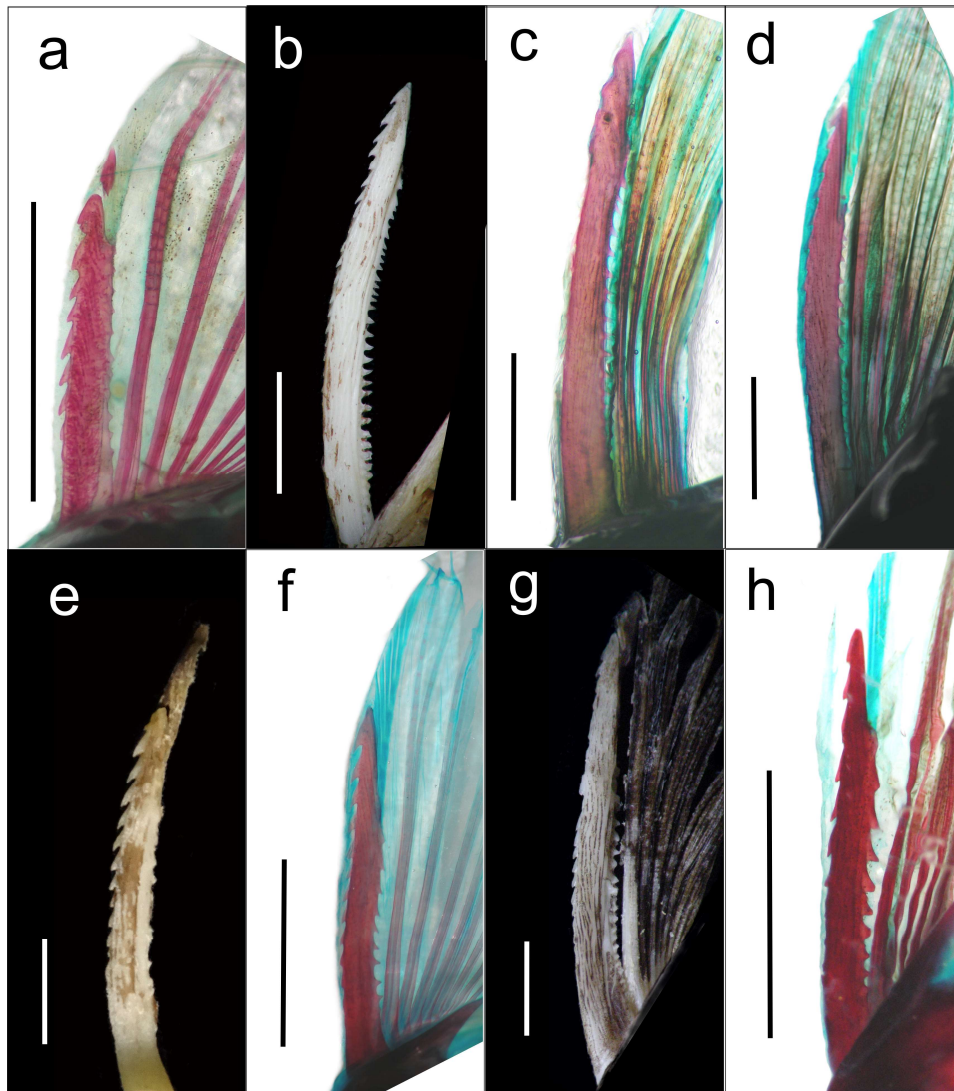


Figura 3.13: Variación en las espinas pectorales de *Rhamdia quelen*. **a-** LGEP 011; **b-** LGEP 129; **c-** LGEP 139; **d-** LGEP 190; **e-** LGEP 230; **f-** LGEP 302; **g-** LGEP 493; **h-** LGEP 555. Longitud de cada barra= 5 mm.

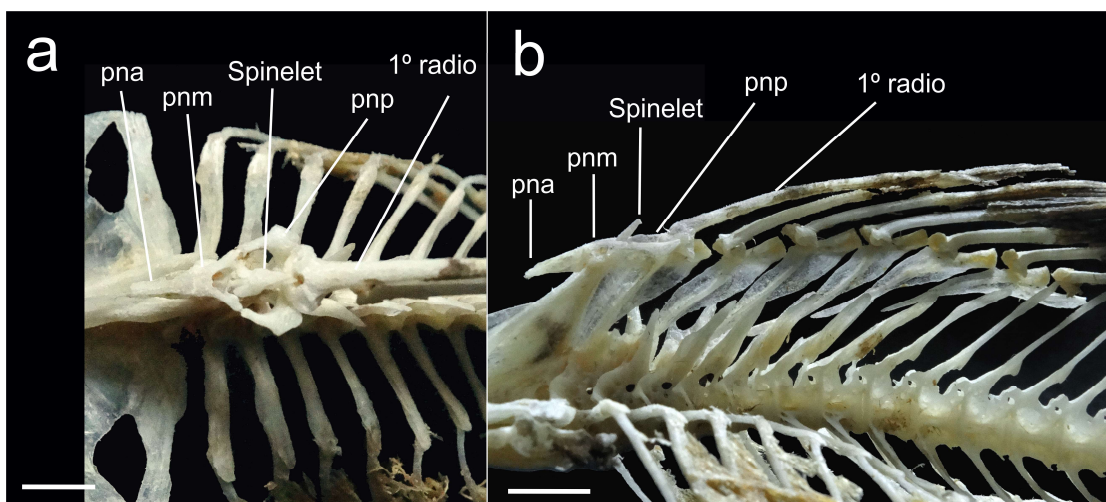


Figura 3.15: Aleta dorsal de *Rhamdia quelen*, LGEP 493 (204,0 mm). **a-** Vista dorsal; **b-** Vista lateral. Longitud de la barra= 5 mm.

3.2.9. Aletas dorsal y anal

En la porción más anterior de la aleta dorsal (Figura 3.15) se ubica un supraneural de forma más o menos triangular en vista dorsal y lateral, constituyendo la placa nucal anterior, que se encuentra asociada al primer pterigióforo. El primer pterigióforo se expande dorsal y distalmente formando la placa nucal media, cuyos brazos definen la porción anterior de la cavidad en la cual se ubica el *spinelet* justo sobre la superficie articular del primer pterigióforo. El segundo pterigióforo es bífido distalmente y expandido en placas que delimitan el espacio ocupado por el primer radio dorsal; presenta además dos procesos anteriores que forman la porción posterior de la cavidad del *spinelet*. Los radios dorsales son variables en número (Tabla 3.3). El primer radio tiene una porción rígida y no ramificada y una porción flexible los demás radios son ramificados variando entre seis y nueve. Los radios se posicionan sobre los pterigióforos cuyo número también es variable (6-9) y los dos primeros siempre se encuentran fusionados. Tienen forma triangular siendo delgados en su extremo basal y se ensanchan posterodorsalmente. Las bases de los pterigióforos se insertan en los espacios formados por las espinas neurales bífidas y se extienden oblicuamente hasta alcanzar el dorso.

La aleta anal se ubica entre las espinas hemales de al menos 10 vértebras, en general entre las vértebras 23 y 33, pero depende el número de vértebras totales (Tabla 3.3). Está conformada por 10 a 12 pterigióforos algunos de los cuales se asocian al extremo distal de los procesos hemales. El primer pterigióforo no está asociado a ninguna estructura anterior y en su extremo distal lleva uno, dos ó tres radios no ramificados.

3.2.10. Esqueleto caudal (Figura 3.16)

La aleta caudal está constituida por dos lóbulos subiguales siendo el lóbulo dorsal ligeramente más corto que el ventral. La configuración de los radios caudales presenta ciertas variaciones (Tabla 3.2 y 3.3) aunque la configuración modal es la comúnmente descrita para *Rhamdia*, presentando un radio no ramificado y 7 radios ramificados en el lóbulo dorsal y 9 radios ramificados y 1 no ramificado en el caudal (i,7+9,i). Además de los principales se observan radios accesorios que varían entre 8 a 16 dorsales y 10 a 18 caudales.

Los radios están articulados a los huesos hipurales que están fusionados formando placas óseas. En la mayoría de los ejemplares el hipural 5 (hu5) se encontraba separado de la placa formada por la fusión de h4 y h3. Así mismo, dos ejemplares (LGEP230 y LGEP139) presentaban h4 y h5 fusionadas y h3 libre (Figura 3.16). El hipural 5 o la placa hipural dorsal se encuentran asociadas al uroneural y al epural. En general todos los radios ramificados y el primero no ramificado se unen a la placa hipural mientras que el primer procurrente caudal se asocia al uroneural.

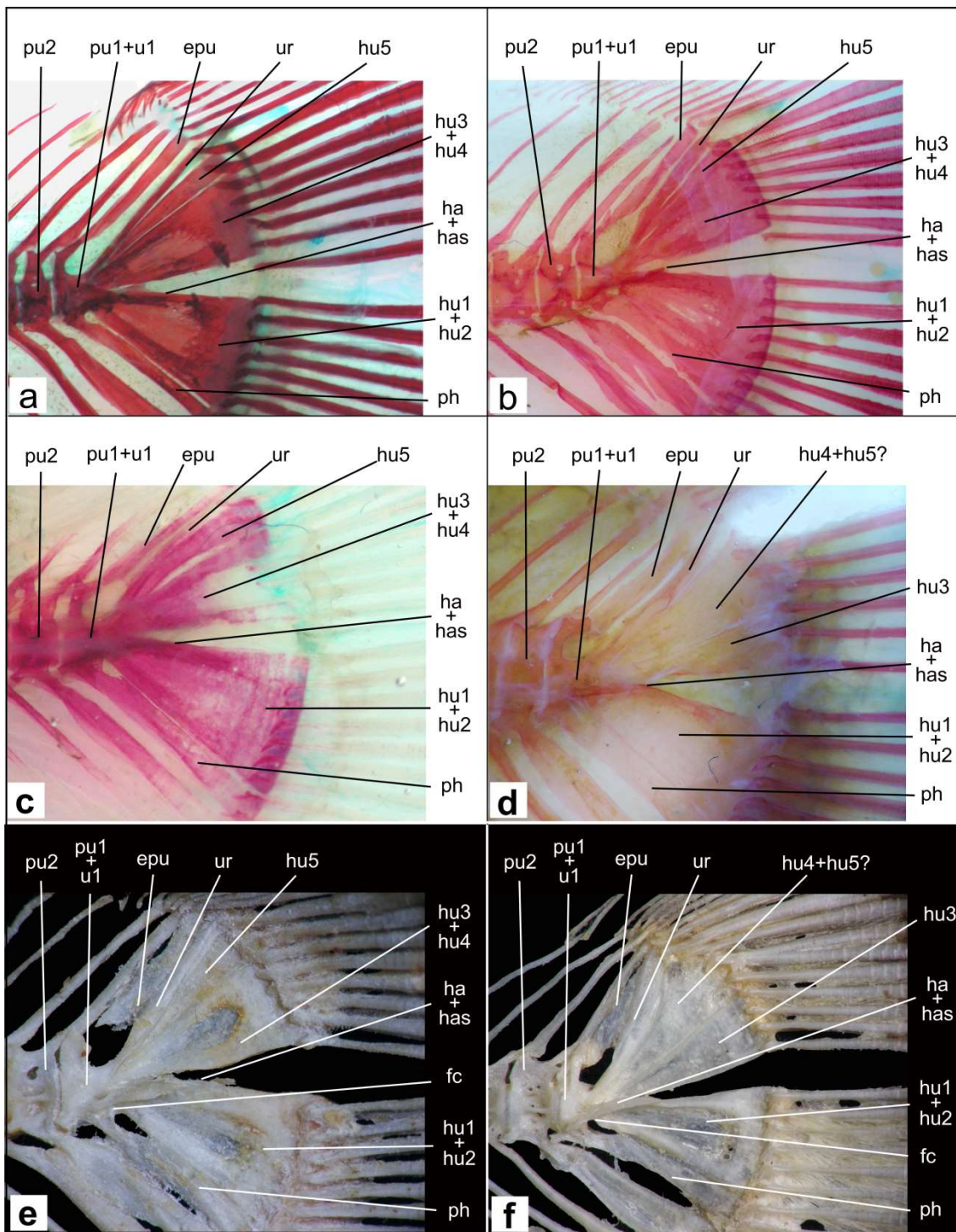


Figura 3.16: Variación en el esqueleto caudal de *Rhamdia quelen*. **a)** LGEP555 (81,8 mm); **b)** LGEP11 (114.8 mm); **c)** LGEP299 (106,2 mm); **d)** LGEP139 (165,2 mm); **e)** LGEP375 (220,5 mm); **f)** LGEP230 (185,7 mm).

El lóbulo ventral está formado por la fusión de los hipurales 1 y 2, se halla íntimamente asociada al parahipural pero no están fusionados. La placa ventral lleva nueve radios y el parahipural dos. Las placas dorsal y ventral se encuentran claramente separadas entre sí

excepto en su base. Las fórmulas caudales encontradas siguiendo la terminología de Lundberg y Baskins (1969) son (PH; 1+2; 3+4; 5) y (PH; 1+2; 3; 4+5), siendo la primera la más frecuente.

La hipurapófisis y la hipurapófisis secundaria están fusionadas formando una placa horizontal, el complejo hipurapófisis, que nace en la base del parhipural y se extiende hasta la base del hipural 2 (tipo "C" de Lundberg & Baskins, 1969). Sus márgenes laterales son rectos y se encuentran posterodorsalmente inclinados. El complejo está atravesado por el foramen caudal por el cual pasa la arteria caudal justo detrás del centro PU1+U1.

4. DISCUSIÓN

4.1. Caracteres morfológicos externos

4.1.1. Caracteres morfométricos

El estudio morfológico más extenso sobre *Rhamdia* fue desarrollado por Silfvergrip (1996) e incluye poblaciones desde México al centro-sur de Argentina. En ese trabajo, el autor redefine morfológicamente la especie nominal *R. quelen*, incluyendo en su sinonimia *R. hilarii*, *R. sapo*, *R. microps*, *R. branneri* y *R. voulezi*. Las primeras tres especies eran citadas para la cuenca del Plata en Argentina (Ringuelet *et al.*, 1967) y las dos últimas para la cuenca del río Iguazú (Garavello & Shibatta, 2016). En este capítulo he analizado morfológicamente, poblaciones de *Rhamdia* de los ríos Paraná y Uruguay que cumplen con los caracteres diagnósticos definidos por Silfvergrip para *Rhamdia quelen*. Caracteres que han sido discutidos por algunos autores por ser demasiado generales (Garavello y Shibatta, 2016; Angrizani & Malabarba, 2018).

Teniendo en cuenta una segregación de los ejemplares en los agrupamientos definidos en el capítulo anterior, solo QUE3 resulta distinguible. Este clado difiere de QUE2 en el diámetro orbital y de QUE4 en la longitud de la aleta adiposa y el largo de las barbillas maxilares. Sin embargo, resulta morfológicamente indistinguible de QUE1. Además, a pesar de estas diferencias morfométricas, el análisis de componentes principales (ACP) no muestra una separación definida entre los clados. De hecho, esta metodología no muestra ningún tipo de agrupamiento o *cluster*. Por otra parte, aunque el análisis discriminante lineal (ADL) logra diferenciar los grupos preestablecidos, la validación cruzada indica que los resultados no son confiables. El proceso de remuestreo solo logra asignar correctamente un individuo, a su grupo de pertenencia, en el 62.9% de los casos. Es necesario tener en cuenta, que el número de ejemplares analizados por clado no es el mismo. En grupos como QUE2 cuyo tamaño muestral es de n=5, se podría estar subestimando la variación de los caracteres. Los rangos de variación más amplios corresponden generalmente a QUE1, el clado mejor representado (n=35) y

distribuido en varias de las cuencas de la provincia de Misiones. Como es de esperar, cuando se incluyen los ejemplares sin caracterización molecular y se analiza todo el conjunto, los rangos de variación son aún más amplios.

Recientemente, Garavello y Shibatta (2016) han revalidado las especies *R. branneri* y *R. voulezi*. La comparación de estas especies con *Rhamdia* cf. *quelen* del río Tibagi (Paraná Alto, Brasil), utilizando ACP, muestra una clara diferenciación entre ellas. Sin embargo, su diagnosis está basada en combinaciones de caracteres no exclusivos, muchos de los cuales se solapan con los de las poblaciones halladas en Misiones. Otra cuestión interesante, es que estos autores emplean medias para diagnosticar las especies, aun cuando los rangos de variación se solapan. Considero que estos caracteres no son diagnósticos, pues solo permiten clasificar ejemplares próximos al valor medio y fallan si las medidas se alejan de ella. Entre los clados encontrados en Misiones, si solo se consideran las medias de cada grupo, es posible encontrar diferencias. A modo de ejemplo, el clado QUE4 se compone, en promedio, de individuos de cuerpos altos, con aleta adiposa relativamente larga y escasa distancia interdorsal, espinas pectorales extensas, barbillas maxilares y mentonianas externas e internas más largas, cabezas más grandes (en altura, ancho y longitud) y mayor distancia interorbital e internarinas posteriores. De cualquier modo estas diferencias son promedios y los rangos de variación se solapan, por lo cual en la práctica, no son aplicables. Diferentes morfotipos de cada uno de los clados pueden apreciarse en el Apéndice 2.

Si se comparan las relaciones morfológicas obtenidas, con las brindadas por Ringuelet *et al.* (1967) para las sinonimias de *R. quelen* reportadas en Argentina, se observa que *R. sapo* presentan rangos de variación en la altura corporal y la longitud de la cabeza que solo se hallan en los clados QUE1 y QUE4. Así mismo, la altura corporal y del pedúnculo caudal presentados para *R. hilarii* coinciden únicamente con QUE1. La longitud de la cabeza establecida para *R. microps* la excluye de cualquiera de los clados.

4.1.2 Caracteres merísticos

Los caracteres merísticos tampoco pueden ser empleados como diagnósticos dado que su variación es notable dentro de los clados, sobre todo con respecto a las configuraciones de las aletas dorsal, anal y caudal. El clado QUE1 es el más variable y suele presentar los conteos más altos en relación al número de radios en las aletas antes mencionadas. Silfvergrip (1996) reporta que poblaciones de la cuenca del Plata y ríos de la costa sur de Brasil, suelen presentar mayor número de radios que las poblaciones del norte. Por otra parte el clado menos variable es QUE3, lo cual es esperable, pues todos los ejemplares provienen de la misma localidad.

Las aletas dorsal, pélvica y caudal presentan rangos de variación y valores modales que se ajustan a los reportados para *R. quelen* y otras especies de *Rhamdia* (Silfvergrip, 1996; Garavello & Shibatta, 2016; Angrizani & Malabarba, 2018).

Los radios anales son interesantes para discutir. Silfvergrip (1996) describe un número modal de 14 radios dispuestos en más de 30 combinaciones, siendo las más frecuentes, aquellas con un número semejante de radios ramificados y no ramificados (viii,6; vii,6 y vii,7). Ninguna de estas formulas se encontró en el material analizado, de hecho, los ejemplares se caracterizan por un bajo número de radios no ramificados en relación a los ramificados. Las fórmulas más frecuentes incluyen cuatro ó cinco radios no ramificados y ocho ó nueve ramificados. Por otra parte, el número total de radios no suele superar los 12, siendo 11 ó 12 la moda de los clados. Silfvergrip (1996) plantea que el conteo de radios en material intacto suele ser impreciso, dada la dificultad de observar los radios rudimentarios anteriores. Es posible que la diferencia entre sus valores y mis conteos se deba a la metodología aplicada. Garavello & Shibatta (2016) reportan valores modales aun más bajos de radios anales en *R. branneri* (nueve y 10) y *R. voulezi* (nueve) con fórmulas que presentan bajo número de radios no ramificados (i-v) en relación a los ramificados (7-9). Finalmente, Ringuelet *et al.* (1967) contabilizan de 12 a 14 radios en *R. hilarii*, de 11 a 13 en *R. microps* y 10 en *R. sapo*. Cualquiera sea el caso resulta un carácter extremadamente variable como para ser considerado diagnóstico.

4.1.3. Coloración

La variación en los patrones de coloración no permitió la segregación de los clados moleculares, ya sea que considere la coloración de los ejemplares vivos o fijados. Como se comentó previamente, las variaciones ocurrían incluso en cada organismo dependiendo de su estado. Silfvergrip (1996) también reporta una gran variación y la clasifica como “individual” haciendo alusión a que cada ejemplar presenta ligeras diferencias que los distinguen. Garavello y Shibatta (2016) en cambio, utilizan la coloración como carácter diagnóstico para diferenciar a *R. branneri* de *R. voulezi* y *Rhamdia* cf. *quelen*. Así mismo Ringuelet *et al.* (1967) sugiere la ausencia de banda hialina en la aleta dorsal en *Rhamdia sapo* (al igual que *R. branneri*). Entre los ejemplares que hemos analizados la banda hialina siempre estaba presente, aunque en algunos casos era muy delgada o menos marcada que en otros.

4.1.3. Poros cefálicos

En su tratamiento de los poros cefálicos Silfvergrip (1996) no deja en claro cuántos poros observa en cada uno de los canales sensoriales y argumenta que su distribución sigue el patrón propuesto para *Brachyrhamdia imitator* por Lundberg & McDade (1986). A pesar de esto, en el gráfico de *R. muelleri*, indica siete poros supraorbitales y seis infraorbitales; mientras que en *B. imitator* se describen seis poros en el canal supraorbital y no se establece cuántos poros presenta el canal infraorbital. En el caso de los poros preopérculomandibulares, Silfvergrip discute poros mandibulares pero no es claro cómo los define. Sostiene que las poblaciones del norte suelen presentar seis mientras que en las del sur (Río de la Plata y costa sur brasileña) se encuentran ejemplares con ocho, pero las imágenes no están referenciadas y son confusas. En las poblaciones analizadas, he encontrado ejemplares con 10 y con 11 poros preopérculomandibulares, indistintamente al clado que pertenezcan.

La distribución de los poros supraorbitales es, en general, similar a la exhibida en el gráfico de Silfvergrip (1996) y a la descrita en otros Heptapteridae (Bichuette & Trajano, 2005; Bockmann & Miquelarena, 2008; Bockmann & Castro, 2010). Sin embargo el clado QUE3 puede distinguirse de los otros clados analizados por la ausencia del poro supraorbital s4.

Por otra parte Arratia y Gayet (1995) no observan presencia de la rama pterótica en *Rhamdia sapo*, aunque si la reportan en *Rhamdia wagneri*. Este carácter está presente en *Rhamdia enfernada* (Bichuette & Trajano, 2005) *Rhamdia guasarensis* (DoNascimento *et al.*, 2004) y en las poblaciones de *Rhamdia* aquí analizadas. Además parece ser la condición frecuente en Heptapteridae encontrándose en *Heptapterus* (Arratia & Gayet, 1995), *Phenacorhamdia* (DoNascimento & Milani, 2015), *Brachyrhamdia* (Slobodian & Bockmann, 2013), *Rhamdella* (Bockmann & Miquelarena, 2008), *Myoglanis* (DoNascimento & Lundberg, 2005) y *Rhamdiopsis* (Bockmann & Castro, 2010). La ausencia de la rama pterótica es considerado un carácter plesiomórfico dentro de siluroidei (Arratia & Gayet, 1995).

4.2. Caracteres osteológicos

Este trabajo constituye la segunda descripción osteológica completa de ejemplares bajo la especie nominal *Rhamdia quelen*. En el material observado, se encontró variación en ciertos caracteres osteológicos, los cuales se comentaron previamente. Caracteres osteológicos merísticos, como vertebras, costillas, pterigióforos y rastrillos branquiales del primer arco branquial, son variables dentro de los clados y se ajustan a los rangos y las modas establecidas por Silfvergrip (1996) para *R. quelen*.

Solamente el clado QUE3 presentó diferencias osteológicas apreciables en relación a los demás grupos. Los dos ejemplares de este clado presentaban un cráneo dorsoventralmente más bajo y sus procesos supraoccipitales no superaban el margen anterior del proceso transversal posterior de la VC, mientras que en todos los demás superan este punto. Silfvergrip (1996) comenta que el proceso SOC puede o no estar bifurcado y sugiere que esta bifurcación, es el resultado de la osificación de los músculos erectores de la aleta dorsal. En el material analizado solo dos ejemplares (de 16) presentaban bifurcación.

Algunas diferencias halladas entre los ejemplares estudiados y la descripción provista por Silfvergrip (1996) son:

- la presencia de una sutura interdigitada entre los frontales y el orbitoesfenoides; en los ejemplares estudiados la unión entre estos huesos es lisa.
- la ausencia del basibranquial 1, una estructura descrita como cartilaginosa y con forma de estaca; solo un ejemplar diafanizado (del clado QUE1) presentaba bb1 y a diferencia de lo descrito era óseo.
- Silfvergrip describe al faringobranquial 2 como un pequeño hueso que contacta los extremos cartilaginosos de los fb 1 y 3 y los epibranquiales 1 y 2; este hueso no ha sido hallado en el material analizado y en esa posición existe una estructura cartilaginosa denominada nódulo cartilaginosa accesorio siguiendo lo propuesto por Bockmann & Miquelarena (2008).
- En la mandíbula Silfvergrip describe tres poros en la mitad anterior y tres poros posteriores. Se observan en realidad 4 poros en la mitad anterior (Figura 3.2).
- El número de radios branquiostegos; mientras que este autor describe seis radios para el ejemplar del río Samiria (Perú), las poblaciones analizadas pueden presentar seis ó siete, siendo el último más frecuente. Hay ejemplares con seis radios branquiostegos en QUE1, QUE2 y QUE4; QUE3 presenta siempre siete.
- La unión del coracoides no es exclusivamente por cuatro proyecciones en cada margen de la unión, sino que pueden ser tres ó cuatro, encontrándose con mayor frecuencia tres.

Por otra parte, la presencia de espinas pectorales serradas con fuertes dientes en ambas caras es uno de los caracteres empleados para diferenciar *R. branneri*, *R. voulezi* y *Rhamdia cf. quelen* del Tigabi, de todas las demás especies de *Rhamdia* (Garavello & Shibatta, 2016). En Misiones se encontraron ejemplares que presentan sierras bien notorias en ambas caras de la espina pectoral (Figura 3.13) y que según análisis de secuencias de COI no corresponden a *R. voulezi* o *R. branneri*. La revisión de material tipo de estas especies queda pendiente para

corroborar la fidelidad de este carácter. Silfvergrip evaluó las espinas pectorales y determinó que el número de sierras tiende a incrementarse en individuos más grandes, dado que el crecimiento de las espinas es por adición de segmentos. Por otra parte las sierras tienden a fusionarse con la base de la espina a medida que esta va aumentando su grosor. En algunos casos puede verse como las paredes de la espina pectoral forman un surco en el cual las sierras quedan alojadas.

La estructura del esqueleto caudal, por otra parte, presentó dos formulas distintas, (PH; 1+2; 3+4; 5) y (PH; 1+2; 3; 4+5). La primera es la típica configuración encontrada en *Rhamdia* y en la mayoría de los Heptapteridae. La retención de hu5 como un elemento autógeno es considerado un carácter plesiomórfico (Bockmann & Miquelarena, 2008), existiendo una tendencia a la fusión de los elementos. La segunda configuración es bastante rara y se detectó en un ejemplar que no fue caracterizado molecularmente (LGEP230) y el único ejemplar del clado QUE2 analizado osteológicamente (LGEP139). Es necesaria una revisión de más ejemplares de este clado para corroborar si puede ser un carácter diagnóstico. Silfvergrip halló esta configuración en un solo ejemplar.

4.3. Consideraciones finales del capítulo

En este capítulo se desarrolló un análisis morfológico completo de poblaciones de *Rhamdia* de los ríos Paraná y Uruguay en Misiones. Aunque molecularmente se han podido distinguir 4 clados, desde la perspectiva morfológica solo es posible diferenciar uno de ellos. Los ejemplares de este grupo provienen de la cuenca del Urugua-í, un afluente del Paraná que previo a la construcción de la represa homónima, presentaba un salto de 28 m de altura, confiriendo a su fauna íctica cierto grado de aislamiento (Mirande & Koerber, 2015; Bogan & Cardoso, 2017). El clado QUE3 se distingue de los demás en la ausencia del poro cefálico supraorbital 4 (so4), un cráneo dorsoventralmente más deprimido y un proceso supraoccipital que no supera el margen anterior del proceso transversal posterior de la vértebra compleja. Además, es distinguible de QUE 2 en el diámetro orbital (13,8- 16,9% vs. 16,4-19,6%) y de QUE4 por la longitud de la aleta adiposa y el largo de las barbillas maxilares. Las medidas morfológicas requieren corroboración, sobre todo en QUE2 que presenta muy pocos ejemplares (n=5) y sus rangos de variación pueden estar siendo subestimados.

El acto taxonómico de Silfvergrip (1996) fue muy cuestionado y continua siéndolo (Weber & Wilkens, 1998; Perdices *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003; Bichuette y Trajano, 2005; Hernández *et al.*, 2015; Garavello & Shibatta, 2016; Angrizani & Malabarba, 2018). Sinonimizar tantas especies nominales sin tener en cuenta patrones biogeográficos o hábitos claramente diferentes como la troglofilia y considerar a todas partes de un mismo linaje histórico, resulta

inverosímil. Sin embargo, como ya se planteó previamente, su acción se basa en un criterio, los linajes históricos son distintos si pueden ser distinguidos mediante combinaciones de caracteres observables (Nelson & Platnick, 1981; Cracraft, 1983; Nixon & Wheeler, 1990). Bajo este criterio sus conclusiones no son erradas. Los patrones morfológicos no permiten diferenciar distintas poblaciones entre sí; lo cual no significa que refleje la historia evolutiva de este taxón.

Como bien apunta de Queiroz (2007), el modo en el que actúan los procesos evolutivos afecta distintos caracteres en forma diferente. Los cambios pueden ser genotípicos, fenotípicos, afectar caracteres cuantitativos o cualitativos, ser selectivos o neutrales y actuar sobre distintos aspectos de la biología de los organismos ya sea en su desarrollo, morfología o comportamiento. Un enfoque integral con diferentes líneas de evidencia es necesario para deducir como ocurre la divergencia entre linajes de un determinado taxón (Dayrat, 2005; Katz *et al.*, 2015;).

La variación morfológica ha sido históricamente la piedra angular de la taxonomía y ha demostrado sobradamente su valor, visto que la mayoría de las especies y su organización en taxones de mayor rango han sido delimitadas mediante caracteres morfológicos y actualmente corroboradas mediante otras fuentes de caracteres (Stepien & Kocher, 1997). Sin embargo, hay grupos complejos en los que la morfología no es resolutive (Milhomen *et al.*, 2007, Utsunomia *et al.*, 2014; Ribeiro Souza *et al.*, 2018) y este es el caso de *Rhamdia quelen*. Estudios moleculares posteriores al trabajo de Silfvergrip (1996), demuestran gran divergencia genética entre las poblaciones cisandinas y transandinas de '*Rhamdia quelen*', lo cual condujo a la distinción de los clados cis y transandinos como unidades evolutivas diferentes (Perdices *et al.*, 2002) y a la revalidación de especies sinonimizadas (Hernández *et al.*, 2015). Lo mismo ha ocurrido con ciertas poblaciones troglobióticas que por su tipo de hábito no se acepta que constituyan una unidad con las especies epigeas (Weber & Wilkens, 1998; Bichuette y Trajano, 2005).

Rhamdia quelen constituye un complejo de especies crípticas cuya identificación por medio de caracteres morfológicos resulta prácticamente imposible. Diferentes poblaciones pueden distinguirse parcialmente pero en conjunto presentan rangos de variación solapados entre sí que complican la diagnosis. El género *Rhamdia* sin dudas precisa una nueva revisión y si se pretende comprender la complicada relación entre los linajes que lo componen, esta deberá ser una revisión integral que incluya fuentes de caracteres independientes.

CAPÍTULO 4

Citogenética

1. INTRODUCCIÓN

El cariotipo constituye en sí mismo un tipo de diagnóstico donde el número, tamaño, morfología y patrones de bandeo de cada uno de sus cromosomas se consideran caracteres constantes de una especie. De este modo, los estudios citogenéticos pueden aportar caracteres útiles para la distinción de taxones y sus relaciones filogenéticas (Dobigny *et al.*, 2004). La incorporación de técnicas como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la pintura cromosómica (GISH) y la hibridación genómica comparativa (WCP) permiten estudios aún más detallados sobre la organización cromosómica y su evolución (Bertollo *et al.*, 2017).

En algunos casos, los estudios citogenéticos descriptivos han permitido inferir la existencia de especies crípticas; taxones nominales definidos bajo un único nombre específico pero con diferencias notables en sus cariotipos. Tal es el caso de complejos como *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Vicari *et al.*, 2008), *Astyanax fasciatus* (Pazza *et al.*, 2006), *Hoplias malabaricus* (Bertollo & Mestriner, 1998; Bertollo *et al.*, 2000; Pazza & Ferreira Jr, 2003) y *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano *et al.*, 2001), entre otros taxones que aún resultan taxonómicamente conflictivos. En la actualidad, muchos de estos complejos de especies son abordados desde una perspectiva más inclusiva, combinando datos citogenéticos con información morfológica (Silva *et al.*, 2015), molecular (Ferreira *et al.*, 2017; do Nascimento *et al.*, 2018; Usso *et al.*, 2018) e incluso ambas (Alves-Silva & Dergam, 2014).

Rhamdia quelen es la especie de Heptapteridae más estudiada citogenéticamente. Las primeras evaluaciones en este género datan de la década del 80 (Le Grande, 1981; Hochberg & Erdtmann, 1988) y en general están relacionados al reporte de cromosomas B en las especies *R. hilarii*, *R. quelen* y *R. sapo* (Fenocchio & Bertollo, 1990; Valcarcel *et al.*, 1993), actualmente sinonimizadas con *R. quelen*. Los estudios citogenéticos en el género han sido desarrollados, principalmente, en poblaciones brasileñas que incluyen las cuencas del Paraná, Mogi Guaçu, Iguazú, São Francisco, Paraíba do Sul y ríos de la costa Atlántica (Fenocchio & Bertollo, 1990; Fenocchio *et al.*, 2000; Abucarma & Martins-Santos, 2001; Fenocchio *et al.*, 2003-a, 2003-b; Moraes *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011; Splendore de Borba *et al.*, 2013; Usso *et al.*, 2018). La única caracterización de especímenes australes de *Rhamdia*, fue desarrollada por Valcarcel *et al.* (1993) en ejemplares que provenientes de tres lagunas del sistema hidrográfico “Las encadenadas” (Chascomús, Buenos Aires). Así mismo, se han reportado estudios citogenéticos en poblaciones de los ríos Paraguay y Paraná en el nordeste argentino (Fenocchio *et al.*, 2000; Cowper Coles *et al.*, 2013).

Todos los estudios desarrollados en esta especie nominal concuerdan en que el número diploide de la especie es $2n=58$, con una macroestructura cariotípica caracterizada por presentar pocos cromosomas monobraquiales en relación a los bibraquiales. Sin embargo, reflejan una notable variación referida a la fórmula cariotípica, el número fundamental y tamaño y posición de las regiones organizadoras nucleolares (NOR). Además se han descrito de 1 a 5 cromosomas B en distintas poblaciones de *Rhamdia*. Esta variación en los caracteres citogenéticos ha llevado a considerar la especie *Rhamdia quelen* como un complejo de especies (García *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011, Usso *et al.*, 2018).

En la revalidación de las especies *Rhamdia branneri* y *R. voulezi*, además de los caracteres morfológicos, Garavello & Shibatta (2016) emplearon en su diagnóstico caracteres citogenéticos definidos previamente en estas especies por Abucarma & Martins-Santos (2001). Aunque no se observan diferencias en la macroestructura cariotípica, *R. branneri* presentaría NORs múltiples, mientras que *R. voulezi* presenta NORs en un solo par cromosómico como la mayoría de los ejemplares de *Rhamdia*. Por otra parte la presencia de un cromosoma B submetacéntrico grande diferenciaría a *R. branneri*, ya que no es observado en ninguna otra población de *Rhamdia*. Abucarma & Martins-Santos definen a este B como un carácter citotaxonomico específico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de suspensiones cromosómicas se empleó la técnica directa propuesta por Moreira-Filho y Bertollo (1991-b), con modificaciones. Los ejemplares fueron eutanatizados por sobrianestesia con benzocaína y diseccionados con el propósito de extirpar sus riñones, que en telósteos cumplen funciones hematopoyéticas. Los riñones fueron transferidos a una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCL 0,075 M) y macerados mediante un disgregador de vidrio. Al tubo con la suspensión se adicionaron 5-6 gotas de colchicina (0,05%) y se incubó la suspensión en estufa durante 45 minutos. Cumplido este tiempo, se agregaron unas gotas de fijador (3 Metanol: 1 ácido acético), se resuspendió la preparación con una pipeta pasteur y se centrifugó durante 10 minutos a 900 rpm (prefijación). El sobrenadante fue removido, se agregaron 10 ml de fijador, se resuspendió suavemente el pellet y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 900 rpm (fijación). Estos últimos pasos se repitieron al menos 2 veces o hasta obtener un pellet blanquecino (lavados). La solución final fue goteada sobre un portaobjetos limpio y se dejó secar al aire. Para la observación al microscopio, los vidrios goteados fueron teñidos con giemsa al 10% (diluido en buffer fosfato de pH 7) por 10 minutos.

Para el armado de los cariogramas, los cromosomas fueron medidos utilizando el *software* liberado *MicroMeasure* versión 3.3 (Reeves & Tear, 2000) y clasificados mediante el índice de proporción de brazos de acuerdo a los parámetros establecidos por Levan, *et al.* (1964).

3. RESULTADOS

Fueron procesados alrededor de 50 ejemplares de *Rhamdia*, sin embargo en la mayoría de los casos las suspensiones no tenían buena calidad. En general, se observó un número muy bajo de células en división por vidrio y los cromosomas se encontraban muy condensados, si bien esto permitió el conteo cromosómico en algunos ejemplares (Tabla 4.1), sólo en unos pocos casos fue posible armar cariogramas. Así mismo, todos los ejemplares con buenas metafases eran hembras y la mayoría correspondían al clado QUE1, un ejemplar a QUE2 y uno a QUE4.

ACRÓNIMO	SEXO	CLADO	LOCALIDAD	2n						Total	
				55	56	57	58	59	60		62
LGEP123	F	QUE1	Arroyo Tabay	5	5	3	15	2	1		31
LGEP130	M	QUE4	Arroyo Garupá		1	1	4				6
LGEP131	F	QUE1	Arroyo Garupá	3	3	6	20	2	2		36
LGEP139	F	QUE2	Arroyo San Juan	1	4	4	23	4			36
LGEP161	*	QUE4	Arroyo Garupá	1	2	5	22		1	2	31
LGEP162	M	QUE4	Arroyo Garupá	1	7	4	21	1			34
LGEP175	F	QUE1	Arroyo Concepción	1			11	5			17
LGEP176	F	QUE1	Arroyo Concepción			3	3	25			31
LGEP178	*	QUE1	Arroyo Concepción		2	2	14	6	1		25
LGEP189	F	QUE1	Arroyo Concepción	1	3	4	22	2	1		33
LGEP190	F	QUE1	Arroyo Concepción		2	3	8	5	2		20
LGEP191	M	QUE1	Arroyo Concepción		1	2	4		1		8
LGEP299	F	QUE1	Arroyo Bonito		9	5	8	1			23
LGEP300	F	QUE1	Arroyo Bonito			1	5	2			8
LGEP301	F	QUE1	Arroyo Ramos			1	1	1			3
LGEP342	M	QUE1	Arroyo 3 de Mayo		2				1		3
LGEP379	F	QUE3	Arroyo Uruzú		1	1	2		1		5
LGEP478	F	QUE2	Arroyo San Juan				13		1		14
LGEP510		QUE1	Arroyo Acaraguá				5	3			8

Tabla 4.1: Contéo de cromosomas por metafase. Total indica el número de células analizadas en cada individuo.

Los conteos cromosómicos indican que $2n= 58$ es el número modal en la mayoría de los especímenes analizados. Sin embargo, LGEP176 presentó un número modal $2n= 59$ y otros ejemplares de la misma localidad mostraron conteos variables aunque con moda $2n= 58$.

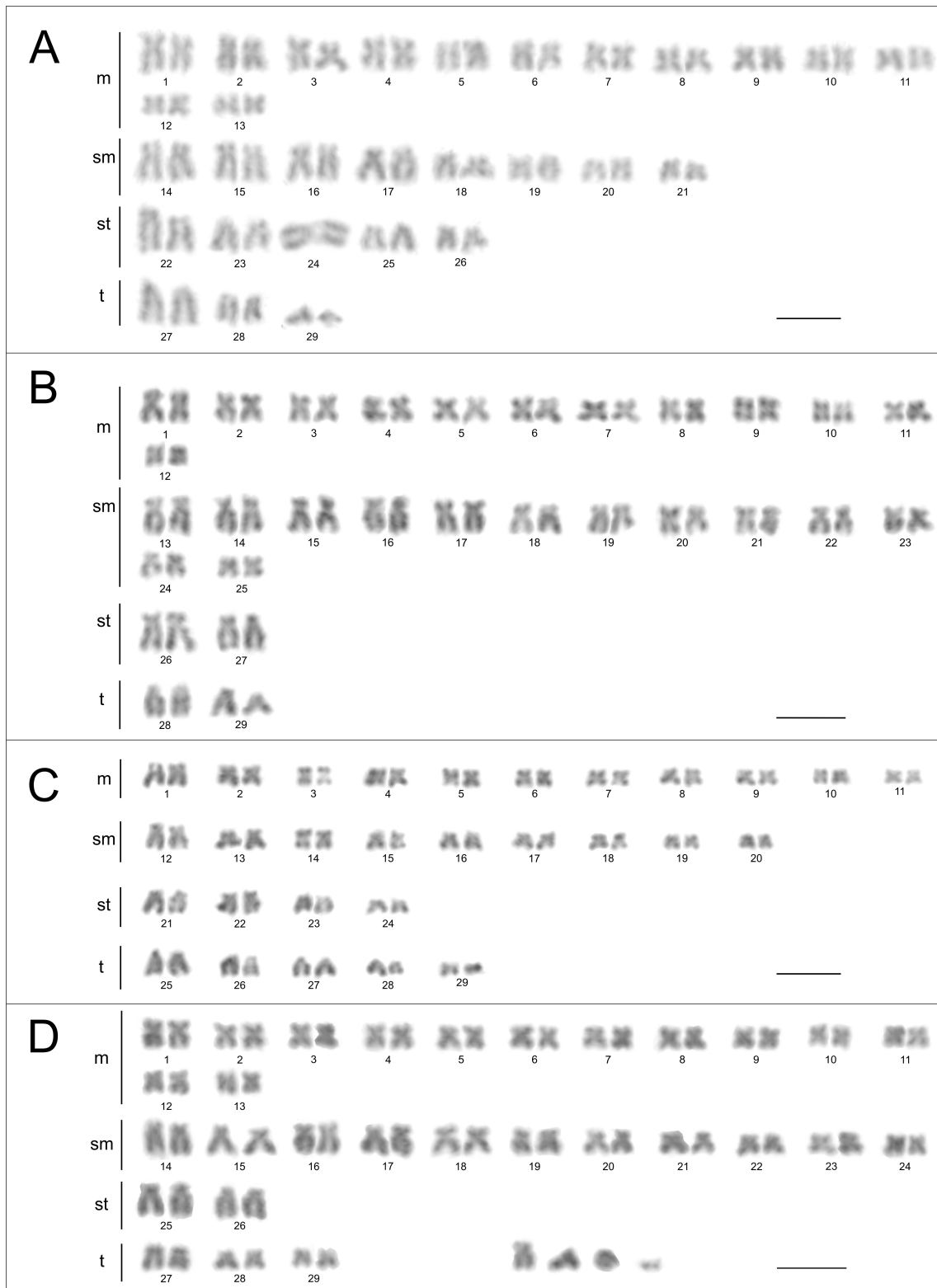


Figura 4.1: Cariogramas de *Rhamsdia quelea*: A. LGEP131 (F), 2n= 58, QUE1; B. LGEP175 (F), 2n=58 + 1, QUE1; C. LGEP139 (F), 2n= 58, QUE2; D. LGEP161 (F), 2n= 58 + 4, QUE4. Longitud de la barra= 5 μ m.

Lamentablemente es difícil distinguir la morfología de los cromosomas de LGEP176 pero la figura 4.1 muestra una metafase donde se observa un cromosoma extra. Por otra parte,

LGEP161, correspondiente al clado QUE4, presentó hasta 4 cromosomas extra, aunque la mayoría de sus células presentaba $2n = 58$.

La estructura cariotípica de los distintos clados puede observarse en la figura 4.2. La fórmula cariotípica del clado QUE1 no pudo ser establecida con precisión. El cariograma de LGEP131 presenta más cromosomas subtelocéntricos que LGEP175 y uno de los pares tiene morfología difícil de determinar, hay que resaltar que los límites de cada cromosoma son más difusos en LGEP131. El clado QUE2 (LGEP 139) presentó $22m + 18sm + 4st + 6t$ y el clado QUE4 (LGEP 161) exhibió $26m + 22sm + 4st + 6t$ y hasta 4 cromosomas extra, uno de ellos submetacéntrico de tamaño medio. Lo más probable es que estos cromosomas adicionales en QUE1 y QUE4 sean cromosomas B, pero es necesario analizar más ejemplares incluyendo machos, para poder determinarlo con certeza. El par 24 de la figura 4.1 A se encontraba asociado en las células metafásicas.

4. DISCUSIÓN

Los análisis citogenéticos resultaron poco productivos. Se obtuvieron pocas metafases de calidad, lo cual no permite hacer demasiadas inferencias respecto a las características citogenéticas de los clados. La calidad de las preparaciones posiblemente se vio disminuida por dos cuestiones: el tipo de muestreo y el procesamiento de los ejemplares. Al emplear redes agalleras como arte de pesca, los recorridos se realizaban a intervalos de tiempo de 3 a 6 horas, generando que varios ejemplares se encontraran en muy mal estado al momento de ser procesados. Por otra parte, casi todos los especímenes fueron procesados en campo, donde las variables no pueden ser controladas como en el laboratorio. A pesar de esto, hay algunas cuestiones a ser discutidas.

En primer lugar, los cariogramas obtenidos presentan la estructura típica en *Rhamdia* con predominancia de cromosomas bibráquidos. Además, se observa una estructura bastante similar entre sí y con los cariotipos reportados por Fenocchio *et al.* (2003-a), García *et al.* (2010) y Cowper-Coles *et al.* (2013) en poblaciones pertenecientes a la cuenca del Paraná en Argentina y Brasil. La comparación con los cariotipos reportados por Valcarcel *et al.* (1993) es complicada dado la calidad de las imágenes publicadas. LGEP139 (QUE2) pareciera tener más cromosomas telocéntricos, aunque también es una de las metafases con mayor grado de condensación. Al comparar cariotipos de especímenes provenientes de varias cuencas, García *et al.* (2010) encontraron notable variación, pero no pudieron encontrar un patrón cariotípico que defina una localidad o cuenca hidrográfica. Estos autores han sugerido que las

poblaciones de *Rhamdia* se encuentran en un estado inicial de diferenciación cariotípica que favorecerá el aislamiento reproductivo y la especiación.

En los cariogramas de LGEP131 un par subtelocéntrico se encontró asociado, este tipo de asociación suele ocurrir entre los cromosomas portadores de NORs (Fenocchio *et al.*, 2000; Cowper-Coles *et al.*, 2013) pero es necesario realizar tinción argéntica para confirmarlo.

Por otra parte, aunque la fórmula cariotípica es uno de los criterios más empleados para marcar diferencias, al cotejar las fórmulas con las imágenes y comparar las publicaciones entre sí, puede verse que la clasificación de los cromosomas depende en gran medida del criterio del autor. Si bien en todas las publicaciones se establece que se emplea la clasificación propuesta por Levan *et al.* (1964), no suele explicarse cómo se miden los cromosomas o cómo se obtiene el índice de proporción de brazos. Así por ejemplo, por mera observación se distingue que cromosomas definidos por Martínez *et al.* (2011) como acrocéntricos son clasificados como subtelocéntricos por García *et al.* (2010). Establecer los criterios adoptados en la medición de los brazos es fundamental para definir la morfología cromosómica. Se observó también, que en algunos cariotipos, los pares definidos como homólogos difieren entre sí en su morfología pero no se establece a que se deben esas diferencias y tampoco son denominados pares heteromórficos. Finalmente, el grado de condensación de los cromosomas puede sesgar los cálculos de proporciones, sobretodo en cromosomas cuya relación de brazos se halla en los límites establecidos entre categorías. Por todas estas cuestiones, es necesario rever la forma en la que se clasifican y ordenan los cromosomas en citogenética de peces, a fin de que las comparaciones entre cariotipos puedan ser más sencillas.

En algunos de los ejemplares analizados se observó que las células presentaban más de $2n=58$ cromosomas, encontrándose hasta $2n=62$. Estas variaciones podrían ser atribuidas a cromosomas B. Estos son elementos adicionales al complemento A, considerados dispensables y usualmente carente de efectos fenotípicos para sus portadores. Han sido extensamente reportados en *Rhamdia* (Hochberg & Erdtmann, 1988; Fenocchio & Bertollo, 1990; Valcarcel *et al.*, 1993; Fenocchio *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2007 y 2011; García *et al.*, 2010; Splendore de Borba *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2011) variando en tamaño, forma y patrón de bandeo C. En la mayoría de los casos es metacéntrico y puede ser total o parcialmente heterocromático e incluso eucromático (Maistro *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2007). Cromosomas B con morfología y tamaño similar son compartidos por poblaciones con fórmulas cariotípicas diferentes, lo que llevó a sugerir un origen común de los Bs previo a la diversificación cromosómica del grupo (Maistro *et al.*, 2002; Fenocchio *et al.*, 2003-a). Por otra parte la presencia de Bs distintos en poblaciones con la misma fórmula, podría indicar la evolución independiente de estos elementos.

Finalmente, aunque la constitución del cromosoma B encontrado en *R. branneri* es particular, su empleo como carácter diagnóstico de la especie (Abucarma & Martins-Santos, 2001; Garavello & Shibatta, 2016) es discutible dado la naturaleza de los cromosomas B. Estos son elementos dispensables, cuya presencia es variable incluso entre las células del mismo individuo y cuyo comportamiento y evolución es independiente del resto del complemento cromosómico.

Aunque los resultados citogenéticos de este estudio no son suficientes para poder comparar los clados entre sí, esta es una disciplina que merece ser considerada. Es preciso continuar con los análisis, incluyendo estudios con cultivos celulares para mejorar la calidad de las preparaciones y bandeos cromosómicos de alta resolución así como análisis de meiosis, a fin de establecer si los cariotipos son o no similares, si difieren o no entre poblaciones del mismo clado y si se puede descartar la presencia de cromosomas sexuales.

CAPÍTULO 5

Consideraciones finales y conclusiones

CONSIDERACIONES FINALES

Delimitar una especie, entendiéndola como un linaje independiente, es un gran desafío y el modo de conseguirlo continúa en discusión (Padial *et al.*, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Schutze *et al.*, 2017). Sin embargo, existe en la comunidad científica, el acuerdo general de que una especie definida desde una perspectiva holística constituye una hipótesis más robusta.

Una de las especies de vertebrados taxonómicamente más discutidas del neotrópico es *Rhamdia quelen*. La sinonimización de cerca de 50 especies nominales (Silfvergrip, 1996) fue cuestionada por taxónomos y biólogos, dado que no considera caracteres ecológicos o barreras biogeográficas, que claramente impiden el flujo génico entre las poblaciones, tornándolas linajes diferentes. *Rhamdia quelen* ha sido evaluado desde diversas disciplinas (morfología, ecomorfología, citogenética y genética molecular) que apoyan la hipótesis de que conforma un complejo de especies. Sin embargo, cada abordaje fue independiente y parcial. En esta tesis se planteó como objetivo, incrementar el conocimiento de este taxón, mediante un estudio multidisciplinario que permitiera establecer si existían diferencias entre las poblaciones de *R. quelen* distribuidas en las cuencas del Paraná y Uruguay en Misiones. Se abordó un enfoque taxonómico iterativo (Yeates *et al.*, 2011), utilizando una hipótesis inicial basada en la delimitación molecular, que luego fue puesta a prueba, mediante el análisis de caracteres morfológicos y citogenéticos.

Los caracteres moleculares permitieron la identificación de 4 clados en las cuencas analizadas. Dos de ellos se distribuyen simpátricamente en el Paraná y Uruguay (QUE1 y QUE4), uno se encontró únicamente en el Paraná (QUE2), mientras que otro es endémico del arroyo Uruguáí (QUE3). La aplicación subsiguiente de los estudios morfológicos solo permitió corroborar la distinción de este último clado. Pero los otros tres no pudieron ser diferenciables entre sí y parecen poseer una gran plasticidad fenotípica. Finalmente, la comparación en base a caracteres citogenéticos no es fiable, por las razones explicadas en el capítulo anterior. Lamentablemente no se consiguieron preparaciones cromosómicas del clado QUE3 y aunque el clado QUE2 parece presentar más cromosomas telocéntricos que los demás, es necesario aumentar el número muestral para poder hacer inferencias sólidas.

La diferenciación morfológica y molecular del clado QUE3 apunta a su delineamiento como una nueva especie. Esta sería endémica de la cuenca del arroyo Uruguáí, al norte de la provincia de Misiones, una cuenca que previo a su represamiento poseía un gran salto que funcionaba como barrera natural con el río Paraná y que ha favorecido el aislamiento de sus comunidades ícticas con numerosos endemismos descriptos (Mirande & Koerber, 2015; Bogan

& Cardoso, 2017). Sin embargo, para poder llevar adelante este acto taxonómico, se necesita contrastarla con material tipo de *R. quelen* y las especies sinonimizadas bajo esta denominación.

Suele aceptarse, que las variaciones observadas entre organismos de cuencas distintas validan su distinción como especies diferentes. Esta visión se aplica metodológicamente cuando las diagnósis consideran únicamente las poblaciones más próximas al taxón descrito o revalidado. Esta es una práctica extendida y muy poco recomendada, nuestros resultados muestran que ejemplares del río São Francisco en Brasil, no difieren genéticamente de ejemplares encontrados en Argentina y que especies definidas como endémicas del Iguazú se encontrarían también en el Paraná medio argentino.

Si bien los estudios moleculares desarrollados permitieron definir 4 clados, no se puede obviar que están basados exclusivamente en genes mitocondriales. El ADNmt es un marcador que, a pesar de sus ventajas, presenta problemas como la homoplásia, la introgresión y la separación incompleta de linajes que pueden llevar a conclusiones erróneas sobre las relaciones entre especies muy cercanas (Funk & Omland, 2003; Ballard & Withlock, 2004). De hecho, un estudio publicado recientemente por Ríos et al. (2018) empleando CYTB, microsátelites de loci nucleares y un enfoque genético poblacional, sugiere eventos ancestrales de hibridación entre los linajes denominados Rq4 (QUE1) y Rq6 (QUE11) los cuales se encuentran en simpatría en la cuenca del Uruguay y se distribuyen en varias cuencas incluidos los ríos Paraná, São Francisco y lagunas de la Costa Atlántica uruguaya. Ríos et al. (2018) proponen que la distribución de estos linajes se asocia a eventos de inundación y contacto entre cuencas por incursiones marinas y propone la filopatría (*homing behaviour*) como un mecanismo que mantiene aislado a los demás linajes moleculares entre sí. Por lo expuesto, es fundamental incorporar en el futuro, estudios con genes nucleares que permitan contrastar con los patrones mitocondriales hallados.

Una correcta delimitación de la riqueza específica es esencial para cualquier estudio de biodiversidad y el desarrollo de políticas de conservación (Mayden, 1997; Bickford *et al.*, 2007). En efecto, dada su explotación como recurso pesquero en algunos países de Sudamérica, *Rhamdia quelen* fue catalogada una especie prioritaria para programas de conservación (Loureiro et al., 2013). Sin embargo, el estatus taxonómico de esta especie continúa en debate y en este sentido es interesante destacar la distinción de los linajes mitocondriales encontrados como posibles Unidades de Manejo (Mus) y potenciales Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs).

El concepto de ESU fue acuñado por Ryder (1986) como: “Unidades poblacionales con variación adaptativa significativa y cuya definición se establece en base a la concordancia entre

diferentes fuentes de datos derivados de diferentes sistemas de caracteres (Ej: historias de vida, morfometría, rangos de distribución, genética). El propósito de estas unidades es la conservación de la variación genética y el potencial evolutivo de las poblaciones. Así, una especie puede constituir en sí misma una ESU o puede estar constituida por varias de ellas. Con rapidez, el concepto de ESU cobró relevancia y surgieron definiciones alternativas (Waples, 1991; Dizon et al., 1992; Moritz, 1994a, b; Vogler & DeSalle, 1994; Bowen, 1998; Crandall et al., 2000; Fraser and Bernatchez, 2001; Avise, 2004; De Guia & Saitoh, 2006) que mayormente discrepan en la metodología aplicada para delimitarlas. Una de las más aplicadas (Moritz, 1994) define las ESUs como: “poblaciones recíprocamente monofiléticas para alelos mitocondriales, que además muestran significativa divergencia de las frecuencias alélicas de loci nucleares”. Aunque criticada por basarse únicamente en una componente genética, esta definición continúa siendo una de las más empleadas. La propuesta actual es hacia una delimitación de las ESUs, basada en el análisis de las múltiples fuerzas que pueden conducir a la evolución de los distintos tipos de caracteres entre las poblaciones (Casacci et al., 2013). Sin embargo, la distinción de diferentes linajes mitocondriales en *R. quelen* denotan que es una especie que debe ser tomada en cuenta para la definición de Unidades de Manejo (MUs) y su posterior evaluación como ESUs.

La correcta definición del estatus taxonómico de *R. quelen* no es importante solamente a fines conservacionistas. Como se expresó anteriormente, este taxón es empleado en programas de piscicultura, constituyendo una de las especies nativas más comercializadas en Brasil (Scaranto et al., 2018). Así mismo es empleada como modelo en pruebas fisiológicas de estrés por anestésicos (Silva et al., 2013; Parodi et al., 2014) y estudios de respuesta a dietas de engorde en peces (Poli et al., 2015; Zeppenfeld et al., 2016; Lovatto et al., 2017). Por consiguiente, la correcta delimitación de las especies de *Rhamdia* podría contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos, evitando la incorporación de linajes distintos como reproductores o prevenir conclusiones incorrectas frente a respuestas fisiológicas distintas de los linajes involucrados frente un determinado tratamiento.

Finalmente, es importante resaltar que alcanzar una correcta delimitación de una especie tan discutida y estudiada como *Rhamdia quelen* representa un arduo desafío. Su gran distribución y su compleja historia taxonómica y evolutiva dificultan esta labor, pero el establecimiento de lazos cooperativos entre la comunidad ictiológica y la implementación de estudios integrales como el desarrollado en esta tesis, han de contribuir a su resolución.

CONCLUSIONES

- El análisis de secuencias mitocondriales indica que la especie nominal *Rhamdia quelen* constituye un complejo de especies.
- Se detectaron cinco linajes moleculares en la provincia de Misiones, de los cuales cuatro son reportados por primera vez. Estos linajes son recuperados como clados monofiléticos por MP y ML, definidos como especies hipotéticas por el ABGD y presentan distancias genéticas intergrupos que superan siempre el 3%.
- Los linajes QUE1 y QUE4 se distribuyen simpátricamente en la cuenca del río Uruguay y Paraná; en este último también se encuentra QUE2. El linaje QUE3 parece ser endémico de la cuenca del Uruguá y fue el único detectado en esa cuenca. QUE5 fue encontrado en un afluente del río Iguazú.
- El análisis del gen COI sugiere que *Rhamdia branneri* no sería una especie endémica del Iguazú y también se encontraría distribuida en el Paraná bajo y afluentes relacionados a la laguna Mar Chiquita (Buenos Aires).
- Al analizar poblaciones hasta ahora no caracterizadas molecularmente, esta tesis contribuye a ampliar el conocimiento sobre los linajes que conforman el clado cisandino.
- Los caracteres morfométricos y merísticos no logran diferenciar categóricamente los clados inferidos molecularmente. Las poblaciones de *Rhamdia* parecen presentar una gran plasticidad fenotípica.
- En esta tesis se presenta una detallada descripción osteológica que revela que la variación en estos caracteres no sigue un patrón que permita su diferenciación. El único clado que mostró particularidades es QUE3 que presenta un cráneo dorsoventralmente más plano y un proceso supraoccipital muy corto en relación a los otros.
- Entre los ejemplares analizados del linaje QUE3 no se observó la presencia del poro sensorial supraorbital s4. De ser confirmado mediante tinción constituirá un carácter autapomórfico dentro de *Rhamdia*.
- En base a los estudios morfológicos y moleculares se sugiere que el linaje QUE3 constituye una especie no descrita de *Rhamdia*.
- A partir de los análisis cariotípicos se confirma que las poblaciones misioneras de *Rhamdia* presentan $2n=58$ con una macroestructura cariotípica similar, caracterizada por más cromosomas bbraquiados, siguiendo el patrón característico de este grupo.

REFERENCIAS

- Abucarma M & Martins-Santos IC (2001) Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the River Iguazu basin. *Cytologia*, 66 (3): 299–306.
- Angrizani RC & Malabarba LR (2018) Morphology and molecular data reveal the presence of two new species under *Rhamdia quelen* (Quoy Gaimard, 1824)(Siluriformes: Heptapteridae) species complex. *Zootaxa*, 4388 (1): 44–60.
- Aquadro CF & Greenberg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287–312.
- Armbruster JW (2011) Global catfish biodiversity. In American Fisheries Society Symposium 77: 15–37.
- Arratia G & Gayet M (1995) Sensory canals and related bones of tertiary siluriform crania from Bolivia and North America and comparison with recent forms. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 15 (3): 482–505.
- Arratia G & Huaquín L (1995) Morphology of the lateral line system and of the skin of diplomystid and certain primitive loricarioid catfishes and systematic and ecological considerations. *Bonner Zoologische Monographien*, 36: 1–110.
- Arratia G & Quezada-Romegialli C (2017) Understanding morphological variability in a taxonomic context in Chilean diplomystids (Teleostei: Siluriformes), including the description of a new species. *PeerJ*, 5: e2991.
- Arratia G (1987) Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): morphology, taxonomy and phylogenetic implications. *Bonner Zoologische Monographien*, 24: 1–120.
- Arratia G, Kapoor BG, Chardon M & Diogo R (Eds) (2003) *Catfishes*, volúmenes 1 y 2, Science Publisher, INC, Enfield, USA, 789 pp.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, 447 pp.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. Second edition, Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA, 684 pp.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18 (1): 489–522.
- Ballard JWO & Kreitman M (1995) Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. *Trends in Ecology & Evolution*, 10 (12): 485–488.
- Ballard JWO & Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13 (4) 729–744.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16 (1): 37–48.
- Bermingham E, Lamb T, Avise JC (1986) Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *Journal of Heredity*, 77 (4): 249–252.
- Bertollo LA, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS & Moreira-Filho O (2000) A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic

- distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8 (7): 603–613.
- Bertollo LAC & Mestriner CA (1998) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. *Chromosome research*, 6 (2): 141–147.
- Bertollo LAC, Cioffi MB, Galetti Jr PM, Filho OM (2017) Contributions to the cytogenetics of the Neotropical fish fauna. *Comparative Cytogenetics*, 11 (4): 665–690.
- Bichuette ME & Trajano E (2005) A new cave species of *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) from Serra do Ramalho, northeastern Brazil, with notes on ecology and behavior. *Neotropical Ichthyology* 3 (4): 587–595.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK & Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22 (3): 148–155.
- Bleeker P (1858) De visschen van den Indischen Archipel. Beschreven en toegelicht. Siluri. Acta Soc. Sci. Indo-Neerl, 4: 1-370 + I-XII.
- Bockmann FA & Castro R (2010) The blind catfish from the caves of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Siluriformes: Heptapteridae): description, anatomy, phylogenetic relationships, natural history, and biogeography. *Neotropical Ichthyology*, 8 (4): 673–706.
- Bockmann FA & Ferraris Jr. CJ (2005) Systematics of the Neotropical catfish genera *Nemuroglanis* Eigenmann & Eigenmann 1889, *Imparales* Schultz 1944, and *Medemichthys* Dahl 1961 (Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 124–137.
- Bockmann FA & Guazzelli GM (2003) Family Heptapteridae. In: Reis RE, Kullander SO & Ferraris Jr. CJ. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, pp. 406–431.
- Bockmann FA & Miquelarena AM (2008) Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina, with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann & Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*, 1780: 1–54.
- Bockmann FA (1994) Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catfish from Northern Brazil, with comments on phylogenetic-relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes, Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 107 (4): 760–777.
- Bockmann FA (1998) Análise filogenética da familia Heptapteridae e redefinição de seus géneros. Unpublished Doctoral dissertation, São Paulo, Universidade de São Paulo, 599 pp.
- Bogan S & Cardoso YP (2017) Revisión de la distribución de *Glanidium ribeiroi* Haseman, 1911 en la Argentina (Siluriformes: Auchenipteridae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 19 (1): 1–7.
- Bookstein FL, Chernoff B, Elder RL, Humphries JM, Smith GR & Strauss RF (1985) Morphometrics in evolutionary biology: the geometry of size and shape change, with examples from fishes. Philadelphia, Academy of Natural Sciences of Philadelphia (Special publication/ Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 15), 277pp.
- Bowen BW (1998) What is wrong with ESUs? The gap between evolutionary theory and conservation principles. *Journal of Shellfish Resource*, 17: 1355–1358.
- Bruno MC, Casciotta JR, Almirón AE, Ricillio FL & Lizarrade MS (2015) Quaternary refugia and secondary contact in southern boundary of the Brazilian subregion: Comparative phylogeography of freshwater fish. *Vertebrate zoology*, 65 (1): 45–55.

- Cain AJ (1954) *Animal Species and their evolution*. Hutchinson University Library, New York, 210 pp.
- Casacci LP, Barbero F & Balletto E (2014) The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology*, 81(2): 182–193.
- Campello FD & Bemvenuti FA (2002) Diferenciação morfométrica e osteológica entre *Ramnogaster arcuata* (Jenyns) e *Platanichthys platana* (Regan) (Teleostei, Clupeidae). *Revista brasileira de zoologia*, 19 (3): 757–766.
- Caterino MS, Cho S & Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45 (1): 1–54.
- Collins RA, Boykin LM, Cruickshank RH & Armstrong FF (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3 (3): 457–465.
- Cowper Coles F, Sánchez S & Jorge LC (2013) Cytogenetic studies of two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) from the Paraná and Paraguay rivers (Argentina). *Revista veterinaria*, 24 (2): 144–147.
- Cox AJ & Hebert PD (2001) Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular ecology*, 10 (2): 371–386.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis; In: Johnstone RF (Ed) *Current ornithology*. Plenum Press, New York, pp: 159–187.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM & Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290–295.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D (2012) "JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods*, 9 (8): 772.
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85 (3): 407–417.
- de Carvalho DC, Oliveira DA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C & Hanner R (2011) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1): 80–86.
- de Guia APO & Saitoh T (2007) The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: The need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecological Research*, 22: 604–612.
- de Pinna MCC (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypothesis. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena CAS & Lucena ZMS. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil. Pp. 279–330.
- de Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations; In: Howard DJ & Berlocher SH (eds). *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, New York, pp: 57–75.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56 (6): 879–886.
- Díaz de Astarloa JM (2005) Osteología craneal comparada de tres especies de lenguado del género *Paralichthys* (Pleuronectiformes, Paralichthyidae) del Atlántico suroccidental. *Revista chilena de historia natural*, 78 (3): 343–391.

- Díaz J, Villanova GV, Brancolini F, del Pazo F, Posner VM, Grimberg A & Arranz SE (2016) First DNA barcode reference library for the identification of South American freshwater fish from the lower Paraná river. *PLoS One*, 11 (7): e0157419.
- Dizon A, Lockyer C, Perrin WF, Demaster DP, Sisson J (1992) Rethinking the stock concept – A phylogeographic approach. *Conservation Biology*, 6: 24–36.
- do Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, de Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L, Pavanelli CS, Torres RA, MoreiraFilho O, Vicari MR (2018) Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation?. *Zoologischer Anzeiger*, 272: 93–103.
- Dobigny G, Ducroz JF, Robinson TJ & Volobouev V (2004) Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology*, 53 (3) 470–484.
- DoNascimento C & Lundberg JG (2005) *Myoglanis aspredinoides* (Siluriformes: Heptapteridae), a new catfish from the Río Ventuari, Venezuela. *Zootaxa*, 1009 (1): 37–49.
- DoNascimento C & Milani N (2008) The Venezuelan species of *Phenacorhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae), with the description of two new species and a remarkable new tooth morphology for siluriforms. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 163–180.
- DoNascimento C, Provenzano F & Lundberg JG (2004) *Rhamdia guasarensis* (Siluriformes: Heptapteridae), a new species of cave catfish from the Sierra de Perijá, northwestern Venezuela. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 117 (4): 564–574.
- Dowling DK, Friberg U & Lindell J (2008) Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in ecology & evolution*, 23 (10): 546–554.
- Elías-Gutiérrez M, Valdez-Moreno M, Topan J, Young MR & Cohuo-Colli JA (2018) Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and evolution*, 8 (5): 3002–3018.
- Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T & Meyer A (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1143 (3): 243–271.
- FAO (2010) Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo. *Serie Acuicultura en Latinoamérica*. FAO, Roma, Italia, 200 Pp.
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H & Meyer A (2001) The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, 53 (2): 89–103.
- Faulks LK, Gilligan DM & Beheregaray LB (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.
- Fenocchio AS & Bertollo LAC (1990) Supernumerary chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica*, 81 (3): 193–198.
- Fenocchio AS, Bertollo LAC, Takahashi CS, Dias AL & Swarça AC (2003-a) Cytogenetic Studies and Correlate Considerations on Rhamdiinae Relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae) *Cytologia*, 68 (4): 363–368.
- Fenocchio AS, Bertolo LAC, Takahashi CS & Camacho JPM (2000) B chromosomes in two fish species genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica-Krakow*, 48 (3/4): 105–110.

- Fenocchio AS, Swarca AC, Cestari MM & Días AL (2003-b) Short Note Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguacu River (Brazil). *Folia biologica*, 51 (3-4): 219–222.
- Ferreira M, Garcia C, Matoso DA, de Jesus IS, Cioffi MB, Bertollo LAC, Zuanon J & Feldberg E (2017) The *Bunocephalus coracoideus* Species Complex (Siluriformes, Aspredinidae). Signs of a Speciation Process through Chromosomal, Genetic and Ecological Diversity. *Frontiers in Genetics*, 8: 120.
- Fracalossi DM, Meyer G, Santamaria FM, Weingartner M & Zaniboni Filho E (2004) Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 26 (3): 345–352.
- Fraser DJ & Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741–2752.
- Fricke R, Eschmeyer WN & Fong JD (2018-a) Species by family/subfamily. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Versión electrónica revisada el 19/03/2018.
- Fricke R, Eschmeyer WN & van der Laan R (eds) (2018-b) Catalog of fishes: genera, species, references. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Versión electrónica revisada el 19/03/2018.
- Frost DR, Crafts HM, Fitzgerald LA & Titus TA (1998). Geographic variation, species recognition, and molecular evolution of cytochrome oxidase I in the *Tropidurus spinulosus* complex (Iguania: Tropiduridae). *Copeia*, 4: 839–851.
- Funk DJ & Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual review of Ecology and Systematics*, 34: 397–423.
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S & Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22): 4541–4550.
- Garavello JC & Shibatta OA (2016) Reappraisal of *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 and *Rhamdia voulezi* Haseman, 1911 (Siluriformes: Heptapteridae) from the río Iguacu with notes on their morphometry and karyotype. *Neotropical Ichthyology*, 14 (1): e140111.
- García C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC and Centofante L (2003). B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68: 403–411.
- García C, Oliveira C & Almeida-Toledo LF (2010) Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research*, 9 (1): 365–384.
- García-Dávila C, Castro-Ruiz D, Renno JF, Chota-Macuyama W, Carvajal-Vallejos FM, Sanchez H, Angulo C, Nolorbe C, Alvarado J, Estivals G & Núñez-Rodríguez J (2015) Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of Pimelodid catfishes from the Marañon, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. *Journal of applied ichthyology*, 31: 40–51.
- Gill TN (1862) Synopsis of the genera of the sub-family of Pimelodinae. *Proceeding of the Boston Society of Natural History*, 8: 46–55.
- Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O & Bertollo LAC (2001) Comparative cytogenetic studies on *Hoplerthrinus unitaeniatus* populations (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, 66 (1): 39–43.
- Goldstein PZ & DeSalle R (2011) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33 (2): 135–147.

- Goloboff PA & Catalano SA (2016) TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics*, 32 (3): 221–238.
- Goloboff PA, Catalano SA, Mirande JM, Szumik CA, Arias JS, Källersjö M & Farris JS (2009) Phylogenetic analysis of 73,060 taxa corroborates major eukaryotic groups. *Cladistics*, 25 (3): 211–230.
- Gomes LDC, Golombieski JI, Gomes ARC & Baldisserotto B (2000) Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30 (1): 179–185.
- Grivell LA (1983) Mitochondrial DNA. *Scientific American*, 248 (3): 78–89.
- Hall BG (2011). Phylogenetic trees made easy: a how-to manual. 4th edition, Sinauer. 282 pp.
- Hammer Ø, Harper DAT & Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1): 9 pp.
- Hardman M (2005) The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 37 (3): 700–720.
- Hebert PD, Cywinska A & Ball SL (2003-a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270 (1512): 313–321.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH & Hallwachs W (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (41): 14812–14817.
- Hebert PD, Ratnasingham S & de Waard JR (2003-b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1): S96–S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS & Francis CM (2004a) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*, 2 (10): e312.
- Hernández CL; Ortega-Lara A, Sánchez-Garcés GC & Alford MH (2015) Genetic and morphometric evidence for the recognition of several recently synonymized species of trans-Andean *Rhamdia quelen* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 103 (3): 563–579.
- Hey J (2006) On the failure of modern species concepts. *Trends in ecology & evolution*, 21 (8): 447–450.
- Hillis DM (1987) Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18 (1): 23–42.
- Hochberg VBM, Erdtmann B (1988) Cytogenetical and morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). The occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Brazilian Journal of Genetics*, 11: 563–576.
- Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH & Hebert PD (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7 (4): 544–548.
- Katz AD, Giordano R & Soto-Adames FN (2015) Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American Entomobrya (Collembola: Entomobryidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173 (4): 818–840.
- Kekkonen M & Hebert PD (2014) DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. *Molecular ecology resources*, 14 (4): 706–715.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX & Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (16): 6196–6200.

- Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33 (7): 1870–1874.
- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O & Katoh K (2013) aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic acids research*, 41 (W1): W22–W28.
- Le Grande WH (1981) Chromosomal evolution in North-American catfishes (Siluriformes, Ictaluridae) with particular emphasis on madtoms, *Noturus*. *Copeia*, 1: 33–52.
- Levan A, Fredga K & Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52 (2): 201–220.
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451–1452.
- Loureiro M, Zarucki M, González I, Vidal N & Fabiano G (2013) Peces continentales. In: Soutullo A, Clavijo C, Martínez-Lanfranco JA (eds). Especies prioritarias para la Conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo, pp: 91–112.
- Lovatto NDM, Goulart FR, Loureiro BB, Adorian TJ, de Freitas ST, Pianesso D, Dalcin MO, Athayde ML & da Silva LP (2017) Effects of phosphorylated protein concentrate of pumpkin seed meal on growth and digestive enzymes activity of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 23 (1): 201–209.
- Loxterman JL & Keeley ER (2012) Watershed boundaries and geographic isolation: patterns of diversification in cutthroat trout from western North America. *BMC Evolutionary Biology*. 12 (1): 38. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-38>
- Lundberg JG & Baskin JN (1969) The caudal skeleton of the catfishes, order Siluriformes. *American Museum novitates*; 2398: 1–49.
- Lundberg JG & McDade LA (1986) On the southamerican catfish *Brachyrhamdia imitator* Myers (Siluriformes, Pimelodidae), with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Notulae Naturae*, 463: 1–24.
- Lundberg JG, Bornbusch AH & Mago-Leccia F (1991) *Gladioglanis conquistador* n. sp from Ecuador with diagnoses of the subfamily Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia* (1): 190–209.
- Lydeard C & Roe KJ (1997) Inferring relationships among Actinopterygian Fishes; In: Kocher TD & Stepien CA (eds). Molecular Systematics of fishes. Academic Press, California, USA. Chapter 17, Pp: 285–311.
- Mabragaña E, de Astarloa JMD, Hanner R, Zhang J & Castro M (2011) DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS One*, 6 (12): e28655.
- Machordom A & Doadrio I (2001) Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proceeding of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 268 (1473): 1297–1306.
- Maistro EL, Oliveira C & Foresti F (2002) Cytogenetic analysis of A-and B-chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, silver nitrate and CMA₃ staining and restriction endonuclease banding. *Cytologia*, 67 (1): 25–31.
- Manly BFJ (1994) Multivariate statistical methods. Second Edition. Chapman & Hall, Londres, UK, 215 pp.

- Martínez JF, Lui RL, Blanco DR, Traldi JB, Silva LF, Venere PC, Souza IL & Moreira-Filho O (2011) Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*, 64 (1): 121–128.
- Mayden R (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In Claridge MF, Dawah HA & Wilson MR (eds). *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp: 381–424.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York. 372 pp.
- Meier R (2008) DNA sequences in taxonomy: Opportunities and Challenges; In: Wheeler QD (2008) *The new taxonomy*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, USA. Chapter 7, Pp: 96–119.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G & Ng PK (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic biology*, 55 (5): 715–728.
- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods in enzymology*, 101: 20–78.
- Meyer CP & Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3 (12): e422.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Souza AD, Carvalho Jr JR & Nagamachi CY (2007) Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. *Zootaxa*, 1397 (1): 55–62.
- Mirande JM & Koerber S (2015) Checklist of the freshwater fishes of Argentina (CLOFFAR). *Ichthyological Contributions of Peces Criollos*, 36: 1–68.
- Mise FT, Tencatt LFC & Souza FD (2013) Ecomorphological differences between *Rhamdia* (Bleeker, 1858) populations from the Iguaçu River basin. *Biota Neotropica*, 13 (4): 99–104.
- Miyamoto MM & Fitch WM (1995) Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology*, 44 (1): 64–76.
- Mo TA (1991) Anatomy, relationships and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny. *Theses Zool*, 17: 1–216.
- Moraes NA, Silva MD, Matoso DA, Vicari MR, Almeida MCD, Collares-Pereira MJ & Artoni RF (2011) Karyotype variability in neotropical catfishes of the family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 9 (1): 97–105.
- Moraes VP, Cereali SS, Froehlich O & Dias AL (2007) Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 6 (3): 627–633.
- Moreira-Filho O & Bertollo LA (1991-b) Extraction and use of the cephalic kidney for chromosome studies in small fish. *Brazilian Journal of Genetics* 14: 1085–1090.
- Moreira-Filho O & Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics*, 14: 331–357.
- Moritz C (1994a) Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373–375.
- Moritz C (1994b) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401–411.
- Nei M & Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (10): 5269–5273.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University press, New York, USA, 512 pp.

- Nelson G & Platnick NI (1981). Systematics and biogeography. Columbia University Press, New York, 582 pp.
- Nixon KC & Wheeler QD (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6 (3):211–223.
- Northcutt RG (1989) The phylogenetic distribution and innervation of craniate mechanoreceptive lateral lines. In: Coombs S, Görner P & Münz H. The mechanosensory lateral line). Springer, New York, NY, pp: 17–78.
- Packer L, Gibbs J, Sheffield C & Hanner R (2009) DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9: 42–50.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I & Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7 (1) 16: 1–14.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK. Molecular Systematics. 2nd ed, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Parodi TV, Cunha MA, Becker AG, Zeppenfeld CC, Martins DI, Koakoski G, Barcellos LG, Heinzmann BM & Baldisserotto, B (2014) Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish physiology and biochemistry*, 40 (2): 323–334.
- Pazza R & Ferreira Jr JH (2003) Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain (Brazil). *Cytologia*, 68 (2): 159–163.
- Pazza R, Kavalco KF & Bertollo LAC (2006) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112 (3-4): 313–319.
- Perdices A, Bermingham E, Montilla A & Doadrio I (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25 (1): 172–189.
- Pereira LH, Hanner R, Foresti F & Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14 (1): 20.
- Pereira LH, Maia GM, Hanner R, Foresti F & Oliveira C (2011) DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial Dna*, 22 (sup1): 71–79.
- Pereyra MO, Baldo D, Blotto BL, Iglesias PP, Thomé MTC, Haddad CF, Barrios-Amorós C, Ibáñez R & Faivovich J (2016) Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): a molecular perspective with comments on hybridization and introgression. *Cladistics*, 32 (1): 36–53.
- Pérez-Ponce de León G & Nadler SA (2010) What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology*, 96 (2): 453–464.
- Poli MA, Schweitzer R & de Oliveira Nuñez AP (2015) The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. *Aquacultural engineering*, 66: 17–21.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S & Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21 (8): 1864–1877.
- Reeves A & Tear J (2000) MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.

- Regan CT (1911) The classification of the Teleostean fishes of the order Ostariophysi.—2. Siluroidea. *Journal of Natural History*, 8 (47): 553–577.
- Reis RE, Malabarba LR & de Lucena CA (2014) A new species of *Rhamdella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Siluriformes: Heptapteridae) from the coastal basins of southern Brazil. *Arquivos de Zoologia*, 45 (esp): 41–50.
- Ribeiro Souza C, de Mello Affonso PRA, de Araújo Bitencourt J, Sampaio I & Carneiro PLS (2018) Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia*, 809 (1): 309–321.
- Ribolli J, Scaranto BM, Shibatta OA, Bombardelli RA & Zaniboni-Filho E (2017) DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçu River Basin. *Neotropical Ichthyology*, 15 (1): e160147.
- Ringuelet RA, Aramburu RH & Alonso de Aramburo AS (1967) Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de investigación científica, La Plata, Argentina, 604 pp.
- Ríos N, Bouza C, Gutiérrez V & García G (2017) Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (*Rhamdia*: Heptapteridae). *Environmental Biology of Fishes*, 100 (9): 1047–1067.
- Ríos N, Bouza C & García G (2018) Past hybridisation and introgression erased traces of mitochondrial lineages evolution in the Neotropical silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). *Hydrobiologia*, 830(1): 161–177.
- Rosso JJ, Mabragaña E, Gonzalez Castro M & Díaz de Astarloa JM (2012) DNA barcoding of Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12 (6): 999–1011.
- Rubinoff D, Cameron S & Will K (2006) A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of Heredity*, 97: 581–594.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: The dilemma of the subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, 1: 9–10.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4893): 487–491.
- Scaranto BMS, Ribolli J & Zaniboni-Filho E (2018) DNA barcoding reveals blend of silver catfish *Rhamdia* species from fish farms in Southern Brazil. *Aquaculture Research*, 49 (5): 1907–1913.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E & Crozier RH (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual review of entomology*, 55: 421–438.
- Schmitz A & Riesner D (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical biochemistry*, 354 (2): 311–313.
- Schutze MK, Virgilio M, Norrbom A & Clarke AR (2017) Tephritid integrative taxonomy: Where we are now, with a focus on the resolution of three tropical fruit fly species complexes. *Annual review of entomology*, 62: 147–164.
- Seehausen O & Wagner CE (2014) Speciation in freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45: 621–51.

- Shibatta OA, Muriel-Cunha J, & de Pinna MC (2007) A new subterranean species of *Phreatobius* Goeldi, 1905 (Siluriformes, *Incertae sedis*) from the Southwestern Amazon basin. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 47 (17): 191–201.
- Silfvergrip AMC (1996) A systematic revisión of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae). Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 156 pp.
- Silva DS, Peixoto LA, Pieczarka JC, Wosiacki WB, Ready JS & Nagamachi CY (2015) Karyotypic and morphological divergence between two cryptic species of *Eigenmannia* in the Amazon basin with a new occurrence of XX/XY sex chromosomes (Gymnotiformes: Sternopygidae). *Neotropical Ichthyology*, 13 (2): 297–308.
- Silva LDL, Silva DTD, Garlet QI, Cunha MA, Mallmann CA, Baldisserotto B, Longhi SJ, Pereira AMS & Heinzmann BM (2013) Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, 11 (2): 443–451.
- Simpson GG (1951) The species concept. *Evolution* 5 (4):285–298.
- Slobodian V & Bockmann FA (2013) A new *Brachyrhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) from Rio Japurá basin, Brazil, with comments on its phylogenetic affinities, biogeography and mimicry in the genus. *Zootaxa*, 3717 (1): 1–22.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF & Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105 (36): 13486–13491.
- Souza IL, Moreira-Filho O & Bertollo LAC (1995) Cytogenetic Diversity in the *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) Complex II. Different Cytotypes Living in Sympatry. *Cytologia*, 60 (3): 273–281.
- Splendore de Borba R; Da Silva EL, Pacheco ACS, Parise-Maltempi PP & Alves AL (2012) Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in fish biology and fisheries*, 22 (2): 509–518.
- Stepien CA & Kocher TD (1997) Molecules and Morphology in Studies of fish evolution; In: Kocher TD & CA Stepien (1997). *Molecular Systematics of fishes*. Academic Press, California, USA. Chapter 1, Pp: 1–9.
- Stöver BC & Müller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, 11: 7.
- Sullivan JP, Lundberg JG & Hardman M (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41 (3): 636–662.
- Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10 (3): 512–526.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH & Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 18 (2): 70–74.
- Tavaré S (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, 17 (2): 57–86.
- Taylor WR & Van Dyke GC (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn* 9: 107–109.

- Thielsch A, Knell A, Mohammadyari A, Petrussek A & Schwenk K (2017) Divergent clades or cryptic species? Mito-nuclear discordance in a *Daphnia* species complex. *BMC evolutionary biology*, 17 (1): 227.
- Tschá MK, Baggio RA, Marteleto FM, Abilhoa V, Bachmann L & Boeger WA (2017) Sea-level variations have influenced the demographic history of estuarine and freshwater fishes of the coastal plain of Paraná, Brazil. *Journal of fish biology*, 90 (3): 968–979.
- Uso MC, dos Santos AR, Gouveia JG, Silva WF, Araya-Jaime C, Marques de Oliveira ML, Foresti F, Giuliano-Caetano L & Dias AL (2018) Genetic and Chromosomal Differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by Repetitive Molecular Markers and DNA barcoding. *Zebrafish*, 0 (0): 1–11.
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C & Foresti F (2014) Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and genome research*, 142 (4): 286–292.
- Valcarcel A, Brunner P & Maggese MC (1993) B-chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture*, 110 (2): 111–118.
- Valdez-Moreno, M.; Ivanova N.V., Gutierrez M.E., Contreras-Balderas S. & Hebert P.D. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, 74 (2): 377–402.
- Vaz BS, Cerqueira GM, Silva JC, Manzke VHB, Moreira CGA & Moreira HLM (2010). Sequence analysis of the growth hormone gene of the South American catfish *Rhamdia quelen*. *Genetics and Molecular Research*, 9 (4): 2184–2190.
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O & Bertollo LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex: evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1): 173–179.
- Vogler AP & DeSalle R (1994) Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology*, 8: 354–363.
- Waples RS (1991) Pacific Salmon *Oncorhynchus spp*, and the definition of “species” under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review*, 53(3): 11–22.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR & Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 360 (1462): 1847–1857.
- Wares JP & Cunningham CW (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55 (12): 2455–2469.
- Weber A & Wilkens H (1998) *Rhamdia macuspanensis*: a new species of troglobitic pimelodid catfish (Siluriformes; Pimelodidae) from a cave in Tabasco, Mexico. *Copeia*: 998–1004.
- Weber A, Allegrucci G & Sbordoni V (2003) *Rhamdia laluchensis*, a new species of troglobitic catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from Chiapas, Mexico. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14 (3): 273–280.
- Wheeler QD (2008) The new taxonomy. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, USA, 244 pp.
- Wiemers M & Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in zoology*, 4 (1): 8.

- Will KW, Mishler BD & Wheeler QD (2005) The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic biology*, 54 (5): 844–851.
- Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron SL, Joseph LEO & Trueman JW (2011) Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. *Systematic Entomology*, 36 (2): 209–217.
- Zeppenfeld CC, Hernández DR, Santinón JJ, Heinzmann BM, Da Cunha MA, Schmidt D & Baldisserotto B (2016) Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture nutrition*, 22 (4): 933–940.

APÉNDICE 1

Material examinado

Todos de Argentina: **LGEP011** (C&S): 114,75 mm; Arroyo Uruguay-í, Bernardo de Irigoyen, Misiones (26°12'9.20"S 53°58'6.30"W); 05/08/2012; D Baldo, E Krauczuk, JM Boeris, F Kolacheski. **LGEP044**: 199,43 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'39.1"S 55°49'14.5"W); 25/06/2014; DR Aichino. **LGEP055** (3 + 1 C&S): 65,89-81,1 mm; Río de la Plata, Punta Lara, Buenos Aires (34°49'00"S 57°58'W); MM Azpelicueta. **LGEP056**: 164,54mm; afluyente del Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (27°26'06.6"S 55°37'25.7"W); 21/09/2014; JD Baldo, MF Benitez, E Castillo, A Taffarel. **LGEP077**: 154,13mm; Afluyente del Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (27°26'06.6"S 55°37'25.7"W); 21/09/2014; JD Baldo, MF Benitez, E Castillo, A Taffarel. **LGEP118**: 240,00 mm; Arroyo Tabay, Jardín América, Misiones (26°59'56.26"S 55°10'42.99"W); 19/11/2014; MF Benitez, JM Boeris, N Acuña, M Sanchez. **LGEP123**: 273,00 mm; Arroyo Tabay, Jardín América, Misiones (26°59'51.17"S 55°10'44.93"W); 19/11/2014; MF Benitez, JM Boeris, N Acuña, M Sanchez. **LGEP129** (esqueleto): 163,93 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/12/2014; MF Benitez, E Castillo, A Taffarel. **LGEP130**: 202,86 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/12/2014; MF Benitez, E Castillo, A Taffarel. **LGEP131**: 200,72 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/12/2014; MF Benitez, E Castillo, A Taffarel. **LGEP139** (C&S): 165,18 mm; Arroyo San Juan, Cerro Corá, Misiones (27°29'46.56"S 55°36'54.18"W); 23/01/2015; D Baldo, MF Benitez, JM Boeris, E Castillo, JM Ferro, E Krauczuk, A Taffarel, M Sánchez. **LGEP161**: 210,00 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/02/2015; MF Benitez, JM Boeris; E Castillo; JM Ferro; A Taffarel. **LGEP162**: 206,00 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/02/2015; MF Benitez, JM Boeris, E Castillo, JM Ferro, A Taffarel. **LGEP163**: 247,68 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 03/02/2015; MF Benitez, JM Boeris, E Castillo, JM Ferro, A Taffarel. **LGEP175**: 220,85 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP176**: 231,87 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP178**: 101,37 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP189**: 166,60 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP190**

(C&S): 160,16 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP191**: 150,78 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (28°01'26.73"S 55°33'27.21"W); 6 al 8/02/2015; MF Benitez, I Reinko, M Sanchez, R Schneider. **LGEP198** (esqueleto): 260,09 mm; Arroyo Cuña Pirú, Aristobulo del Valle, Misiones (27°05'9.57"S 54°57'13.19"W); 9 y 10/02/2015; MF Benitez, E Castillo, JM Ferro, M Sanchez, R Schneider, A Taffarel. **LGEP200**: 247,00 mm; Arroyo Cuña Pirú, Aristobulo del Valle, Misiones (27°05'9.57"S 54°57'13.19"W); 9 y 10/02/2015; MF Benitez, E Castillo, JM Ferro, M Sanchez, R Schneider, A Taffarel. **LGEP208**: 142,19 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP209**: 138,65 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP210**: 126,42 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP211**: 150,39 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP212**: 130,49 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP213**: 124,91 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP214**: 142,45 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP215** (C&S): 173,71 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP216**: 106,66 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP217**: 122,20 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP218**: 211,24 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP219**: 239,31 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP220**: 129,33 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP221**: 143,57 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP222**: 132,69 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP223**: 243,07 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP224**: 215,56 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuck. **LGEP225**: 195,55 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E

Krauczuk. **LGEP226**: 166,71 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuk. **LGEP227**: 183,29 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuk. **LGEP229**: 149,11 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuk. **LGEP230** (esqueleto): 185,71 mm; Arroyo Isla Chico, Colonia Larrhague, Misiones (26°39'44"S 54°23'48"W); 14 al 17/02/2015; JM Boeris, E Krauczuk. **LGEP260**: 213,36mm, Arroyo Panambí, Panambí, Misiones (27°43'46.33"S 54°55'0.14"W); 24 al 26/02/2015; MF Benitez- JM Boeris- C Labaroni- Schneider, R. **LGEP298**: 207,88 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP299** (C&S): 106,17 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP300**: 130,45 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP301**: 221,56 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP302** (C&S): 89,19 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP303**: 144,85 mm; Arroyo Ramos, Campo Ramón, Misiones (27°26'42.19"S 54°55'36.59"W); 13 al 15/03/2015; MF Benitez. **LGEP341**: 144,78 mm; Arroyo 3 de Mayo, Garuhapé, Misiones (26°45'28,8"S 54°55'26,4"W); 27/09/2015; MF Benitez, M Sanchez, K Sanchez. **LGEP342**: 143,36 mm; Arroyo 3 de Mayo, Garuhapé, Misiones (26°45'28,8"S 54°55'26,4"W); 27/09/2015; MF Benitez, M Sanchez, K Sanchez. **LGEP375** (esqueleto): 220,50 mm; Arroyo La Playita, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 14 al 16/12/2015; MF Benitez, L Buschiazio, C Labaroni, M Sánchez. **LGEP376**: 152,43 mm; Arroyo La Playita, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 14 al 16/12/2015; MF Benitez, L Buschiazio, C Labaroni, M Sánchez. **LGEP377**: 137,95 mm; Arroyo Uruzú, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 14 al 16/12/2015; MF Benitez, L Buschiazio, C Labaroni, M Sánchez. **LGEP378**: 165,82 mm; Arroyo Uruzú, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 14 al 16/12/2015; MF Benitez, L Buschiazio, C Labaroni, M Sánchez. **LGEP379** (esqueleto): 156,41 mm; Arroyo Uruzú, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 14 al 16/12/2015; MF Benitez, L Buschiazio, C Labaroni, M Sánchez. **LGEP406**: 213,95 mm; Arroyo Portera, San Javier, Misiones (27°48'17.9"S 55°12'26.9"W); 31-03-16; MF Benitez, J Caffetti, M Maldonado, A Rau. **LGEP412**: 234,38 mm; Arroyo Portera, San Javier, Misiones (27°48'17.9"S 55°12'26.9"W); 31-03-16; MF Benitez, J Caffetti, M Maldonado, A Rau. **LGEP414**: 189,70 mm; Arroyo Cuña Pirú, Aristobulo del Valle, Misiones (27°05'9.57"S 54°57'13.19"W); 01-04-16; MF Benitez, J Caffetti, M Maldonado, A Rau. **LGEP421**: 168,56 mm; Garapé, Santa Tecla, Corrientes (27° 26' 17" S 56° 22' 31" W); 18-05-15; Staff Biología Pesquera. **LGEP430**: 139,08 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones

(27°29'40.13"S 55°49'16.05"W); 06-05-16; MF Benitez, M Pereson, E Castillo. **LGEP447**: 205,30 mm; Arroyo El rey, Las Taperitas, Santa Fé (28°50'48.1"S 59°44'28.7"W); 19-06-16; A De Bernardis. **LGEP478**: 123,69 mm; Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (27°26'31.38"S 55°38'48,3"W); 11-08-16; MF Benitez, C Labaroni, J Torres, S Filippi. **LGEP492**: 151,76 mm; Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (27°26'31.38"S 55°38'48,3"W); 11-08-16; MF Benitez, C Labaroni, J Torres, S Filippi. **LGEP493** (esqueleto): 203,95 mm; Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (27°26'31.38"S 55°38'48,3"W); 05-10-16; MF Benitez, JM Boeris, C Labaroni, L Buschiazzo, F Da Rosa. **LGEP510**: 166,94 mm; Arroyo Acaraguá, Villa Bonita, Misiones (27°27'16,66"S 54°55'42,74"W), 31-10-16; MF Benitez, JM Boeris, P Torres. **LGEP526**: 198,28 mm; Arroyo Melo, 25 de Mayo, Misiones (27°25'12"S 54°41'57,6"W); 11-11-16; MF Benitez, D Baldo, JM Ferro, M Mirande, G Terán, F Alonso, G Aguilera. **LGEP527**: 187,09 mm; Arroyo Melo, 25 de Mayo, Misiones (27°25'12"S 54°41'57,6"W); 11-11-16; MF Benitez, D Baldo, JM Ferro, M Mirande, G Terán, F Alonso, G Aguilera. **LGEP528** (esqueleto): 137,65 mm; Arroyo Melo, 25 de Mayo, Misiones (27°25'12"S 54°41'57,6"W); 11-11-16; MF Benitez, D Baldo, JM Ferro, M Mirande, G Terán, F Alonso, G Aguilera. **LGEP540**: 130,92 mm; Arroyo Isla, Colonia Larrhague, Misiones (26°36'22.7"S 54°27'18.4"W); 14-11-16; G Aguilera, F Alonso, MF Benitez, M Mirande, G Terán. **LGEP555** (C&S): 81,82 mm; Obras Sanitarias, Buenos Aires, Buenos Aires (34°35'04.8"S 58°20'25.0"W); 1964-1966; RB López, HP Groncelli- Costello. **LGEP573**: 77,30 mm; Arroyo Isla, Colonia Larrhague, Misiones (26°36'22.7"S 54°27'18.4"W); 14-11-16; G Aguilera, F Alonso, MF Benitez, M Mirande, G Terán. **LGEP598**: 170,19 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (26°38'23.28"S 54°7'30.7"W); 22-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP599**: 130,11 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (26°38'23.28"S 54°7'30.7"W); 22-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP606**: 118,96 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (26°38'23.28"S 54°7'30.7"W); 22-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP607**: 223,92 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (26°38'23.28"S 54°7'30.7"W); 22-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP608**: 122,22 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (26°38'23.28"S 54°7'30.7"W); 22-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP609**: 111,07 mm; Arroyo Tabay, Jardín América, Misiones (26°59'56.2"S 55°10'43"W); 24-04-17; MF Benitez, JM Boeris, O Escalante. **LGEP614**: 155,38 mm; Arroyo del Rey, Moussy, Santa Fé (29°00'12.0"S 59°44'46"W); 05-01-17; M Pereson, E Martí. **LGEP662**: 74,86 mm; Río Paraná, San Ignacio, Misiones (27°14'57.37"S 55°34'19.67"W); 28/02/2004; L Hirt, P Araya, S Flores, L Amarilla. **LGEP713**: 200,50 mm; Arroyo Uruzú, Andresito, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 05/07/2017; MF Benitez, JM Boeris. **LGEP714**: 156,44 mm; Arroyo Uruzú, Andresito, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 05/07/2017; MF Benitez, JM Boeris. **LGEP715**: 146,09 mm; Arroyo Uruzú, Andresito, Misiones

(25°51'20.77"S 54°10'01"W); 05/07/2017; MF Benitez, JM Boeris. **LGEP716**: 118,24 mm; Arroyo Uruzú, Andresito, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 05/07/2017; MF Benitez, JM Boeris. **LGEP717**: 126,35 mm; Arroyo Uruzú, Andresito, Misiones (25°51'20.77"S 54°10'01"W); 05/07/2017; MF Benitez, JM Boeris. **LGEP764** 195,29 mm; Las Garzas, Santa Fé (28°51'20.77"S 59°28'02.8"W); 20/07/2017; A De Bernardis, M Pereson. **LGEP777**: 183,80mm; Las Garzas, Santa Fé (28°51'20.77"S 59°28'02.8"W); 20/07/2017; A De Bernardis, M Pereson. **LGEP778** (esqueleto): 156,87 mm; Las Garzas, Santa Fé (28°51'20.77"S 59°28'02.8"W); 20/07/2017; A De Bernardis, M Pereson.

Material comparativo

CI-FML 541: *Rhamdia quelen*, 1 ejemplar (252,53 mm), Riacho Formosa, Formosa, Argentina. **CI-FML 620**: *Rhamdia quelen*, 1 ejemplar (195,87 mm), Isla Apipé Grande, Ituzaingó, Corrientes, Argentina. **CI-FML 1931**: *Rhamdia quelen*, 1 ejemplar (143,03 mm), Arroyo El Manantial, Lules, Tucumán, Argentina. **CI-FML 2883**: *Rhamdia* cf. *quelen*, 1 ejemplar (277,48 mm), Arroyo Aguas chiquitas, Burruyacu, Tucumán, Argentina. **CI-FML 4981**: *Rhamdia* cf. *quelen*, 5 ejemplares (122,73- 142,47 mm), Bahía Negra, Alto Paraguay, Paraguay. **CI-FML 5400**: *Rhamdia quelen*, 1 ejemplar (155,02 mm), Bahía Negra, Alto Paraguay, Paraguay. **CI-FML 53782**: *Rhamdia quelen*, 2 ejemplares (40,29-59,1 mm), Arroyo Los Pérez, Simoca, Tucumán, Argentina. **MLP 5902**: *Rhamdia sapo*, 2 ejemplares (77,76- 75,81 mm), La Falda, Córdoba, Argentina. **MLP 6382**: *Rhamdia* sp., 2 ejemplares (aprox. 150 mm), Arroyo Pigüé, Buenos Aires, Argentina. **MLP 6981**: *Rhamdia sapo*. 12 ejemplares (60 a 80 mm), entre Tacuarembó y San Antonio, Santa Fé, Argentina. **MLP 7003**: *Rhamdia* sp., 3 ejemplares (71,39- 77,76 mm), Basail, Chaco, Argentina. **MLP 7844**: *Rhamdia* sp., 1 ejemplar (81.76 mm), Sierra de la Ventania, Buenos Aires, Argentina. **MLP 8875**: *Rhamdia* sp., 3 ejemplar- 1 medido (140,47 mm), Charcas de desagüe, Formosa, Argentina. **MLP 9089**: *Rhamdia sapo*., 1 ejemplar (aprox. 130 mm), Los Talas, Berisso, Buenos Aires, Arg. **MLP 9093**: *Rhamdia sapo*, 1 ejemplar (181 mm), Los Talas, Buenos Aires, Argentina. **MLP 9315**: *Rhamdia sapo*, 4 ejemplares (aprox. 74 mm), Río Coronda, Santa Fé, Argentina. **MACN 10653**: *Rhamdia* sp., 2 ejemplares (181,08 y 174,88 mm), San Luís, Argentina. **MACN 10679**: *Rhamdia* sp., 2 ejemplares (aprox 150 mm), Laguna Blanca, Formosa, Argentina. **MACN 11136**: *Rhamdia* sp., 1 ejemplar (320 mm), Arroyo Yacarecito, Colastini, Santa Fé, Argentina. **MACN 11218**: *Rhamdia* sp., 1 ejemplar (160 mm), Mojón cercano a Laguna Blanca, Formosa, Argentina. **MACN 1809**: *Rhamdia aff. sapo*, 4 ejemplares (159,31 y 239,9 mm), Río de la Plata, Isla Martín García, Argentina. **MACN 5871**: *Rhamdia sapo*, 1 ejemplar (250 mm), Río Quequén, Buenos Aires, Argentina. **MACN 5904**: *Rhamdia* sp., 1 ejemplar (350 mm), Laguna interna Estancia Acelaín, Tandil, Buenos Aires, Argentina. **MACN**

619: *Rhamdia hilarii*, Río de la Plata (Obras Sanitarias), Buenos Aires, Argentina. **MACN 6876:** *Rhamdia sp.*, 5 ejemplares (107,43- 150,7 mm), Arroyo Santa María, San Javier, Bolivia. **MACN 6886:** *Rhamdia sp.*, 4 ejemplares medidos (121,2- 168,04 mm), Río Quizer, Santa Cruz, Bolivia. **MACN 7388:** *Rhamdia sp.*, 6 ejemplares (181,2-334,65 mm), Río Paraiba do Sul, Resende, Rio de Janeiro, Brasil. **MACN 7492:** *Rhamdia sapo*, 3 ejemplares (137 mm), Río Quequén, Buenos Aires, Argentina.

APÉNDICE 2



LGEP077: 154,13mm; Afluente del Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (QUE1)



LGEP123: 273,00 mm; Arroyo Tabay, Jardín América, Misiones (QUE1)



LGEP131: 200,72 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (QUE1)



LGEP178: 101,37 mm; Arroyo Concepción, Concepción de la Sierra, Misiones (QUE1)



LGEP606: 118,96 mm; Arroyo Santa Rita, San Pedro, Misiones (QUE1)



LGEP118: 240,00 mm; Arroyo Tabay, Jardín América, Misiones (QUE2).



LGEP139 (C&S): 165,18 mm; Arroyo San Juan, Cerro Corá, Misiones (QUE2).



LGEP478: 123,69 mm; Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (QUE2).



LGEP375 (esqueleto): 220,50 mm; Arroyo La Playita, Cmte. Andresito, Misiones (QUE3)



LGEP376: 152,43 mm; Arroyo La Playita, Cmte. Andresito, Misiones (QUE3)



LGEP713: 200,50 mm; Arroyo Uruzú, Cmte. Andresito, Misiones (QUE3)



LGEP717: 126,35 mm; Arroyo Uruzú, Cmte. Andresito, Misiones (QUE3)



LGEP 130: 202,86 mm; Arroyo Garupá, Garupá, Misiones (QUE4).



LGEP493: 203,95 mm; Arroyo San Juan, Santa Ana, Misiones (QUE4).



LGEP614: 155,38 mm; Arroyo del Rey, Moussy, Santa Fé (QUE4).



LGEP778: 156,87 mm; Las Garzas, Santa Fé (QUE4).