

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“Estructuración genética y variabilidad fenotípica de dos especies de pejerreyes *Odontesthes nigricans* y *Odontesthes smitti* a lo largo del extenso gradiente latitudinal de la costa patagónica”.

Lic. Laura Leilén Cocito

Director de Tesis: Dr. Daniel Alfredo Fernández

Lugar de realización: Laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos Acuáticos (LEFyE) - Centro Austral de Investigaciones Científicas y Técnicas (CADIC-CONICET) - Ushuaia

2020

A Ezequiel y Valentín

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis y del laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos Acuáticos del CADIC, Dr. Daniel Fernández, agradezco profundamente por brindarme la oportunidad de realizar esta aventura en el Fin del Mundo, por la confianza ofrecida y la pasión profesional inspiradora, además de ofrecer el espacio de trabajo, poniendo a disposición los recursos e insumos necesarios para alcanzar los objetivos de esta Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por permitirme el desarrollo y crecimiento profesional a lo largo del Doctorado donde además me inicié en el mundo académico.

A la ANPCyT y a CONICET, por haberme otorgado la beca inicial de postgrado y la beca de finalización de doctorado, respectivamente. Las cuales me permitieron realizar mi doctorado y desarrollarme profesionalmente.

Al Centro Austral de investigaciones Científicas (CADIC-CONICET) donde realicé las prácticas de laboratorio para cumplir los objetivos de la presente Tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología, Fisiología y Evolución de Organismos acuáticos (LEFyE) con quienes intercambiamos picadas y mates. En especial a mis compañeros de oficina del Laboratorio (LEFyE), con quienes compartí desde los primeros días de llegar a Ushuaia. Entre ellos a Javier Rojo por su entera disposición a brindar lo mejor de él y ayudarme a deducir en los diferentes análisis, a Paola Villatarco, Daniel Bruno y Tomas Chalde por sus opiniones y saberes, a Santiago Ceballos por sus aportes genéticos, a Daniel Aureliano por su compañerismo en la búsqueda de muestras en las varias salidas a campo en la isla y a Sonia Rimbau por su gran afecto, generosidad, paciencia y atención en el laboratorio.

A todas las personas que me ayudaron a obtener las muestras para esta tesis, desde Viedma hasta Pto. Santa Cruz, entre ellas a Andrea Tombari, Bruno Rodríguez, Matías Ocampo Reinaldo, Raúl Gonzáles, Denis Landete, Mauro Marcinkeviciu y Luis Pellanda.

A todas las personas que conocí durante estos años de doctorado y facilitaron el día a día para que pueda concretar esta Tesis.

A mis padres, a quiénes les debo la vida y los valores con los cuales me educaron, dejándome siempre libertad en tomar todas las decisiones por las cuales hoy soy. En especial a mi Madre que, con su constante incentivo, demostración de alegría y sobre todo amor ayuda a concretar mis sueños y ha sido el motor para comenzar y finalizar este doctorado.

A mis hermanos, que desde lejos me fortalecieron.

A mi tío Raúl que me alentó a tomar la decisión de venir a Ushuaia, siempre atento a mis viajes.

A las amistades de siempre y nuevas que me dio la vida en estos años de doctorado, a Néstor, Laura, Juli, Seba, Mabel, Carlos, Flor, Rosi y Eli por brindarnos lo mejor sobre todo a Valen y especialmente a Mile; quien me ha alentado, alegrado y ayudado a pensar en cada momento que necesité.

A mi marido Ezequiel, quién me acompañó en las decisiones que hicieron que la vida tome este rumbo, por su gran amor y compañía incondicional en todo momento, por vivir el día a día de esta Tesis y ayudarme a concretarla. Sin él no hubiese llegado a éste momento.

A mi hijo Valentín quien me da la energía y amor para nunca bajar los brazos.

PUBLICACIONES

Cocito L. L., Ceballos Santiago G., Daniel A. Fernández. (2019). “*Sharp phylogeographical differentiation near the southern range edge of the silverside *Odontesthes nigricans*: Distinct peripheral populations and incipient speciation?*”. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 226.

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	16
7.1 Características del Océano Atlántico y Mar Argentino	16
Características del Golfo San Matías	18
Características del Golfo San José.....	19
Características del Golfo Nuevo	19
Características del Golfo San Jorge	20
7. 2 Características físicas del Canal Beagle.....	21
7.3 Características del Pejerrey.....	22
• Taxonomía	22
• Distribución.....	22
• Características morfológicas	25
• Alimentación.....	26
7.4 Historia geológica y clima de la región marina patagónica	26
7.5 Importancia del trabajo y objetivos.....	27
8. OBJETIVOS.....	28
8.1 Objetivo general.....	28
8.2 Objetivos específicos	28
Hipótesis	28
9. CAPÍTULO 1: GENÉTICA DE POBLACIONES	30
9.1 Introducción	30
9.2Objetivo.....	32
9.3 Materiales y métodos	33
9.3.1 Obtención de muestras	33
9.3.2 Extracción de ADN.....	36
9.3.3 Amplificación por PCR y secuenciación	36
9.3.4 Edición de secuencias	37
9.3.5 Análisis de datos	38
Diversidad Genética.....	38
Estructura Genética.....	38
Historia demográfica y análisis filogenético.....	39

• <i>Red de Haplotipos</i>	39
• <i>Tasa de mutación de la región de control del gen mitocondrial.</i>	39
• <i>Test de Neutralidad</i>	40
• <i>Distribución Mismatch</i>	40
• <i>Bayesian Skyline Plot</i>	40
9.4 Resultados	41
<i>O. nigricans</i>	41
Diversidad Genética y Estructura Genética	41
Historia demográfica y análisis filogenético.....	44
• <i>Tasa de mutación</i>	44
• <i>Árbol filogenético y Red de haplotipos</i>	45
• <i>Test de Neutralidad</i>	48
• <i>Distribución Mismatch</i>	48
• <i>Bayesian skyline plot</i>	49
<i>O. smitti</i>	50
Diversidad genética y Estructura Genética	50
Historia demográfica y análisis filogenético.....	53
• <i>Tasa de mutación</i>	53
• <i>Árbol filogenético y Red de haplotipos</i>	53
• <i>Test de Neutralidad</i>	56
• <i>Distribución Mismatch</i>	56
• <i>Bayesian skyline plot</i>	57
9.5 Discusión	58
<i>O. nigricans</i>	58
<i>O. smitti</i>	62
9.6 Conclusión	63
10. CAPÍTULO 2: MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA	67
10.1 Introducción	67
10.2 Objetivo	69
10.3 Hipótesis	69
10.4 Materiales y Métodos	70
10.4.1 Obtención de muestras	70
10.4.2 Análisis	71

10.6 Resultados	74
<i>O. nigricans</i> vs <i>O. smitti</i>	74
<i>O. nigricans</i>	77
Canal Beagle	83
O. Atlántico.....	85
<i>O. smitti</i>	88
10.7 Discusión	91
<i>O. nigricans</i> y <i>O. smitti</i>	91
<i>O. nigricans</i>	92
<i>O. smitti</i>	94
10.8 Conclusión	95
11. CAPÍTULO 3: HISTOLOGÍA	97
11.1 Introducción	97
11.2 Objetivo	102
11.3 Materiales y métodos	102
11.3.1 Obtención de muestras	102
11.3.2 Procesado de las muestras.....	103
11.3.3 Digitalización de imágenes	104
11.3.4 Análisis estadísticos	105
11.4 Resultados	106
<i>O. nigricans</i> y <i>O. smitti</i>	106
Tamaño de la fibra muscular (Distribución del diámetro de fibra muscular)	108
<i>O. nigricans</i> y <i>O. smitti</i>	108
<i>O. nigricans</i>	110
11.5 Discusión	115
<i>O. nigricans</i> y <i>O. smitti</i>	115
<i>O. nigricans</i>	116
11.6 Conclusión	117
12. CONCLUSIONES GENERALES	120
13. BIBLIOGRAFÍA	124

Abreviaturas y Símbolos

ACP: Análisis de Componentes Principales

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AP: antes del presente

AVC: Análisis de Variación Canónica

BG: Bahía Golondrina

BR: Bahía Rosas

BSP: Bayesian Skyline Plot

BV: Bahía Varela

CA: costa Atlántica

CAC: costa Atlántica Continental

CAI: costa Atlántica Insular

CB: Canal Beagle.

cm: centímetro

CP: componente Principal

CR: Comodoro Rivadavia

g: gramo

h: número de haplotipos

Hap: haplotipo

Hd: diversidad haplotípica

km: kilómetro

Lf: largo de fork

LG: Las Grutas

Lm: *landmark*

Ls: largo estándar

LT: largo total

m: metro

M: Puerto Madryn

mg: miligramo

ML: María Luisa

ml: mililitro

mm: milímetro

n: tamaño de muestras

nro: número

O. nigricans: *Odontesthes nigricans*

O. smitti: *Odontesthes smitti*

P: peso

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Punta María

PP: Punta Popper

PSC: Puerto Santa Cruz

seg: segundo

SJ: San Julián

Sp: número de sitios polimórficos

Spi: sitios parsimoniosamente informativos

SS: San Sebastián

TDF: Tierra del Fuego

Ups: unidades prácticas de salinidad

VC: variable Canónica

μl: microlitro

μm: micrómetro

II: diversidad nucleotídica

RESUMEN

Las dos especies de peces marinos estudiadas en esta Tesis: *Odontesthes nigricans* y *Odontesthes smitti*, se encuentran distribuidas en la costa Atlántica de la Patagonia, además *O. nigricans* también se encuentra en el Canal Beagle. A pesar de ser especies de gran importancia en las pesquerías artesanales, se conoce muy poco sobre su biología. El presente trabajo analiza la variabilidad genética y fenotípica de estas dos especies endémicas del Sur de Sudamérica y evalúa cómo han respondido sus poblaciones a la variación ambiental (actual y/o histórica) a lo largo de su distribución. Para examinar la variabilidad genética, se estudiaron secuencias de la región de control mitocondrial (RC ADNmt) y para analizar la variación fenotípica se efectuó morfometría geométrica corporal e histología de la musculatura axial.

En *O. nigricans*, la variabilidad genética se estudió a partir de 224 secuencias (814 pb de RC ADNmt) de individuos capturados en dos sitios del Canal Beagle y seis sitios de la costa Atlántica. El análisis morfométrico se llevó a cabo con 576 especímenes provenientes de dos sitios del Canal Beagle y de cinco sitios de la costa Atlántica. Finalmente, la histología muscular se evaluó estudiando 30 ejemplares, de tres sitios de la costa atlántica y dos del Canal Beagle. La estructura genética reveló una profunda división filogeográfica entre el Canal Beagle y la costa Atlántica de la Patagonia con un 39.83% de variación entre individuos pertenecientes a estos dos grupos. La diversidad genética observada fue menor en el Canal Beagle que en los sitios de la costa Atlántica y los resultados de los análisis demográficos son compatibles con un escenario de expansión demográfica, especialmente en el Canal Beagle. Los resultados obtenidos mediante morfometría geométrica también marcaron una gran diferenciación entre los individuos del Canal Beagle y de la costa Atlántica, observándose el pedúnculo caudal más largo y un cuerpo más angosto en los pejerreyes del Canal que en los pejerreyes de la costa Atlántica. Los análisis histológicos indicaron que las fibras musculares de *O. nigricans* presentaron una distribución unimodal de la frecuencia de diámetros de las fibras musculares, siendo esta moda de 110 micras para las tallas estudiadas. La distribución de frecuencias del tamaño de las fibras musculares estudiadas indicó que el único proceso activo en el crecimiento de la musculatura era la hipertrofia muscular dada la casi completa ausencia de fibras nuevas (menores a 20 micras de diámetro).

En *O. smitti*, se estudiaron 120 secuencias (858 pb de RC de ADNmt) de 8 sitios de la costa Atlántica para analizar la variabilidad genética. Un total de 258 ejemplares provenientes de 6 sitios se usaron para el estudio de morfometría geométrica y en una sola población de la costa Atlántica de la isla de Tierra del Fuego se analizaron las fibras musculares

(6 individuos). La estructuración genética permitió separar las poblaciones en tres grupos con una variación significativa de 15.94 % entre grupos: un grupo conformado por Bahía Rosas y Las Grutas, otro conformado por Comodoro Rivadavia y como tercer grupo a todos los sitios de Tierra del Fuego junto a Pto. Madryn. Se observó un aislamiento por distancia a lo largo de la costa Atlántica. Valores negativos del test de neutralidad y la distribución mismatch unimodal soportan un posible escenario de la expansión poblacional. Morfométricamente, las mayores variaciones entre los individuos se encontraron en la cabeza y el abdomen, y se observaron las mismas agrupaciones que con los análisis genéticos. Los análisis histológicos mostraron una distribución bimodal de la frecuencia de diámetros de las fibras musculares, siendo estas modas de 60 y 110 micras. La distribución de frecuencias del tamaño de las fibras musculares estudiadas indicó que el único proceso activo en el crecimiento de la musculatura era la hipertrofia muscular, dada la casi completa ausencia de fibras nuevas (menores a 20 micras de diámetro). La existencia de dos modas en la distribución de frecuencias indicó al menos un pulso de hiperplasia muscular después del desarrollo embrionario.

En conjunto, los resultados de esta Tesis muestran claras diferencias genéticas y morfológicas entre las dos especies de pejerreyes estudiadas. También sugieren que las poblaciones de *O. smitti*, de *O. nigricans* de costa Atlántica y de *O. nigricans* del Canal Beagle deberían considerarse como unidades diferentes para fines de conservación y manejo sustentable de las pesquerías artesanales. En el caso de *O. nigricans* es muy clara la diferencia genética y fenotípica observada entre las poblaciones de la costa Atlántica y el Canal Beagle determinando que el Canal Beagle constituye una barrera efectiva que genera diferenciación genética y morfológica, y que estaría generando una especiación incipiente.

ABSTRACT

The two species of marine fishes studied in this thesis: *Odontesthes nigricans* and *Odontesthes smitti*, are distributed on the Atlantic coast of Patagonia, in addition *O. nigricans* is also found in the Beagle Channel. Despite being species of great importance in artisanal fisheries, very little is known about their biology. The present work analyzes the genetic and phenotypic variability of these endemic species of the South of South America and evaluates how the populations of these silversides have responded to the environmental variation (current or historical) throughout their distribution. To examine the genetic variability, sequences of the mitochondrial control region (CR mtDNA) were studied and to analyze the phenotypic variation, body geometric morphometry and histology of the axial caudal musculature were performed.

In *O. nigricans*, genetic variability was studied with 224 sequences (814 bp of CR mtDNA) generated from individuals captured at two sites in the Beagle Channel and six sites on the Atlantic coast. The morphometric analysis was carried out with 576 specimens, from two sites of the Beagle Channel and five sites on the Atlantic coast. Finally, muscle histology was evaluated by studying 30 specimens from three sites on the Atlantic coast and two from the Beagle Channel. The genetic structure revealed a sharp phylogeographic division between Beagle Channel and the Atlantic coast of Patagonia with a 39.83% of variance between individuals belonging to these two groups. The genetic diversity observed was lower in Beagle Channel than in the Atlantic coast sites and the results of the demographic analyses were compatible with a scenario of past population expansion, especially in the Beagle Channel. The result obtained through geometric morphometry also marked a great differentiation between individuals of the Beagle channel and the Atlantic coast: observing the longer caudal peduncle and a narrower body in the silversides of the channel than in the silversides of the Atlantic coast. Histological analyzes indicated that *O. nigricans* muscle fibers had a unimodal distribution of the frequency of muscle fiber diameters, being this mode 110 microns. The size of the muscle fibers studied indicated that the only active process in muscle growth was muscle hypertrophy.

In *O. smitti*, 120 sequences (858 bp of mtDNA RC) from eight sites were used to analyze the genetic variability. A total of 258 specimens from 6 sites were used for the study of geometric morphometry and muscle fibers were analyzed in one population of the Atlantic coast of the island of Tierra del Fuego. Genetic structuring separated the populations into three groups with a significant variation of 15.94 % between groups: one group formed by Bahía

Rosas y Las Grutas, a second one formed by Comodoro Rivadavia and a third group with all the sites from Tierra del Fuego and Puerto Madryn. Distance isolation was observed along the Atlantic coast. Negative values of the neutrality test and the unimodal mismatch distribution support the possible scenario of population expansion. Morphometrically, the greatest variations between individuals were found in the head and abdomen, and the same clusters were observed as with the genetic analyzes. Histological analyzes showed a bimodal distribution of the frequency of diameters of muscle fibers, these modes were 60 and 110 microns. The size of the muscle fibers studied indicated that the only active process in muscle growth was muscle hypertrophy. The existence of two modes in the frequency distribution indicated at least one pulse of muscle hyperplasia after embryonic development.

All the results of this thesis show a clear genetic and morphological difference between the two species of silversides studied. They also suggest that the populations of *O. smitti*, *O. nigricans* of the Atlantic coast and *O. nigricans* of the Beagle Channel should be considered as different units for the purposes of conservation and sustainable management of artisanal fisheries. In the case of *O. nigricans* the genetic and phenotypic difference observed between the populations of the Atlantic coast and Beagle Channel it is very clear, determining that the Beagle Channel constitutes an effective barrier that generates genetic and morphological differentiation and that it would be generating an incipient speciation.

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

La costa Patagónica Argentina ubicada en la parte más austral del cono Sur en Sudamérica, se desarrolla a lo largo de un extenso gradiente latitudinal, asociado a otros gradientes como por ejemplo un claro gradiente de temperatura y fotoperiodo, y otras variaciones no tan claras como las de salinidad y amplitud de mareas [1]. También existen conexiones entre el Pacífico y el Atlántico Sur que modifican algunos de estos patrones y generan potenciales intercambios faunísticos (el Estrecho de Magallanes y el Canal Beagle). Diferentes grupos de peces parecen haber respondido evolutivamente de formas diversas a estas presiones de selección, en términos del número de especies que se generaron como de la estructura genético-poblacional y de la variación fenotípica desarrollada [2–6].

En la presente Tesis se intenta conocer la escala espacial y temporal de la variación fenotípica y genética en dos especies marinas que forman parte importante en las pesquerías artesanales de la costa Patagónica Argentina y el Canal Beagle, y de potencial valor para la acuicultura. Ésta información ayudaría a comprender cómo están estructuradas las distintas especies desde el punto de vista de su dinámica poblacional a lo largo de su distribución geográfica, si se trata de una o más unidades poblacionales de las mismas, y si las principales características biológicas de éstas especies varían a lo largo de la distribución. Además, la información generada podrá ser utilizada en el futuro para detectar cambios debidos a alteraciones ambientales o por sobrepesca a partir de la generación de datos biológicos de base inexistentes en la actualidad, y de gran importancia para la conservación de la biodiversidad.

7.1 Características del Océano Atlántico y Mar Argentino

El Mar Argentino es una porción del océano Atlántico sudoccidental que cubre la plataforma continental (1.782.000 km²), adyacente a las costas de la República Argentina, siendo el de mayor extensión en el hemisferio Sur (35° - 55° S) [7]. El mismo comprende desde la salida del estuario del Río de la Plata por el norte (35° S) hasta la isla de los Estados por el sur (55°S) y 100 millas marinas contadas desde la isobata de los 2500 m de profundidad, que incluye a las islas Malvinas (o 350 millas contadas desde la línea de base) [8,9].

Las aguas del Mar Argentino están dominadas por dos corrientes marinas: la corriente de Brasil y la corriente de Malvinas. Por el norte fluye la corriente cálida de Brasil, a lo largo del borde continental de América del Sur con dirección hacia latitudes mayores, como parte de la “Corriente del Margen Occidental”. La corriente de Brasil ingresa al Mar Argentino con baja

concentración de nutrientes en sus aguas subtropicales de salinidades superiores a los 35 ups y temperaturas mayores a los 16° C, hasta confrontarse con la corriente de Malvinas en la nominada Zona de Confluencia [10]. Por el sur, la corriente fría de Malvinas corre en dirección noreste, a lo largo del talud continental argentino, como una rama de la “Corriente Antártica Circumpolar” [7]. La corriente de Malvinas inicia del brazo norte de la corriente Circumpolar Antártica y atraviesa el Pasaje de Drake bifurcándose allí donde la rama principal se desplaza por el talud continental, moviendo aguas frías y ricas en nutrientes hacia el norte, entre los 55°S y 39° - 36° S, y la rama oeste favorece a formar la Corriente Costera Patagónica que circula hacia el norte sobre la plataforma continental donde alcanza el paralelo 38° S trasladando aguas frías subantárticas y de baja salinidad por el aporte de aguas continentales aumentando de la costa hacia la plataforma exterior y del sur al norte desde los 33 ups a los 34,2 ups [11,12] (Figura1). Su temperatura media, que varía con la latitud y la estación, oscila entre los 5°C y los 15°C [13]. El núcleo principal de la Corriente de Malvinas se ubica entre los 150 y 600 m de profundidad con valores de temperatura entre 4 a 5 °C y salinidades entre 34.1 y 34.2 ups [10].

Dentro de la plataforma se han identificado áreas cerradas y semicerradas que generan localmente sus propias características, como son los sistemas del golfo San Matías, gofo San José, golfo Nuevo y golfo San Jorge, los cuales son sitios de muestreo en esta Tesis. Estas aguas localmente modificadas, generan zonas frontales con importantes implicancias biológicas [13], a tener en cuenta con nuestros resultados. En toda la plataforma patagónica, la mezcla inducida por las corrientes de marea provoca altos niveles de disipación y, en zonas de bancos topográficos particulares, puede inhibir la formación de una termoclina estacional, creando frentes térmicos de primavera y verano que definen la frontera entre aguas estratificadas y mezcladas verticalmente [13].

Las características únicas del Mar Argentino lo convierten en uno de los caladeros más ricos del mundo, con su ecosistema templado-frío y con variedades de recursos inigualables y de gran valor comercial [14].

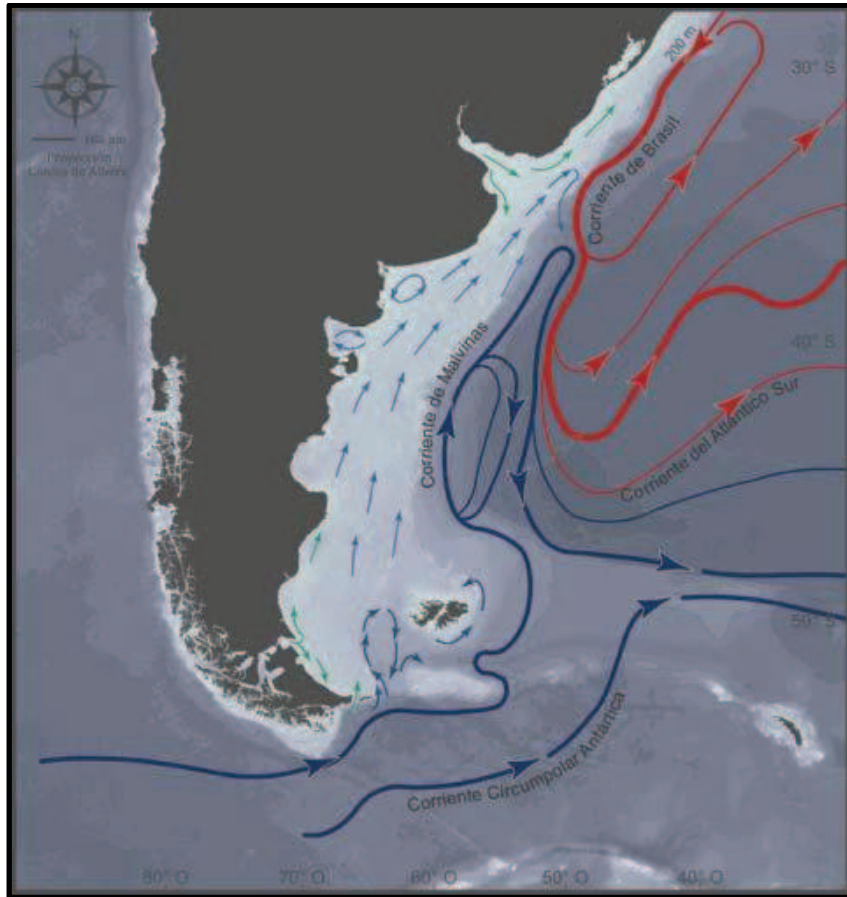


Figura 1. Corrientes marinas del O. Atlántico de Sud América (Mapa modificado de Piola y Matano, 2001).

Características del Golfo San Matías

El golfo de San Matías se encuentra ubicado entre 40° - 42° S y 64° O en la costa argentina de la provincia de Río Negro, cubre un área de aproximadamente 20000 km^2 y es el segundo golfo más grande del país. Alrededor del 55% del área total es más profunda que 100 m, con un máximo de 180 m en la zona central [15]. La plataforma continental en el lado este, forma una cuenca abierta con una profundidad media de 70 m en la entrada. Una característica particular del golfo es que posee dos grandes depresiones de 160 m de profundidad situadas simétricamente respetando el paralelo $41^{\circ} 40' \text{ S}$. En primavera el golfo presenta dos zonas con masas de agua marcadamente diferentes. Una es denominada “aguas típicas del golfo” (área norte y oeste) caracterizada por alta temperatura y salinidad, una marcada termoclina que limita las concentraciones de nitrato y menor tasa de renovación; y la otra llamada “aguas de origen exterior” (área sur y sureste) que tiene menor temperatura y

salinidad, carece de estratificación y posee concentraciones relativamente altas de nitrato, siendo fuertemente influenciada por la intrusión de agua fría del sur [16,17]. Los datos oceanográficos también mostraron un frente térmico durante el verano ubicado cerca de 41° 50' S, que separa ambas áreas, es decir las aguas más cálidas y con mayor salinidad del sector norte de las más frías y de menor salinidad que ingresan de la región sur [15]. La temperatura de la superficie del mar varía en el orden de 1 - 3° C entre las dos zonas anteriormente mencionadas excepto en invierno cuando la diferencia entre zonas desaparece [15]. La marea es de régimen semi-diurno y alcanza una amplitud de 6 m en algunas zonas costeras y las corrientes asociadas son de 1 m/s [18].

La estacionalidad del frente térmico sería uno de los principales factores que condicionan la pesca en el golfo San Matías, siendo la mayor producción pesquera cuando (y donde) el frente térmico (noviembre a marzo) está presente [19].

Características del Golfo San José

El golfo San José se ubica a los 42° S y 64° O en la costa argentina de la provincia de Chubut, mide unos 43 km por 20 km, siendo de forma aproximadamente rectangular. Su profundidad media es de 30 m con una profundidad máxima de 85 m. Esta área es definida como una plataforma de erosión formada principalmente por toba (cenizas volcánicas cementadas con alto contenido de carbonatos). Dicha plataforma permanece sumergida casi por completo durante la marea alta, y tiene, en bajamar, sobre la cara este de la punta, unos 120 m de ancho por unos 350 m de largo. La pendiente de la plataforma es leve, de unos 3 grados en promedio [20]. El régimen de mareas del golfo San José es de tipo diurno con amplitudes que van desde los 4 a 7 m [21]. La temperatura promedio superficial del agua presenta un valor 13.5° C, variando entre la temperatura mínima anual promedio 9.8° C (en agosto o septiembre) y la máxima anual promedio de 16,5° C (en febrero). La salinidad del agua tiene un valor promedio de 33.82 ups con escasas variaciones (33.48 a 34.26 ups). Las lluvias constituyen el único aporte de agua dulce, siendo la precipitación anual media de 173 mm [22,23].

Características del Golfo Nuevo

Golfo Nuevo es un golfo semicerrado aproximadamente elíptico situado a 43° S y 65° O en la costa patagónica de Argentina en la provincia de Chubut, con una superficie de 2500 km², con la ciudad de Puerto Madryn en su costa occidental, en comunicación con el Océano

Atlántico sudoccidental a través de un estrecho de 17 km de ancho. Golfo Nuevo posee una profundidad de hasta 184 m [24], caracterizado por ser más profundo que la plataforma continental adyacente, con escaso intercambio con aguas de la plataforma y recibe escorrentía de agua dulce solo por precipitación (anual precipitación 200 – 300 mm). Hay fuertes mareas semidiurnas con una amplitud media de 3.93 m y un máximo de 5.76 m. La principal que afecta a la cuenca es semidiurna lunar [10] y representa casi el 90% de la energía de la marea total del golfo Nuevo. La transparencia del agua es alta y la concentración de oxígeno disuelto es siempre superior a condiciones saturadas, incluso en profundidad [25]. Durante la mayor parte del otoño y del invierno la columna de agua está completamente mezclada mientras que en verano existe una estratificación con la termoclina ubicada a 20 - 30 m de profundidad.

Características del Golfo San Jorge

El golfo San Jorge es una cuenca semiabierta ubicada entre 45° - 47° S y 65° E de la costa argentina, comparte las provincias de Chubut y Santa Cruz y cubre una superficie de 39340 km². Está definido por tres sectores con características fisicoquímicas particulares y mínimas variaciones estacionales: 1) el más grande y más profundo, comprende el área central del golfo y corresponde a un ambiente de depósito; 2) comprende las áreas próximas a los extremos del golfo y corresponde a un ambiente bajo o erosivo y 3) incluye la zona costera y la parte sureste del golfo y pertenece a un entorno de transición [26].

En su sector norte presenta profundidades que varían entre 80 y 95 m y las mayores profundidades (>110 m) se encuentran en la región central [27]. Las aguas del golfo son parte de la plataforma continental modificadas por la contribución de las aguas costeras variando su salinidad espacial y temporalmente entre 33.0 y 33.6 ups. Las aguas costeras de baja salinidad fluyen desde el Estrecho de Magallanes cerca de la costa de la provincia de Santa Cruz donde bifurcan su flujo en dos ramas principales: una entra al golfo en el extremo sureste y tiene una notable influencia en la región durante todo el año; la otra se aleja de la costa en dirección norte/norte-este [28]. En los extremos menos profundos del golfo, la mezcla vertical afectada por vientos y mareas, genera sistemas frontales de desarrollo estacional que permanecen principalmente durante primavera y otoño [26]. Las aguas costeras procedentes del Estrecho de Magallanes que ingresan al golfo San Jorge generan un intenso frente termohalino en su extremo sur [13]. Es decir, el golfo San Jorge, presenta un ciclo estacional de temperaturas del agua, una producción diferenciada de fitoplancton y variaciones estacionales en las variables químicas y en el origen de sedimentos de la materia orgánica [29].

7. 2 Características físicas del Canal Beagle

El Canal Beagle conecta el extremo sur de los océanos Atlántico y Pacífico, y está situado en el extremo austral de Sud América entre la costa Sur de la isla Grande de la Tierra del Fuego y la costa Norte de las islas Hoste y Navarino, pertenecientes al archipiélago fueguino (54° S y 66° - 70° O) recorriendo en dirección E - O con una longitud aproximada de 240 km, y un ancho promedio de 4 km [30]. Se encuentra a una distancia de 1.500 km del extremo norte de la Península Antártica y es la región más próxima al Continente Antártico, formando parte de la región Sub-Antártica [31].

El canal es un valle tectónico que fue completamente cubierto por el hielo glaciar durante la última glaciación. Posteriormente, el canal fue ocupado por un lago glaciar desde los 12 mil a los 8 mil años A.P. y luego fue invadido por el mar que alcanzó un nivel máximo entre los 6 mil y 5 mil años A.P. [32–34]. El Canal Beagle cubre las costas tanto de la República Argentina (Isla Grande de Tierra del Fuego) como de Chile (XII Región), países a los que a su vez sirve de límite. Es una zona de gran importancia biológica ya que en ella confluyen masas de agua de tres orígenes distintos: atlánticas, pacíficas y antárticas.

Las dos ondas de marea que penetran diariamente el Canal Beagle provienen del Atlántico Sur y del Pacífico Sur, siendo ésta última la onda principal que se mueve hacia el este, hasta neutralizar la velocidad de propagación en cercanías de la Isla Martillo, al este de la Isla Gable [35]. Las mareas del Canal Beagle son semidiurnas y desiguales, siendo la amplitud media de 1.1 m, con amplitudes máximas de 2.18 m y mínimas de 0.67 m [32]. Las corrientes de mareas medidas confirman valores máximos de 0.15 m/s [30].

El Canal Beagle presenta un comportamiento estuarino [32] debido a la estratificación de sus aguas, con una zona de mezcla de aguas a los 12 m de profundidad en las proximidades de la Isla Gable. Presenta valores de salinidad bajos que fluctúan entre 25 ups (en verano) y no superan las 34 ups, debido al gran aporte de aguas continentales producto del alto índice de precipitaciones y deshielo [30] con la salinidad promedio anual de 29.4 ups [36]. La temperatura del agua de mar del Canal Beagle presenta una estacionalidad bien definida. Las temperaturas máximas se encuentran entre diciembre y marzo, mientras que las mínimas se alcanzan durante los meses de junio a septiembre [24,31,32,33], siendo en agosto de 4° C y en marzo de 9° C, con una temperatura promedio del agua del Canal de 6.5° C [33,34].

A lo largo del canal se identifican grandes diferencias de profundidad cuyo fondo está conformado principalmente por arena fina. Las profundidades máximas alcanzan los 300 m y

las profundidades medias en el tramo que llega hasta la altura de la isla Gable, en el paso Mackinlay es de aproximadamente 50 m. Los vientos predominantes son del sudoeste, con una frecuencia anual de 23,6% y velocidad media de 31 km/h [41]. La velocidad máxima del viento coincide con la época de deshielo, entre septiembre y diciembre, favoreciendo la mezcla de agua.

7.3 Caracterización del Pejerrey

- **Taxonomía**

Los pejerreyes son peces teleósteos pertenecientes al orden Atheriniformes, que comprende 6 familias y 49 géneros [42]. Aunque el número de familias Atheriniformes y su composición han sido relativamente variables en el tiempo [43], la monofilia de Atheriniformes está respaldada por análisis moleculares de genomas mitocondriales para un pequeño número de taxones [42], por análisis de datos de citocromo b y RAG-1 para 47 taxones [44], por diez sinapomorfías morfológicas [45] y una inferencia filogenética calibrada en el tiempo [46] (Figura 2). Filogenéticamente, las dos especies estudiadas en ésta tesis pertenecen al género *Odontesthes* y a la subfamilia de Atherinopsidae: Atherinopsinae [43,45].

- **Distribución**

El género *Odontesthes* es el más diverso y con la mayor distribución en las cuencas costeras marinas y de agua dulce en el sur de América [47,48]. *Odontesthes* incluye 20 especies nominales [49] que habitan en América del Sur en ambientes marinos, de estuarios y de agua dulce. Las especies marinas se distribuyen desde el extremo austral del continente americano (Tierra del Fuego) hasta Piura, Perú, en el Pacífico y Santos, Brasil, en el Atlántico. Varias coexisten en los mismos hábitats y tienen una morfología muy similar [50].

A lo largo de la Patagonia argentina existen al menos cuatro especies de pejerreyes (*Odontesthes argentinensis*, *O. nigricans*, *O. smitti* y *O. incisa*) que presentan distribuciones diferentes, pero con algún grado de solapamiento (Figura 3). En este trabajo estudiaremos dos de ellas: *O. nigricans* y *O. smitti*.

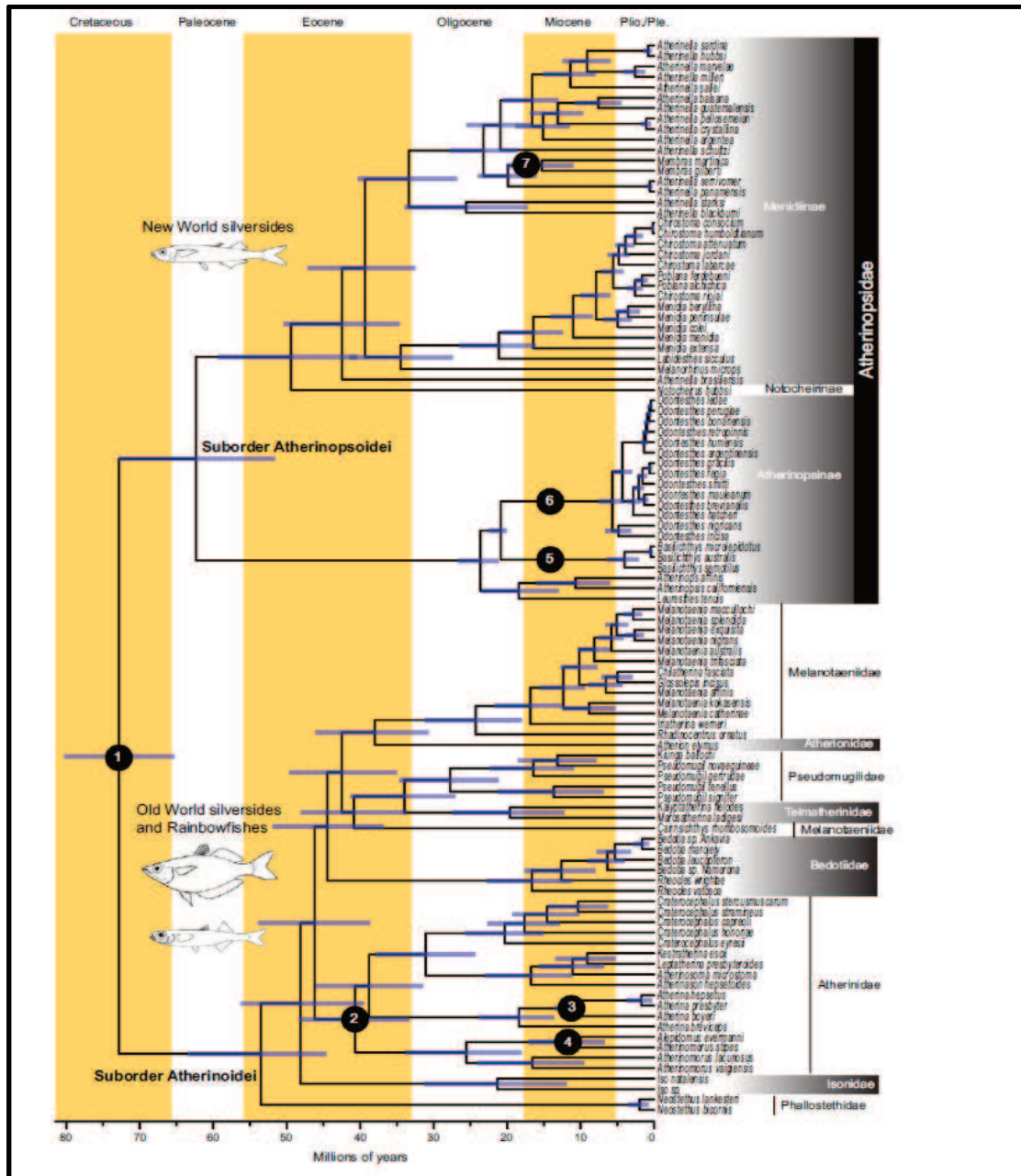


Figura 2. Filogenia calibrada en el tiempo. Los números dentro de círculos negros indican la ubicación de las 7 calibraciones utilizadas. Las barras representan el 95% más alto. (Figura modificada de Campanella y col., 2015).

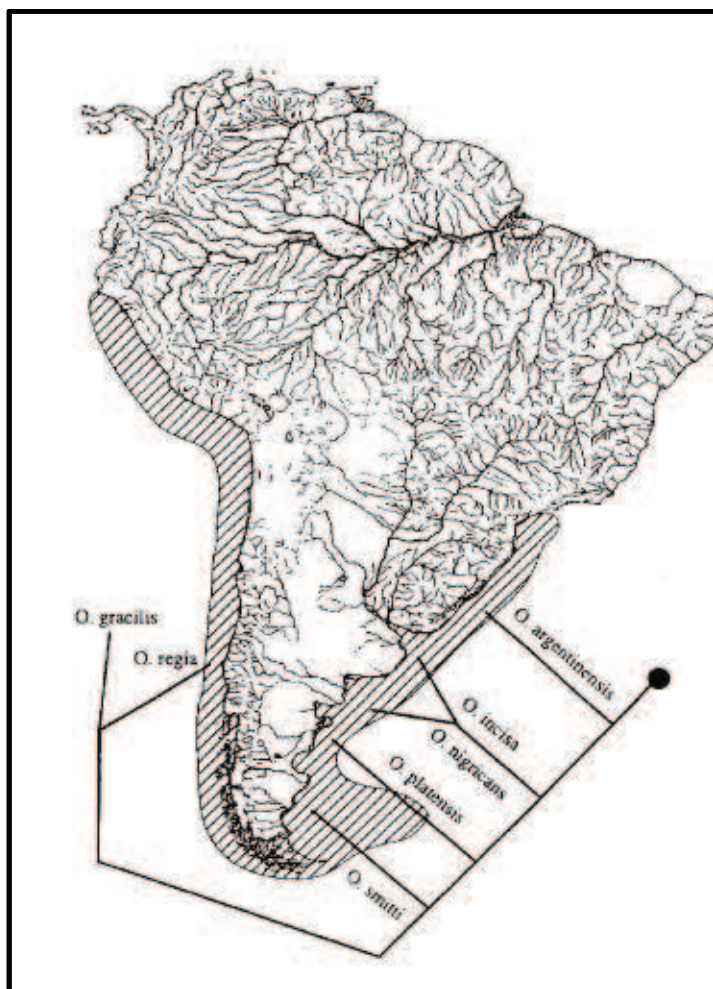


Figura 3. Distribución de las distintas especies marinas del género *Odontesthes* en América del Sur (Figura modificada de Dyer, 2006).

Odontesthes smitti [51], "manila", "corno" o "cola o aleta amarilla" se encuentra desde Uruguay (34 ° S) hasta Tierra del Fuego (54 ° S) y las Islas Malvinas [47] a lo largo del Océano Atlántico, y en el Océano Pacífico desde Tierra del Fuego hasta Seno Última Esperanza (52 ° S) [52], pasando por el Estrecho de Magallanes.

Odontesthes nigricans [53] o "pejerrey plateado" habita la costa del Océano Atlántico desde Orense (39 ° S, provincia de Buenos Aires) hasta el sur de Cabo de Hornos (56 ° S, Cabo de Hornos) pero no está en el Océano Pacífico [52]. Por lo tanto, *Odontesthes nigricans* y *O. smitti* son simpátricos en gran parte de sus distribuciones.

- **Características morfológicas**

Odontesthes es un género en el que las diferentes especies son muy similares fenotípicamente, inclusive las de agua dulce y las marinas.

En cuanto a los caracteres externos distintivos, las dos especies que estudiaremos poseen un cuerpo fusiforme con escamas pequeñas y una banda lateral de color plateado, una cabeza relativamente pequeña, de la cual el hocico ocupa más de la cuarta parte. La boca también es relativamente pequeña, no alcanza la altura de los ojos, los cuales son de tamaño moderado; y dientes diminutos, iguales en ambas mandíbulas. Presentan dos aletas dorsales y la aleta caudal es bifurcada. Una de las diferencias principales entre las dos especies, se basa en la ubicación de las aletas. En *O. smitti*, la primera aleta dorsal se inicia por detrás de la aleta pélvica y la segunda aleta dorsal comienza bastante más atrás que la anal. La coloración es azul celeste verdoso en su dorso y plateada brillante en la zona ventral. Las aletas suelen ser de color amarillo con un borde oscuro [47] (Figura 4). En *O. nigricans*, la primera aleta dorsal y la aleta pélvica se encuentran a la misma altura. Y las inserciones de la segunda aleta dorsal y la aleta anal comienzan casi a la misma altura, a diferencia en *O. smitti* [54] (Figura 4).

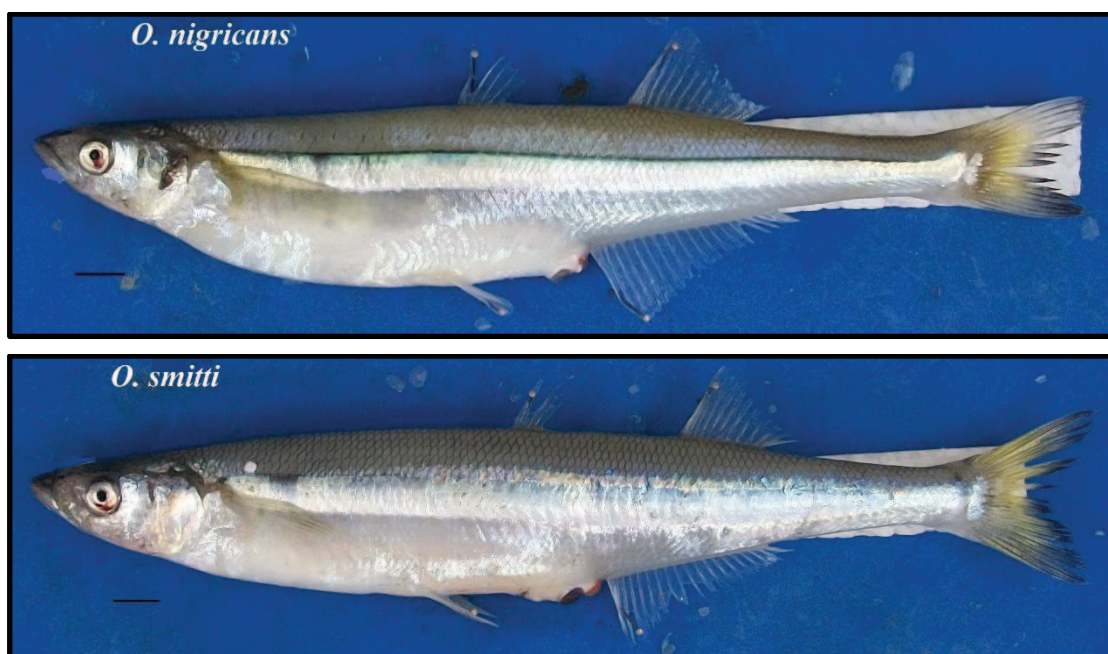


Figura 4. Ejemplares de *O. nigricans* (arriba) y *O. Smitti* (abajo). Escala: 1 cm.

O. smitti puede alcanzar un tamaño máximo de 500 mm de LT en hembras y los machos son más pequeños en tamaño completo [47,54,55]. Las longitudes máximas de *O. nigricans* alcanzadas en Bahía Varela y Punta María fueron de 289 y 240 mm de LT,

respectivamente [56] y en golfo Nuevo, Patagonia norte, se publicaron datos LT de 236 mm [57].

- **Alimentación**

Odontesthes smitti y *O. nigricans* poseen una dieta variada. En el golfo norpatagónico, la dieta de *O. nigricans* y *O. smitti* está conformada por organismos planctónicos y bentónicos, respectivamente [58]. Y en Tierra del Fuego, tanto en la costa Atlántica como en el Canal Beagle *O. nigricans* es categorizado como un depredador de invertebrados, siendo los organismos bentónicos los componentes más importantes de su dieta [56]. Precisamente en el Canal Beagle, *O. nigricans* tiene una dieta más diversa comparada a los ejemplares *O. nigricans* en la costa Atlántica (Pta. María) [56].

En ambas especies hay plasticidad trófica con respecto a los recursos disponibles y García (1994) expuso lo mismo para *O. smitti* en Mar del Plata [59].

7.4 Historia geológica y clima de la región marina patagónica

La región más austral de Sudamérica, es la única masa de tierra continental en el mundo (excepto la Antártida) que se extiende más al sur de los 40°S. La Patagonia argentina se extiende hacia el sur del Río Colorado, con una longitud total de casi 2500 km, entre 37° y 56° S, en el lado este de la Cordillera Andina, incluida la Isla Grande de Tierra del Fuego [60].

El clima en Patagonia sufrió variaciones significativas durante el Cenozoico, particularmente desde el Mioceno. Las glaciaciones fueron frecuentes en esta región durante el Plioceno y el Pleistoceno. Los eventos de glaciación permitieron la formación de una placa de hielo continua; de aproximadamente 2500 km; entre 36 y 56°S, que cubrió completamente los andes patagónicos y se extendió hacia el este, incluyendo Isla Grande de Tierra del Fuego hasta la actual plataforma submarina al sur de Río Gallegos y hasta el nivel del mar en el lado pacífico.

En el Hemisferio Sur, fuera de la Antártida, la glaciación más antigua reconocida tuvo lugar entre ca. 7 y 5 Ma (Mioceno final- Plioceno inicial). En el Plioceno medio-tardío (Estadios Isotópicos de Oxígeno-EIO 54-82) acontecieron un mínimo de ocho glaciaciones. La “Gran Glaciación Patagónica” (GGP) se desarrolló entre 1.68 y 1.016 Ma (EIO 30-34; Pleistoceno temprano). Luego de ella, hubo 14-16 épocas geoclimáticas frías, glaciales/estadales, intercaladas con sus correspondientes equivalentes cálidos,

interglaciales/interestadiales. La Última Gran Glaciación (UGG) alcanzó su máximo (Último Máximo Glacial, UMG) hacia 25000 y finalizó hacia 16000 años-calendario atrás (EIO 2; Pleistoceno tardío). Posteriormente, tuvieron lugar dos nuevos reavances glaciares (o fases estacionarias) durante el Tardiglacial (15000-10000 años ¹⁴C A.P.) [61].

Precisamente, el Canal Beagle durante la última glaciación fue totalmente cubierto por el hielo glacial. Consecutivamente, desde los 12000 a los 8000 años A.P. fue ocupado por un lago glacial e invadido por el mar, alcanzando el máximo nivel entre los 6000 y 5000 años A.P [33].

7.5 Importancia del trabajo y objetivos

O. nigricans y *O. smitti* son especies autóctonas de la costa marina argentina y *O. nigricans* además del Canal Beagle, importantes como recursos de pesquerías artesanales y de gran importancia ecológica. La amplia distribución geográfica de estas dos especies de *Odontesthes* nos da la posibilidad de estudiar fenómenos de diferenciación poblacional en respuesta a la variación ambiental teniendo en cuenta además que la región austral de sus distribuciones fue especialmente afectada por glaciaciones. Las características morfométricas y de historia de vida de las poblaciones se encuentran íntimamente ligadas al concepto de stock fenotípico o ambiental, siendo útiles para el manejo de las especies.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Evaluar cómo han respondido las poblaciones de peces a la variación ambiental asociada a un extenso gradiente latitudinal (16°) en el que se distribuyen estas especies, tanto en términos de su estructura genético-poblacional como en cuanto a la variación fenotípica (forma del cuerpo y características básicas de la musculatura natatoria) estudiando los pejerreyes *O. nigricans* y *O. smitti*

8.2 Objetivos específicos

1. Determinar la variabilidad genética y la estructuración geográfica de *O. nigricans* y *O. smitti* en un amplio gradiente latitudinal.
2. Estudiar las diferencias en la morfología del cuerpo entre especies y entre sitios.
3. Comparar las características principales de la musculatura natatorias de *O. nigricans* y *O. smitti*: tamaño de las fibras musculares.

Hipótesis

1. Las poblaciones con distribución continua pueden mostrar cierto grado de estructuración genética si procesos actuales o históricos limitaron el flujo génico o si las mismas se encuentran bajo diferentes regímenes de selección natural. En el caso de estas dos especies de pejerreyes la existencia de estructuración genética poblacional podría inferirse a partir de algunas diferencias biológicas ya conocidas en distintos sitios de su amplia distribución, que incluso incluye algunas potenciales barreras geográficas importantes como el Estrecho de Magallanes y el Canal Beagle.

2. La potencial diferenciación genética poblacional de los ejemplares de la costa atlántica y el Canal Beagle estaría acompañada por diferencias en la morfología general del cuerpo y en la musculatura de *O. nigricans*.

Capítulo I:

Genética de Poblaciones

9. CAPÍTULO 1: GENÉTICA DE POBLACIONES

9.1 Introducción

La estructura genética poblacional de una especie es la consecuencia de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes [62], a partir de procesos tales como flujo génico, selección, mutación y deriva genética [63]. La variación genética se expresa en un conjunto de secuencias de un *locus* (alelos) que difieren entre sí. Esta variación puede forjar cambios funcionales en la bioquímica o la morfología de los individuos, y además impactar en su tasa de reproducción, supervivencia, conducta, etc.; por consiguiente, la variación genética es esencial para explicar la evolución [64].

Las poblaciones de casi todas las especies, exhiben cierto grado de diferenciación genética en relación a su distribución geográfica [65]. En *loci* neutrales, la estructura genética depende principalmente de los niveles y patrones de flujo génico entre subpoblaciones; mientras que, la divergencia adaptativa depende del balance entre el flujo génico y la variación geográfica en la intensidad y modos de selección [66]. En general hay una relación inversamente proporcional entre la movilidad de la especie considerada y la estructura genético-poblacional de la misma [67]. En peces, por ejemplo, las especies de agua dulce suelen presentar poblaciones genéticamente más estructuradas que las marinas, aunque estas últimas sean evaluadas en escalas geográficas más amplias [65,68]. Diferentes ecotipos de peces han experimentado rápidas divergencias genéticas en distintos ambientes, llegando incluso a una especiación incipiente [3].

La estructura genética en organismos marinos, puede depender de factores ecológicos, geográficos, conductuales, genéticos y oceanográficos, que determinan de qué forma y en qué medida, gametos, cigotos, larvas, y/o adultos se dispersan, se asientan en una nueva población y se reproducen [69], pudiendo producir aislamiento entre las subpoblaciones y contribuir a la diferenciación genética entre las mismas.

Teniendo en cuenta que la cantidad de diferenciación genética dentro de una especie o población, representa un balance entre las fuerzas evolutivas [70]; la diversidad genética es dada por las mutaciones, modificada por el efecto de la selección natural (eficacia biológica), la deriva génica (estocasticidad genética y demográfica) y la migración. El balance entre la selección y la deriva génica depende del tamaño poblacional y de la intensidad de la selección. Cuando ambos factores están actuando, la selección predomina en las poblaciones grandes y la deriva en las poblaciones pequeñas. La diversidad genética dentro y entre poblaciones se puede

representar mediante el estadístico F . Este estadístico describe el comportamiento de las frecuencias génicas en una población y precisamente el índice F_{st} es la herramienta más usada para esta diferenciación genética entre subpoblaciones [71]. Si no hay subdivisión poblacional, F_{st} tenderá a cero (las frecuencias alélicas dentro de cada población son muy similares) y en caso contrario, para subpoblaciones que son muy distintas, (las frecuencias alélicas son muy diferentes) el F_{st} tenderá a 1.

En los últimos años, una de las aproximaciones preferidas para la estimación de niveles de flujo génico entre poblaciones es la Filogeografía. Esta disciplina estudia los “principios y procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes, especialmente a nivel intraespecífico o entre especies estrechamente emparentadas” [72]. Éste se puede utilizar para intentar comprender los distintos procesos involucrados en la evolución de las especies. Es decir, la filogeografía es la interpretación de la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado rastros evolutivos en la distribución geográfica actual de caracteres genéticos [72], utilizando información temporal (histórica) que ha sido posible obtener a partir del análisis de la información contenida en las moléculas de ADN. Por otra parte, permite determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación [63,72,73]. Analizar los patrones filogeográficos de especies co-distribuidas ayuda a hipotetizar potenciales eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar los orígenes geológicos, ecológicos o etológicas que pudieran haber influido en ellos [74], apoyándose de la información sobre comportamiento, caracteres morfométricos, caracteres de historia de vida, relaciones filogenéticas con especies cercanas, paleontología, geología, historia geográfica, etc.

Los marcadores moleculares mitocondriales son habitualmente utilizados para el análisis de la estructura poblacional y filogeografía de las especies, ya que presentan algunas ventajas respecto de los marcadores nucleares, aunque actualmente existen nuevas herramientas más eficaces para estudios filogeográficos, como ser los estudios genómicos por ejemplo RADseq. En particular, los marcadores moleculares mitocondriales existen en copias múltiples dentro de cada célula eucariota lo que facilita su extracción y posterior amplificación por PCR; poseen tasas de mutación varias veces mayores que las de los genes nucleares por lo que son muy informativos, en particular para el estudio de linajes genéticos que han divergido recientemente y se heredan de manera haploide sin recombinación (aunque hay excepciones), generalmente por vía materna, lo que permite generar filogenias intraespecíficas (filogenia de genes) que pueden ser interpretadas como el linaje materno del pedigree de un organismo. Las secuencias de ADN mitocondrial registran la historia por descendencia de línea materna de eventos mutacionales, los cuales pueden relacionarse en un filograma (red ó árbol de genes)

[72,73]. La Región Control se usó para análisis filogeográficos en escalas pequeñas de tiempo evolutivo (miles o cientos de miles de años), ya que, como se mencionó, tiene una tasa excepcionalmente alta de sustitución de nucleótidos y altos niveles de polimorfismo intraespecífico [75].

Las distancias geográficas y genéticas [76] entre las poblaciones se correlacionan [77,78], generando lo que se conoce como el principio de *aislamiento por distancia* [79]. Este principio expone que los individuos más cercanos geográficamente tienden a aparearse con mayor frecuencia en relación a aquellos que se encuentran más distantes y se cumple excepto que barreras de diferentes tipos interrumpen el flujo génico [80].

Los eventos climáticos pueden ser relacionados a cambios demográficos en el pasado, ya que, si las variaciones en el tamaño poblacional son grandes, estas dejan improntas genéticas en las poblaciones. En las zonas de altas latitudes, los principales procesos naturales que afectaron a la arquitectura de las poblaciones fueron las glaciaciones. Durante los periodos fríos se habría producido una retracción hacia menores latitudes de la biota en general que habría permanecido viable en diferentes refugios o poblaciones aisladas (favoreciendo la divergencia genética en condiciones alopátricas) a partir de las cuales se habría producido la recolonización hacia latitudes mayores durante los periodos cálidos [81].

A pesar, de que tanto *O. nigricans* como *O. smitti* son recursos de importancia económica por las pesquerías artesanales en la Patagonia y el Canal Beagle, se desconoce su estructura genética poblacional, conocimiento crucial para la conservación de los recursos y para identificar poblaciones discretas (stocks biológicos) lo que sería importante para un manejo informado de sus pesquerías

9.2 Objetivo

Determinar la variabilidad genética y la estructuración geográfica de *O. nigricans* y *O. smitti* en la costa Atlántica y el Canal Beagle (en el caso de la primera especie) mediante el análisis de secuencias de ADN mitocondrial. Teniendo en cuenta las características físicas extremas y los efectos de las glaciaciones en la zona austral de las costas Atlántica y del Canal Beagle, hipotetizamos que existiría una diferenciación genética en los sitios de la Patagonia sur.

9.3 Materiales y métodos

9.3.1 Obtención de muestras

Para la obtención de muestras de pejerreyes se realizaron campañas en distintos sitios de la costa Atlántica de Tierra del Fuego y en el Canal Beagle. Complementariamente se adquirieron ejemplares a partir de pescadores artesanales de las provincias costeras patagónicas atlánticas de Argentina (Río Negro, Chubut, Santa Cruz) con el propósito de abarcar casi todo el gradiente latitudinal en el que se distribuyen las especies. La especie *O. smitti* se capturó solamente en la costa Atlántica mientras que *O. nigricans* se capturó tanto en la costa Atlántica como en aguas del Canal Beagle (Figura 5, Tabla 1).

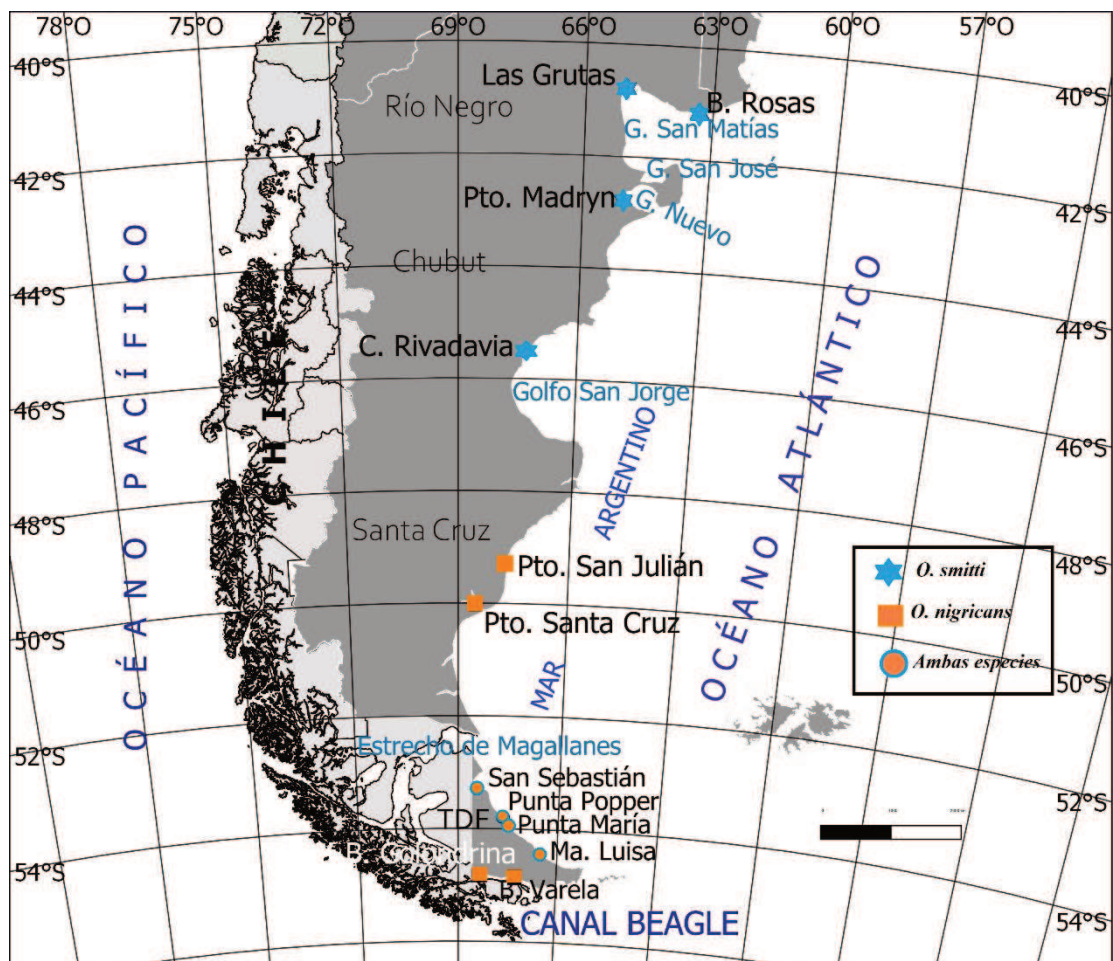


Figura 5. Sitios de muestreo de *O. nigricans* y *O. smitti* a lo largo del sur de la costa Atlántica y el Canal Beagle. ● Ambas especies ■ *O. nigricans* ★ *O. smitti*

Tabla 1. Sitios de muestreo y número de individuos analizados de cada especie. * Cabe destacar que BR es la bahía situada más alejada del Canal Beagle en la costa argentina que se estudió en esta tesis, aunque posee una latitud más alta que LG debido a la forma del golfo San Matías. CAC: costa Atlántica Continental, CAI: costa Atlántica Insular, CB: Canal Beagle, n: número de individuos analizados.

Área	Sitio	Coordenadas (Latitud-Longitud)	Especie (n)		Temporada (mes)
			<i>O. nigricans</i>	<i>O. smitti</i>	
CAC	B. Rosas (BR) *	41°11'S, 63°19'O		26	Otoño (May-Jun)
CAC	Las Grutas (LG)	40°48'S, 65°5'O		32	Otoño (May-Jun)
CAC	Puerto Madryn (M)	42°46'S, 65°1'O		45	Invierno (Jul)
CAC	Comodoro Rivadavia (CR)	45°46'S, 67°27'O		26	Invierno (Jul)
CAC	San Julián (SJ)	49°18'S, 67°43'O	15		Verano (Dic)
CAC	Puerto Santa Cruz (PSC)	50°1'S, 68°30' O	23		Primavera (Nov)
CAI	San Sebastián (SS)	53°17'S, 68°26'O	30	8	Verano (Nov-Mar)
CAI	Punta Popper (PP)	53°79'S, 67°67'O	21	29	Verano (Nov-Mar)
CAI	Punta María (PM)	53°94'S, 67°49'O	39	19	Verano (Nov-Mar)
CAI	Ma. Luisa (ML)	54°28'S, 66°28'O	36	35	Verano (Nov-Mar)
CB	B. Varela (BV)	54°52'S, 67°16'O	29	-	Verano (Nov-Mar)
CB	B. Golondrina (BG)	54°50'S, 68°21'O	31	-	Verano (Nov-Mar)

Los peces fueron colectados usando redes de enmalle agalleras, trasmallos y de arrastre costero. Las redes de enmalle (48 m long, 2.6 m alto y 38 mm tamaño de malla) y trasmallos (20 m long, 1.10 m alto y 230mm/50mm) se colocaron en marea creciente, en posición perpendicular a la costa en la zona intermareal, y fueron operadas por 6 horas durante la noche, pasando una marea antes de la recolección de los ejemplares (Figura 6). La red de arrastre costero (25 m long, 1.5 m alto y 3 mm de tamaño de malla estirada) se usó solamente en el Canal Beagle, cubriendo aproximadamente 100 m de la costa desde la zona menos profunda hasta alrededor de 1.5 m de profundidad (Figura 7). En Las Grutas y B. Rosas la pesca fue con caña y líneas de 3 anzuelos usándose de carnada langostino y camarón teñido con colorante amarillo.



Figura 6. Disposición de la red agallera en la playa de Punta María.



Figura 7. Pesca con la red de arrastre en Bahía Varela.

Los parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, pH y conductividad) fueron registrados en cada sitio de muestreo con un multiparámetro Hanna HI 9828.

Los peces así capturados fueron llevados al laboratorio. Allí, cada individuo fue medido con un calibre digital ($\pm 0.1\text{mm}$) para obtener las medidas de largo total (LT), largo estándar (LS) y largo de fork (LF) y además se pesó cada ejemplar para obtener el peso total (PT) ($\pm 0.01\text{g}$). Luego de ser fotografiado, a cada ejemplar se le extrajo una muestra de aproximadamente 1 gr de músculo rápido (también denominado *fast twitch* o blanco) tomado del flanco izquierdo. Los tejidos se colocaron en tubos plásticos de 2 ml con alcohol 99% y se conservaron en freezer a -20°C para posteriormente realizar la extracción de ADN. Para evitar contaminación cruzada entre las muestras o con otras fuentes ambientales, el instrumental de disección y los tubos plásticos utilizados fueron esterilizados previamente a la obtención de cada muestra.

9.3.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN total a partir de tejido muscular de cada individuo utilizando el protocolo modificado de Miller SA et al. 1988, en el cual se realiza una digestión con proteinasa K seguida de extracción con cloruro de sodio y precipitación con isopropanol. Luego la calidad del ADN extraído fue controlada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % con 1 μl de GelRed™ para la visualización eficiente de ácidos nucleicos en *buffer* TBE 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0), sembrando 5 μL del ADN total extraído diluido 1/10 para cada muestra con 1 μL de *buffer* de siembra, junto con el marcador de 100 pb de tamaño molecular (100 pb Ladder, Fermentas) a fin de estimar la concentración de ADN total obtenido en la extracción.

9.3.3 Amplificación por PCR y secuenciación

Se realizaron PCRs (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar la región de control mitocondrial de ambas especies (814 pb de *O. nigricanas* y 858 pb de *O. smitti*) de todos los sitios muestreadas (entre 15 y 39 individuos de cada sitio). Para ello se utilizaron los primers Forward: peje_rc3 F (5'-CCCTAACTCCCAAAGCTAGGA-3') y Reverse: peje_rc3R (5'-AGCCTTTGTGCTTACGGAAC-3). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 35 μl conteniendo los siguientes componentes: 17.5 μl del ADN extraído en una dilución 1/10 ($\sim 4 \mu\text{g/ml}$) como molde, 1 unidad de ADN Taq polimerasa (Promega), buffer

Taq polimerasa 5X, dNTPs (0.2 mM cada uno), primers (0.3 mM cada uno) y MgCl₂ (1 mM). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo un programa de 35 ciclos en un termo ciclador modelo 2720 de Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial del ADN a 95° C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 30 segundos de hibridación de los primers al ADN molde a 55° C y 1 minuto de extensión a 72°C, terminando con una elongación final de 7 minutos a 72° C (Tabla 2).

Tabla 2. Detalles del ciclo de las reacciones de PCR.

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	3:00
Desnaturalización	94	0:30
Asociación	55	0:30
Extensión	72	1:00
Extensión final	72	7:00

Los productos de PCR fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en *buffer* TBE 1X teñidos con Gel Red (GelRed Nucleic Acid Gel Stain- Biotium) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. En cada calle se sembraron 5 ul de producto de PCR de la amplificación del gen mitocondrial de la región de control de pejerrey, más 1ul de *buffer* de carga y en otra calle se sembró un marcador molecular de 100 pb (Fermentas) para corroborar el tamaño de fragmento obtenido. Al obtenerse bandas claras y únicas, las amplificaciones fueron enviadas con ambos *primers* para su secuenciación a Macrogen S.A. (Korea).

Los controles negativos de las PCRs incluyeron los reactivos necesarios para la amplificación, pero sin el agregado de ADN que actúa como molde (“template”).

9.3.4 Edición de secuencias

Posteriormente de recibir las secuencias de Macrogen S. A., los electroferogramas que resultaron de las secuenciaciones fueron visualizados y analizados con el software gratuito “BioEdit sequence alignment editor” [82] y alineados en el programa Clustal W que permite alinear secuencias múltiples. Las secuencias *forward* y *reverse* fueron alineadas para confirmar los resultados y resolver ambigüedades. Las secuencias resultaron de muy buena calidad,

permitiendo diferenciar a las dos especies de pejerreyes, obteniéndose secuencias de 814 pb para *O. nigricans* y 858 pb para *O. smitti* que fueron utilizadas para los análisis subsiguientes.

9.3.5 Análisis de datos

Para definir grupos de poblaciones geográficamente homogéneas y máximamente diferenciadas genéticamente de cada una, se aplicó el programa SAMOVA 1.0 (Análisis espacial de varianza molecular) [83]. Este programa intenta definir grupos de poblaciones de modo de potenciar la proporción de varianza genética debida a las diferencias entre los grupos, mediante un procedimiento de anidamiento simulado. De esta manera se identifica el número de grupos (K) que maximiza la diferenciación genética de forma geográficamente homogénea lo que permitiría, al mismo tiempo, identificar potenciales barreras geográficas entre dichos grupos.

Diversidad Genética

El software DNAsp v5.1 [84] se utilizó para calcular los índices de diversidad molecular de los haplotipos de la región de control incluyendo: número de haplotipos definidos (h o k), número de sitios polimórficos (informativos y no informativos), diversidad haplotípica (H_d) (expresada como la probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra) y diversidad nucleotídica (π) (expresa la probabilidad de encontrar sitios nucleotídicos diferentes entre secuencias de la misma población), los sitios variables e invariables y el número total de mutaciones. Todos estos parámetros fueron analizados para cada sitio de muestreo, para las distintas agrupaciones y/o áreas de muestreo (CAC, CAI, CB) y globalmente para todos los sitios estudiados de cada especie.

Estructura Genética

La estructura genética de cada especie se estimó mediante el software Arlequin v 3.5 [85] utilizando un análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas en inglés) coincidiendo los resultados con los de SAMOVA. Este método calcula los índices de diferenciación genética (F_{ST}) y el porcentaje de la variabilidad genética total que se puede atribuir a diferencias dentro de poblaciones o entre poblaciones de una especie. La diferenciación entre sitios fue inferida a través de las comparaciones de los F_{ST} pareados, (con

pruebas de significación basadas en 1,023 permutaciones), teniendo en cuenta las agrupaciones realizadas por el software SAMOVA. Los valores de F_{ST} se consideraron bajos (0 - 0.05), moderados (0.05 - 0.15), altos (0.15 - 0.25) y muy altos (> 0.25) [70].

La hipótesis de “Aislamiento por distancia” fue testeada con el test no paramétrico de Mantel [86] usando comparaciones pareadas de F_{ST} (obtenidas por el software Arlequin v3.5 como ya mencionáramos) y distancias geográficas (calculadas siguiendo la línea de costa en Google Earth). La significancia estadística de los valores de F_{ST} se estimó a partir de 10.000 permutaciones.

Historia demográfica y análisis filogenético

Para evaluar si las especies sufrieron cambios demográficos históricos se realizaron varios análisis que se detallan a continuación.

- *Red de Haplotipos*

Para evaluar las relaciones filogenéticas entre poblaciones se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con RAxML [87], con valores de soporte superiores al 50% (probabilidad a posteriori), el cual se usó como entrada para generar una red de haplotipos con el software Fitchi [88]. La configuración de Fitchi fue estándar, discriminando los sitios, usando el comando - p.

- *Tasa de mutación de la región de control del gen mitocondrial.*

Las estimaciones de las tasas de mutación específicas de ambas especies, se obtuvieron de calibraciones de relojes relajados lognormales no correlacionados utilizando Beast v1.8.2 [89] bajo los modelos más apropiado de evolución molecular resultante de JModeltest [90]. El archivo de entrada para Beast se armó en Beauti v1.8.2 [91] con las 5 secuencias de la región de control mitocondrial más cercanas en la filogenia de *O. nigricans* y *O. smitti*, teniendo en cuenta el trabajo de Campanella y col. 2015 [46]. El set de secuencias elegido de la base de datos GenBank, contenía cuatro secuencias representativas de *Odontesthes* (*O. nigricans* (n° acceso: MK989989), *O. smitti* (n° acceso: GQ352695) [92], *O. bonariensis* (n° acceso: GQ352699) [92], *O. reggia* (n° acceso: FJ380106) [93] y una secuencia de *Basilichthys* (*B. microlepidotus* (n° acceso: FJ380105) [94].

El parámetro utilizado en Beast como *tree prior* fue Birth-death Speciation con una tasa de crecimiento media inicial de 1 y una tasa de muerte relativa de 0.1. In *prior*, el ancestro común más reciente (tmcra) fue seteado en 5.68 Mya, Std. Dev. = 4.25 (Campanella et al. 2015) con una distribución normal. La corrida fue de 20 millones de iteraciones cada 1.000 pasos y la convergencia se analizó en Tracer v 1.5 [95]. El árbol de máxima credibilidad se calculó utilizando el software Tree Annotator v1.8.2 [96].

- *Test de Neutralidad*

Con el software Arlequín v 3.5 [97], se calcularon los valores de D de Tajima [98] y Fs de Fu [99], para poder detectar desviaciones de la neutralidad (desviaciones significativas del equilibrio entre mutación y deriva genética).

- *Distribución Mismatch*

Para determinar si las poblaciones exhibieron evidencia de expansión demográfica [100,101] la distribución de diferencias pareadas observada y esperada fueron calculadas bajo un modelo de crecimiento poblacional exponencial, usando el software DnaSP v 5.1 [84]. Las distribuciones unimodales indicarían una expansión poblacional demográfica reciente y distribuciones multimodales sugerirían poblaciones demográficamente estables [102].

- *Bayesian Skyline Plot*

Variaciones históricas del tamaño de la población de ambas especies fueron estimadas usando el método coalescente “Bayesian Skyline Plot” (BSP) implementado en el programa Beast v1.8.2 [89]. Este análisis permite estimar dinámicas poblacionales pasadas a través del tiempo sin depender de un modelo paramétrico preespecificado de la historia demográfica. Los análisis fueron realizados bajo un modelo de reloj molecular lognormal relajado no correlacionado, con la tasa de mutación obtenida previamente para cada especie, usando el mejor modelo para cada especie (nominado por JModeltest 3.5 [103] y un modelo Bayesiano constante con 5 grupos. La convergencia se inspeccionó a través de Tracer v1.5 [96]. Estos análisis (Test de Neutralidad, Mismatch y Bayesian Skyline plot) también fueron realizados para cada sitio de muestreo, globalmente para cada grupo y para cada especie.

9.4 Resultados

O. nigricans

Diversidad Genética y Estructura Genética

Se analizaron 224 secuencias de 814 pb de longitud de la región de control de *O. nigricans* (subidas a Gen Bank, n° acceso MK989766) [104] de los diferentes lugares de la costa patagónica y del Canal Beagle, de las cuales 186 fueron de Tierra del Fuego (CB y CAI) y 38 de la CAC. Como era de esperarse en marcadores mitocondriales con alto nivel de poliformismo, estos fragmentos mostraron gran diversidad, con 68 haplotipos distintos definidos por 749 sitios monomórficos (invariables), 44 sitios polimórficos (variables) y 28 de ellos informativos. Los haplotipos más frecuentes se encontraron en varias poblaciones a lo largo del rango geográfico muestreado. La diversidad haplotípica global fue de 0.943 (con un rango de 0.557 en BG a 0.963 en SS), y la diversidad nucleotídica global fue de 0.0038 (con un rango de 0.0012 en BG a 0.042 en PSC) (Tabla 3).

La exploración de la estructura genética geográfica utilizando SAMOVA dio resultados diferentes dependiendo del valor de K. Con $K = 2$, se observó que las poblaciones del CB y de la CA conformaban dos grupos altamente diferenciados con un 39.83% de variación entre los grupos y solo un 1.14% entre las poblaciones dentro de los grupos. Con $K = 3$, se diferenció a SJ (1° grupo), separada del resto de las poblaciones de la CA (2° grupo) y por último a las poblaciones del CB (3° grupo), con 34.82 % de variación entre grupos y 1.38% entre las poblaciones dentro de los grupos. Por lo tanto, considerando que la variación entre grupos era mayor con $K= 2$ restringimos el análisis subsiguiente a estos dos grupos: CA y CB (Tabla 4).

Los índices de diversidad genética también variaron entre CA y el CB: siendo la diversidad haplotípica y nucleotídica menores en los sitios del CB ($Hd_{CB} = 0.635$, $\pi_{CB} = 0.0013$) que en los sitios de CA ($Hd_{CA} = 0.950$, $\pi_{CA} = 0.0035$) (Tabla 3).

Tabla 3. Variación genética en cada sitio de la región de control de ADN mitocondrial de *O. nigricans* a lo largo de la costa patagónica y el Canal Beagle.

n: tamaño de muestras, h: número de haplotipos, Sp: número de sitios polimórficos, Spi: Sitios parsimoniosamente informativos, Hd: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica. CAC= costa Atlántica Continental; CAI = costa Atlántica Insular; CA = costa Atlántica; CB = Canal Beagle.

		Área	Sitio	n	h	Sp	Spi	Hd	π
costa Atlántica (CA)	CAC	CAC	San Julián (SJ)	15	11	16	6	0.933	0.0034
		CAC	Puerto Santa Cruz (PSC)	23	15	21	9	0.941	0.0042
	Tierra del Fuego (CAI)	CAI	San Sebastián (SS)	30	20	20	12	0.963	0.0036
			Punta Popper (PP)	21	17	16	9	0.967	0.0038
			Punta María (PM)	39	23	21	10	0.947	0.003
Ma. Luisa (ML)			36	20	14	13	0.954	0.0034	
	Global CA	CAC + IAC	163	64	44	27	0.950	0.0035	
Canal Beagle (CB)	Tierra del Fuego (CAI)	CB	Bahía Varela (BV)	29	6	7	2	0.69	0.0014
		CB	Bahía Golondrina (BG)	31	5	4	4	0.557	0.0012
	Global CB	BV + BG	60	8	9	5	0.635	0.0013	
		Total	Todas los sitios (CAC+CAI+CB)	224	68	44	27	0.943	0.0038

Entonces, el análisis de SAMOVA considerando dos grupos, CA y CB, mostró diferencias significativas, entre grupos, dentro de las poblaciones y entre poblaciones dentro de los grupos. La mayor variabilidad fue dentro de las poblaciones (FCT = 59.03%) y entre grupos (FST = 39.83%), pero casi nada fue explicado por la variabilidad entre las poblaciones dentro de los grupos (FSC = 1,14%). Es decir que, por ejemplo, al comparar poblaciones de la CA, no se observaron diferencias significativas entre CAC y CAI (Tabla 5).

Los valores pareados de F_{ST} fluctuaron entre 0.000 a 0.535. Los F_{ST} más altos se observaron al comparar poblaciones entre el CB y CA (F_{ST} pareados= 0.397 - 0.535) siendo significativos todos estos valores de F_{ST} pareados (cuadrados rellenos, Figura 8) y también fueron significativos los F_{ST} involucrando a la población de PSC con SS y PM (círculos rellenos, Figura 8); ambos resultados en concordancia con los resultados del SAMOVA (Tabla 4). Los valores F_{ST} pareados dentro de cada grupo, CA o CB, fueron bajos (F_{ST} pareados = 0 -

0.085), (círculos rellenos y vacíos en Figura 8) y muchos de ellos fueron no significativos (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados SAMOVA para las diferentes agrupaciones de *O. nigricans* basados en la región control de ADN mitocondrial. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

	<i>O. nigricans</i>	
	K = 2	K = 3
Valor de agrupaciones		
Poblaciones/ Índices de Variación	CA vs CB	SJ vs CA vs CB
Entre grupos (FST)	39.83%, *	34.82 %, **
Dentro de poblaciones (FCT)	59.03%, ***	63.80 %, ***
Entre poblaciones dentro de grupos (FSC)	1.14%, **	1.38 %, **

Tabla 5. Matriz de F_{ST} pareados (considerando como distancia entre haplotipos el número de diferencias) en base a las secuencias de la región de control del gen mitocondrial de *O. nigricans* en diferentes sitios con sus respectivas significancias. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

	SJ	PSC	SS	PP	PM	ML	BV
SJ	0.000						
PSC	-0.009	0.000					
SS	-0.004	0.023 ***					
PP	0.002	0.02	-0.011	0.000			
PM	0.001	0.044***	-0.002	0.015	0.000		
ML	0.000	0.025	-0.008	-0.012	0.01	0.000	
BV	0.467***	0.416***	0.421***	0.474***	0.397***	0.432***	0.000
BG	0.530 ***	0.469***	0.481***	0.535***	0.445***	0.485***	0.085***

La correlación entre distancias geográficas (km) y genéticas (F_{ST}), incluyendo todas las poblaciones, mostró dos claros agrupamientos de F_{ST} : uno cuando las comparaciones incluyeron poblaciones de ambos grupos (CA y CB), y un segundo agrupamiento cuando las comparaciones incluyeron poblaciones de solo un grupo (CA o CB) (Figura 8). Cuando se realizó el Test de Mantel en la CA, se observó un valor no significativo ($r = 0.324$, $p = 0.264$), por lo que no existiría aislamiento por distancia en la CA. En el CB no se realizó Test de Mantel porque abarca solo dos sitios.

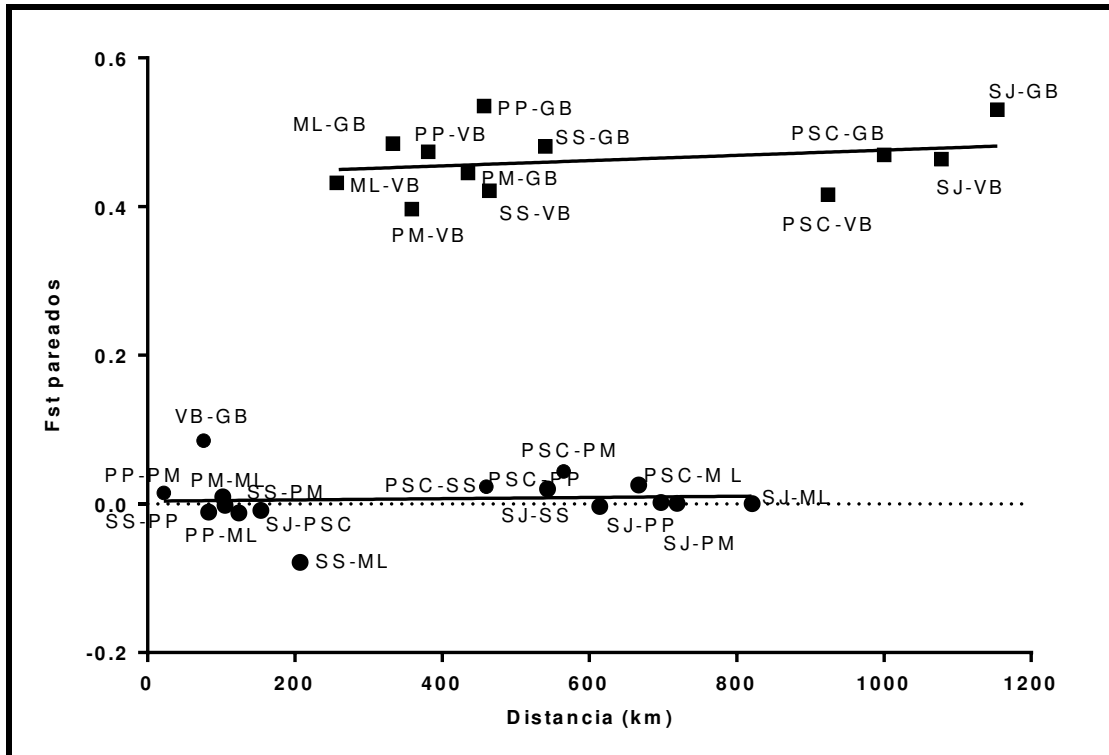


Figura 8. Representación gráfica de la correlación entre distancia geográfica y F_{ST} pareados dentro de grupos y entre grupos de *O. nigricans*. Los grupos son: CA (SJ, PSC, SS, PP, PM, ML) y CB (BV y BG). Círculos y cuadrados indican valores las correlaciones de F_{ST} pareados - distancia dentro de grupos y entre grupos, respectivamente. Las figuras rellenas indican las comparaciones de F_{ST} significativamente distintas de cero ($p < 0.05$) y las figuras vacías representan F_{ST} que no son estadísticamente significativos.

Historia demográfica y análisis filogenético

- *Tasa de mutación*

La tasa de mutación obtenida para *O. nigricans* fue 0.009 mutaciones/sitio/ millones de años (Figura 9).

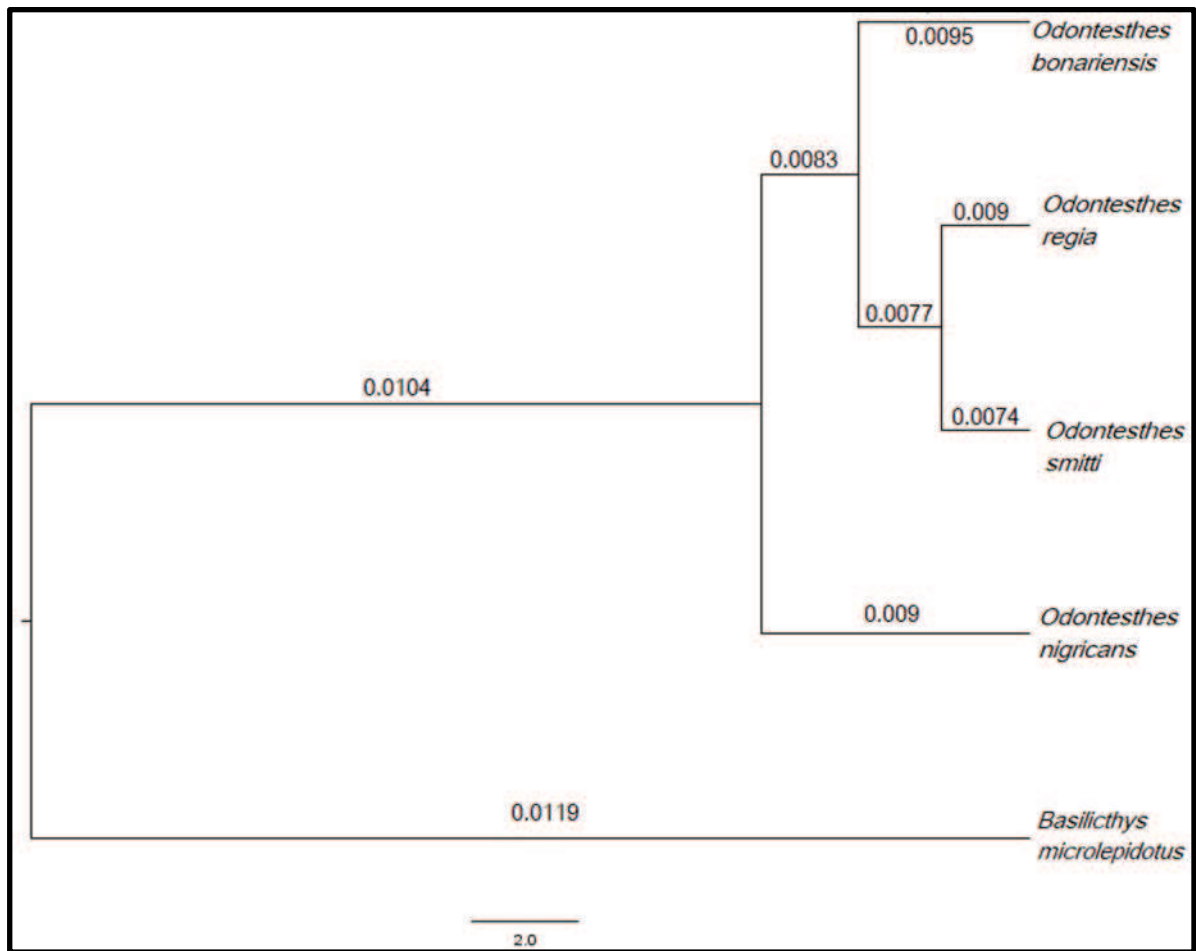


Figura 9. Estimación de la tasa de mutación para la región de control mitocondrial (en sustituciones por sitio por millón de años) usando Beast v. 1.8.2 y estableciendo el tiempo para el MRCA de *Odontesthes* en 5.68 Mya.

- *Árbol filogenético y Red de haplotipos*

El árbol filogenético Maximum-likelihood (Figura 11) y la red de haplotipos exhibieron una fuerte estructuración filogeográfica, diferenciando las poblaciones del CB y la CA (Figura 10: A y B), en concordancia con el análisis de SAMOVA y los F_{ST} . La red de haplotipos mostró relativamente pocos haplotipos compartidos, pero tres de ellos en frecuencias relativamente altas. Uno distribuido exclusivamente en ambos grupos de la CA (Hap 45, $n = 31 = 44.9\%$), otro perteneciente exclusivamente a las poblaciones del CB (Hap 58, $n = 34 = 49.3\%$) y el tercero, perteneciente mayormente al CB, pero también presente en dos sitios insulares de la CA (Hap 72, $n = 17 = 24.6\%$). Los haplotipos restantes están en baja frecuencia, con varios de ellos detectados en un solo individuo (Figura 10).

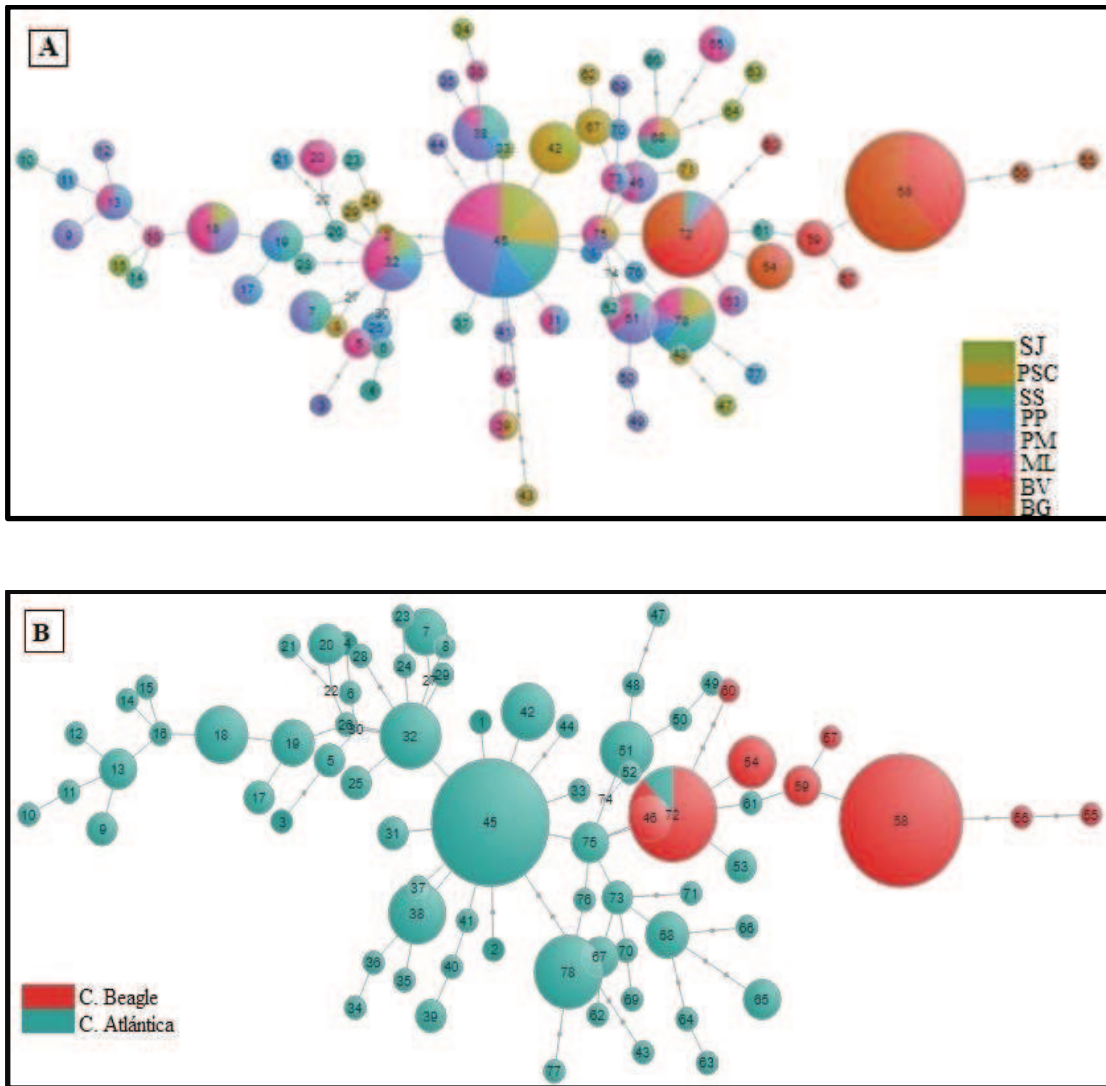
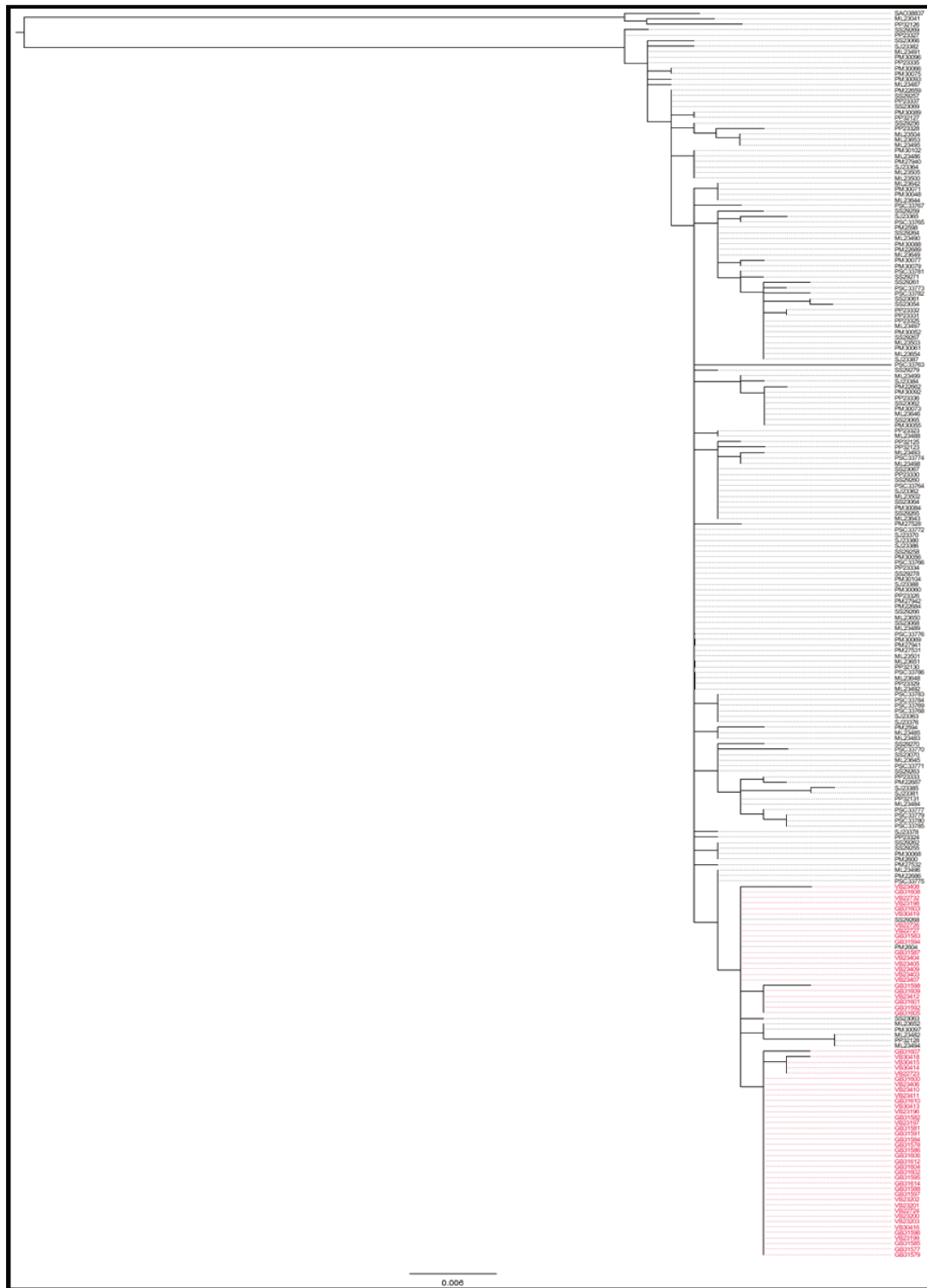


Figura 10: Red de haplotipos de *O. nigricans* A) representando todos los sitios de muestreo con un color diferente, B) representando las dos áreas CA (Turquesa) y CB (Rojo). El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Las mutaciones se muestran como puntos.



- *Test de Neutralidad*

Los valores de D de Tajima fueron negativos y estadísticamente significativos sólo en SJ, SS y PM. Todos los valores F_s de F_u fueron negativos y significativos (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de la prueba de neutralidad obtenidos en los 8 sitios analizadas de *O. nigricans*

Especie		Área	Sitio	D de Tajima	Fu's Fu
<i>O. nigricans</i>		CAC	SJ	-1.638*	-15.8***
			PSC	-1.465	-25.921***
	Tierra del Fuego	CAI	SS	-1.5 *	-26.194***
			PP	-1.132	-26.083***
			PM	-1.699*	-26.107***
			ML	-0.622	-26.468***
			Global CA	CAC + CAI	-1.971**
		CB	BV	-1.151	-27.483***
			BG	-0.524	-28.424***
		Global CB	BV + BG	-1.240	-28.024***
		Total	CAC + CAI + CB	-1.798***	-25.859***

- *Distribución Mismatch*

El análisis de distribución de diferencias pareadas de poblaciones agrupadas en CA y CB fue unimodal, aunque en el CB las poblaciones mostraron una distribución en forma de L (Figura 12). La misma unimodalidad se observa si separamos a la CAC de CAI. De la misma forma, la distribución de las diferencias pareadas individuales (de cada población) fueron mayormente unimodales, excepto en SJ y SS que mostraron bimodalidad.

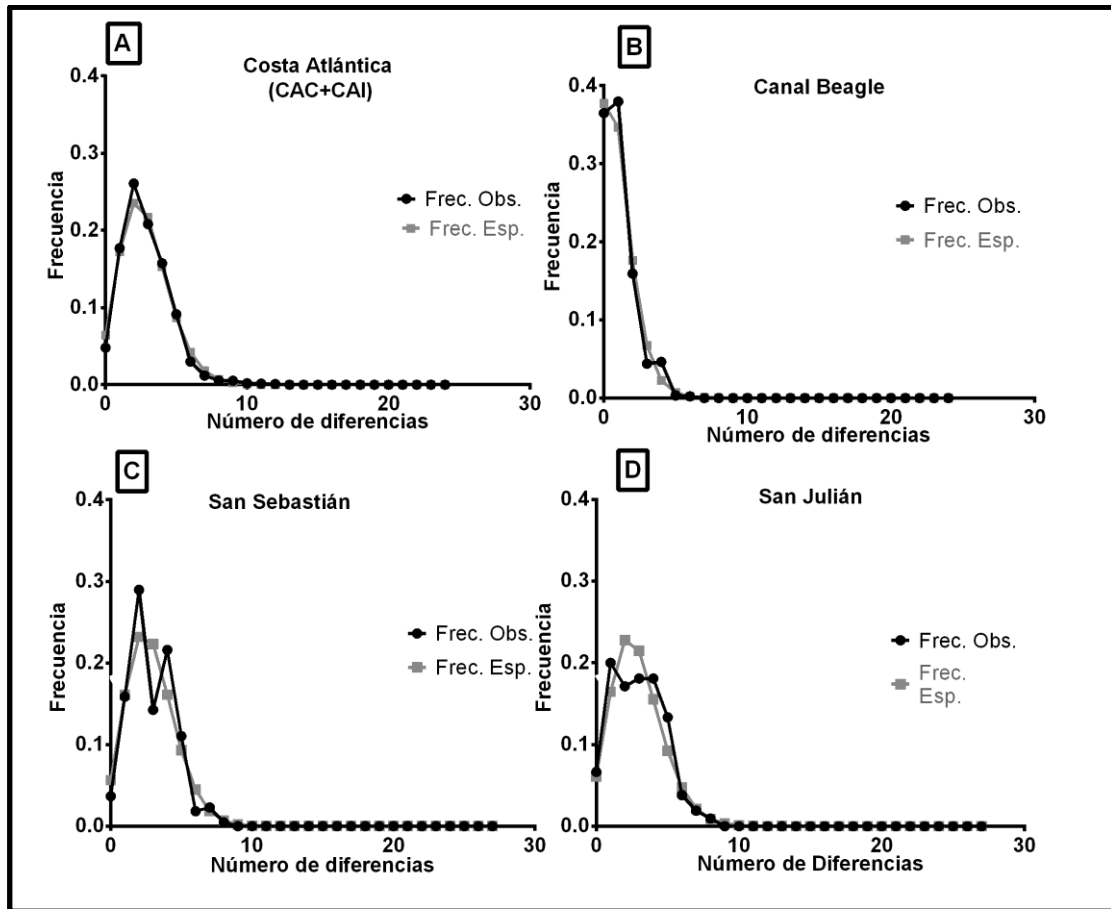


Figura 12. Distribuciones observada y esperada bajo un modelo de crecimiento exponencial para *O. nigricans* en: A) CA, B) CB, C) SS y D) SJ.

- *Bayesian skyline plot*

Para estimar las dinámicas poblacionales pasadas, se usó una tasa de mutación obtenida por nosotros de $u = 0.009$ mutaciones/ sitio/por millones de años. Según el análisis bayesiano se observó un tamaño de población bastante estable en ambos grupos. Es decir, no se pudo apreciar un signo de expansión ni en la CA ni en el CB (Figura 13) sin embargo, hay una ligera tendencia al crecimiento especialmente en CB.

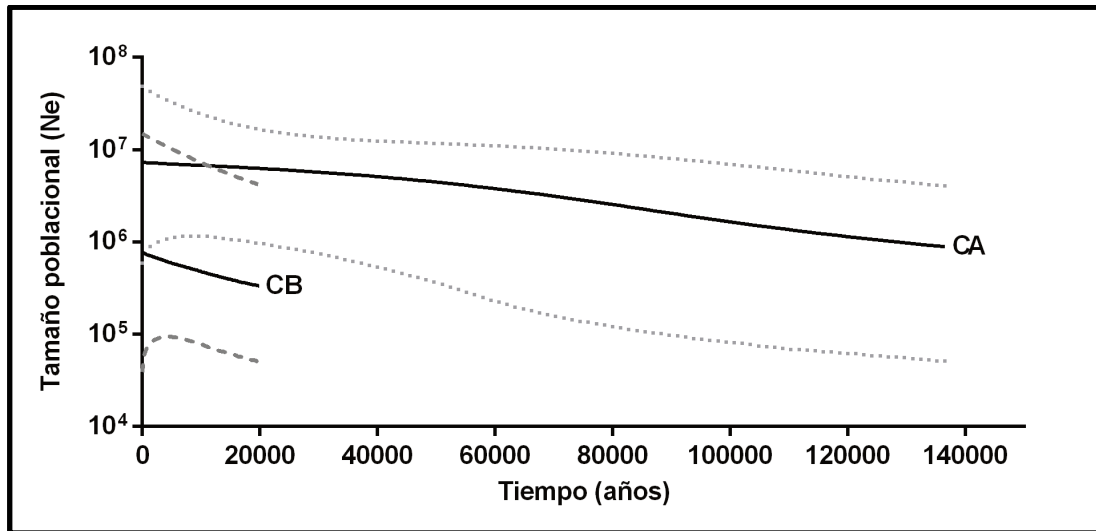


Figura 13. Estimación del tamaño poblacional histórico usando “Bayesian skyline plot” con los haplotipos de región de control mitocondrial de *O. nigricans* en la CA y en el CB. El eje X está en años antes del presente. El eje Y es el producto del tamaño efectivo de la población (N_e) y el tiempo generacional (t) en una escala logarítmica. Las estimaciones medias de las historias demográficas se muestran como líneas continuas negras y los intervalos de densidad de probabilidad más altos del 95% están representados por el área entre líneas negras (color gris).

O. smitti

Diversidad genética y Estructura Genética

En *O. smitti* se estudiaron 220 secuencias de 858 pb en 4 sitios de la CAI y en 4 sitios de la CAC, obteniéndose mayor diversidad haplotípica en esta especie que en *O. nigricans*. Se observaron 85 haplotipos, con 747 sitios monomórficos (invariables), 106 sitios polimórficos (variables) y 70 de ellos informativos (Tabla 7).

Se realizó el análisis de SAMOVA con $K = 2$ y con $K = 3$. Con $K = 2$ se diferenció a LG, BR y CR del resto, incluyendo a M con todos los sitios de TDF, con un 13.88% de variación entre los grupos y solo un 3.89% entre las poblaciones dentro de los grupos. Cuando se probó $K = 3$ se diferenció a un grupo formado por LG y BR (1° grupo), a CR como un grupo aparte (2° grupo) y como tercera agrupación a todos los sitios de TDF junto a M (3° grupo), con 15.94% de variación entre grupos y 1.63% entre las poblaciones dentro de los grupos (Tabla 8). Con ambos valores de K , todas las comparaciones fueron significativas (Tabla 8). Se distingue un patrón muy claro en el que la mayor parte de la variación explicada está dentro de las poblaciones (FCT mayor a 80%). Si bien entre grupos se observó una mayor estructuración

con $K = 3$ ($F_{ST} = 15.94\%$) que con $K = 2$ ($F_{ST} = 13.88\%$), ambos valores son mucho más bajos que los encontrados en *O. nigricans* y entre poblaciones dentro de grupos la variabilidad fue mínima ($F_{SC} = 3.89\%$ con $K = 2$; $F_{SC} = 1.63\%$ con $K = 3$) (Tabla 8). Por tanto, nuestros análisis subsiguientes se restringieron a $K = 3$ (1° grupo = BR - LG, 2° grupo = CR, 3° grupo = M - SS - PP - PM - ML), teniendo en cuenta los valores obtenidos del SAMOVA, de aquí en adelante para el resto de los análisis.

Tabla 7. Variación genética de la región de control de ADN mitocondrial de *O. smitti* de todos los sitios muestreados a lo largo de la costa patagónica, teniendo en cuenta la agrupación dada por SAMOVA ($K = 3$).

n: tamaño de muestras, h: número de haplotipos, Sp: número de sitios polimórficos, Spi: Sitios parsimoniosamente informativos, Hd: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica. CAC= costa Atlántica Continental; CAI = costa Atlántica Insular; CA = costa Atlántica.

	Área	Sitio	n	h	Sp	Spi	Hd	π
costa Atlántica (CA)	CAC	Bahía Rosas (BR) *	26	26	51	34	1.000	0.0125
		Las Grutas (LG)	32	32	40	20	1.000	0.0083
		LG – BR (1° Grupo)	58	56	61	41	0.999	0.0103
		Puerto Madryn (M)	45	31	50	38	0.975	0.0112
		Comodoro Rivadavia (CR) (2° Grupo)	26	25	56	37	0.997	0.015
	Tierra del Fuego (CAI)	San Sebastián (SS)	8	6	19	11	0.929	0.0085
		Punta Popper (PP)	29	19	35	26	0.924	0.0096
		Punta María (PM)	19	14	25	14	0.953	0.0077
		Ma. Luisa (ML)	35	26	40	27	0.960	0.0101
		M – TDF (3° Grupo)	136	82	64	46	0.962	0.0101
		Todos los sitios (CAC + CAI)	220	159	106	70	0.984	0.0119

Tabla 8. Salida de análisis SAMOVA para las diferentes agrupaciones de *O. smitti*

Valor de agrupaciones	<i>O. smitti</i>	
	K = 2	K = 3
Poblaciones/ Índices de Variación	M, SS, PP, PM; ML vs LG, BR, CR	M, SS, PP, PM, ML vs LG, BR vs CR
Entre grupos (FST)	13.88%, *	15.94%, **
Dentro de poblaciones (FCT)	82.23%, ***	82.44%, ***
Entre poblaciones dentro de grupos (FSC)	3.89%, ***	1.63%, *

Los valores de F_{ST} pareados oscilaron de 0.00 a 0.325. Todas las comparaciones que involucran al menos un sitio de la CAC son significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Comparaciones de F_{ST} pareados de los sitios muestreados de *O. smitti* con sus respectivas significancias.

	BR	LG	M	CR	SS	PP	PM	ML
BR	0.000							
LG	0.031*	0.000						
M	0.171***	0.081***	0.000					
CR	0.145***	0.062***	0.17***	0.000				
SS	0.325***	0.134***	0.035	0.147***	0.000			
PP	0.292***	0.142***	0.042***	0.161***	-0.017	0.000		
PM	0.276***	0.110***	0.039*	0.163***	0.029	-0.007	0.000	
ML	0.280***	0.135***	0.033**	0.160***	-0.009	-0.020	0.005	0.000

La correlación entre distancias geográficas (km) y genéticas (F_{ST}), incluyendo todos los sitios fue significativa, dada por la prueba de Mantel ($r = 0,675$, $p = 0,005$) (Figura 14).

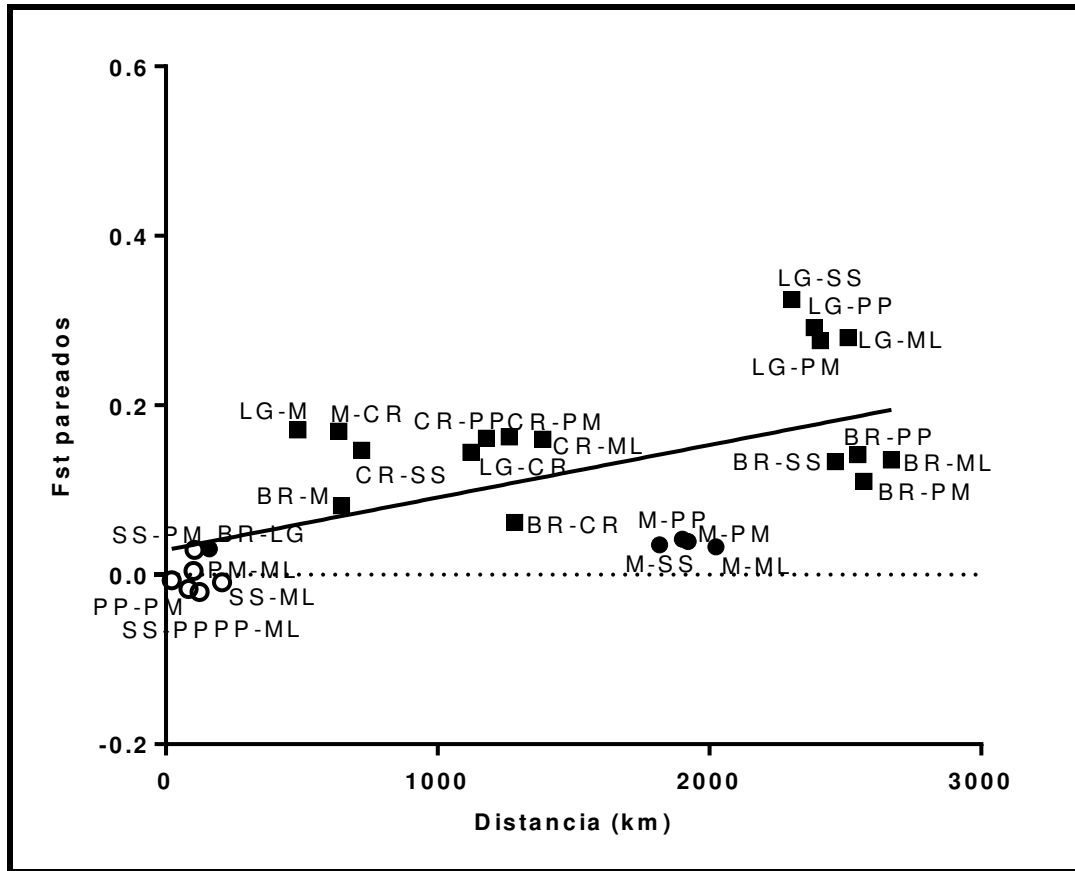


Figura 14. Gráfica de la correlación entre distancia geográfica y F_{ST} pareados. Los círculos indican las comparaciones dentro de grupos y los cuadrados entre grupos. Las figuras rellenas indican valores significativos y las vacías no significativos.

Historia demográfica y análisis filogenético

- *Tasa de mutación*

Para *O. smitti* la tasa de mutación obtenida fue 0.0074 mutaciones/sitio/ millones de años (Figura 9).

- *Árbol filogenético y Red de haplotipos*

La red de haplotipos y el árbol filogenético para el linaje evolutivo de *O. smitti* muestran ser bastantes ramificados y complejos (Figura 15 y 16). Podemos distinguir dos haplotipos con muy alta frecuencia y bastante estrellados: un haplotipo central (Hap 66), que aparece en todas las poblaciones estudiadas excepto las 2 de más al norte, y el otro haplotipo

de alta frecuencia (Hap 74), pertenece principalmente a los sitios de la Patagonia continental, y en menor proporción a un sitio insular (ML) (Figura 15). El Hap 66 se encontró en 75 (34%) especímenes de 8 poblaciones (4 del norte y 4 del sur), mientras que el Hap 74 se encontró en 34 (15%) especímenes de cinco poblaciones (4 del norte y una del sur). El haplotipo dominante Hap 66 está vinculado a otros haplotipos separados por pocos pasos mutacionales, formando una red estrellada. El otro haplotipo dominante, Hap 74, se encuentra a 5 pasos mutacionales del Hap 66 existiendo un individuo intermedio. Además, se observan muchos haplotipos con baja frecuencia pertenecientes en su mayoría a los sitios de CR y PM, posiblemente indicando expansión poblacional reciente.

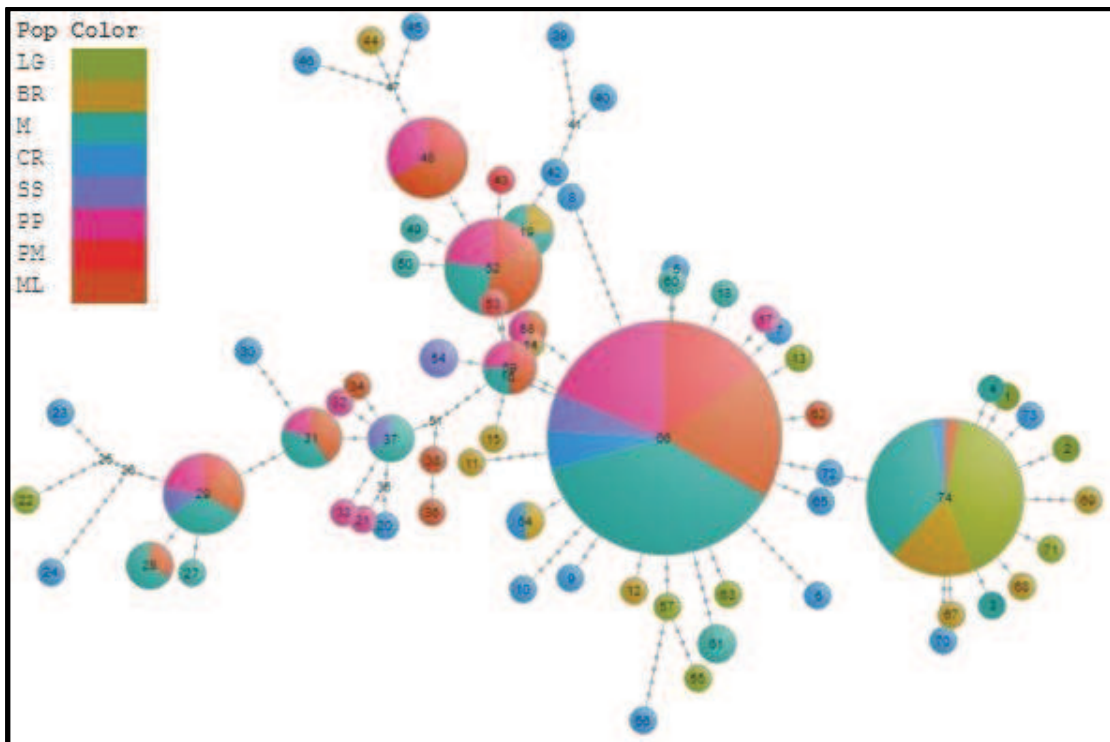


Figura 15. Red de haplotipos de *O. smitti* conectando 220 haplotipos mtDNA.

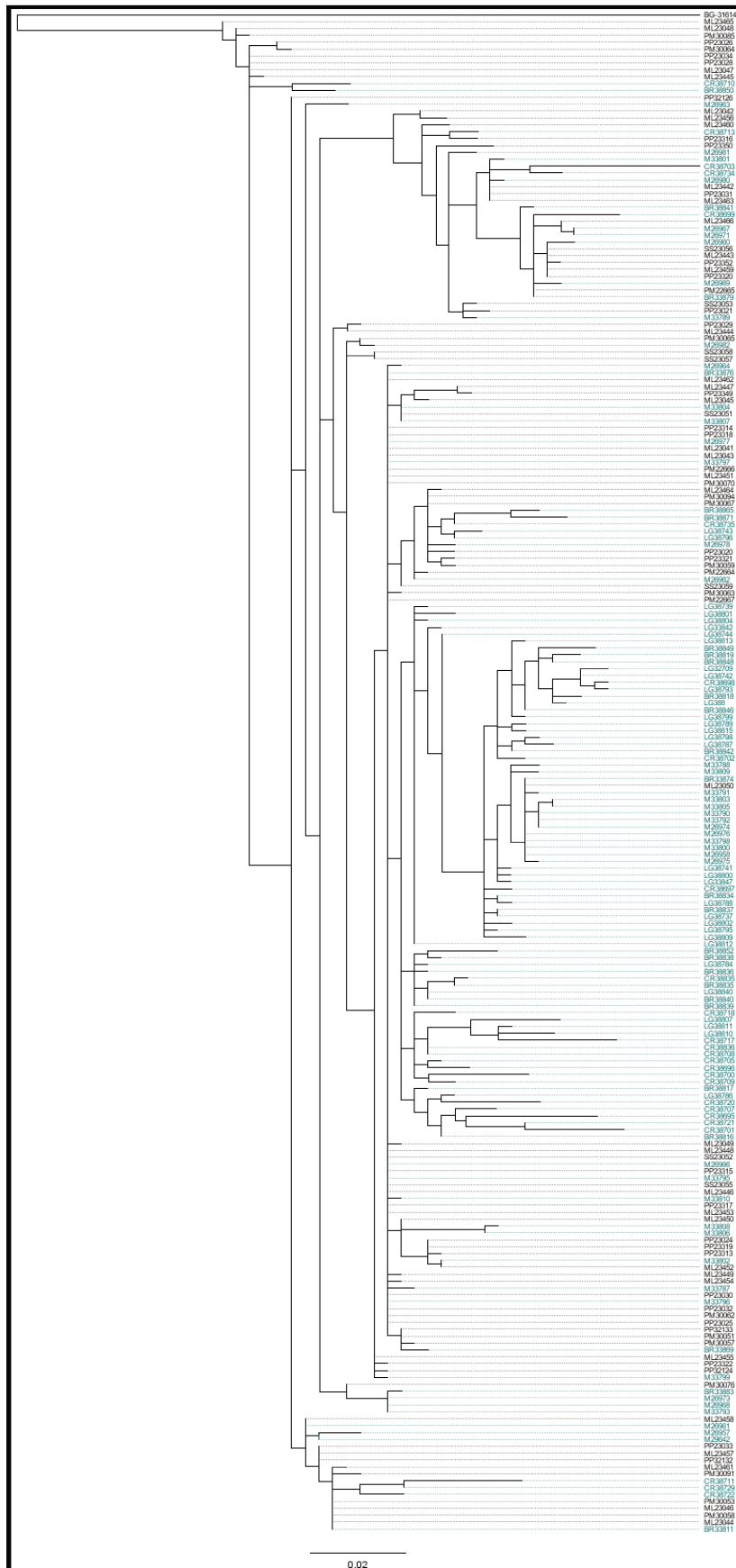


Figura 16. Árbol filogenético basado en máxima verosimilitud para las poblaciones de *O. smitti* obtenidas con RAxML. En los nodos los valores de soporte muestran valores superiores al 50%, los que corresponden a probabilidad a posteriori. Sitios de Patagonia Norte o CAC (LG, BR, M, CR) y Patagonia Sur o CAI (SS, PP, PM, ML). Líneas turquesas = CAC y líneas negras = CAI.

- *Test de Neutralidad*

En *O. smitti*, los valores de D de Tajima fueron negativos, pero no significativos. Los valores Fs de Fu fueron todos negativos y significativos (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de las pruebas de neutralidad en los 8 sitios analizadas de *O. smitti*.

Especie		Área	Sitio	D de Tajima	Fs´s Fu	
<i>O. smitti</i>	CAC		BR	- 0.763	- 18.435***	
		CAC	LG	- 1.043	- 25.079***	
			M	- 0.568	- 24.687***	
		CAC	CR (1° Grupo)	- 0.484	- 16.379***	
	Tierra del Fuego	CAI		SS	- 0.005	- 2.885*
				PP	- 0.305	- 21.408***
				PM	- 0.375	- 14.428***
				ML	- 0.320	- 24.821***
		CAC	LG - BR (2° Grupo)	- 1.370	- 66.457***	
		CAC+CAI	M - TDF (3° Grupo)	- 0.849	- 74.619***	
		Total	CAC + CAI	- 1.329	- 24.128***	

- *Distribución Mismatch*

El análisis de distribuciones pareadas en las poblaciones de *O. smitti* mostró un patrón más complejo que *O. nigricans*. Todas las secuencias juntas (CA) revelaron una distribución unimodal, pero la CAC y la agrupación LG - BR manifestaron una distribución bimodal y la CAI, CR y M - TDF mostraron multimodalidad. A excepción de la gráfica de la sumatoria de todas las poblaciones (CA) todas las gráficas son compatibles con poblaciones demográficamente estables y/o genéticamente estructuradas (Figura 17 A - F).

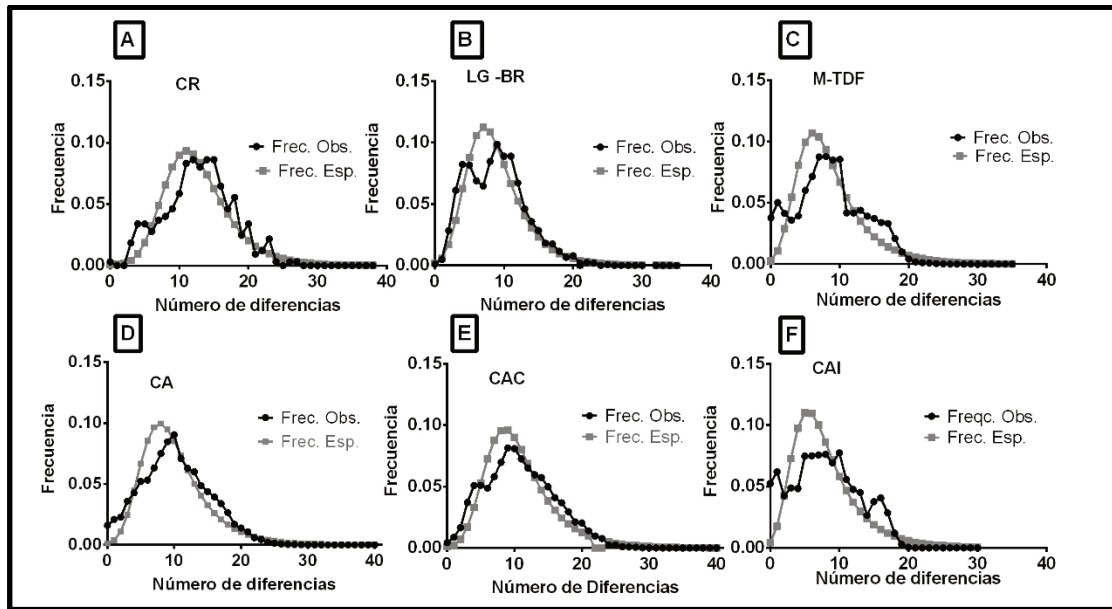


Figura 17. Distribución mismatch de la región de control mitocondrial para *O. smitti* de las tres agrupaciones generada por los análisis: A) CR, B) LG - BR, C) M-TDF, de todas las poblaciones juntas: D) CA, y de las poblaciones según las regiones geográficas analizadas: E) CAC y F) CAI.

- *Bayesian skyline plot*

La traza del perfil bayesiano para *O. smitti* a lo largo de la CA muestra un crecimiento leve pero constante desde hace 350.000 años con una expansión de la población, que comenzó alrededor de 26.000 años atrás; post- Última Expansión Máxima Glacial (Figura 18). Los perfiles bayesianos por separado de la CAC y la CAI mostraron iguales tendencias (Figura no mostrada).

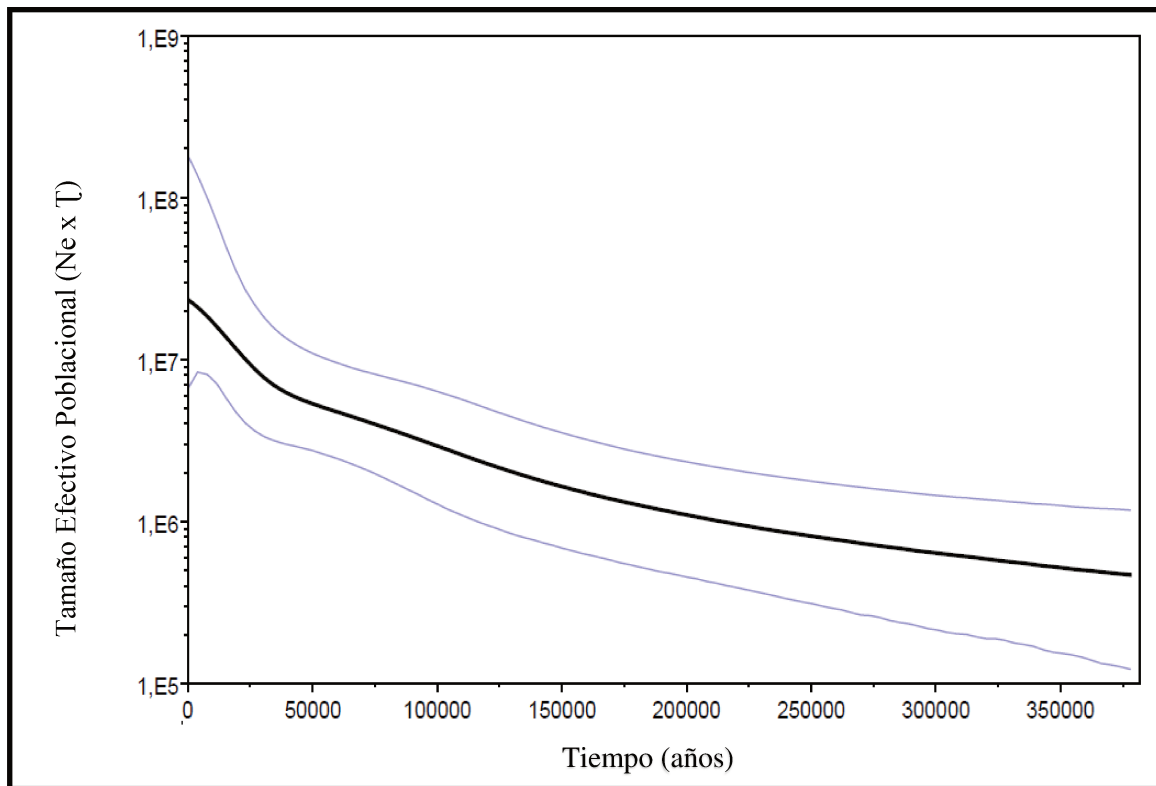


Figura 18. Estimación del tamaño poblacional histórico usando el método “*Bayesian Skyline Plot*” con todos los haplotipos (CAC y CAI) de la región mitocondrial de *O. smitti*. El eje X está en unidades de años antes del presente y el eje Y representa el producto del tamaño poblacional efectivo y el tiempo generacional en escala logarítmica. La línea negra es la estimación de la mediana y el área entre las líneas azules representa la región de densidad de probabilidad más altos del 95%.

9.5 Discusión

El presente estudio es el primer intento de dilucidar la estructura genética poblacional de *O. nigricans* y *O. smitti*, ambas especies de amplia distribución en la costa de la Patagonia argentina.

O. nigricans

Globalmente, los resultados de la diversidad genética mostraron una mayor diversidad en los sitios de la CA que en los del CB. Estos valores menores de diversidad haplotípica y nucleotídica en las poblaciones del CB que en las de la CA, indicarían que las poblaciones del CB son más recientes que las de la CA, lo que indudablemente coincide con la historia geológica de la región, es decir entonces que esta menor variabilidad podría explicarse

debido a un asentamiento más tardío de estas poblaciones. Esta idea se ve reforzada por los resultados del análisis del BSP, el cual muestra una población de aproximadamente 20.000 años en el CB, plausible pensando que se originó luego de la última glaciación.

En términos absolutos la diversidad haplotípica en *O. nigricans* tanto en la CA como en el CB fue alta (valores mayores a 0.5) y la diversidad nucleotídica fue baja en ambas áreas (valores menores a 0.0038), con un nivel más bajo en las poblaciones del CB. Según Grant y Bowen [105], valores altos de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica indican una acumulación de mutaciones después de un evento de cuello de botella en la población seguido por un rápido aumento en el tamaño de la población. Este aumento en tamaño de la población se puede distinguir sobre todo en el CB, según el análisis BSP.

En *O. nigricans* se observó un marcado quiebre filogeográfico, considerando que se observaron dos grupos de poblaciones bien diferenciadas: por un lado, las poblaciones de la CA y, por otro, las poblaciones del CB. Este patrón fue respaldado primeramente por un porcentaje significativo y alto de la variación explicada por la varianza entre los grupos (entre los sitios de la CA y del CB) en el SAMOVA jerárquico ($F_{ST} = 39.83\%$, *). Secundariamente, el patrón también fue respaldado cuando se analizó la correlación de F_{ST} y la distancia entre las poblaciones. Todos los F_{ST} dentro de un área geográfica (CA o CB) fueron bajos, mientras que los F_{ST} entre las áreas fueron muy altos, mostrando una fuerte subdivisión geográfica de la variabilidad genética entre las poblaciones de estas dos áreas. Por último, el quiebre filogeográfico también fue observado con los análisis filogenéticos, mostrando dos grupos monofiléticos recíprocamente cercanos. Dentro de estos últimos análisis, en la red de haplotipos, se observó una fuerte estructuración, a pesar de que se encontraron algunos haplotipos compartidos. Según la red obtenida para *O. nigricans*, el Hap 45 puede ser el más ancestral, porque está en el centro de la red, tiene una alta frecuencia y está presente en todos los sitios muestreados de la CA [106]. El Hap 58 podría ser el más ancestral del CB. Otro haplotipo perteneciente al CB (Hap 72) tiene una frecuencia intermedia y se observó en ambos sitios del CB y en dos sitios de la CAI. Específicamente, tres haplotipos anidados dentro del clado del CB se encontraron en individuos de la CA.

Dos diferentes factores pueden explicar esta variación genética compartida, que se observó en la red de haplotipos y en el árbol filogenético: uno es la retención de polimorfismos ancestrales por clasificación de linaje incompleto (ILS); el otro factor es el flujo de genes (después del contacto secundario si se considera el segundo escenario). El hecho de que tres haplotipos del clado del CB fueran encontrados en la CA sugiere que si se ha producido una migración fue en dirección oeste a este, que está de acuerdo con el principal patrón de

migración descrito en la zona para otros organismos como *Nacella magellanica* [107], *Siphonaria lessoni* [108,109] y *Eleginops maclovinus* [110], y además está en el curso de las principales corrientes marinas en el extremo sur de América del Sur [111,112]. Por otro lado, si la ILS fue la razón de los haplotipos compartidos, pueden haberse encontrado en cualquier parte de la CA. Sin embargo, los haplotipos compartidos fueron encontrados en los sitios de muestreo más australes de la CA de TDF cerca de la supuesta zona de contacto secundario. El bajo número de haplotipos observado en los sitios del CB de *O. nigricans* podría indicar una radiación reciente de la especie dentro del Canal [113]. La red de haplotipos obtenida, posiblemente deriva de una población pasada en expansión [113].

En el CB, la baja variabilidad genética, la distribución mismatch, el test de neutralidad negativo, la existencia de un haplotipo con muy alta frecuencia (49.3% de los individuos) y el BSP muestran una tendencia de crecimiento/expansión poblacional muy reciente. Podemos pensar que la expansión de la población del CB pudo haber cursado durante el Pleistoceno. Además, considerando que a largo plazo la tasa de sustitución entre especies podría ser un orden de magnitud menor que la tasa de evolución molecular operando en el marco de tiempo de procesos demográficos recientes dentro de especies [114], parece razonable que el inicio de la expansión de la población hubiera sido después del Último Máximo Glacial (LGM). Sin embargo, varios factores pueden afectar la fiabilidad del BSP, especialmente el número limitado de muestras [115,116].

La marcada ruptura genética también concuerda con las diferencias reportadas previamente por Lattuca et al. (2015) [56] en los parámetros de crecimiento, la morfología del otolito y dieta al comparar poblaciones de *O. nigricans* del O. Atlántico y del CB.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, planteamos la hipótesis de que en al menos dos escenarios diferentes pueden explicar el patrón observado en *O. nigricans*. El primero puede ser una colonización del rango de distribución más meridional de la especie (incluido el CB) a partir de poblaciones del norte de la CA después del retiro de la lengua glaciaria que cubría el CB después del último glacial (LG). El elevado valor de FST encontrado sería explicado por un importante efecto fundador (que parece poco probable en un entorno marino) y/o fuerte presión de selección para la adaptación a las condiciones locales. De otra manera, parece poco probable que la deriva genética por sí sola pueda explicar la diferenciación observada, teniendo en cuenta que el patrón típico después de una expansión de la población es la ausencia de estructura genética debido al tiempo limitado para que las poblaciones alcancen el equilibrio de migración-deriva.

El segundo escenario podría involucrar diferenciación genética en condiciones alopátricas durante las glaciaciones seguida de expansión durante períodos interglaciales y contacto secundario en el extremo oriental de TDF (Península Mitre). La menor variabilidad genética encontrada en el CB también es compatible con ambos escenarios, ya que la población podría quizás ser una población más pequeña y más nueva que solo recientemente ha invadido el área que ocupa. La fuerte diferenciación filogeográfica observada entre los dos grupos a pesar del alto potencial de dispersión de la especie podría indicar la existencia de algunas barreras pre o post-cigóticas al flujo de genes limitando la hibridación y homogeneización genética. El incipiente aislamiento reproductivo puede haber evolucionado como un subproducto de divergencia en poblaciones alopátricas [117]. La adaptación local a las condiciones ambientales, (considerando la discontinuidad biogeográfica) puede haber mantenido o reforzado el quiebre filogeográfico luego del contacto secundario.

A lo largo de la CA, *O. nigricans* mostró ausencia de estructura genética, mostrando homogeneidad genética en el grupo ($F_{ST} < 0.044$). Esta ausencia de estructura genética y geográfica dentro de la CA en *O. nigricans* en un amplio rango de más de 800 km, sugiere que los diferentes ambientes a lo largo de la CA no son barreras para el movimiento de *O. nigricans* y que el potencial de dispersión de esta especie es alto con respecto al mantenimiento de la cohesión genética. La baja o débil estructuración a lo largo de la CA podría ser el resultado de expansiones recientes en el rango de distribución contribuyendo a un bajo nivel de diferenciación, en segundo lugar a altos niveles de flujo génico por ausencias de barreras físicas y en tercer lugar a tamaños poblacionales grandes.

Como ya se manifestó, la variación dentro del grupo fue muy baja en ambos grupos (CA o CB) y no se observó patrón de aislamiento por distancia. La ausencia de correlación significativa entre F_{ST} y la distancia geográfica en *O. nigricans*, podría provenir de un evento relativamente reciente de expansión demográfica junto con un flujo genético alto. Considerando las características de la especie, la alta capacidad de dispersión puede lograrse tanto por la movilidad de los adultos como por la dispersión de larvas con las corrientes [118].

Se han realizado un número limitado de trabajos filogeográficos en la zona [4,108,110,119,120]. En el pez *E. maclovinus* se encontró una diferenciación entre el CB y la CA, sin embargo, la diferenciación fue sutil y solo detectable con microsátelites [110], pero no con marcadores mitocondriales [4]. Un quiebre filogeográfico similar al encontrado en *O. nigricans*, fue reportado en diferentes moluscos [108,109] y otros organismos [121,122] a la latitud 41 sobre la costa del Océano Pacífico. Sin embargo, estas especies no muestran la misma ruptura entre el CB y la CA. Por lo tanto, a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en

identificar una profunda diferenciación filogeográfica entre el CB y el Océano Atlántico. Podemos afirmar que el CB representa una barrera geográfica para *O. nigricans*. Es necesario profundizar en las razones y consecuencias de la existencia de esta barrera para la conservación y manejo sustentable de la especie.

O. smitti

O. smitti, se caracterizó por altos valores de diversidad haplotípica (mayores a 0.924) y bajos valores de diversidad nucleotídica (menores a 0.0127), a lo largo de la CA para cada población, agrupación y globalmente.

La estructuración genética de *O. smitti*, considerando los resultados del SAMOVA, fue poco marcada ($F_{ST} = 15.94\%$) y distinguió tres agrupaciones. Por un lado, se observa a CR, por otro a LG y BR, y por último a M junto a los sitios de TDF, lo que resulta difícil de explicar y merecería un estudio más profundo, que no pudo realizarse en los tiempos de este proyecto. Sin duda la mayor parte de la varianza se explicó por la varianza dentro de la población ($F_{CT} = 82.44\%$, ***) y fue muy baja la variabilidad explicada entre poblaciones dentro de los grupos ($F_{SC} = 1.63\%$). La falta de una estructura genética muy marcada de alguna manera también fue reflejada por los valores de F_{ST} que si bien mostró diferencias entre las dos poblaciones de más al norte con todas las de Tierra del Fuego (F_{ST} entre 0.110 y 0.325), y entre CR y las poblaciones de Tierra del Fuego (F_{ST} entre 0.147 y 0.163), presentó valores de F_{ST} llamativos en M, que resultó una población más parecida a las de Tierra del Fuego que a las otras de Patagonia Continental. Resumiendo, las 2 poblaciones ubicadas más al norte (BR y LG) constituyeron un grupo con F_{ST} muy bajo entre sí, y bastante alto con todas las demás poblaciones (> 0.141). La población M reveló un resultado difícil de entender ya que resultó más parecida a las poblaciones de TDF que a las poblaciones más cercanas como BR, LG y CR. Esta última resultó bastante diferente de todas las poblaciones y las poblaciones de TDF fueron todas muy parecidas entre sí constituyendo el grupo menos diferenciado de poblaciones.

La diversidad genética (haplotípica) en los tres grupos fue similar y alta, por lo que la antigüedad de las poblaciones sería similar. La alta diversidad haplotípica seguramente se deba a que, en términos generales, las poblaciones tienen un alto flujo génico entre ellas sin fuertes barreras físicas y/o ecofisiológicas.

La correlación de distancias geográficas y valores F_{ST} pareados entre todas las poblaciones de los grupos dio significativa y consistente con un patrón de aislamiento por

distancia según la prueba de Mantel ($r = 0.675$; $p = 0.005$), evidenciando probablemente un equilibrio entre flujo de genes y deriva genética.

O. smitti muestra una moderada estructura geográfica en la variación de las secuencias del ADNmt, que se observan en el árbol filogenético y en la red de haplotipos. Probablemente, el Hap 66 de la red, que representa en tanto a los sitios de la isla de TDF como a los de la Patagonia continental, es el más ancestral y el centro de una red clásica en forma de estrella, lo cual es indicio de poblaciones que han experimentado una expansión poblacional a lo largo de su distribución favoreciendo un bajo nivel de diferenciación y un flujo génico elevado. Sin embargo, las distribuciones mismatch de las tres agrupaciones (LG - BR, CR y M - TDF) por separado mostraron bimodalidad o multimodalidad, lo que indicaría poblaciones estables demográficamente [113].

A lo largo de la CA (incluyendo todos los sitios), los valores negativos del test de neutralidad y la distribución mismatch unimodal soportan el posible escenario de la expansión poblacional en el pasado [98]. El BSP también muestra una disposición general de crecimiento en la CA, pudiendo haber cursado en el Pleistoceno, hace 350.000 años, donde se registra una elevación oceánica interglacial, la que coincide con el período interglacial Hoxniense (correspondiente a la última glaciación). Los cambios climáticos del Cuaternario, podrían explicar las variaciones en el tamaño poblacional de especies como estas de altas latitudes [4,122].

En otras especies de *Odontesthes*, aunque de agua dulce, se observó diferenciación genética pero moderada ($F_{ST} = 0.085-0.199$) entre pejerreyes del Gran Paraná y *O. bonariensis* de la Laguna Chascomús [123] y en otras especies como salmónidos del género *Oncorhynchus* se observó diferenciación genética temporal relacionando el tiempo de migración y la reproducción [124], o relacionando a cambios ambientales (inundaciones), como por ejemplo el pez cíclido africano *Pseudocrenilabrus* multicolor [125]. Siempre la estructura genética marcada es más probable en especies de agua dulce o que pasan parte de su ciclo de vida en agua dulce por la mayor posibilidad de barreras.

Más allá de los importantes aportes de este estudio, es necesario un análisis más profundo para comprender completamente las fuerzas evolutivas que actúan sobre esta especie.

9.6 Conclusión

Los resultados indican ciertas diferencias entre las dos especies estudiadas. En principio las distribuciones de las especies, si bien coincidían en gran parte de la CA diferían en que *O. smitti* no habitaba el CB.

La caracterización genética a lo largo de la CA, realizada a partir de la secuenciación de la región de control del genoma mitocondrial (814 pb), en 6 poblaciones de *O. nigricans* y 8 de *O. smitti*, en la Isla Grande de Tierra del Fuego y en la Patagonia Continental (2/6 y 4/8 poblaciones, respectivamente), muestra una mayor diversidad genética en *O. smitti* (dada por: 159 haplotipos en 220 secuencias vs 64 haplotipos en 163 secuencias, diversidad haplotípica de 0.984 vs 0.950, diversidad nucleotídica de 0.0119 vs 0.0035).

En *O. nigricans*, se observó un marcado quiebre filogeográfico con una estructura genética poblacional mostrando dos grupos bien diferenciados: la CA de Patagonia y el CB. A lo largo de la CA la estructura genética fue muy tenue. Por tanto, se concluyó que el CB es una barrera física al flujo de genes. Los valores bajos de F_{st} en la CA y la ausencia de aislamiento por distancia podría ser consecuencia de un alto flujo génico acoplado a un escenario de expansión poblacional reciente.

En *O. smitti* se observó una moderada estructuración genética, separando a las poblaciones de la CAC de la CAI con algunos haplotipos compartidos. La relación de la población M con el resto resulta controvertida, y serán necesarios más estudios para entender por qué es más similar a las poblaciones de TDF que a poblaciones más cercanas como CR o LG.

Los resultados de la estructuración genética en ambas especies, fueron soportados por varios análisis, entre ellos SAMOVA, la relación entre los valores de F_{ST} y la distancia geográfica, el análisis filogenético y la red de haplotipos.

O. smitti presentó una historia demográfica más antigua que las dos agrupaciones de *O. nigricans*, siendo el CB el sitio más joven, lo que se corrobora a partir de su menor diversidad haplotípica y sería el resultado del reasentamiento postglacial más reciente. Es decir, la CA tiene poblaciones más antiguas, tanto para *O. smitti* como para *O. nigricans* debido al alto nro. de haplotipos y a la alta diferenciación genética observada.

Los análisis demográficos muestran claros signos de expansión poblacional en *O. nigricans* del CB. En el caso de *O. smitti*, si bien los valores de los estadísticos de Tajima y Fu dan negativos, no se ve una señal clara de expansión.

A lo largo de la CA, en ambas especies, la distribución unimodal de las diferencias pareadas y los valores negativos de las pruebas de neutralidad globales, indicarían un único refugio, es decir reflejarían una posible expansión desde un único refugio ubicado probablemente al NE de su actual distribución.

La actual arquitectura genética de las poblaciones; particularmente en zonas de alta latitud; podría ser consecuencia de los cambios climáticos ocurridos durante el Cuaternario, es decir procesos naturales asociados a cambios demográficos.

Estudios futuros, idealmente usando enfoques de todo el genoma como RAD-seq, se podrían realizar para intentar evaluar el grado de hibridación, especialmente en la zona de contacto secundario (Península Mitre o Península de Valdés). Además, estudios en otras especies con una distribución continua en estas zonas son necesarios para evaluar el nivel de generalidad de éste patrón biogeográfico.

Capítulo 2:

Morfometría Geométrica

10. CAPÍTULO 2: MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

10.1 Introducción

Los procesos ecológicos y evolutivos que influyen sobre la biodiversidad y por lo tanto aportan al conocimiento de base para la administración y conservación de las especies, se ven reflejados en el análisis de la variación fenotípica a nivel geográfico [126,127]. Las diferencias morfológicas entre individuos pueden deberse a una variedad de procesos biológicos como, por ejemplo: adaptación a condiciones ambientales locales, cambios ontogenéticos inducidos por el ambiente (plasticidad fenotípica), o divergencia evolutiva [127,128]. Además, los patrones geográficos en la forma y el tamaño del cuerpo son esenciales para la identificación de stocks fenotípicos [129].

La morfometría geométrica (MG) es simplemente una forma cuantitativa de abordar las comparaciones de formas. Dicho de otra manera, la morfometría es una rama de análisis de formas utilizando matemáticas que permiten ilustrar y explicar las diferencias de formas ofreciendo información y descripción precisa [130]. En muchos estudios biológicos, el análisis de forma juega un papel importante, como una aproximación para comprender la variación y transformación morfológica [130].

Las técnicas de MG basadas en análisis de imágenes digitalizadas han resultado ser muy buenas en la identificación de stocks fenotípicos [131,132].

La MG que se basa en métodos de *landmarks*, compara la geometría de los individuos utilizando un sistema de coordenadas espaciales, basándose en puntos anatómicos únicos homólogos [131,133–135]. Las deformaciones descritas en las coordenadas de los *landmarks*, llamadas *partial warps*, pueden utilizarse en conjunto con los métodos convencionales de análisis multivariado, como los análisis de componentes principales y la familia de análisis de discriminante [136].

Para la biología, los *landmarks* son *loci* anatómicos discretos que pueden ser reconocidos como los mismos en todos los individuos del estudio; y matemáticamente, los *landmarks* son puntos de correspondencia, coincidentes dentro y entre poblaciones. Los *landmarks* se clasifican en tipo I, II y *semilandmarks* [134] y deben proporcionar una muestra de morfología suficientemente completa para que se puedan descubrir las características de importancia biológica. Los *landmarks* de tipo I se localizan en uniones de tejidos diferentes y habitualmente se identifican fácilmente (ej. inserción de una aleta). Los de tipo II se ubican en las zonas de mayor curvatura (ej. mitad de curvatura del opérculo). Los *semilandmarks* se

ubican considerando la posición de otros *landmarks* y comúnmente no representan estructuras anatómicas homólogas, aunque matemáticamente se consideran como homólogas [130]. Debido a que los *landmarks* desempeñan un papel fundamental en la MG, es importante entender su función en un análisis de forma. Respecto a la configuración de *landmarks*, las posiciones (coordenadas) de un set de *landmarks* representan un simple objeto, conteniendo información sobre el tamaño, la forma, orientación y sitio. El número de *landmarks* es representado por K, y la dimensionalidad (nro. de coordenadas) es normalmente representada por M.

La MG con coordenadas de *landmarks* resuelven muchos de los problemas que enfrentan los métodos tradicionales de medición, ya que las relaciones espaciales propias de cada configuración de *landmarks* permiten, en general, una descripción de la forma más precisa que la morfometría tradicional de medidas lineales [137]. Los métodos morfométricos geométricos facilitan la interpretación visual e intuitiva, ya que los enfoques morfométricos convencionales no son adecuados como herramientas discriminatorias. La MG es la manera más efectiva de capturar información sobre la forma de un organismo, especialmente cuando se combinan con estadística [136,138]. Además, la MG facilita extraer y comunicar la información sobre la localización espacial de variación morfológica (su magnitud, posición y extensión espacial sobre los organismos); detectando cambios de formas sutiles y permitiendo una visualización e interpretación sencilla de las diferencias en la forma [130].

Entonces, complementando a los análisis genéticos informados en el capítulo anterior, la técnica de MG es considerada apropiada para estudiar estructura de poblaciones, y ha sido usada para discriminar entre poblaciones de peces [139].

Los aterínidos tienen una gran plasticidad fenotípica para adaptarse a variaciones ambientales. En pejerreyes marinos se observaron diferencias morfológicas y merísticas en estructuras óseas a lo largo de la costa argentina [140,141]. En términos de morfología, los tamaños de cuerpos de adultos registrados varían de 250 mm a 520 mm de longitud [142]. Es difícil distinguir a simple vista las diferentes especies de pejerrey, incluso si son especies marinas o dulceacuícolas, por lo que, el análisis de MG parece ser *a priori* una alternativa robusta para la discriminación entre especies de éste género o incluso poblaciones de una misma especie. La discriminación entre especies del género se hace normalmente utilizando la clave publicada por Dyer 2006, que en el caso de *O. nigricans* indica que el origen de la primera dorsal se sitúa sobre la primera mitad de la aleta pélvica y que el origen del último radio de la segunda aleta dorsal se sitúa notablemente anterior al último radio de la aleta anal [48,55] mientras que *O. smitti* presenta el origen de la primera dorsal situada sobre la mitad posterior

de la aleta pélvica y que el origen del último radio de la segunda aleta dorsal se sitúa sobre el origen del último radio de la aleta anal. Esta clave se ha utilizado para los pejerreyes del Canal Beagle, aunque nunca ha sido corroborada ni contrastada con la genética de las especies y tampoco se ha investigado si existen diferencias interespecíficas. Si bien *O. nigricans* y *O. smitti* son distinguibles genéticamente (ver capítulo 1) algunas variaciones geográficas (morfología, patrones reproductivos, crecimiento y mortalidad) no son siempre consistentes con la variación genética. En algunas situaciones, ésta variación es relacionada a plasticidad fenotípica como un resultado de diferentes condiciones ambientales [132]. Diferentes presiones selectivas pueden generar y mantener diferentes fenotipos y los análisis morfológicos son útiles para mostrar esas diferencias adaptativas [143].

En resumen, en éste capítulo, utilizamos el análisis morfológico geométrico (MG) para discriminar entre dos especies de pejerreyes *O. nigricans* y *O. smitti*, analizando 8 sitios de muestreo en el caso de *O. nigricans* y 5 sitios de muestreo en el caso de *O. smitti*, a lo largo del amplio gradiente geográfico. Buscaremos identificar diferencias anatómicas significativas entre estas dos especies marinas, y también utilizar la variación morfológica como una aproximación para discriminar stocks fenotípicos en sus poblaciones.

10.2 Objetivo

Estudiar las diferencias en la morfología corporal de estas dos especies de pejerreyes: *O. nigricans* y *O. smitti*, analizando mediante técnicas de MG, la forma general del cuerpo; y también analizar si existen diferencias intraespecíficas en individuos provenientes de distintos sitios de la costa Patagónica Atlántica y el Canal Beagle. La morfología del cuerpo permitirá contrastar la estructura poblacional encontrada a partir de las técnicas genéticas con la que se desprende de la variación fenotípica, enriqueciendo la interpretación acerca de las causas y consecuencias de la estructuración.

10.3 Hipótesis

Dado que el diseño corporal de cada especie de pez presenta cierto tiempo de evolución separada de las otras especies (aproximadamente 5 millones de años), esperamos que existan diferencias entre las dos especies de pejerreyes. Dado que la evolución también incluye adaptaciones locales y que la historia de vida de los peces está profundamente relacionada con el ambiente (luz, corrientes marinas, depredadores, etc.) que el pez frecuente se propone que

existirán diferencias en la morfología corporal (principalmente en la cabeza y el pedúnculo caudal relacionadas potencialmente con diferencias en la alimentación y las capacidades natatorias) entre las distintas poblaciones de peces en ambas especies.

10.4 Materiales y Métodos

10.4.1 Obtención de muestras

Los peces se obtuvieron de la misma manera que para el estudio genético poblacional explicado en el Capítulo 1, detallado en 9.3.1.

Se utilizaron un total de 242 individuos de *O. smitti* y 582 de *O. nigricans*, provenientes de distintos sitios del Canal Beagle y la costa Atlántica (Tabla 11). El rango de talla de los individuos muestreados varió entre 20 a 36 cm de los cuales el 98.5% de los individuos se encontraba en estadio adulto/subadulto.

O. nigricans y *O. smitti* son capturadas cada año en diferentes meses dependiendo de la región. En la costa Atlántica de Tierra del Fuego (53° - 55° S) se capturan comercialmente entre los meses de noviembre a marzo, donde la temperatura del agua está entre 10 y 14 ° C, y muchas hembras capturadas mediante pesca artesanal muestran gónadas maduras sugiriendo período de desove. Que las especies no sean capturadas por los pescadores artesanales en otros meses no indica necesariamente que no estén presentes en esos ambientes, pero que quizás el esfuerzo pesquero para capturarlas no valga la pena dada la abundancia de esas poblaciones en esas épocas del año por variaciones de distribución, comportamentales, etc.

Tabla 11. Sitios de muestreo y número de individuos analizados de cada especie. CAC: costa Atlántica Continental, CAI: costa Atlántica Insular, CB: Canal Beagle, n: número de individuos analizados.

Área de muestreo	Sitio	n / Especie		Temporada de muestreo (mes)
		<i>O. nigricans</i>	<i>O. smitti</i>	
CAC	Bahía Rosas (BR)		74	Otoño (May-Jun)
	Las Grutas (LG)		75	Otoño (May-Jun)
	Comodoro Rivadavia (CR)		43	Invierno (Jul)
	Puerto Santa Cruz (PSC)	52		Primavera (Nov)
	San Sebastián (SS)	87		Verano (Nov-Mar)
CAI	Punta Popper (PP)	8	4	Verano (Nov-Mar)
	Punta María (PM)	69	46	Verano (Nov-Mar)
	M. Luisa (ML)	136		Verano (Nov-Mar)
Canal Beagle (CB)	Bahía Varela (BV)	112		Verano (Nov-Mar)
	Bahía Golondrina (BG)	118		Verano (Nov-Mar)
	Total	582	242	

10.4.2 Análisis

Se fotografiaron ejemplares de cada población estudiada hasta alcanzar un n mínimo de 40 individuos por sitio (de alrededor de 22-30 cm de largo), excepto en PP (8 individuos), debido a necesidades de las técnicas a utilizar (Tabla 11). Para estandarizar las condiciones de la fotografía, se siguieron las recomendaciones (orientación, zoom, uso de macro, etc.) propuestas por Zeldich y col. [130]. Los ejemplares fueron fotografiados con una cámara digital marca Nikon modelo coolpix 4600, utilizando un estativo para mantener la cámara a 30 cm de los individuos y se utilizó un nivelador de burbuja para constatar el nivel de la cámara de fotos respecto al pez y que estuvieran en planos paralelos. En cada fotografía se colocaron 20 *landmarks* (puntos) morfológicos sobre el costado izquierdo del pez escogidos siguiendo a Bookstein y col. [144] (Figura 19, Tabla 12), utilizando el programa TpsDig2 [145] para determinar sus coordenadas en los ejes “x” e “y”. Posteriormente las imágenes fueron procesadas mediante software específicos para morfometría geométrica (MorphoJ, TPS) [120], realizando un análisis por medio de la utilización de *landmarks*. Los puntos se discriminaron entre *landmarks* tipo I (16), tipo II (3) y *semilandmarks* (1) según la nomenclatura de Bookstein [134,144]. El análisis de la MG de los pejerreyes se realizó según el método de la superposición de Procrustes por mínimos cuadrados [130]. Éste consiste en transformar la configuración de

landmarks, que define una estructura, mediante reescalado, rotación y translación. De este modo se extrae toda la información que no es relativa a la forma (como el tamaño) y se minimizan las diferencias y las distancias Procrustes entre todas las configuraciones de *landmarks* de la muestra [144]. El unbending se utilizó para corregir la posición del cuerpo con los *landmarks* 1, 15 y 20. El *landmark* 20 se utilizó solamente para realizar el unbend y luego fue eliminado para el análisis estadístico.

Tabla 12. Descripción de los *landmarks* y *semilandmarks* utilizados para evaluar las variaciones en forma de los peces. Abreviaturas: Lm, *landmark*.

Lm	Descripción	Tipo
1	Extremo anterior del labio superior	I
2	Extremo inferior de la inserción del labio	I
3	Extremo anterior y medio del ojo	II
4	Centro y medio del ojo	I
5	Extremo posterior y medio del ojo	I
6	Techo medio del cráneo (siguiendo la línea negra que sale de la pectoral)	II
7	Mitad de curvatura del opérculo	II
8	Contacto entre el opérculo y el lado ventral del cuerpo	I
9	Inserción del radio superior de la aleta pectoral	I
10	Inserción anterior de la primera aleta dorsal	I
11	Inserción posterior de la primera aleta dorsal	I
12	Inserción anterior de la segunda aleta dorsal	I
13	Inserción posterior de la segunda aleta dorsal	I
14	Extremo superior de la aleta caudal	I
15	Punto medio de la mancha caudal	I
16	Extremo inferior de la aleta caudal	I
17	Inserción posterior de la segunda aleta ventral	I
18	Inserción anterior de la segunda aleta ventral	I
19	Inserción anterior de la primera aleta ventral	I
20	Punto de intersección entre la estola de coloración plateada lateral y la línea que une los Lm 11 y 18 (Sólo se usa para realizar el Unbend)	<i>semilandmark</i>

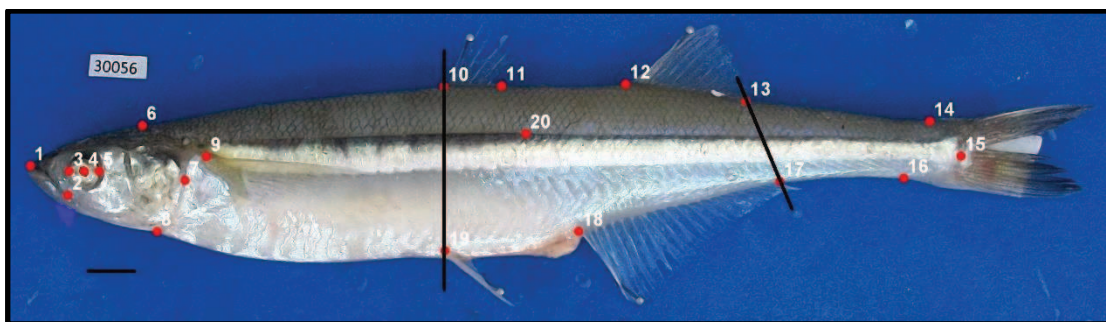


Figura 19. Localización de los *landmarks* en un ejemplar de *O. nigricans*. Las líneas rectas indican: entre los *landmarks* 10-19, la ubicación de las inserciones de la primera aleta dorsal y la aleta pélvica; entre los *landmarks* 13-17, la ubicación del último radio de la segunda aleta dorsal y el último radio de la aleta anal, siguiendo la clave de Dyer 2006. Escala: 1 cm.

En primer lugar, se compararon las dos especies de pejerreyes, utilizando sólo las poblaciones de la costa Atlántica en el caso de *O. nigricans*, ya que *O. smitti* no se encuentra en el Canal Beagle, para reconocer potenciales diferencias entre los morfotipos. Para ello se realizó un análisis de componentes principales (ACP) sobre la matriz de covarianza. Seguidamente se diagramó un wireframe para distinguir precisamente los puntos de diferenciación y se realizó una prueba de validación cruzada para observar cómo se asignan los individuos a cada especie.

En segundo lugar, se realizó el análisis de *O. nigricans* para observar las diferencias entre los diferentes sitios tanto en la costa Atlántica como en el Canal Beagle. Analizando ambas áreas juntas (todos los sitios de la CA y el CB) y luego por separado. Cuando se estudiaron las dos áreas juntas se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) sobre la matriz de covarianza, para diferenciar por sitio y área. Se realizaron las gráficas de: lollipop, transformation grids y wireframe y posteriormente se realizó un análisis de variación canónica (AVC) para encontrar las características morfológicas que mejor discriminan; es decir la máxima discriminación entre los grupos estudiados. Se obtuvieron las grillas de deformación para destacar las zonas principales de variación en forma. Se efectuaron un total de 1000 permutaciones de individuos entre grupos como test no paramétrico de la significancia de la distancia Procrustes y de Mahalanobis entre pares de grupos. Posteriormente se realizaron pruebas de clasificación (correcta/incorrecta) mediante validación cruzada entre pares de poblaciones utilizando el programa MorphoJ [146]. Cuando se estudiaron las dos áreas por separado (costa Atlántica y Canal Beagle), se realizaron los mismos análisis excepto en el

Canal Beagle que no se calculó AVC ni validación cruzada debido a que solamente se estudiaron dos sitios en el Canal.

En tercer lugar, se analizaron todos los sitios de *O. smitti* en la costa Atlántica efectuando los mismos análisis que para los sitios de *O. nigricans*.

Los análisis estadísticos tanto para las especies como para las distintas subpoblaciones indicarán si existen o no diferencias significativas. De existir las mismas, en el caso de las poblaciones, se compararán con las estructuras que arrojará el análisis genético de ambas especies.

10.6 Resultados

O. nigricans vs *O. smitti*

Los análisis de componentes principales (ACP), discriminante (AD) y de variantes canónicas (AVC), se realizaron con los residuos de dicha regresión; ya que la regresión entre forma y tamaño mostró la existencia de alometría significativa, lo que significa que los individuos analizados tuvieron variación del tamaño por variación ontogenética (dentro de los grupos) sumada a la variación entre los grupos.

Se puede distinguir cada especie diferenciada según los dos primeros componentes principales (Figura 20). La variación dada por los dos primeros componentes principales (CP) calculados sobre las variables de forma general del cuerpo, explica el 64 % de la variación acumulada (Tabla 13).

Tabla 13. Datos de los autovalores obtenidos del análisis ACP de todos los individuos de ambas especies juntos.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	0.000796	52.61	52.61
2	0.000165	10.88	64.49
3	0.000983	6.49	69.99

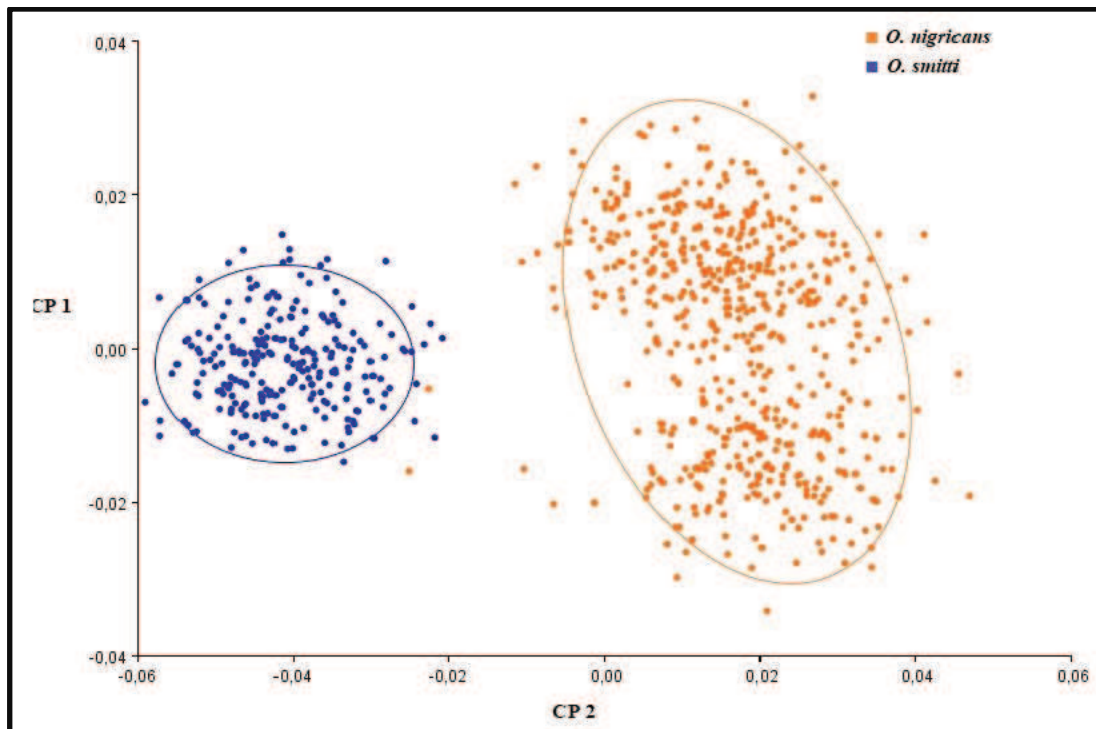


Figura 20. Representación gráfica del análisis de componentes principales (ACP) para el cuerpo completo en los individuos de todos los sitios de las dos especies juntas.

Para interpretar la variación de la forma descrita en el análisis de componentes principales (ACP), se generaron diagramas wireframe para mostrar el cambio de la forma en los extremos positivos y negativos de los ejes de los CP del diagrama obtenido del ACP (Figura 20), representando a los sitios de *O. nigricans* el factor positivo = 0.05 y a *O. smitti* el factor negativo = - 0.05 (Figura 21). Los diagramas wireframe muestran que la variación de la forma ocurre en la región del pedúnculo caudal, observándose el pedúnculo más largo y angosto en *O. nigricans*. Además de la forma es importante también comparar la inserción de la primera dorsal en relación al comienzo de la pélvica y el final de la segunda dorsal en función del final de la anal, dado que son los ítems que usa Dyer para diferenciar a las especies de *Odontesthes*, como ya explicáramos en la introducción.

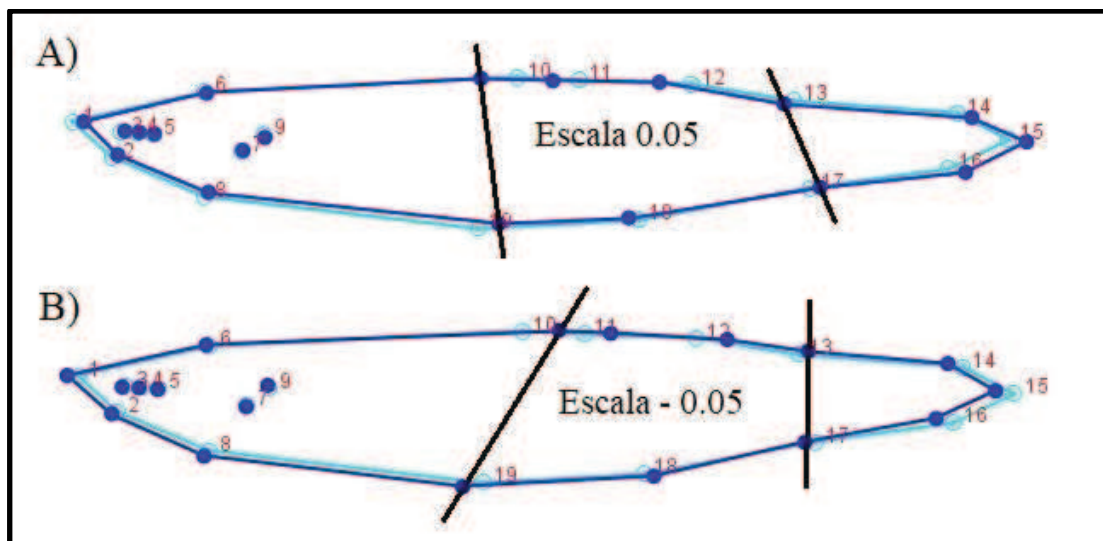


Figura 21. Diagrama wireframe que describe la forma de ambas especies A) con los valores extremos positivos del CP 1 que representan a *O. nigricans* (Factor de escala: 0.05) y B) con valores negativos del CP 1 que representan a *O. smitti* (Factor de escala: - 0.05). Línea celeste: forma consenso, y línea azul: forma a la escala.

En las pruebas de validación cruzadas, se observan que los individuos fueron correctamente asignados a su grupo de origen con $\geq 99.6\%$ para todas las comparaciones pareadas *O. nigricans* u *O. smitti* (Tabla 14 y Figura 22).

Tabla 14. Pruebas de validación cruzadas de comparaciones pareadas para *O. nigricans* y *O. smitti*.

Función Discriminante				
Grupo Asignado	<i>O. nigricans</i>	<i>O. smitti</i>	Total	% Validación
Grupo de Origen				
<i>O. nigricans</i>	580	2	582	99.6%
<i>O. smitti</i>	0	242	242	100%
Validación Cruzada				
Grupo Asignado	<i>O. nigricans</i>	<i>O. smitti</i>	Total	% Validación
Grupo de Origen				
<i>O. nigricans</i>	580	2	582	99.6%
<i>O. smitti</i>	0	242	242	100%

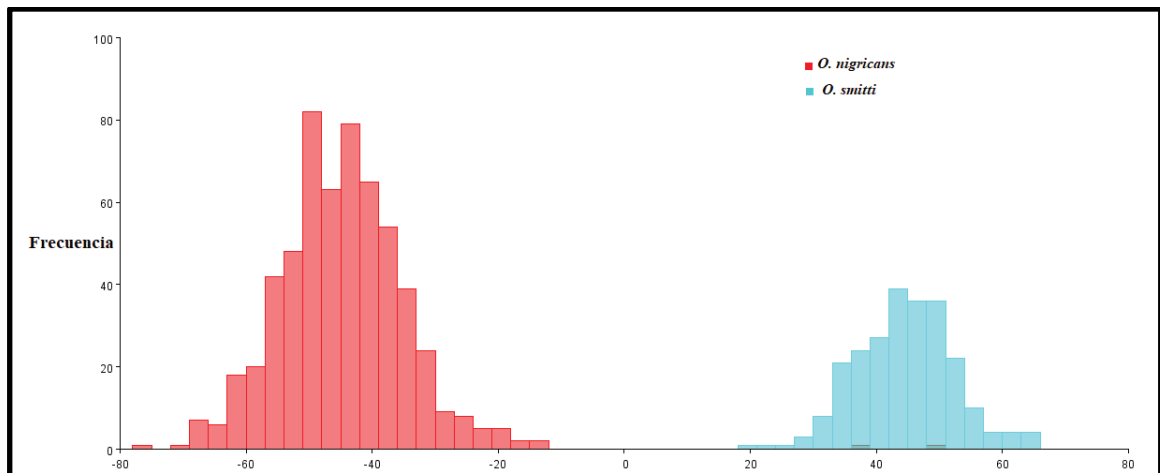


Figura 22. Frecuencias de las comparaciones pareadas de todos los individuos (*O. nigricans* + *O. smitti*) de la costa Atlántica.

O. nigricans

La figura 23 muestra la posición de los 19 *landmarks* y su variación para todos los ejemplares de *O. nigricans* analizados.

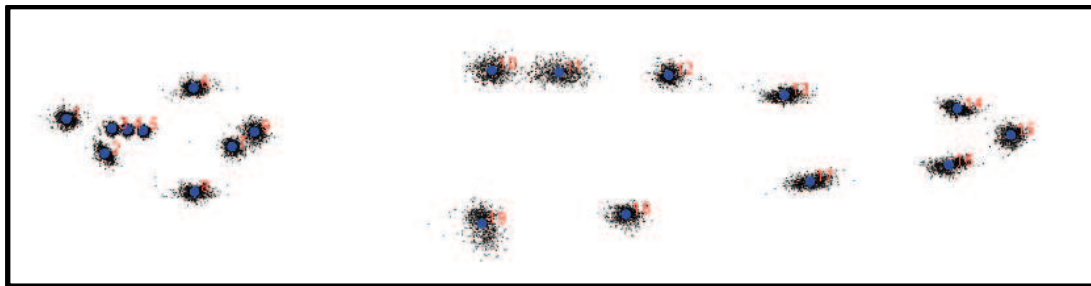


Figura 23. Posición media de los 19 *landmarks*; realizada mediante superposición de Procrustes; utilizados para analizar los cambios de forma en *O. nigricans* de los 8 sitios de muestreo de esta especie. Los puntos azules de mayor tamaño ubicados en el centro de cada nube corresponden a la configuración de consenso.

Cuando se realiza la regresión de todos los ejemplares de *O. nigricans*, incluyendo todas las poblaciones, sin discriminar por población se obtiene un valor $p < 0.0001$ y dentro de subgrupos un $p = 0.0309$, indicando esto que existe alometría.

Análisis de Componentes Principales

Inicialmente al realizarse el Análisis de Componentes Principales (ACP), el porcentaje de variación explicada por los tres primeros componentes principales (CP) calculados sobre las variables de forma general del cuerpo en todos los individuos de todos los sitios de muestreo de *O. nigricans* fue del 51.94 % (Tabla 15), mediante el cual fue posible distinguir entre sitios. Los cambios de la forma de los ejemplares de *O. nigricans* asociados a los dos primeros componentes principales se encuentran representados en la Figura 24. En la misma se puede observar la diferenciación marcada entre los individuos de la CA y los del CB, establecidas en el ancho del cuerpo y el largo del pedúnculo caudal.

Tabla 15. Análisis de Componentes Principales de todas las poblaciones juntas de *O. nigricans*: Coordenadas de Procrustes con sus correspondientes autovalores y porcentajes de varianza.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	0,00023595	26,132	26,132
2	0,00014768	16,356	42,488
3	0,00008537	9,455	51,943

Al igual que en la comparación de las dos especies, para comprender la variación brindada por el análisis de componentes principales, se generaron diagramas wireframe para mostrar el cambio de la forma en los individuos de los sitios que representan al CB (extremo positivo del eje del CP 1: factor = 0.05) y a la CA (extremo negativo del eje del CP 2: factor = - 0.05).

Los cambios en la forma asociados al CP 1 (26 % de la varianza explicada) se centran en el ancho del cuerpo, dado por los *landmarks* puntos 10, 11, 12, 13 y 19; y también al ancho y largo del pedúnculo caudal dado por los *landmarks* 14, 15 y 16. Como era de esperar la posición de las aletas dorsales y ventrales no se ven modificadas ya que es una diferencia interespecífica, no intraespecífica (Figura 25).

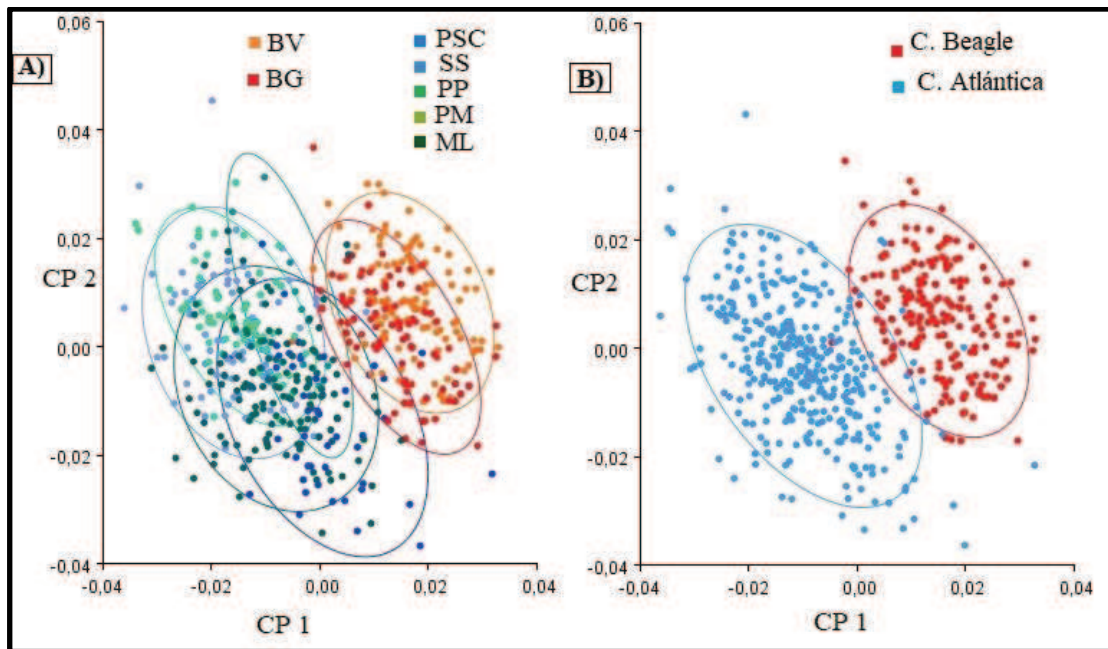


Figura 24. Relación entre componentes principales (CP 1 y CP 2) de *O. nigricans* de todos los sitios muestreados identificando A) cada sitio con una elipse y color diferente B) cada área con una elipse de color diferente: Cada elipse corresponde al 90% de confianza.

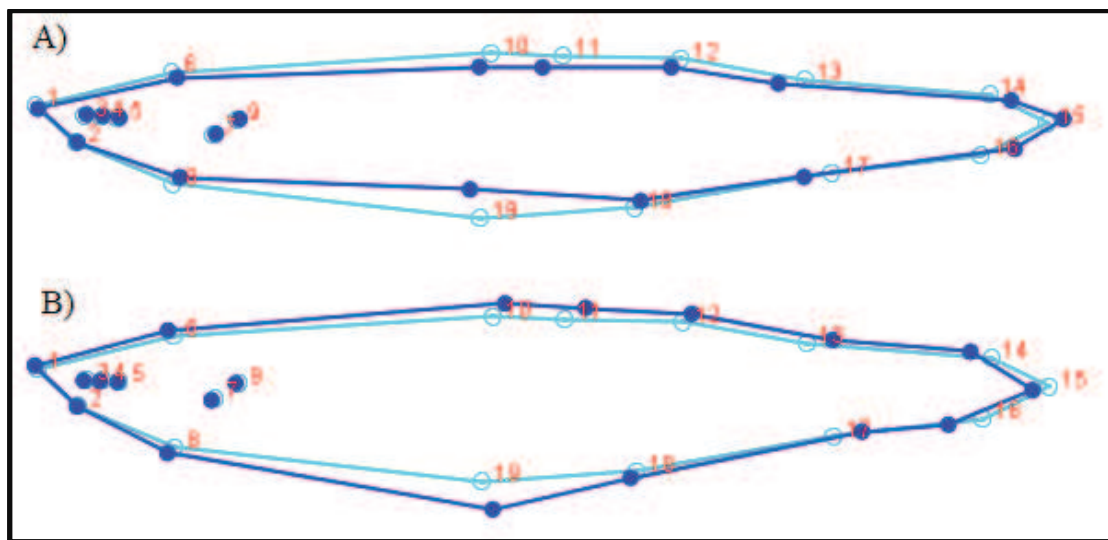


Figura 25. Diagrama Wireframe que describe la forma de *O. nigricans*. El factor de escala corresponde a: A) 0.05 que representa al Canal Beagle y B) -0.05 que representa al O. Atlántico.

En los sitios del CB se observa un pedúnculo caudal más largo, pero más estrecho, y cuerpo más angosto que la forma consenso. Lo contrario sucede en los sitios de la costa Atlántica, donde se distingue el pedúnculo caudal más corto y más ancho que la forma

consenso, además mayor ancho del cuerpo. El CP 2 (16 % de la varianza explicada) describe cambios mínimos similares al CP 1, específicamente en el punto 10 y 11 (en las aletas dorsales), mostrando un desplazamiento superior de los puntos 10 y 11 (cambios observables hacia los valores positivos del CP 2).

Análisis de Variación Canónica

Para discriminar mejor aún entre sitios y áreas se procedió a realizar un análisis canónico. En conjunto los 3 ejes discriminantes distinguen a todos los sitios entre sí. La variación entre grupos explicada por el eje canónico 1 fue más del doble que la explicada por el eje canónico 2 o el eje canónico 3 (Tabla 16). Específicamente el EC 1 explicó el 63% de la varianza entre grupos, el EC 2 el 15% y el EC 3 el 12%. Los ejes de variación están describiendo la máxima discriminación (diferencias) entre todos los sitios de muestreo. Existe un 63% de varianza acumulada en el primer eje canónico. Además, el valor p de los dos tests de permutaciones están informando que existe alometría ($p < 0.0001$).

Tabla 16. Resultados de AVC donde se muestra, la máxima discriminación entre grupos, teniendo en cuenta la variación dentro de grupos.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	6.280	63.093	63.093
2	1.509	15.157	78.250
3	1.199	12.052	90.303
4	0.476	4.783	95.086
5	0.403	4.049	99.135
6	0.086	0.865	100

Las distancias de Mahalanobis y de Procrustes del análisis de variación canónica para todos los sitios analizados fueron significativas, excepto en ML-BV (Tabla 17 y 18).

Según los valores de la Tabla 18, y considerando que los sitios más parecidos son los que poseen los valores de las distancias de Mahalanobis más cercanas, se observa que la distancia obtenida para BV con BG, que son poblaciones del CB, son las más semejantes (D Mahalanobis = 2.2332). De la misma manera, las poblaciones que más difieren son en general las de la CA con los del CB (Valores que varían entre D Mahalanobis 4.048 - 6.54).

Tabla 17. Distancia Mahalanobis entre grupos de *O. nigricans*

	PSC	SS	PP	PM	ML	BG
SS	4.4512 ***					
PP	4.1941 ***	4.0605 ***				
PM	5.1707 ***	3.3139 ***	3.9278***			
ML	3.9536 ***	3.8713 ***	4.0270 ***	3.5942 ***		
BG	4.7762 ***	5.9433 ***	4.0370 ***	5.4830***	5.0409 ***	
BV	5.5637 ***	6.5368 ***	4.3775 ***	5.9991 ***	5.7479	2.2332 ***

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

Tabla 18. Distancia Procrustes entre grupos de *O. nigricans*

	PSC	SS	PP	PM	ML	BG
SS	0.0252 ***					
PP	0.0200 **	0.0159 **				
PM	0.0307 ***	0.0129 ***	0.0171 ***			
ML	0.0207 ***	0.0186 ***	0.0180**	0.0196***		
BG	0.0244 ***	0.0309 ***	0.02023***	0.0308***	0.0252***	
BV	0.0288 ***	0.0337 ***	0.02226***	0.0339***	0.0304***	0.0091***

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

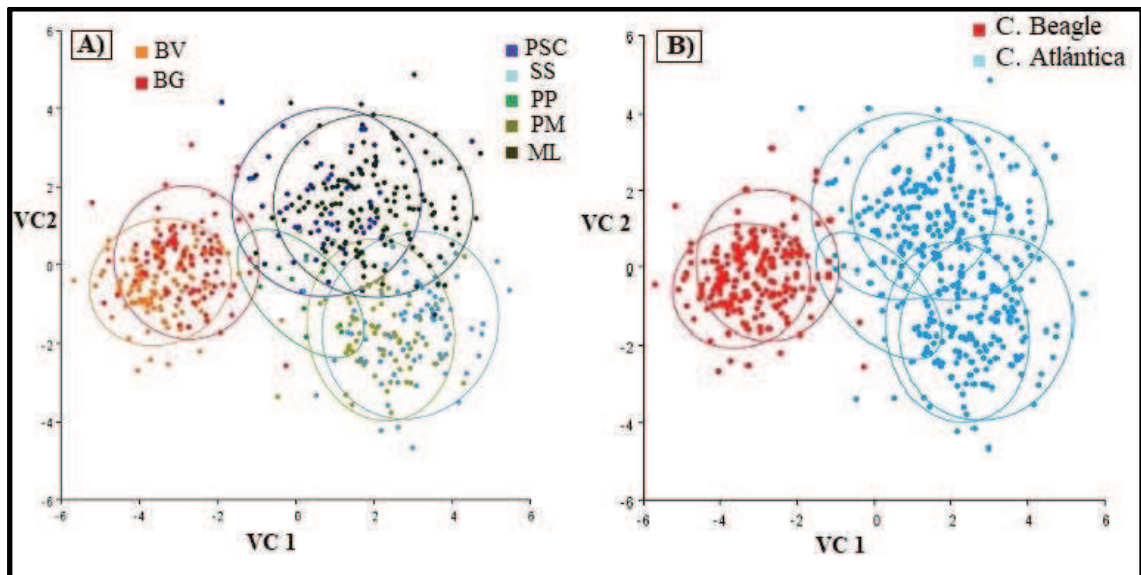


Figura 26. Eje canónico 1 vs. eje canónico 2 de *O. nigricans* correspondiente a A) los 7 sitios estudiadas y B) a las dos áreas (Canal Beagle y costa Atlántica). Las elipses representan el área del 90% de confianza para cada sitio.

Los *wireframes*, del AVC mostraron que los ejemplares del CB presentan un abdomen más angosto que los ejemplares de la CA (Figura 27).

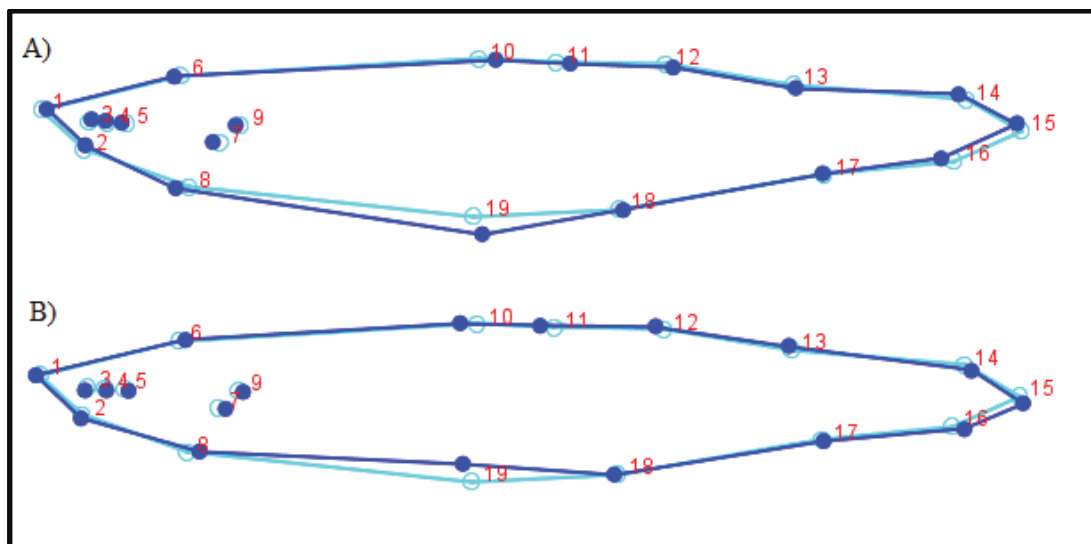


Figura 27. Wireframe del CVA de *O. nigricans* de todos los sitios estudiados, representando: A) la costa Atlántica y B) el Canal Beagle (factor de escala = 5).

Según la gráfica de la figura 26 A), BG y BV son más parecidas entre sí respecto a las poblaciones de la CA (PSC, SS, PP, PM y ML), observándose esta diferenciación en el eje de la VC 1. El eje de la VC 2 no distingue a las poblaciones. Otra manera de observar esta información es con las distancias de Mahalanobis entre grupos.

Cuando se realizó el análisis en MorphoJ combinando los sets de datos del CB y de la CA se observó que hay alometría entre los ejemplares ($p = 0.0005$).

Los grupos estuvieron conformados por 354 ejemplares de la costa Atlántica y 230 ejemplares del Canal Beagle. El análisis de la función discriminante mostró un alto porcentaje ($\geq 97\%$) de asignación a su correspondiente población (Tabla 19). La validación cruzada realizada para evaluar la fiabilidad de la discriminación entre grupos mediante comparaciones pareadas, correctamente asignó a los individuos a sus grupos en general en más del 97 % de los casos (Figura 28).

Tabla 19. Pruebas de Función discriminante y validación cruzada donde se indica la cantidad de individuos que fueron correctamente asignados a su grupo de origen para las comparaciones de C. Atlántico y C. Beagle.

Función Discriminante				
	C. Atlántico	C. Beagle	Total	% Validación
C. Atlántico	347	5	352	98.58%
C. Beagle	3	227	230	98.69%
Validación Cruzada				
	C. Atlántico	C. Beagle	Total	% Validación
C. Atlántico	342	10	352	97.16%
C. Beagle	3	227	230	98.69%

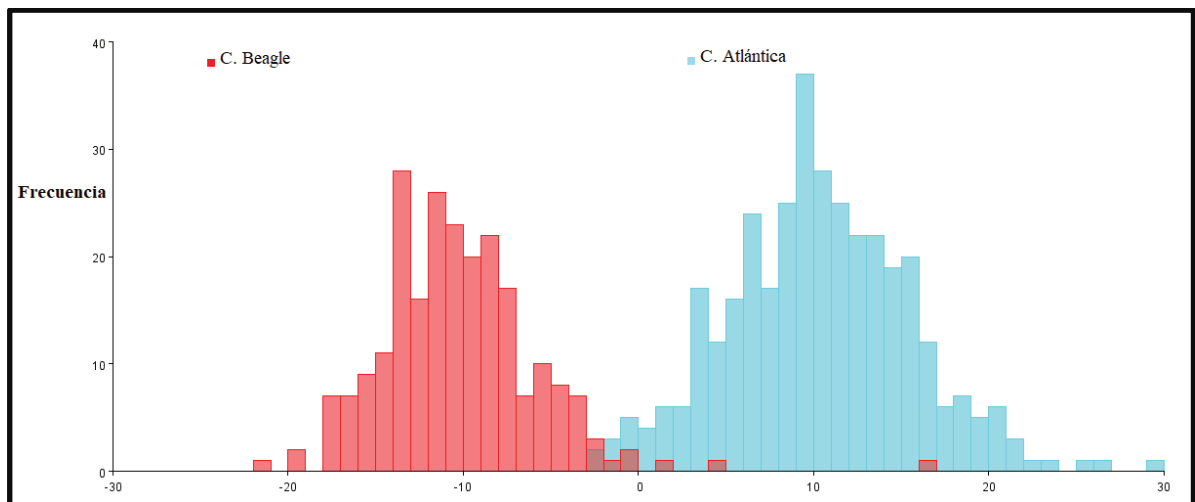


Figura 28. Representación de la validación cruzada de las muestras de *O. nigricans*.

Canal Beagle

En el análisis de las poblaciones del CB solamente, los residuos de la regresión dieron un valor $p = 0.018$, por tanto, hay alometría, es decir hay cambios de dimensión relativa de las partes corporales correlacionados con los cambios en el tamaño total (Figura 29).

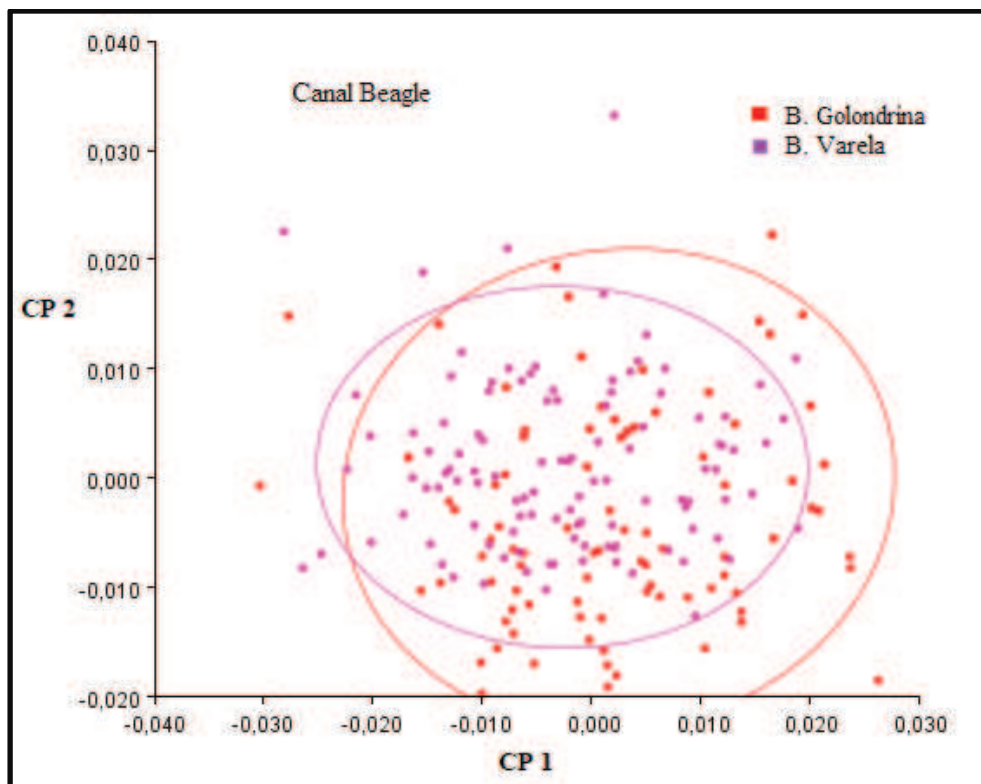


Figura 29. Componentes principales (CP 1 vs CP 2) de los sitios del Canal Beagle.

Al realizar el Análisis de Componentes Principales (ACP), el porcentaje de variación explicada por los dos primeros componentes principales (CP) calculados sobre las variables de forma general del cuerpo en todos los individuos capturados en el Canal Beagle fue del 38 % (Tabla 20).

Tabla 20. Datos de autovalores obtenidos del análisis ACP de los individuos del Canal Beagle.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	0,00013322	23,191	23,191
2	0,00008529	14,847	38,039
3	0,00005450	9,488	47,527

En los componentes principales de las poblaciones del Canal Beagle, el *landmark* 11 (-0,764; 0,067) y *landmark* 10 (-0,408; 0,025) son los que muestran mayor variación, representando éstos las inserciones (anterior y posterior) de la primera aleta dorsal.

O. Atlántico

El porcentaje de variación explicada por los tres primeros componentes principales (CP) calculados sobre las variables de forma general del cuerpo en todos los individuos de la CA de *O. nigricans* fue del 60% (Tabla 21). Los datos de todos los sitios de la CA son alométricos ($p < 0.0001$).

Tabla 21. Datos de los primeros autovalores obtenidos del análisis ACP de todos los ejemplares de los sitios muestreados en la costa Atlántica.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	0,00050616	43,396	43,396
2	0,00010527	91,026	52,421
3	0,00009724	8,337	60,758

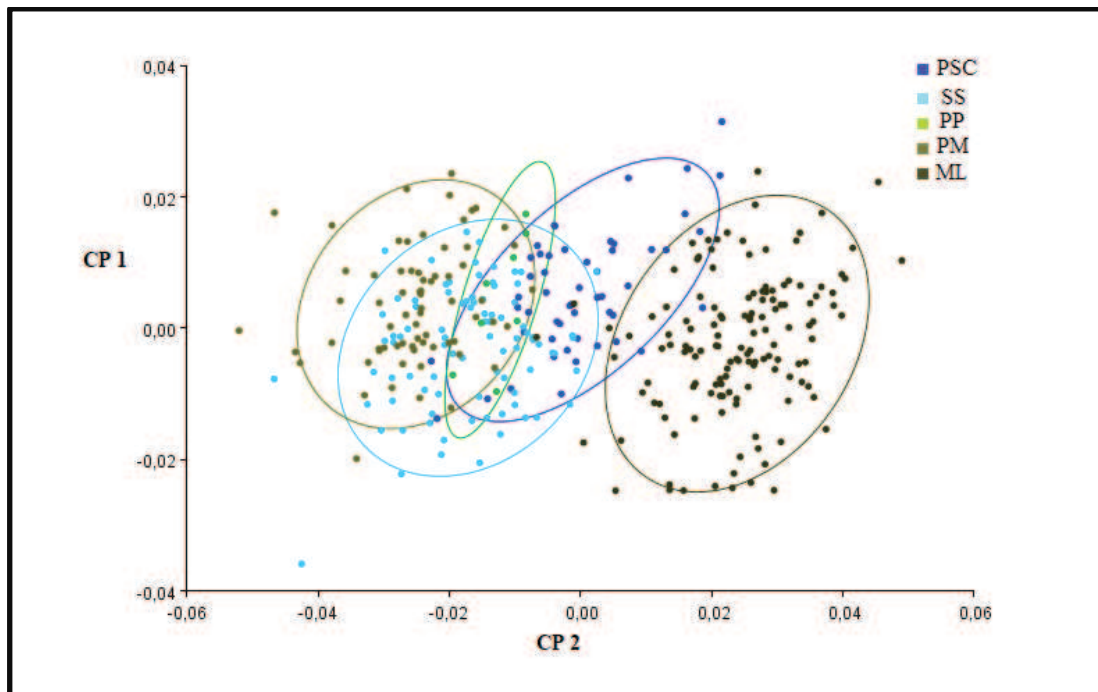


Figura 30. Componente principal 1 vs Componente principal 2 de *O. nigricans* de la costa Atlántica. Los colores se corresponden con los 5 sitios estudiados. Las elipses representan el área del 90% de confianza para cada sitio.

Teniendo en cuenta los componentes principales, los *landmarks* 8 (0,29; 0,07), 10 (-0,33; 0,21), 11 (-0,43; 0,14), 12 (-0,16; 0,13), 14 (0,17; -0,17), 15 (-0,05; -0,23), 16 (0,23; -0,11) y 19 (-0,05; 0,39), muestran mayor variación. Éstos *landmarks* se encuentran en las aletas dorsales, el pedúnculo y el abdomen (Figura 31).

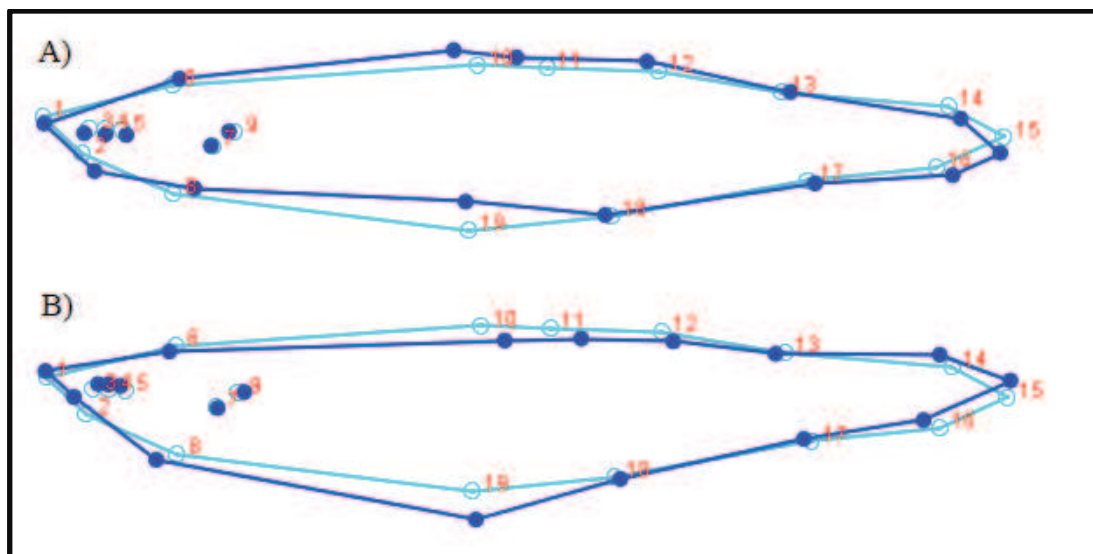


Figura 31. Wireframe que describe el cambio de forma asociado con valores extremos del eje del CP 1 de todos los ejemplares de la costa Atlántica de *O. nigricans*. A) Factor escala: + 0.05 y B) Factor de escala: - 0.05.

Teniendo en cuenta el análisis canónico de todas las poblaciones de la CA, podemos ver que el eje canónico 1 diferencia notablemente a ML del resto de los sitios. El eje canónico 2, diferencia a PSC (único sitio continental) de los sitios de Tierra del Fuego (Figura 32).

En conjunto los 3 ejes discriminantes diferencian a todos los sitios entre sí. La variación entre grupos explicada por el eje canónico 1 fue más alta que la explicada por el eje canónico 2 o el eje canónico 3 (Tabla 22). Particularmente el EC1 explicó el 56,66 % de la varianza entre grupos, el EC2 el 32,66% y el EC3 el 9,05%.

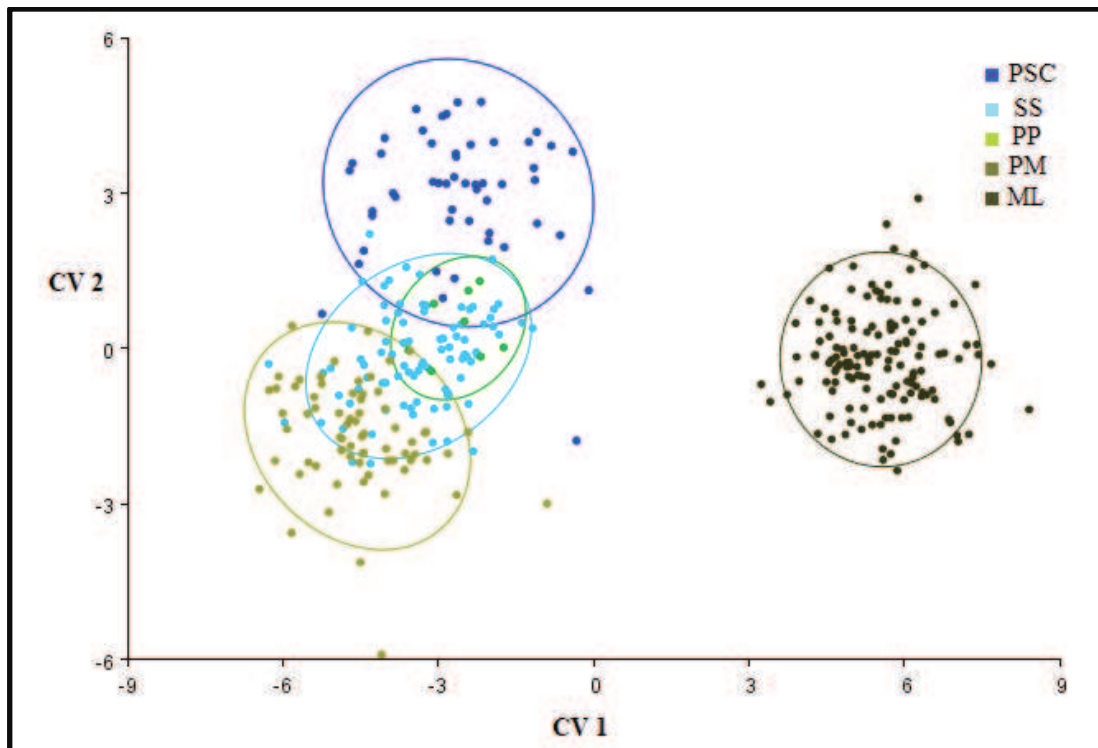


Figura 32. Eje canónico 1 vs. eje canónico 2 de la costa Atlántica de *O. nigricans*. Los colores se corresponden con los 5 sitios estudiados. Las elipses representan el área del 90% de confianza para cada sitio.

Tabla 22. Valores de datos del análisis de CVA para los sitios de la costa Atlántica solamente, escalado por la inversa de la variación dentro del grupo.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	20.320	86.193	86.193
2	1.926	8.171	94.365
3	1.119	4.746	99.111
4	0.209	0.889	100

Todos los valores de las distancias de Mahalanobis y Procrustes resultantes del análisis de variación canónica fueron significativas (Tabla 23 y 24). Los sitios más parecidos son SS con PM y PP (d Mahalanobis = 3.517*** y 3.979***, respectivamente). Los sitios que más difieren son los de ML (d Mahalanobis = 8.804 – 10.296) (Tabla 23).

Tabla 23. Distancia de Mahalanobis entre grupos de todos los sitios de la costa Atlántica de *O. nigricans*.

	PSC	SS	PP	PM
SS	4.074***			
PP	4.069***	3.979***		
PM	5.094***	3.517***	4.249***	
ML	8.804***	9.093***	8.731***	10.296***

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

Tabla 24. Distancia de Procrustes entre grupos

	PSC	SS	PP	PM
SS	0.025***			
PP	0.019***	0.016**		
PM	0.033***	0.015***	0.020***	
ML	0.031***	0.042***	0.039**	0.049***

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

O. smitti

El análisis de componentes principales permitió distinguir las diferentes poblaciones de *O. smitti*, a partir del porcentaje de variación (53 %) explicada por los tres primeros componentes principales calculados sobre las variables de forma general del cuerpo en todos los individuos de la CA (Tabla 25). Cuando se realiza la regresión incluyendo todas las poblaciones de *O. smitti* se observa que no hay alometría entre los ejemplares $p = 0.814$.

Análisis de Componentes Principales y de Variación Canónica

Tabla 25. Datos de los autovalores obtenidos del análisis ACP de todos los individuos *O. smitti* (obtenidos de los sitios la costa Atlántica).

	Autovalores	%Varianza	% Acumulado
1	0.000153	26.381	26.381
2	0.000097	16.687	44.069
3	0.000058	10.049	53.117

Al tener en cuenta los valores extremos del eje del CP 1, con un Factor de escala = 0.05, el cual representan a los ejemplares del sitio ubicado más al norte (BR), se vio una variación en el largo de la cabeza (más alargada) y un abdomen (más estrecho) que la forma consenso (Figura 34 - A). Lo contrario se observó con un Factor de escala = - 0.05 (el otro extremo del eje del CP 1), que representa a uno de los sitios más australes (PM), donde se distinguió una disminución en el largo total indicada por la variación en los *landmarks* 1, 2 y 6 de la cabeza y un cuerpo algo más ancho, precisamente en el *landmark* 19.

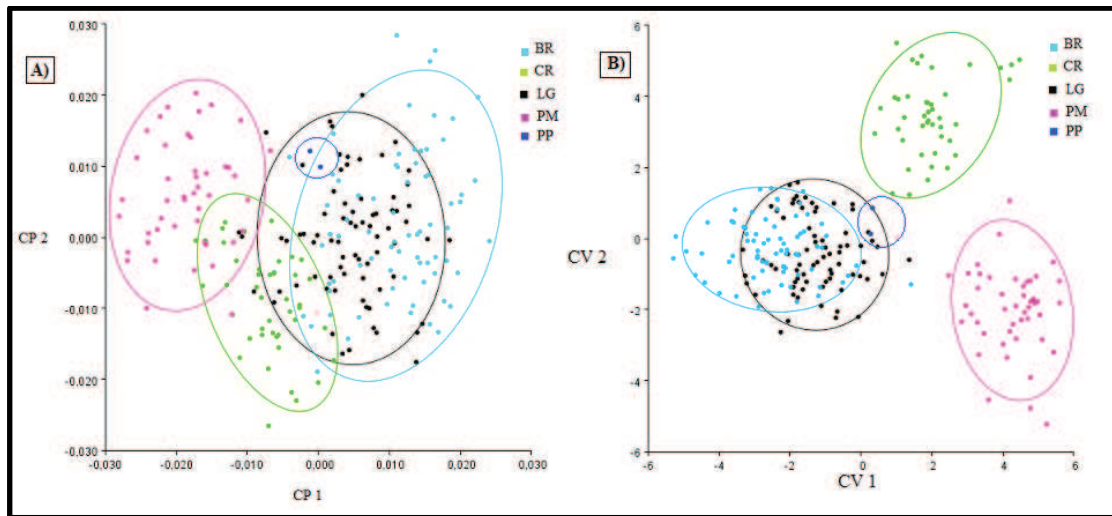


Figura 33. A) ACP de *O. smitti*. B) AVC de *O. smitti*. Los colores se corresponden con los 5 sitios estudiados. Las elipses representan el área del 90% de confianza para cada sitio.

Según la información de los componentes principales, las variaciones más notorias se encuentran en la cabeza [*landmark* 1 (-0,54; 0,04), *landmark* 2 (-0,24; -0,06), *landmark* 3 (0, 20; 0,00), *landmark* 7(0,34; -0,09) y *landmark* 9 (0.46; -0.02)] y en el abdomen: *landmark* 19 (-0.02; 0.26) (Figura 34).

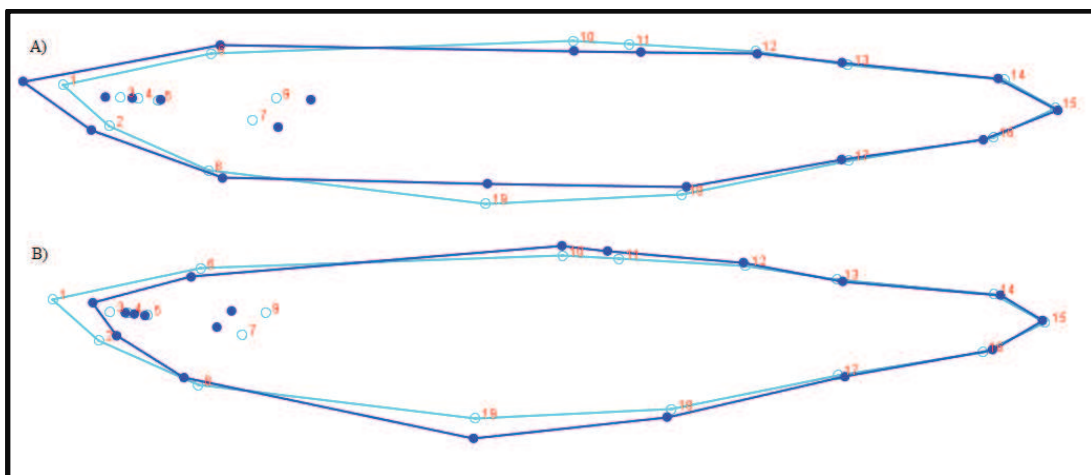


Figura 34. Diagrama Wireframe de *O. smitti* que describe la forma con valores extremos positivos del CP 1. A) Factor de escala: 0.05 que representa a los sitios ubicados al norte: BR y LG y B) Factor de escala: - 0.05 que representa a los sitios de mayores latitudes.

Con los datos del AVC de todos los sitios de la CA, podemos ver que tanto el eje canónico 1 como 2, diferencian bien los sitios analizados a excepción de BR y LG que los superpone (Figura 34 - B). La variación entre grupos explicada por el eje canónico 1 fue el triple de la dada por el eje canónico 2 (Tabla 26).

Tabla 26. Valores de datos del análisis de CVA para los sitios de la costa Atlántica de *O. smitti*.

	Autovalores	% Varianza	% Acumulado
1	6,802	63.15	63.15
2	3,092	28.70	91.85
3	0.501	4.65	96.50
4	0.269	2.49	98.99
5	0.108	1.00	100

Los sitios más semejantes son BR y LG (d Mahalanobis = 2.0703***) (Tabla 27). Se distingue diferenciación entre los sitios de TDF con los de la CAC (d Mahalanobis > 6) y la tabla 28 muestra las distancias de Procrustes.

Tabla 27. Distancia de Mahalanobis entre grupos de todos los sitios de la CA de *O. smitti*.

	BR	CR	LG	PM	PP
CR	5.9036***				
LG	2.0703***	5.1983***			
PM	7.0059***	5.9448***	5.8951***		
PP	6.4835***	6.8294***	6.4026*	7.5020**	
SS	6.3012	6.4715	6.2268	6.5974	7.5837

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

Tabla 28. Distancia de Procrustes de *O. smitti*

	BR	CR	LG	PM	PP
CR	0.028***				
LG	0.0094 ***	0.0194***			
PM	0.0302 ***	0.0225***	0.0248***		
PP	0.0197	0.0248***	0.0199*	0.0238***	
SS	0.0230	0.0198	0.0231	0.0290*	0.0286

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

10.7 Discusión

Los resultados de nuestros análisis presentan una importante diferenciación en la morfología geométrica, tanto entre especies como entre los diferentes sitios estudiados de las dos especies.

O. nigricans y *O. smitti*

El análisis de morfometría geométrica mostró ser suficientemente preciso como para distinguir las dos especies de pejerreyes, *O. nigricans* y *O. smitti*, pudiendo asignar correctamente a los individuos a sus respectivas especies en más de un 97 % en promedio (Figura 22).

Las formas corporales encontradas entre los individuos de ambas especies resultaron diferentes siendo las principales diferencias morfológicas la posición relativa de las aletas dorsales y ventrales, y la zona posterior del cuerpo (el pedúnculo caudal). En *O. nigricans* las posiciones de las aletas coinciden con lo descrito por Dyer 2006 en la bibliografía [48], donde

la inserción de la primera aleta dorsal se encuentra en la misma línea de la aleta pélvica y el último radio de la segunda aleta dorsal coincide con el final de la aleta anal. En *O. smitti* los análisis concuerdan también con lo analizado por Dyer 2000, donde la primera aleta dorsal se ubica posterior o sobre el extremo posterior de las aletas pélvicas [52] y el último radio de la segunda dorsal se ubica por encima del último radio de la aleta anal. Además, los resultados de morfometría geométrica de este estudio permitieron observar que el pedúnculo caudal es más largo y más angosto en *O. nigricans* que en *O. smitti*, lo que podría estar indicando una mayor capacidad de natación [147]. El rendimiento de la natación es importante para los peces porque está relacionado con la capacidad de obtener alimentos, evitar depredadores y realizar otras actividades diarias [148–151]. Por ejemplo, en juveniles de trucha (*Salmo trutta L.*) se observó una relación positiva significativa entre la longitud postanal y el tiempo de resistencia donde los individuos con regiones caudales relativamente más largas son capaces de resistir más tiempo nadando frente a la corriente [147].

Como un importante órgano locomotor para la mayoría de las especies de peces, la aleta caudal juega un papel crucial en la propulsión y guía para los peces durante la natación [152,153]. Las características morfológicas de la parte caudal de los peces entonces, dada su importancia para la natación, está relacionada con la capacidad de alimentación de las especies y entonces en el reparto de los recursos.

Los resultados morfométricos permiten diferenciar claramente a las dos especies de pejerreyes al igual que las secuencias de la región de control lo hicieron genéticamente.

O. nigricans

En *O. nigricans* se observan dos resultados interesantes. Por un lado, se diferencian las poblaciones del CA de las poblaciones del CB, y por otro lado se diferencia a un sitio de la CA del resto de las poblaciones de la CA.

Con el análisis de morfometría geométrica incluyendo todos los especímenes de *O. nigricans*, se diferenciaron todas las poblaciones estudiadas asignando correctamente los ejemplares de cada sitio a su respectiva población en más de un 80 % en promedio. La función discriminante, explica un alto porcentaje de asignación a su correspondiente población, permitiendo distinguir claramente al CB de los otros sitios de la CA estudiados. En éste análisis, las mayores diferencias se observan asociadas al grosor del cuerpo y al largo del pedúnculo caudal. En los pejerreyes del CB el pedúnculo caudal es más largo y angosto que en los

pejerreyes de la CA. El resultado del análisis canónico refuerza la diferenciación en éstas dos grandes áreas (CA y CB) y dentro de la CA diferencia a ML.

Las diferencias en el pedúnculo caudal, podrían explicarse como consecuencia de la natación teniendo en cuenta que la misma cumple un rol importante en la diferenciación morfológica, interviniendo en la alimentación y supervivencia como se mencionó más arriba [148–151]. Sumado a esto, hay que considerar rasgos evolutivos, como las diferentes condiciones ambientales que promueven el polimorfismo de las especies, entre ellas la historia de vida, la predación y las velocidades de las corrientes marinas, en éstas áreas. Según Balestrini y col., en el CB, las corrientes de mareas medidas confirman valores de 0.15 m/s [30] y Piola y col. indican para la corriente de Malvinas (sobre CA) velocidades de superficie mayores a 0.5 m/s [154], por lo que las corrientes de la CA podrían ser mayores a las del CB. No existen mediciones confiables de las corrientes costeras que podrían ser las que más importan dada la distribución de esta especie, sin embargo, las diferencias de mareas, y por ende las corrientes que estas generan, son importantes en la CA de Tierra del Fuego y mucho menor en el CB. Suponemos que las diferencias en las velocidades de la corriente podrían intervenir directamente en el desarrollo de la forma corporal y en la distribución de estas especies de peces. En estudios realizados en truchas (*Salvelinus fontinalis*) se observó que, tanto experimentalmente como en poblaciones naturales, los individuos que habitan ambientes con alta velocidad de corriente desarrollan pedúnculos caudales más estrechos, aletas caudales más grandes y cuerpos ligeramente más largos y delgados que aquellos individuos que habitan en aguas de bajas velocidades de corriente [155,156]. En nuestro laboratorio un estudio de morfología geométrica en *G. maculatus* arrojó que los peces diádromos poseen pedúnculos más largos que los que habitan lagunas encerradas [157]. En el caso de este estudio en que se comparan las poblaciones de *O. nigricans* del CB y de la CA los resultados serían contrarios a lo que se describe anteriormente. Ya que, en la CA, donde las velocidades de corrientes serían mayores a las del CB se distinguieron pedúnculos caudales más anchos y cortos en la CA que en el CB. Serían necesarios estudios de natación para contrastar las capacidades natatorias con las características morfológicas y datos más precisos de las corrientes presentes en los distintos ambientes.

En el análisis morfométricos de los sitios de la CA de *O. nigricans*, se diferenció a ML del resto de los sitios (según el PCA) y se mostró que los datos son alométricos. A excepción de ML, la diferenciación de forma observada entre las poblaciones de *O. nigricans* a lo largo de la CA no sugirió ninguna asociación fuerte con tipos de hábitat específicos.

En general en *O. nigricans*, los sitios que más se asemejan son los ejemplares que representan al CB (BC y BG). En este caso, las variables morfológicas no muestran diferencias marcadas entre los dos sitios que son bastantes cercanos (76 Km). En estos dos sitios no se observaron diferencias genéticas marcadas, pudiendo asociar que BC y BG presentan características ecológicas similares y conforman una misma población.

Teniendo en cuenta lo anterior, sumado a las características oceanográficas y la historia geológica para las dos grandes áreas diferenciadas (CA y el CB), como se explicó en el capítulo 1, los resultados morfométricos permiten profundizar la diferencia de los ejemplares en los sitios de cada área.

O. smitti

En *O. smitti* no se observa alometría en las muestras analizadas, diferenciándose marcadamente a CR y PM de los otros sitios. Los sitios más semejantes en *O. smitti* son LG y BR los cuales están cercanos geográficamente (separados por 160 Km).

En cuanto a las diferencias corporales de *O. smitti*, se puede ver que las poblaciones ubicadas más al norte (LG y BR), poseen una cabeza más alargada y un abdomen más estrecho que las poblaciones de mayores latitudes (PM y CR).

El mayor tamaño de cabeza podría relacionarse a la alimentación, como se describió en otras especies [158,159]. En pejerreyes, *O. argentinensis*, Thompson y Volpedo concluyeron que seleccionan su alimento respecto a la disponibilidad de presas en el ambiente, y que el tamaño de la boca y especialmente el tamaño del ojo indican que buscan y capturan sus presas [160,161].

Teniendo en cuenta los resultados del AVC (Figura 33-B) podemos decir que la variabilidad morfométrica en la CA fue marcada y se han formado al menos tres unidades morfométricas diferentes. La primera ubicada en el extremo norte de distribución de la especie, la segunda en la zona Centro de la Patagonia (CR) y la tercera en la zona Sur (TDF). Estas unidades son consecuencia de la amplia distribución de la especie (distancias entre sitios) y posiblemente a adaptaciones locales.

Teniendo en cuenta que, en otros estudios morfométricos basados en *landmarks* se observaron diferencias de forma relacionadas entre poblaciones de peces a hábitat y hábitos alimenticios [162,163], podemos pensar que las diferencias de forma de cabeza entre los sitios del norte y del sur, podrían deberse a las diferentes maneras de conseguir alimentos o a

diferentes necesidades debidas a las características propias de las masas de agua en cada sitio estudiado.

10.8 Conclusión

El análisis morfométrico pudo discriminar entre especies de los pejerreyes marinos más australes. Se observaron diferencias morfológicas significativas entre *O. nigricans* y *O. smitti* a través de la costa Atlántica. Esta diferencia se observó principalmente en la zona posterior (el pedúnculo caudal). El análisis morfométrico evidenció que en *O. nigricans* el pedúnculo es más largo y la zona anterior del cuerpo más angosta que en *O. smitti*.

A su vez, se observaron diferencias morfológicas en *O. nigricans* en las dos grandes áreas evaluadas en esta especie, la costa Atlántica y el Canal Beagle. Estas diferencias se basaron en el pedúnculo caudal, siendo más largo y angosto en el Canal.

En el Canal Beagle no se observaron diferencias morfológicas entre los individuos y en la costa Atlántica se observaron pequeñas diferencias en todos los sitios, distinguiéndose mayormente a Ma. Luisa del resto de los sitios.

En *O. smitti*, se diferenció notablemente a los sitios ubicados al norte, al centro y sur de la Patagonia, es decir, las dos poblaciones del norte (BR y LG) se diferencian igual que con la genética, de CR y de las poblaciones de Tierra del Fuego. Estas diferencias se observaron en la cabeza, evidenciando que, en la costa Atlántica, a latitudes menores la cabeza es mayor que a latitudes mayores.

Los resultados morfométricos mostraron un patrón de diferenciación entre poblaciones similar a los análisis genéticos poblacionales. En *O. nigricans* la morfometría geométrica permitió diferenciar a las poblaciones de CA y del CB de forma semejante a lo hallado a partir de la genética de poblaciones. De la misma manera los dos sitios del CB no presentaron diferencias morfológicas en concordancia con la falta de diferenciación genética. En cuanto a las poblaciones del CA se pudo diferenciar morfológicamente a la población de ML a diferencia de lo observado en los análisis genéticos. En *O. smitti*, tanto la morfometría geométrica como la genética poblacional diferenciaron a CR.

En *O. nigricans*, las diferencias morfológicas observadas, que estarían relacionadas con procesos sumamente importantes para la supervivencia y la reproducción de las especies como la alimentación y la natación, podrían ser indicadoras de especiación incipiente

Capítulo 3:

Histología

11. CAPÍTULO 3: HISTOLOGÍA

11.1 Introducción

Los peces viven y se desplazan en el agua, que es un medio más denso que el aire, lo que los condicionó a lo largo de la evolución, permitiéndoles sistemas musculares particulares, órganos específicos para flotar, entre otras características específicas. Para lograr desplazarse a través del agua los peces utilizan varios tipos diferentes de locomoción, que han sido clasificado de diversas maneras según las variables tenidas en cuenta en las clasificaciones. Por ejemplo, los tipos de locomoción pueden ser clasificados en dos grandes grupos según la parte del cuerpo que sea la principal responsable de la natación: locomoción de cuerpo y aleta caudal (BCF, por sus siglas en inglés de *body and/or caudal fin*) y locomoción de aletas medias y pectorales (MPF, por sus siglas en inglés de *median and paired fin*). La natación de tipo BCF utiliza ondulaciones del cuerpo que crean ondas que se extienden hacia la aleta caudal, la que a su vez también puede ondularse, permitiendo una mayor propulsión y aceleración. La locomoción de tipo MPF, se da por la oscilación de aletas (pectORALES, pélvicas, anales y dorsales) para propulsar al pez a través de la columna de agua y proporcionar una gran maniobrabilidad. Las diferentes especies pueden nadar principalmente con uno de estos tipos de locomoción, y en algunas de ellas incluso cambiar de acuerdo a la situación específica, por ejemplo, al movimiento MPF lo utilizan muchos peces para velocidades lentas, como especies herbívoras para alimentarse, pero por momentos se ven forzados a cambiar a BCF para escaparse de predadores. A este último tipo de natación la usan especies de nado rápido como las depredadoras. Tanto para la locomoción BCF como MPF se identificaron submodos de natación específicos, basados en el tipo de movimiento (oscilatorio u ondulatorio) empleados para la generación de empuje basado sobre la clasificación de Breder [164] (Figura 35). Algunos tipos de locomoción de los peces dentro del tipo de propulsión primario BCF, utilizado por cerca de un 85% de las familias de peces, son: Anguiliforme, Subcarangiforme, Carangiforme, Tuniforme y Ostraciforme. Dentro del tipo de propulsión MPF, utilizado por alrededor de un 15% de las familias de peces, se pueden encontrar: Balistiforme, Labriforme y Amiforme (Figura 35). Según las características temporales de los movimientos, la natación se ha clasificado en dos categorías genéricas [165]: 1) *Natación periódica (o constante o sostenida)*, caracterizada por una repetición cíclica de los movimientos propulsores. Los peces emplean la natación periódica para cubrir distancias largas a una velocidad constante. 2) *Movimientos transitorios (o inestables)*, que incluyen arranques rápidos, maniobras de escape

y giros. El movimiento transitorio es utilizado típicamente para atrapar presas o evitar depredadores [166].

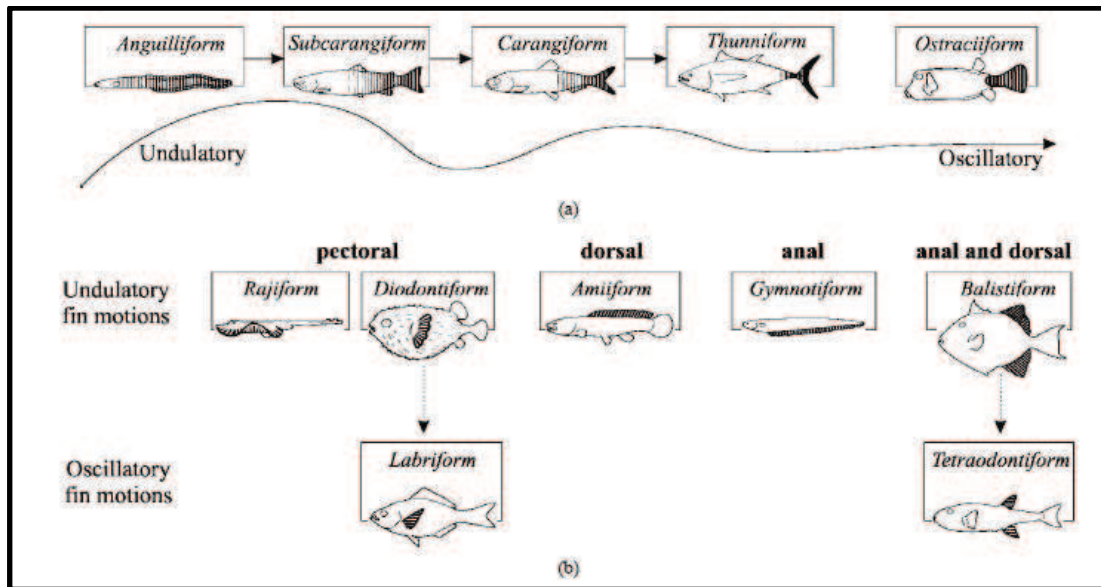


Figura 35. Modos de natación asociados con a) propulsión de BCF y b) propulsión de MPF. Las áreas sombreadas contribuyen a la generación de empuje (Modificado de Lindsey, 1978 [167]).

La oscilación del cuerpo y de la aleta caudal resulta de la contracción de la musculatura axial segmentada; es decir de la activación secuencial de los miótomos; los cuales están separados por las particiones del tejido conectivo (mioseptos) en los que se insertan las fibras musculares. Debido a que la columna vertebral es incompresible, el cuerpo se dobla lateralmente a medida que los miótomos (ubicados metaméricamente a ambos lados del cuerpo) en un lado se contraen y se acortan. Es decir, el tejido muscular es el responsable del movimiento, siendo la unidad funcional del músculo, la “fibra muscular”. Existen tres tipos musculares con distintas características estructurales, que se denominan: liso, cardíaco y esquelético o estriado, constituyendo este último la mayor parte de la musculatura de los vertebrados y el que resulta de interés para el presente estudio. El músculo esquelético de peces teleósteos consiste de largas láminas de músculo (miótomos) que se extienden a ambos lados del cuerpo (Figura 36).

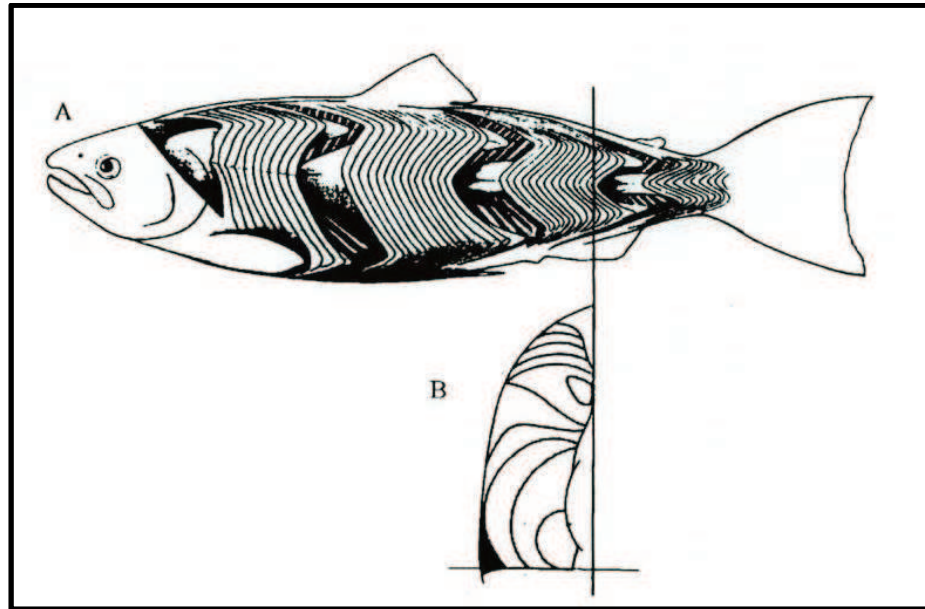


Figura 36. Imagen representando los fascículos musculares (Miótomos), dispuestos metaméricamente a ambos lados del cuerpo del pez. A) Vista lateral de los miótomos de un pez. B) Sección transversal tomada de la región caudal en la que se observa la disposición de los miótomos. Modificado de Videler (1993).

Las fibras musculares se disponen una al lado de la otra, actuando en paralelo. Se forman por la fusión de mioblastos dando lugar a miotubos que se diferencian finalmente en una fibra muscular. Las fibras musculares son células altamente especializadas, alargadas y multinucleadas, que se encuentran agrupadas en haces o fascículos rodeados por una capa de tejido conectivo. Están formadas por un gran número de miofibrillas, las que dan el aspecto estriado al músculo. Este aspecto se debe a que cada miofibrilla está formada por cierto número de miofilamentos compuestos mayormente por dos proteínas: actina (filamentos finos) y miosina (filamentos gruesos). El movimiento se realiza gracias al deslizamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina, en un complejo mecanismo que transforma energía química (ATP) en energía mecánica.

En peces se identificaron tres tipos de fibras musculares por su coloración característica en muestras de peces frescos: a) blancas (rápidas o anaeróbicas); b) rojas (lentas o aeróbicas); c) rosas (intermedias) [168]. La coloración está dada por la diferencia en la concentración de hemoglobina (molécula transportadora de oxígeno) que se corresponde con el tipo de metabolismo que lleva a cabo cada una de ellas [169,170]. Las fibras blancas/rápidas constituyen gran parte de la masa total del músculo estriado pudiendo representar más del 90% de la masa muscular dependiendo de la especie [171,172]. Las fibras rojas/lentas suelen

representar menos del 10% y no más del 30% de la masa muscular total [168]. Por lo tanto, el color de las fibras y la velocidad están en cierta medida vinculados a la historia de vida de los peces: tipo de natación, forma de alimentación, etc.

Durante la natación, los diferentes tipos de fibra presentan funciones diferentes. Las fibras musculares aeróbicas (rojas) están involucradas en los movimientos lentos y periódicos [169,173,174], mientras que las fibras anaeróbicas (blancas) están involucradas en los movimientos rápidos y son responsables del “inicio rápido” (fast start) de los movimientos instantáneos de la natación [175,176], implicados en huir de predadores y capturar presas [169,173,177]. Las fibras intermedias son requeridas para ambos tipos de movimiento [173].

En peces teleósteos, la musculatura constituye, en algunas especies hasta el 75% de la masa corporal y el crecimiento muscular se produce mediante dos procesos distintos: 1) Hiperplasia: incorporación de nuevas fibras musculares y 2) Hipertrofia: crecimiento en tamaño de las fibras existentes [178,179]. La hiperplasia es más importante durante estadios tempranos de desarrollo. El crecimiento por hipertrofia se logra gracias a la absorción de miocitos adicionales a las fibras musculares maduras en crecimiento, lo que posibilita mantener una relación relativa núcleo/citoplasma constante [180]. La importancia de los dos procesos (hiperplasia e hipertrofia) en cada una de las especies de peces son influenciados tanto por la historia evolutiva de la especie en cuestión como por limitantes ambientales [179,181]. En invierno, el crecimiento somático es siempre reducido, probablemente en respuesta a ciertas señales estacionales o condiciones fisiológicas específicas [182–184] o a la menor disponibilidad energética común en esa época del año generalmente por menor disponibilidad y/o ingesta de alimento. Existen estudios realizados en nuestro laboratorio con especies locales (*G. maculatus* y *E. maclovinus*) en las que se comprobó una mayor ingesta de alimentos durante el período que abarca fin de la primavera a fin del verano [185,186].

Obviamente en peces, la temperatura del agua influencia marcadamente las tasas de todos los procesos fisiológicos [187]. El rendimiento natatorio de los peces teleósteos depende entonces, en gran medida, de la temperatura. En otro trabajo del laboratorio se comprobó que el rendimiento natatorio de los arranques rápidos (fast-starts) de *E. maclovinus* aumenta significativamente con la temperatura [188]. La natación de los peces es evidentemente una característica importante directamente relacionada con el *fitness* de cada especie, ya que está directamente relacionada con los comportamientos de captura de alimento y escape de predadores. Una respuesta fenotípica que mejora la capacidad natatoria de los peces, y que se ha documentado tanto en peces que viven a distintas temperaturas como en peces aclimatados

a distintas temperaturas, es el incremento en la cantidad de mitocondrias en la musculatura [187,189,190].

Otro estudio de nuestro grupo de trabajo demostró, que las diferencias en celularidad (el número de células) de 16 especies de nototénidos antárticos y sub-antárticos tienen una clara señal filogenética, es decir que están significativamente relacionadas con el ordenamiento filogenético del suborden. En términos generales crecer más y más rápido mejoraría la supervivencia de los peces por lo que se esperaría encontrar un crecimiento más rápido en las poblaciones de menores latitudes, sin embargo, variaciones en sentido opuesto han sido descritas con anterioridad en Aterínidos del hemisferio Norte a lo largo de gradientes latitudinales similares al que encontramos en Patagonia [191] siendo explicadas como una compensación evolutiva a las temporadas más cortas de crecimiento. La ubicación geográfica (costas de Tierra del Fuego) de algunos de los sitios analizados en esta tesis de *O. nigricans* y *O. smitti*, hacen que tengan la temporada de crecimiento más corta respecto a las poblaciones de la misma especie ubicadas más al norte en el continente, pudiéndose generar potencialmente la misma adaptación evolutiva.

Las características generales de la musculatura del cuerpo en *O. nigricans* y *O. smitti* son similares, con una parte principal de fibras rápidas (blancas) (FMB) y una zona concentrada de fibras lentas (rojas) (FMR) junto con lípidos que constituyen la línea lateral plateada (LL) de estas especies (Figura 37).

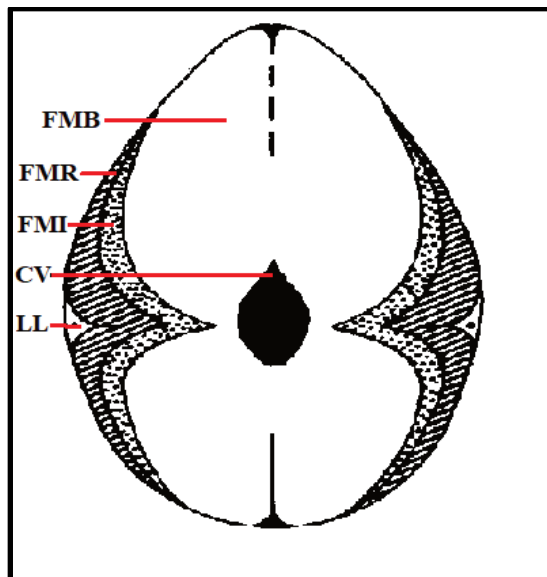


Figura 37. Sección transversal en el punto de máxima flexión. FMB: fibras musculares blancas; FMR: fibras musculares rojas; FMI: fibras musculares intermedias; CV: columna vertebral; LL: Línea lateral. (Modificada de Greer-Walker-1970 [192]).

11.2 Objetivo

Comparar el tamaño de las fibras musculares de la musculatura axial, responsable de la natación, en las distintas poblaciones de *O. nigricans* (costa Atlántica y Canal Beagle) y también en las poblaciones de *O. nigricans* y *O. smitti* en un sitio de la costa atlántica (Punta María).

Se conoce la existencia de diferencias de talla entre las especies alcanzando *O. smitti* tallas mayores que *O. nigricans*; pero se desconoce si la diferencia en las tallas finales observadas, se deben a la variación en la intensidad del proceso de hiperplasia (incorporación de nuevas fibras musculares) o de hipertrofia (crecimiento de las fibras musculares ya existentes) de las fibras musculares, por lo cual resulta interesante realizar este análisis.

11.3 Materiales y métodos

11.3.1 Obtención de muestras

Los ejemplares se capturaron en las costas de Tierra del Fuego argentinas en varias campañas utilizando diferentes artes de pesca, entre ellos: redes de enmalle agalleras, trasmallos y de arrastre costero, como se detalla en el capítulo 1. De la especie *O. nigricans* se obtuvieron individuos de 3 sitios de la costa Atlántica y de 2 sitios del Canal Beagle, mientras que de *O. smitti* sólo se obtuvieron ejemplares de un sitio de la costa Atlántica (Tabla 29) (Figura 5, Capítulo 1).

Tabla 29. Sitios de muestreo para el análisis de las fibras musculares.

	Área	Sitio	Coordenadas (Lat - Long)	Especie	
				<i>O. nigricans</i>	<i>O. smitti</i>
Tierra del Fuego	Costa Atlántica	San Sebastián (SS)	53°17'S, 68°26'O	6	
		Punta Popper (PP)	53°79'S, 67°67'O	6	
		Punta María (PM)	53°94'S, 67°49'O	6	6
		M. Luisa (ML)	54°28'S, 66°28'O	6	
	Canal Beagle	B. Varela (BV)	54°52'S, 67°16'O	6	No se encuentra
		B. Golondrina (BG)	54°50'S, 68°21'O	6	No se encuentra

Las medidas de largo y peso promedio de los individuos utilizados para los objetivos se encuentran detalladas en la siguiente tabla, diferenciando a los individuos de ambas especies en el sitio de PM y de la CA y del CB de *O. nigricans* (Tabla 30).

Tabla 30. Datos de los distintos ejemplares estudiados

	Área	Sitio	Largo Total promedio (cm)	Largo Estándar promedio (cm)	Peso promedio (g)	Especie
TDF	Costa Atlántica	San Sebastián	20.78	18.17	66.71	<i>O. nigricans</i>
		Punta María	21.8	19.32	82.67	<i>O. nigricans</i>
		M. Luisa	23.11	21.35	90.19	<i>O. nigricans</i>
		Promedio CA	21.89	19.61	79.86	<i>O. nigricans</i>
		Punta María	22.87	20.68	85.02	<i>O. smitti</i>
	Canal Beagle	B. Varela	20.55	17.99	50.82	<i>O. nigricans</i>
		B. Golondrina	18.57	16.16	42.05	<i>O. nigricans</i>
		Promedio CB	19.56	17.08	46.44	<i>O. nigricans</i>

11.3.2 Procesado de las muestras

Luego que los peces fueron recolectados y trasladados al laboratorio, cada individuo fue medido y pesado como se detalla en el capítulo 1. Para el análisis de la musculatura axial se cortó una sección transversal de aproximadamente 0.5 cm de ancho del músculo al 75% de la longitud total del pez (3/4 de la longitud total), distancia medida desde el hocico hacia el pedúnculo caudal (Figura 38). Posteriormente ¼ de las secciones de músculo fueron montadas en un corcho utilizando un medio de montaje (Mounting meddium, Biohit Oyj) de modo que las fibras musculares queden orientadas de forma perpendicular a la base. Una vez montados los preparados fueron envueltos en papel aluminio para evitar desecación y fijadas en nitrógeno líquido. Posteriormente, se almacenaron en freezer a -80° C previo a su corte. Los cortes histológicos de 7 a 10 µm de espesor se realizaron en un criostato (Bright modelo OFT) y se montaron en portaobjetos “superfrost” para evitar la pérdida de los cortes durante los lavados y tinción.



Figura 38. Representación del corte transversal de un pez a una longitud de 0,75 x Lt a partir de la cabeza, en la toma de muestra de músculo.

Tinción Hematoxilina - Eosina

A los cortes histológicos obtenidos se los tiñó con la técnica hematoxilina - eosina siguiendo un protocolo estándar del laboratorio (Tabla 31). Sobre estos preparados se realizó la medición y cuantificación de las fibras musculares. Para ello se digitalizaron imágenes de los diferentes cortes teñidos.

Tabla 31. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Compuesto	Tiempo
Alcohol 96% (90%) – Formol (10%)	3 minutos
Agua destilada	3 minutos
Hematoxilina	1 minuto
Agua corriente	10 minutos
Agua destilada	3 minutos
Eosina	Lavado rápido
Alcohol 96 %	3 minutos
Alcohol 100 % (I)	3 minutos
Alcohol 100% (II)	3 minutos
Alcohol 100% (50%) – Xilol (50%)	3 minutos
Xilol	3 minutos
Bálsamo de Canadá	

11.3.3 Digitalización de imágenes

Los preparados histológicos se fotografiaron con una cámara unida a un microscopio óptico binocular (Carl Zeiss), mediante el programa Photoimpact. Se tomaron alrededor de 15

imágenes consecutivas de cada corte con una objetiva de 20X, recorriendo el cuarto de la sección de músculo. Con las imágenes digitalizadas, se midió el perímetro, el área y el diámetro de las fibras musculares utilizando el software Image Pro-Plus 5.0. (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), delineando manualmente todas las fibras que incluía cada imagen (Figura 38). De cada foto se midieron aproximadamente 20 fibras, hasta llegar a un total de entre 250 y 550 fibras por ejemplar, dependiendo de la muestra. La calibración espacial del sistema fue realizada utilizando imágenes tomadas del microscopio de un portaobjeto graduado Stage micrometer P/N KR-812 (25mm).

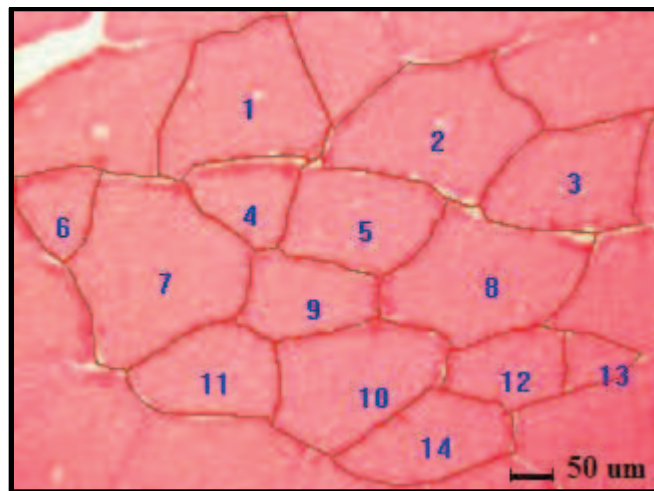


Figura 39. Delimitación del perímetro de las fibras musculares (líneas rojas) en una imagen digitalizada de un corte histológico del músculo de *O. nigricans*. Magnificación: 20X.

11.3.4 Análisis estadísticos

Tamaño de fibras musculares

Las características de las fibras rápidas/blancas fueron medidas en un cuarto de sección histológica (área de sección transversal) y grabadas en una planilla de cálculo (Excel) usando el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Inicialmente, para comparar la distribución de diámetros, áreas y perímetros de las fibras musculares se calculó el promedio de las mismas (Tabla 32) para luego realizar una comparación más completa a partir del análisis de distribuciones de frecuencias. Las distribuciones de frecuencias sólo se realizaron en base al diámetro. Los valores fueron calculados para cada sitio de *O. nigricans* (un total de cinco sitios: tres representando a la CA y dos representando al CB) y también para cada especie en el caso de Pta. María. En cada sitio se evaluaron seis ejemplares.

Para la comparación de las distribuciones de frecuencias se utilizaron técnicas estadísticas no paramétricas ajustando las distribuciones de frecuencias a funciones de densidad de probabilidad suavizada (PDF) [178], utilizando software escrito con lenguaje R, modificado por el Dr. Luciano Selzer, del original brindado generosamente por el Dr. Ian Johnston (Universidad de St. Andrews, Escocia). Para cada individuo se calculó el parámetro suavizado h . La banda de variabilidad de la función PDF es una alternativa a la banda de confianza y se aproximó utilizando técnicas de bootstrap, siendo el área sombreada el área máxima creada por 100 bootstrap de estimaciones de densidad. Las técnicas de bootstrap fueron usadas para distinguir la estructura subyacente de distribución de variación aleatoria, y la banda de variabilidad debe ser interpretada como una banda de confianza. El test de Kolmogorov-Smirnov de dos colas se usó como prueba estadística para probar la hipótesis nula de que la función de densidad de probabilidad obtenida de cada especie en un caso, o de las distintas poblaciones de *O. nigricans* en el otro, eran iguales entre sí para todos los diámetros con un $p < 0.05$.

11.4 Resultados

O. nigricans y *O. smitti*

La tinción H - E mostró al músculo esquelético blanco con fibras musculares poligonales separadas por tabiques finos de tejido conectivo y septos más gruesos del mismo tejido separando las fibras musculares en fascículos. La distribución de tamaños de las fibras musculares en las especies analizadas fue diferente. En *O. nigricans* se observó un patrón de fibras bastante uniforme y en *O. smitti* un patrón de mosaico, donde se vieron dos tamaños diferentes (fibras pequeñas mezcladas con fibras grandes) (Figura 40).

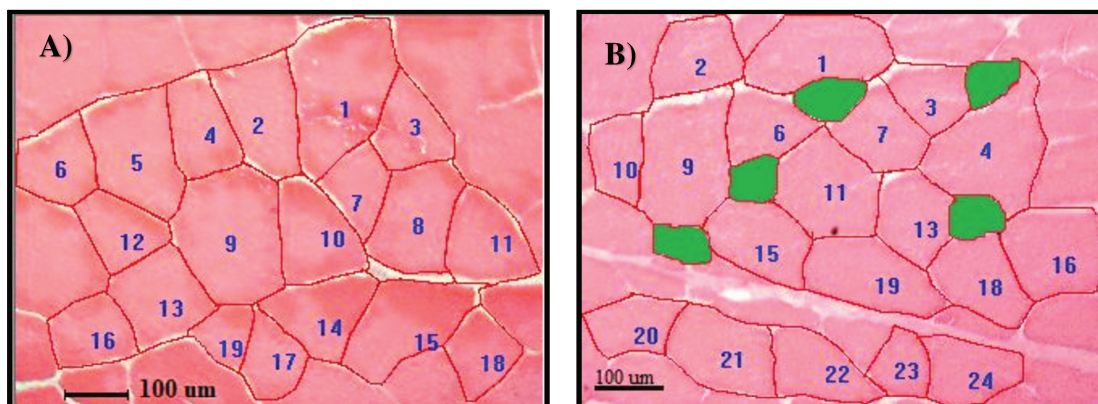


Figura 40. Corte histológico teñido con H – E, donde se distingue la disposición, forma y tamaño de las fibras musculares blancas. A) *O. nigricans* B) *O. smitti*, observándose en esta especie un patrón de mosaico con dos diámetros diferentes de fibras musculares, compuesto de fibras pequeñas (verdes) entre fibras grandes. Magnificación: 20 X.

En la tabla 32 se resumen los valores promedio del área, diámetro y perímetro de las fibras rápidas medidas con el software Image Pro-plus de cada sitio de muestreo y especie con el peso promedio de cada sitio de los individuos utilizados para los análisis.

Tabla 32. Datos de cuantificación de las fibras blancas de los diferentes sitios.

Área	Sitio	A (µm)	D (µm)	P (µm)	P (g)	Especie
Costa Atlántica	SS	12715.27 +/- 25170.53	109.11 +/- 57.35	430.66 +/- 224.10	66.71 +/- 12.44	<i>O. nigricans</i>
	PM	16600.53 +/- 7847.64	137.08 +/- 33.23	553.36 +/- 141.66	91.89 +/- 20.62	<i>O. nigricans</i>
	ML	11013.43 +/-5573.66	110.75 +/- 28.66	438.49 +/- 122.76	90.19 +/- 17.54	<i>O. nigricans</i>
	Promedio	13627.54 +/- 3170.27	119.74 +/- 17.01	474.6 +/- 69.51	79.86 +/- 11.2	<i>O. nigricans</i>
	PM (D ≤ 60)	2449.63 +/- 453.88	53.93 +/- 6.04	212.91 +/- 25.71	85.02 +/- 8.49	<i>O. smitti</i>
	PM (D > 60)	10616.38 +/- 5540.79	110.66 +/- 60.65	424.25 +/- 114.07	85.02 +/- 8.49	<i>O. smitti</i>
Canal Beagle	BG	8268.49 +/- 14077.09	90.02 +/- 38.85	377.01 +/- 166.69	42.05 +/- 11.73	<i>O. nigricans</i>
	BV	6507.19 +/-3947.10	84.05 +/- 25.76	333.16 +/- 103.04	50.82 +/- 9.30	<i>O. nigricans</i>
	Promedio	7387.84 +/- 1245.43	87.04 +/- 4.22	355.09 +/- 31.00	46.44 +/- 6.20	<i>O. nigricans</i>

A: Promedio de área de fibra (µm²). D: Promedio del diámetro de fibra (µm); P: Promedio del perímetro de fibra (µm); **P**: Peso promedio de los individuos de cada sitio (g); n: número de muestras = individuos por sitio.

Tamaño de la fibra muscular (Distribución del diámetro de fibra muscular)

O. nigricans* y *O. smitti

Para cada individuo se calculó el parámetro de suavizado h obteniendo valores que variaron entre 0,0582 a 0,102. La función de densidad de probabilidad (PDF) del diámetro de las fibras musculares estimada para cada especie en el sitio de PM evidenció diferencias. Las PDF obtenidas muestran dos picos (modas) en *O. smitti* y un pico a *O. nigricans* (Figura 41) y además las modas están desplazadas a lo largo del eje diámetro (en micras). Es decir que la forma de la función de *O. nigricans* es unimodal (Figura 41 - A) indicando un tamaño de fibras aproximadamente de 110 μm (correspondiente a la mayor de las modas) y la de *O. smitti* es bimodal (Figura 41 - B) distinguiéndose dos tamaños de diámetro de fibra predominantes (60 y 110 μm). En *O. nigricans* el diámetro máximo de fibra fue cercano a 220 μm y en *O. smitti* mayor a 200 μm .

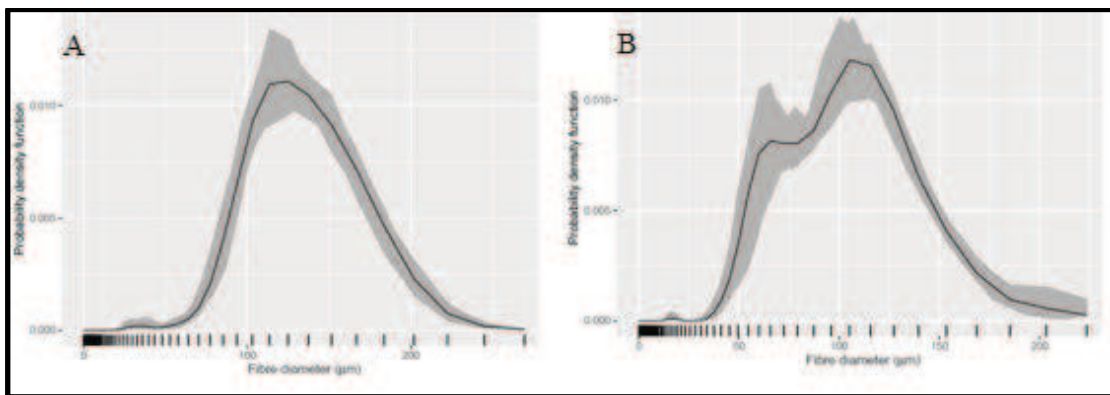


Figura 41. Valor promedio (línea negra) y banda de variabilidad (área sombreada gris) de la función de densidad de probabilidad del diámetro de la fibra muscular de cada especie: A) *O. nigricans* B) *O. smitti*. $n = 6$ individuos por especie. La banda de variabilidad debería ser interpretada como una banda de confianza.

El test de Kolmogorov-Smirnov aplicado a las PDF de fibras musculares indicó diferencias significativas entre las dos especies (Figura 43).

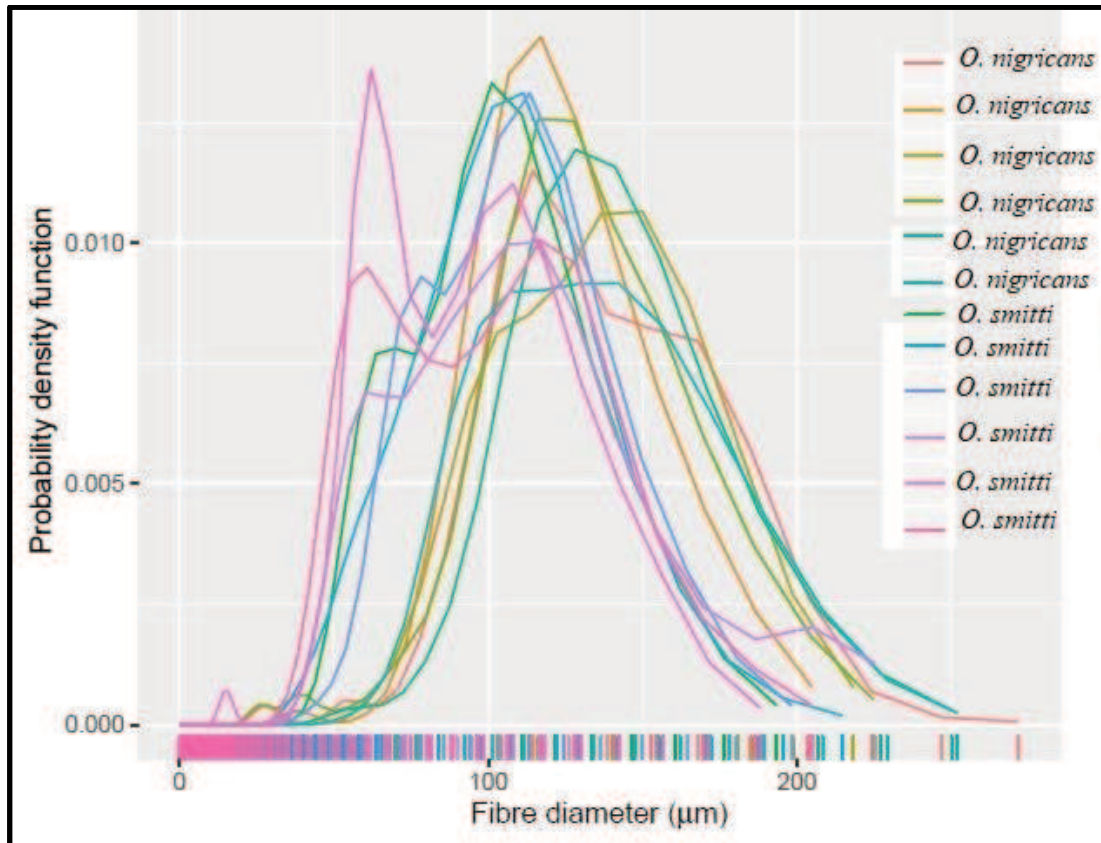


Figura 42. Función de densidad de probabilidad (PDF) correspondiente al diámetro de las fibras de ambas especies en 6 ejemplares de cada una, pertenecientes al sitio de Pta. María. Cada línea de color representa al promedio de la PDF de cada ejemplar.

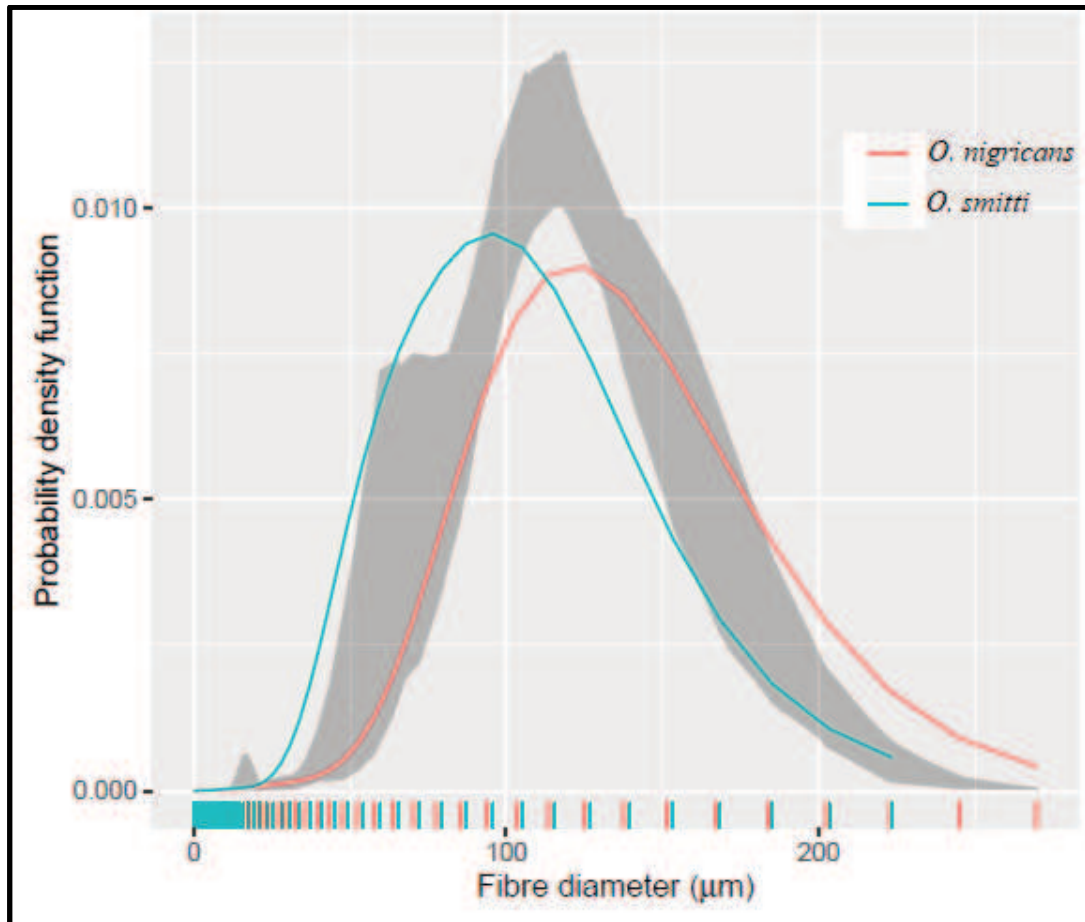


Figura 43. Banda de referencia (área sombreada) representando la variabilidad de las funciones de densidad de probabilidad (PDF) combinadas del diámetro de las fibras musculares de *O. nigricans* (rojo) y de *O. smitti* (celeste) en el análisis con $n = 6$ en cada especie. La banda de variabilidad debería ser interpretada como una banda de confianza.

O. nigricans

La función de densidad de probabilidad (PDF) del diámetro de las fibras musculares estimada para cada individuo de *O. nigricans* estudiado presentó cierta variabilidad, aunque los formatos de las curvas son semejantes (Figura 44). De 5516 fibras cuantificadas en la CA, sólo 15 valores fueron menores a 20 μm (8 en SS, 3 en PM Y 4 en ML). En el CB se cuantificaron 4041 fibras, de las cuales sólo 7 son menores a 20 μm (5 de BV Y 2 de BG) lo cual es consistente con el cese del reclutamiento de nuevas fibras musculares (cese del proceso de hiperplasia).

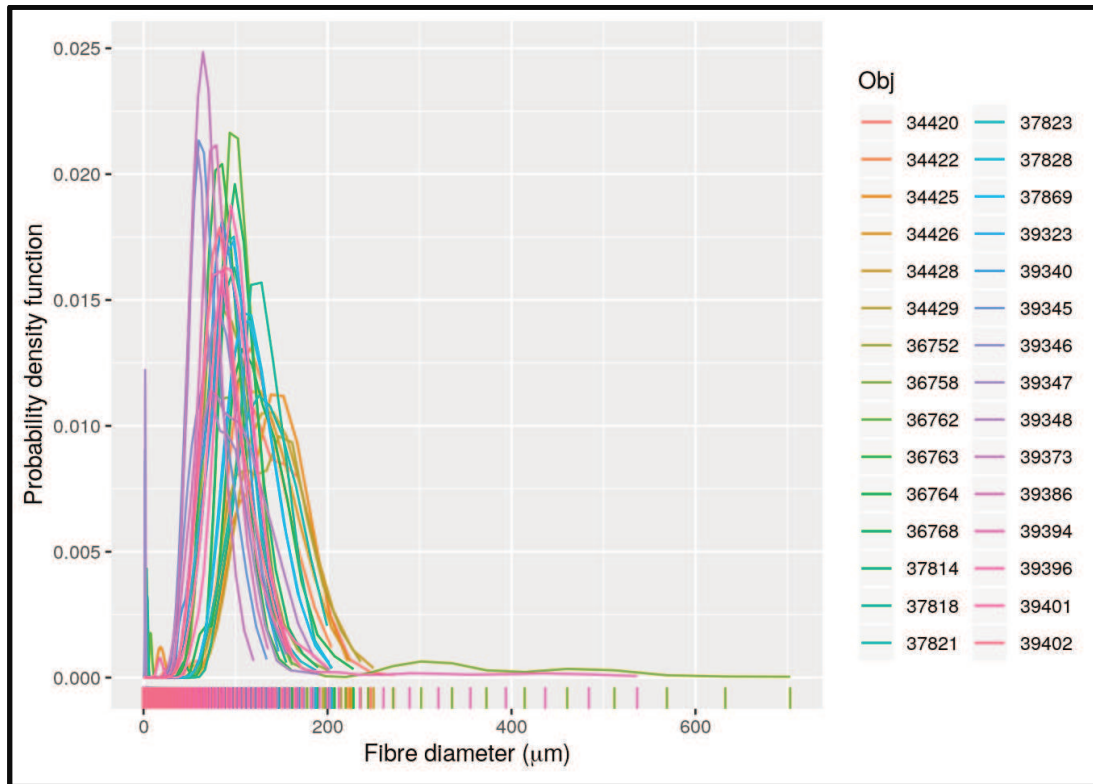
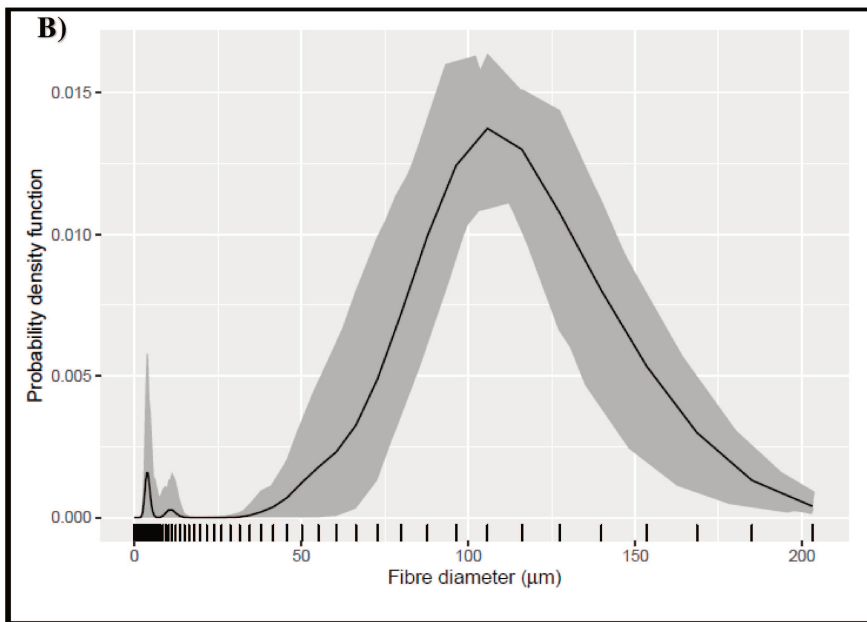
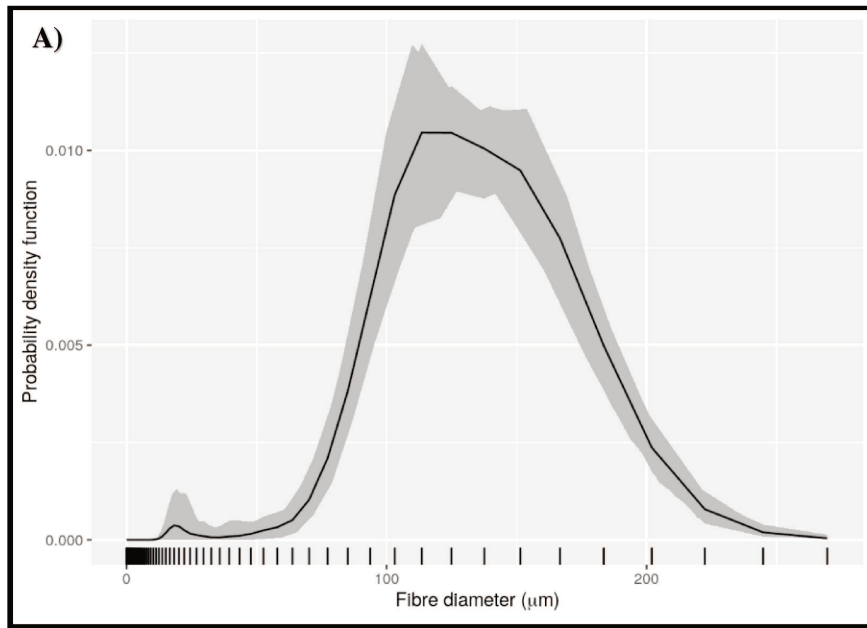
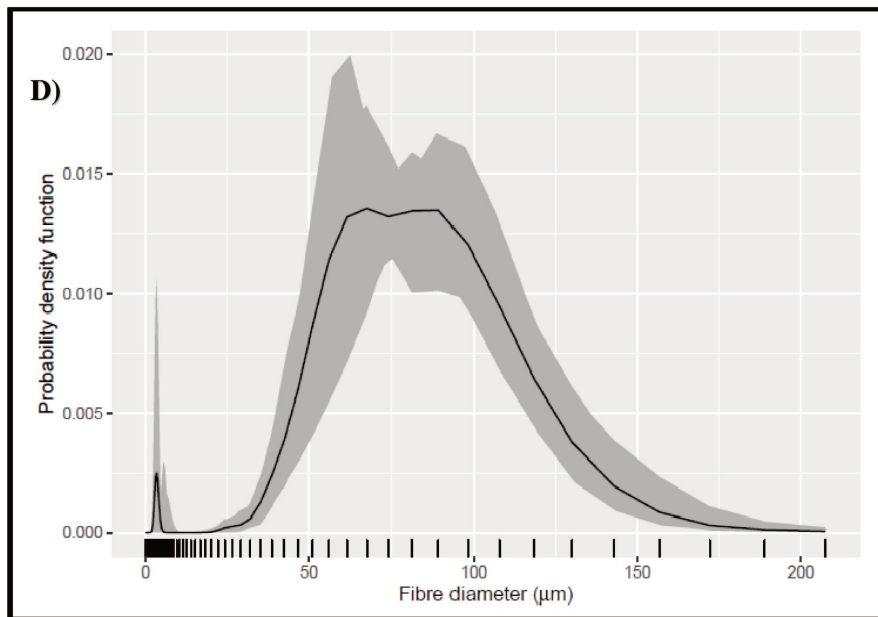
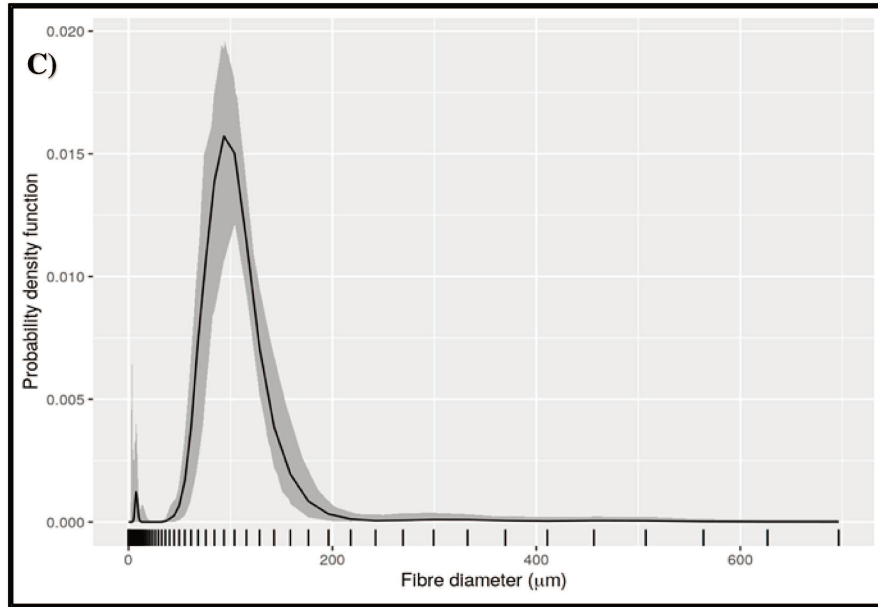


Figura 44. Función de densidad de probabilidad (PDF) correspondiente al diámetro de las fibras de *O. nigricans* de todos los individuos muestreados. Cada línea de color representa la PDF de cada ejemplar.

Los gráficos de las funciones de densidad de probabilidades agrupados por población muestran un patrón general común, más allá de ciertas diferencias por sitio. Se observa un patrón unimodal con un tamaño de fibras un poco menores en el CB que en la CA (Figura 45).





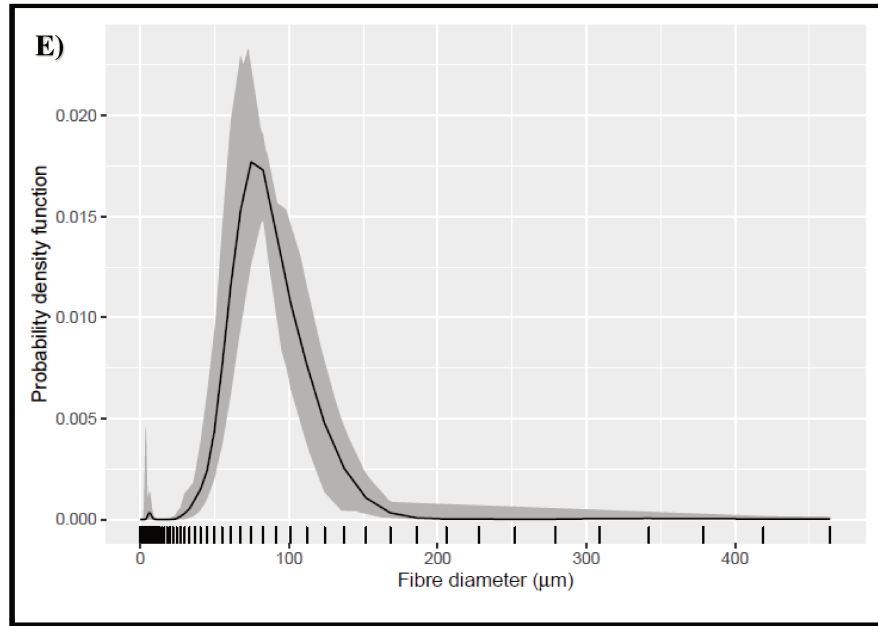


Figura 45. Valor promedio (línea negra) y banda de variabilidad (área sombreada gris) de la función de densidad de probabilidad del diámetro de la fibra muscular en cada sitio de análisis de *O. nigricans*: A) PM B) ML C) SS D) BV y E) BG. La banda de variabilidad debería ser interpretada como una banda de confianza.

Con el test Kolgomorov-Smirnov se constata que las diferencias observadas en las distribuciones de algunos sitios son significativas (Figura 46, Tabla 33). Se puede distinguir que las fibras musculares de los sitios del CB (BV y BG) se diferencian de las de la CA (PM y ML) pero no de SS que muestra un diámetro de fibra intermedio entre las dos áreas (CB y CA).

Tabla 33. Valores p de la salida del análisis Kolmogorov-Smirnov

Sitios	p
BG-BV	0.782
BG-ML	0.049
BG-PM	0.009
BG-SS	0.109
BV-ML	0.049
BV-PM	0.019
BV-SS	0.139
ML-PM	0.109
ML-SS	0.327
PM-SS	0.029

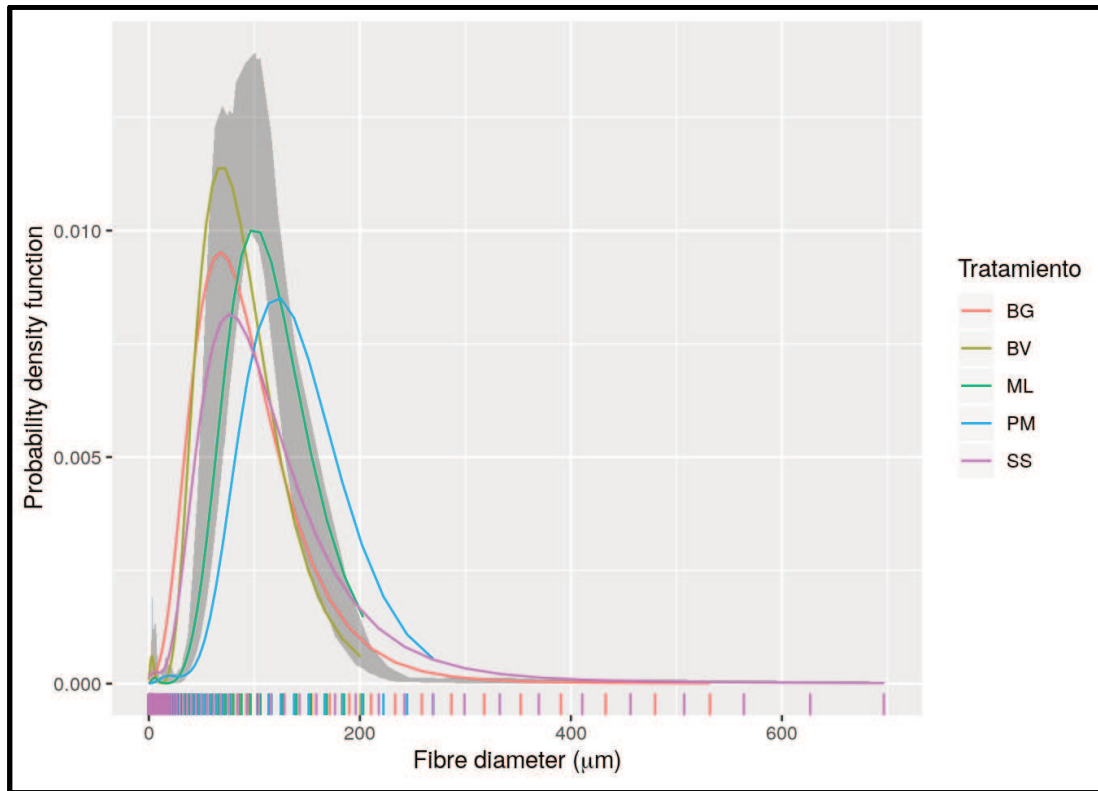


Figura 46. Banda de referencia (área sombreada) representando la variabilidad de las funciones de densidad de probabilidad (PDF) combinadas del diámetro de las fibras musculares de todos los sitios de *O. nigricans* con $n=6$ en por sitio. La banda de variabilidad debería ser interpretada como una banda de confianza. SS = San Sebastián. PM = Pta. María. ML = M. Luisa. BG = B. Golondrina. BV = B. Varela.

11.5 Discusión

El análisis de éste capítulo es una primera aproximación al estudio de la musculatura axial de *O. nigricans* y *O. smitti*.

O. nigricans y *O. smitti*

En *O. nigricans* las secciones de la musculatura axial (1/4) teñidas con H-E muestran un patrón uniforme, con fibras blancas de forma y tamaño similar (Figura 40 - A) indicando que han dejado de incorporar fibras hace bastante tiempo. A diferencia, en *O. smitti*, se observan dos tamaños de fibra, uno mayor y otro menor, confiriendo un aspecto morfológico

de mosaico de crecimiento hiperplásico (Figura 40 - B), denominado comúnmente “crecimiento en mosaico” [179], que indica que hubo al menos dos momentos de generación de fibras musculares siendo las fibras más pequeñas el resabio del último proceso de hiperplasia.

La comparación del diámetro de las fibras musculares de ambas especies en el mismo ambiente a partir de la distribución de frecuencias permitió analizar con más profundidad estas diferencias. En el caso de *O. nigricans* se observa una única moda en la gráfica de la PDF correspondiente al tamaño de 120 μm de diámetro de fibra. En el caso de *O. smitti* se observa una moda semejante, de 110 μm de diámetro de fibra, y otra de alrededor de 60 μm de diámetro de fibra. Como las fibras musculares tienen un límite en el tamaño que pueden alcanzar, los ejemplares de *O. nigricans* analizados tendrán una talla máxima más limitada que los de *O. smitti* en los que las fibras de moda 60 μm de diámetro tienen todavía mucho por crecer. Por tanto, para las tallas de peces analizadas en ambas especies el crecimiento principal es por hipertrofia, ya que no se observa una cantidad importante de fibras menores a 20 μm de diámetro, pero la presencia de una segunda moda de menor tamaño de fibra (60 μm) en *O. smitti* permitirá un mayor crecimiento en esta especie.

Algo similar a lo observado en las imágenes de los cortes de *O. smitti* se observó en la musculatura blanca de otras especies, como en los peces subantárticos *E. maclovinus* [188] y algunos salmónidos, como las truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) [193–195], las cuales adquirieron un aspecto de mosaico con fibras grandes y pequeñas intercaladas. El mosaico hiperplásico observado en los cortes histológicos se observa claramente en la PDF dada en *O. smitti*, siendo una característica predominante en peces que alcanzan una gran talla final, pudiendo concluir en base a los resultados del tamaño de fibras musculares que *O. smitti* llegaría a tallas finales mayores que *O. nigricans*, lo cual concuerda con la bibliografía [11,49–51,196].

O. nigricans

Los resultados indican que todas las poblaciones analizadas presentan una distribución unimodal de diámetros de fibras musculares. En los sitios del CB (BG y BV) las modas presentaron valores cercanos a los 80 μm . Ambos sitios poseen una distribución similar al sitio SS de la CA donde los individuos tuvieron una moda de PDF de aproximadamente 90 μm de diámetro de las fibras musculares. En los otros dos sitios de la CA analizados, las PDF mostraron una moda en el diámetro de las fibras musculares blancas de 120 μm . En todos los

casos no se observan proporciones importantes de fibras menores a 20 micras de diámetro, por tanto, podemos concluir que el crecimiento de la musculatura axial, en las tallas analizadas, para todos los sitios se debe exclusivamente a la hipertrofia de las fibras ya existentes. El patrón de crecimiento de todas las poblaciones de esta especie es similar, aunque se observan diferencias en el diámetro de las fibras entre las poblaciones del CB y de la CA.

El pico máximo de la PDF correspondiente diámetro de fibra muscular de mayor frecuencia en la CA (120 μm) es un valor similar al encontrado en individuos *E. maclovinus*, pero de mayor longitud (entre 50 y 60 cm de longitud total) [188], de todas maneras, es difícil establecer comparaciones entre especies no relacionadas filogenéticamente, aunque compartan el mismo hábitat. Para otras especies marinas, como por ejemplo en el salmón Atlántico (*Salmo salar*) los diámetros máximos fueron aproximadamente 240 μm con un Ls de 50 cm [197] similar o cercanos a los valores obtenidos en nuestros análisis. En otro pez marino lisa o *Crenimugil labrosus* se reportaron diámetros medios de fibras blancas de 100 μm [168], similar a los valores del CB y SS.

El bajo número de individuos utilizados para el experimento nos llevó a ser cautelosos al interpretar los resultados obtenidos en el presente estudio y la decisión de realizar estudios futuros con un mayor número de individuos y diferentes tallas para poder establecer con precisión la talla de finalización del proceso de hiperplasia muscular.

Los estudios de tamaño de fibras musculares en peces del extremo sur de América son escasos. En nuestro laboratorio se realizaron algunos estudios en nototénidos subantárticos, donde se ha caracterizado la musculatura axial de siete especies determinando la presencia de los mismos tipos de fibras musculares existentes en la musculatura axial de otros peces teleosteos: fibras de pequeño diámetro, rojas, intermedias y blancas [188]. Algo similar a lo observado en *O. nigricans* se observó en *Galaxias maculatus*, una especie de agua dulce, donde el crecimiento hiperplásico fue completado antes de que el puyen alcance 65 mm de longitud total, y el cese de la hiperplasia se correlacionó con la transición de la etapa juvenil a adulta [198].

11.6 Conclusión

La musculatura axial de las dos especies de pejerreyes ha sido muestreada en las poblaciones del O. Atlántico Sur y del Canal Beagle en Tierra del Fuego.

Las secciones de la musculatura axial en *O. nigricans* muestran un patrón uniforme, con fibras blancas de forma y tamaño similar y en *O. smitti*, el corte transversal de la

musculatura axial muestra un aspecto de mosaico, con fibras de pequeño y gran diámetro intercaladas.

Correspondiéndose con la observación general de los cortes musculares, la función de densidad de probabilidad en *O. nigricans* es unimodal con un pico a los 120 μm de diámetro de fibra y en *O. smitti* es bimodal con el primer pico a los 60 μm y el segundo a los 110 μm . Es decir que si bien los valores de diámetros de las fibras musculares indican que el crecimiento en ambas especies es por hipertrofia (no se observa una cantidad importante de fibras menores a 20 μm de diámetro) la presencia de una segunda moda en *O. smitti* indica que la hiperplasia ocurrió más recientemente y que la existencia de estas fibras de menor tamaño permitirá un mayor crecimiento en esta especie.

En ambos casos, no se encontraron proporciones importantes de nuevas fibras musculares (considerando como nuevas las de diámetros menores a 20 μm)

En *O. nigricans* se observó diferencia en los diámetros de fibras musculares de los sitios que representan a la CA y de los sitios del CB, pero el patrón de crecimiento fue el mismo, con modas únicas. Las diferencias de tamaño, si bien significativas, no son tan grandes y en parte podría explicarse por diferencias en las tallas de los ejemplares analizados.

Conclusiones Generales

12. CONCLUSIONES GENERALES

La combinación de la evaluación genética y fenotípica realizada en diferentes poblaciones de *O. nigricans* y *O. smitti* de la costa Atlántica de la Patagonia y además, en el caso de *O. nigricans*, del Canal Beagle arrojó diferencias importantes y mayormente resultados concordantes que permiten profundizar en la comprensión de diversas características de las historias de vida y la evolución de estas especies.

El análisis genético realizado mediante las herramientas de la genética de poblaciones utilizando un marcador mitocondrial de la región de control (ADNmt) logró caracterizar los principales patrones de variación genética en ambas especies a lo largo de gran parte de sus amplias distribuciones.

- En *O. nigricans* se observó un pronunciado quiebre filogeográfico en el Canal Beagle mostrando dos grupos bien diferenciados: la costa atlántica de Patagonia (CA) y el Canal Beagle (CB). Este patrón fue apoyado por los análisis de SAMOVA, la relación de F_{st} vs. distancia geográfica y el análisis filogenético.
- La población del Canal Beagle (BV y BG) es más reciente que las de la CA, habiéndose originado alrededor de hace 20.000 años AP, luego de la última glaciación; teniendo en cuenta la diversidad genética (menor en el CB que en la CA) y el resultado del BSP.
- Los análisis demográficos muestran claros signos de expansión poblacional reciente en *O. nigricans* del Canal Beagle.
- A lo largo de la CA no se observó estructura genética en *O. nigricans* y en *O. smitti* fue moderada entre el norte de la Patagonia y el sur, lo que indicaría que el flujo génico entre las localidades de ambas especies sería suficiente para mantenerlas conectadas.
- El BSP indicaría una expansión poblacional mientras que las distribuciones mismatch y la red de haplotipos, indicarían que las poblaciones de *O. smitti* son estables demográficamente, y la antigüedad de las mismas sería similar a lo largo de la CA.

- Probablemente existe un equilibrio entre flujo de genes y deriva genética en la CA.

En la evaluación fenotípica realizada mediante Morfometría geométrica utilizando *landmarks* se obtuvo una importante diferenciación en la morfología corporal, tanto entre especies como entre las poblaciones estudiadas de las dos especies.

- En la comparación de especies, los resultados confirman la bibliografía de Dyer [48,52] y realizan también nuevos aportes a la diferenciación de las mismas. Concordando con Dyer: en *O. nigricans* la inserción de la primera aleta dorsal se encuentra en la misma línea de la aleta pélvica y el último radio de la segunda aleta dorsal coincide con el final de la aleta anal mientras que en *O. smitti* la primera aleta dorsal se ubica posterior o sobre el extremo posterior de las aletas pélvica y el último radio de la segunda dorsal se ubica por encima del último radio de la aleta anal. Pero también los resultados agregan información que discrimina a las especies por la morfología de la zona posterior del cuerpo, donde se observó pedúnculo caudal más largo y angosto en *O. nigricans* que en *O. smitti*, lo que podría estar indicando una mayor capacidad de natación.

- Dentro de *O. nigricans* los resultados muestran diferencias entre las poblaciones de CA y CB, de forma similar a los resultados de genética. La diferencia se centra en la zona caudal. Además, a lo largo de la CA se diferencia morfológicamente la población de ML.

- En el CB, los dos sitios analizados (BG y BV) no muestran notables diferencias morfológicas al igual que lo mostró la genética.

- En *O. smitti* las dos poblaciones del norte se diferencian, al igual que con la genética, de CR y de las poblaciones de Tierra del Fuego. Las diferencias se observaron en la cabeza, evidenciando que en la CA, a latitudes menores la cabeza es mayor que a latitudes mayores.

- En *O. nigricans*, las diferencias morfológicas observadas, sumadas a los grandes valores de FST reportados, podrían ser indicadoras de especiación incipiente, ya que estarían relacionadas con procesos sumamente importantes para la supervivencia y la reproducción de las especies como la alimentación y la natación.

La evaluación fenotípica realizada en la musculatura axial de los peces mediante el tamaño de las fibras musculares permitió distinguir diferencias tanto entre especies como entre poblaciones de *O. nigricans*.

- *O. nigricans* mostró un patrón uniforme, con fibras blancas de forma y tamaño similar y *O. smitti* mostró aspecto morfológico de mosaico con fibras de diámetros pequeños y grandes intercaladas.

- En ambas especies el crecimiento en las tallas analizadas es casi exclusivamente por hipertrofia.

- El patrón de crecimiento observado en *O. smitti*, con un segundo momento de hiperplasia que no se observa en *O. nigricans* le permitirá un mayor crecimiento a esta especie, lo que implicaría tallas finales mayores.

- En *O. nigricans* se observó diferencia en los diámetros de fibras musculares de las distintas poblaciones que representan a la CA y al CB.

Al analizar estos resultados en su conjunto, en *O. nigricans* se puede observar una estructuración genética y diferenciación morfológica entre las muestras provenientes del Canal Beagle por un lado y de la costa Atlántica por el otro lado, sugiriendo que el Canal Beagle es una barrera física al flujo de genes. El alto grado de diferenciación genética junto con las diferencias morfológicas permiten concluir que los individuos de *O. nigricans* de la costa Atlántica y el Canal Beagle no solamente pertenecen a diferentes poblaciones, sino que se encontrarían en un proceso de especiación incipiente.

En *O. smitti* los resultados también concuerdan con una diferenciación tanto genética como morfológica entre la costa Atlántica continental y la costa de Tierra del Fuego, aunque la diferenciación genética es menos marcada. En cuando al Canal Beagle, el mismo constituye una barrera aún más importante para esta especie, porque sólo muy eventualmente se encuentran individuos de esta especie en aguas del canal.

Los resultados presentados aportan al conocimiento biológico de *O. nigricans* y *O. smitti* a lo largo de las extensas aguas del O. Atlántico Sur en Argentina, y evidencian la necesidad de realización de más investigaciones en estas especies.

Bibliografía

13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] JO Codignotto (1997) Geomorfología y dinámica costera, En: *El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros. Tomo 1. Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales*, (1)89-105.
- [2] LB Beheregaray, P Sunnucks, D a Briscoe (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc Biol Sci* 269 (1486):65-73.
- [3] LB Beheregaray, P Sunnucks (2001) Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Mol Ecol* 10 (12):2849-2866.
- [4] SG Ceballos, EP Lessa, MF Victorio, DA Fernández (2012) Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: Evidence of population expansion. *Mar Biol* 159 (3):499-505.
- [5] VG Colombo, V Romea (2006) Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*:4499-4511.
- [6] DE Ruzzante, SJ Walde, VE Cussac, ML Dalebout, J Seibert, S Ortubay, E Habit (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: Roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Mol Ecol* 15 (10):2949-2968.
- [7] V Angelescu, R Sánchez (1997) Exploraciones Oceanográficas y Pesqueras en el Mar Argentino y la región adyacente del Atlántico Sudoccidental (1874-1993), En: *El mar Argentino y sus recursos pesqueros*, (Ed: E Boschi), Inst. Nac., Mar del Plata: 11-64.
- [8] AR Piola, V Falabella (2009) El mar patagónico In: *Atlas del Mar Patagónico: especies y espacios*. Wildlife Conservation Society y Birdlife Internacional. Buenos Aires: .
- [9] Comisión Nacional del Límite Exterior de la Plataforma Continental (2017) *El margen continental argentino*. 53. (9). Buenos Aires: .
- [10] AR Piola, AL Rivas (1997) Corrientes en la plataforma continental, En: *El mar argentino y sus recursos pesqueros*, (Ed: E Boschi), Inst. Nac., Mar del Plata: 119-132.

- [11] AH Orsi, T Whitworth, WD Nowlin (1995) On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Res Part I* 42 (5):641-673.
- [12] MPM Reddy (2001) Descriptive physical oceanography. The Nether. Oxford: A. A. Balkema, p. .
- [13] RA Guerrero, AR Piola (1997) Masas de agua en la plataforma continental. *El mar Argentino y sus Recur Pesq* 1:107-118.
- [14] GJ Macchi, ME Acha (1998) Aspectos reproductivos de las principales especies de peces en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay y en El Rincón. Informe Técnico N°21.
- [15] LML Scasso, AR Piola (1988) Intercambio neto de agua entre el mar y la atmósfera en el Golfo San Matías. *Geoacta* 15 (1):13-31.
- [16] JI Carreto, CA Verona, AB Laborde, MA Casal (1974) Fitoplancton, pigmentos y condiciones ecológicas del golfo San Matías III. Aires. Buenos Aires: .
- [17] AL Rivas, EJ Beier (1990) Temperature and salinity fields in the northpatagonic gulfs. *Oceanol Acta* (13):15-20.
- [18] CA Mazio, CD Vara (1983) Las mareas del golfo San Matías.
- [19] G Williams, M Sapoznik, M Ocampo-Reinaldo, M Solis, M Narvarte, R González, JL Esteves, D Gagliardini (2010) Comparison of AVHRR and SeaWiFS imagery with fishing activity and in situ data in San Matías Gulf, Argentina. *Int J Remote Sens* 31 (17):4531-4542.
- [20] V Sánchez, HE Zaixso (1995) Intertidal recolonization sequences on a rocky shore in the San José Gulf (Chubut, Argentina). *Nat Patagon Ciencias Biológicas* 3:57-83.
- [21] S de H Naval (2010) Available: <http://www.hidro.gov.ar/>; 2010.
- [22] HE Zaixso (1996) Distribución y abundancia de bivalvos de fondos blandos submareales del Golfo San José y sur del Golfo San Matías. *Medio Ambient* 13:97-113.
- [23] H Zaixso, Z Lizarralde, C Pastor, E Gomes-Simes, E Romanello, G Pagnoni (1998) Distribución espacial del macrozoobentos submareal del golfo San José. *Biol Mar y*

Oceanogr 33 (1):43-72.

- [24] FH Mouzo, ML Garza, JF Izquierdo, RO Zibecchi (1978) Rasgos de la geología submarina del Golfo Nuevo (Chubut). *Acta Geográfica Argentina* (2):69-91.
- [25] M Solís (1998) Monitoring in Nuevo Gulf (Argentina): analysis of oceanographic data by geographic information systems (GIS). M.Sc. thesis, International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering (IHE-UNESCO), Delft, The Netherlands, 1998.
- [26] M Fernández, JI Carreto, J Mora, A Roux (2005) Physico-chemical characterization of the benthic environment of the Golfo San Jorge, Argentina. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 85 (6):1317-1328.
- [27] R Akselman (1996) Estudios ecológicos en el Golfo San Jorge y adyacencias (Atlántico sudoccidental). Distribución, abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y a la dinámica hidrográfica. Universidad de Buenos Aires, 1996.
- [28] A Bianchi, M Masonneau, R Olivera (1982) Análisis estadístico de las características del sector austral de la plataforma continental argentina. *Acta Ocean Argentina* (3):93-118.
- [29] M Fernández, J Mora, A Roux, DA Cucchi Colleoni, JC Gasparoni (2008) New contribution on spatial and seasonal variability of environmental conditions of the Golfo San Jorge benthic system, Argentina. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 88 (2):227-236.
- [30] C Balestrini, G Manzella, L Giuseppe, G Lovrich (1998) Simulación de Corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. *Serv Hidrogr Naval, Dep Oceanogr Inf Técnico*:58.
- [31] E Boltovskoy (1981) Masas de agua en el Atlántico Sudoccidental, En: *Atlas del Zooplancton del Atlántico Sudoccidental*, (Ed: D Botolovskoy), Publ. espe, Mar del Plata: 227-237.
- [32] F Isla, G Bujalesky, A Coronato (1999) Procesos estuarianos en el canal Beagle, Tierra

- del Fuego. *Rev la Asoc Geológica Argentina* 54 (4):4822-99.
- [33] G Bujalesky, S Aliotta, FI Isla (2004) Facies del subfondo del canal Beagle, Tierra del Fuego. *Rev la Asociación Geológica Argentina* 59 (1):20-23.
- [34] R Rabassa, J., Heusser, C. & Stuckenrath (1986) New data on Holocene sea transgretión in the Beagle Channel: Tierra del Fuego,. *Argentina Quat South Am Antarct Penins* 4:291-309.
- [35] EE D'Onofrio, A Orsi, R Locarnini (1989) Estudio de Marea en la Costa de Tierra del Fuego. *Serv Hidrogr Naval, Dep Oceanogr Inf Técnico N°49*.
- [36] GA Lovrich (1999) Seasonality of larvae of Brachyura and Anomura (Crustacea Decapoda) in the Beagle Channel, Argentina. *Sci Mar* 63 (SUPPL.):347-354.
- [37] J Curelovich, J Calcagno, G Lovrich (2009) New locality for *Notochthamalus scabrosus* (Crustacea, Cirripedia): Bahía Lapataia, Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *An del Inst la Patagon* 37 (47-50).
- [38] CA Duarte, E Giarratano, OA Amin, LI Comoglio (2011) Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Mar Pollut Bull* 62 (8):1895-1904.
- [39] DO Bruno, MF Victorio, EM Acha, DA Fernández (2018) Fish early life stages associated with giant kelp forests in sub-Antarctic coastal waters (Beagle Channel, Argentina). *Polar Biol* 41 (2):365-375.
- [40] RJ Iturraspe, C Schroeder (1994) Clima en el Canal de Beagle. Ushuaia, Argentina.: .
- [41] RJ Iturraspe, R Sottini, C Schroeder, J Escobar (1989) Hidrología y variables climáticas del Territorio de Tierra del Fuego. Información básica. CADIC CONICET. Ushuaia, Argentina.: .
- [42] DHE Setiamarga, M Miya, Y Yamanoue, K Mabuchi, TP Satoh, JG Inoue, M Nishida (2008) Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. *Mol Phylogenet Evol* 49 (2):598-605.

- [43] J. Nelson (2006) John Wiley & Sons, Inc. , Hoboken, New Jersey.
- [44] DD Bloom, PJ Unmack, AE Gosztonyi, KR Piller, NR Lovejoy (2012) It's a family matter: Molecular phylogenetics of Atheriniformes and the polyphyly of the surf silversides (Family: Notocheiridae). *Mol Phylogenet Evol* 62 (3):1025-1030.
- [45] BS Dyer, B Chernoff (1996) Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha) AND B. CHERNOFF. *Zool J Linn Soc* (117):1-69.
- [46] D Campanella, LC Hughes, PJ Unmack, DD Bloom, KR Piller, G Ortí (2015) Multi-locus fossil-calibrated phylogeny of Atheriniformes (Teleostei, Ovalentaria). *Mol Phylogenet Evol* 86:8-23.
- [47] MB Cousseau, RG Perrotta (2000) Peces Marinos de Argentina. *INIDEP, Mar del Plata*.
- [48] BS Dyer (2006) Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell* 30 (1):69-88.
- [49] R Froese, D Pauly (2012) Species of Odontesthes in FishBase.
- [50] MA Bemvenuti (2006) Silversides in South Brazil: morphological and ecological aspects. *Biocell* 30 (1):111-118.
- [51] F Lahille (1929) Informe Ministerio de Agricultura de la Nación:10-12.
- [52] BS Dyer (2000) Revision Sistemática De Los Pejerreyes De Chile (Teleostei , Atheriniformes). *Estud Ocean* 19:99-127.
- [53] RICHARDSON J (1848) The Zoology of the voyage of HMS «Erebus & Terror» under the command of Captain Sir James Clark Ross, R.N., F.R.S. during the years 1839 to 1843. *Ichthyol Voyag HMS Erebus Terror* 2 (2):75-139.
- [54] I Elías, ME Ré, AE Gosztonyi (1991) Observaciones preliminares sobre el crecimiento del pejerrey manila *O. smitti* (Atherinidae) en el Golfo Nuevo, Chubut, Argentina. *Rev Biol Mar* 26 (1):49-60.
- [55] MB Cousseau, A. Gosztonyi, I Elías, ME Ré (2004) Estado actual del conocimiento de los peces de la plataforma argentina., En: *El Mar Argentino y sus recursos.*, (Ed: EE

- Boschi), Mar del Plata, Argentina: 17-38.
- [56] ME Lattuca, IE Lozano, DR Brown, M Renzi, CA Luizon (2015) Natural growth, otolith shape and diet analyses of *Odontesthes nigricans* Richardson (Atherinopsidae) from southern Patagonia. *Estuar Coast Shelf Sci* 166:105-114.
- [57] M Lopez (2009) Estudios preliminares sobre la edad y el crecimiento del pejerrey lagunero *Odontesthes nigricans* (Atherinopsidae) en Golfo Nuevo, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina., 2009.
- [58] MC Carballo (2008) Rol de los pejerreyes *Odontesthes smitti* y *O. nigricans* (Pisces: atherinopsidae) como hospedadores de helmintos en los golfos norpatagónicos, Chubut, Argentina. Universidad Nacional de La Plata, 2008.
- [59] M García (1994) Feeding habits of *Odontesthes smitti* (Atherinidae, Fishes) in the South Atlantic. , 44: 151-156. *Vie Milieu* 44:151-156.
- [60] J Rabassa (2008) Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an update review. *Dev Quat Sci* 11:151-204.
- [61] J Rabassa, AM Coronato, M Salemme (2005) Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *J South Am Earth Sci* 20 (1-2):81-103.
- [62] PW Wenink, AJ Baker, HU Rösner, MGJ. . Tilanus (1996) Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). *Evolution (N Y)* (50):318-330.
- [63] G Roderick (1996) Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu Rev Entomol* (41):325-352.
- [64] P Hedrick (2000) Genetics of Populations. Boston: Jones & Barlett Publishers, p. .
- [65] JC Avise (2004) Molecular markers, natural history and evolution. 2Rev Ed. Massachusetts: .
- [66] ED Kawecki T. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *EcolLetters* (7):1225-

- 1241.
- [67] RD Ward, M Woodwark, DOF Skibinski (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J Fish Biol* 44 (2):213–232.
- [68] Avise J. (2001) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard U. Cambridge: .
- [69] R Grosberg, C Cunningham (2001) Genetic structure in the sea., En: *Marine Community Ecology*, (Eds: M Bertness), HM Gaines S), Sinauer As, Sunderland: 61-84.
- [70] S Wright (1978) Variability within and among natural populations. *Evol Genet Popul a treatise four Vol Univ Chicago Press* 4.
- [71] R Frankham (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126 (2):131-140.
- [72] JC Avise (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.: .
- [73] JC Avise (2009) Phylogeography: Retrospect and prospect. *J Biogeogr* 36 (1):3-15.
- [74] A Lanteri, V Confalonieri (2003) Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos, En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*, (Eds: JJ Morrone), J & Llorente), CONABIO, México: 185-194.
- [75] DH Lunt, L. Whipple, BC Hyman (1998) Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol Ecol* (7):1441-1455.
- [76] M Nei (1972) Genetic distances between populations. *Am Nat* (106):283-292.
- [77] S Wright (1943) Isolation by Distance. *Genetics* 28 (2):114-138.
- [78] M Kimura, GH Weiss (1964) The Stepping Stone Model of Population Structure and the Decrease of Genetic Correlation with Distance. *Genetics* 49 (4):561-576.
- [79] S Wright (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* (15):323-354.
- [80] ME Hellberg, RS Burton, JE Neigel, SR Palumbi (2002) Genetic assessment of

- connectivity among marine populations. *Mar Sci* 70 (1):273-290.
- [81] DE Ruzzante, SJ Walde, JC Gosse, VE Cussac, E Habit, TS Zemlak, EDM Adams (2008) Climate control on ancestral population dynamics: Insight from Patagonian fish phylogeography. *Mol Ecol* 17 (9):2234-2244.
- [82] T Hall (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.:Nucl Acids Symp Ser 41:95–98.
- [83] I Dupanloup, S Schneider, L Excoffier (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11 (12):2571-2581.
- [84] Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.:Bioinformatics 25 (11):1451.
- [85] SS Excoffier L, Laval G (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis.:Evol Bioinform Online 1:47–50.
- [86] N Mantel (1967) The Detection of disease clustering and generalized regression approach. *Nature* 214 (5088):637-637.
- [87] AM Kozlov, D Darriba, T Flouri, B Morel, A Stamatakis (2019) No Title. *RAxML-NG A fast, scalable, user-friendly tool maximum likelihood phylogenetic inference Bioinformatics*,:btz305.
- [88] M Matschiner (2015) Haplotype genealogy graphs based on the Fitch algorithm, *Bioinformatics*.:1250-1252.
- [89] AJ Drummond, A Rambaut, B Shapiro, OG Pybus (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22 (5):1185-1192.
- [90] D Darriba, GL Taboada, R Doallo, D Posada (2012) jModeltest: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- [91] AJ Drummond, MA Suchard, D y Xie, A Rambaut (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29,:1969-1973.
- [92] S Heras, MI Roldán (2011) Phylogenetic inference in *Odontesthes* and *Atherina*

- (Teleostei: Atheriniformes) with insights into ecological adaptation. *Comptes Rendus - Biol* 334 (4):273-281.
- [93] D Veliz, L Catalan, R Pardo, P Acuna, A Diaz, E Poulin, I Vila (2012) The genus *Basilichthys* (Teleostei: Atherinopsidae) revisited along its Chilean distribution range (21 degrees to 40 degrees S) using variation in morphology and mtDNA. *Rev Chil Hist Nat* 85) REFERE (1):49-59.
- [94] M Quezada-Romegialli, C. Fuentes, D Veliz (2010) Comparative population genetics of *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes: Atherinopsidae) and *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) in north central Chile. *Environ Biol Fishes* 89,:173-186.
- [95] A Drummond, A Rambaut (2009) Tracer v.1.5. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- [96] AJ Drummond, A Rambaut (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7 (1):1-8.
- [97] L Excoffier, HEL Lischer (2010) Arlequin: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*.:10: 564-567.
- [98] F Tajima (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* (123):595.
- [99] X Fu (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* (147):915-925.
- [100] TF Nei M (1981) Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* (98):625-640.
- [101] M Nei, F Tajima, Y Tateno (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol* 19(2) (153):70.
- [102] AR Rogers, H Harpending (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9 (3):552-569.
- [103] CK Posada D1 (1998) MODELTEST: testing the model of DNA. *Bioinformatics* 14

- (9):817-8.
- [104] LL Cocito, SG Ceballos, DA Fernández (2019) Sharp phylogeographical differentiation near the southern range edge of the silverside *Odontesthes nigricans*: Distinct peripheral populations and incipient speciation? *Estuar Coast Shelf Sci* 226 (February):106276.
- [105] WS Grant, BW Bowen (1998) Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. *J Hered* 89:415-426.
- [106] D Posada, K. Crandall (2001) Intra-specific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* (16):37-45.
- [107] CA González-Wevar, M Hüne, JI Cañete, A Mansilla, T Nakano, E Poulin (2012) Towards a model of postglacial biogeography in shallow marine species along the Patagonian Province: lessons from the limpet *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791). *BMC Evol Biol* 12:139.
- [108] JD Nuñez, PJ Fernández Iriarte, EH Ocampo, C Iudica, M Cledón (2015) Deep phylogeographic divergence among populations of limpet *Siphonaria lessoni* on the east and west coasts of South America. *Mar Biol* 162 (3):595-605.
- [109] MC Pardo-Gandarillas, CM Ibáñez, FI Torres, V Sanhueza, A Fabres, J Escobar-Dodero, FO Mardones, MA Méndez (2018) Phylogeography and species distribution modelling reveal the effects of the Pleistocene ice ages on an intertidal limpet from the south-eastern Pacific. *J Biogeogr* 45 (8):1751-1767.
- [110] SG Ceballos, EP Lessa, R Licandeo, DA Fernández (2016) Genetic relationships between Atlantic and Pacific populations of the notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: The footprints of Quaternary glaciations in Patagonia. *Heredity (Edinb)* 116 (4):372-377.
- [111] T Antezana (1999) Hydrographic features of Magellan and Fuegian inland passages and adjacent Subantarctic waters. *Sci Mar* 63 (1):23-34.
- [112] P Miloslavich, E Klein, JM Díaz, CE Hernández, G Bigatti, L Campos, F Artigas, J Castillo, PE Penchaszadeh, PE Neill, A Carranza, M V. Retana, et al. (2011) Marine

- biodiversity in the Atlantic and Pacific coasts of South America: Knowledge and gaps. *PLoS One* 6 (1).
- [113] HR Slatkin M (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial Populations., DNA sequences in stable and exponentially growing. *Genetics* 129 (2):555-562.
- [114] SYW Ho, R Lanfear, L Bromham, MJ Phillips, J Soubrier, AG Rodrigo, A Cooper (2011) Time-dependent rates of molecular evolution. *Mol Ecol* 20 (15):3087-3101.
- [115] WS Grant (2015) Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *J Hered* 106 (4):333-346.
- [116] WS Grant, M Liu, TX Gao, T Yanagimoto (2012) Limits of Bayesian skyline plot analysis of mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). *Mol Phylogenet Evol* 65 (1):203-212.
- [117] D FUTUYMA (2005) Evolution. Sinauer. Sunderland, Massachussets: .
- [118] LB Beheregaray, JA Levy (s. f.) Population Genetics of the Silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): Evidence for Speciation in an Estuary of Southern Brazil. *Copeia* 2 (2):441-447.
- [119] MC de Aranzamendi, R Bastida, CN Gardenal (2011) Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast. *Mar Biol* 158 (11):2405-2418.
- [120] MC de Aranzamendi, R Bastida, CN Gardenal (2014) Genetic population structure in *Nacella magellanica*: Evidence of rapid range expansion throughout the entire species distribution on the Atlantic coast. *J Exp Mar Bio Ecol* 460:53-61.
- [121] WJ Fraser CI, Thiel M, Spencer HG (2010) Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evol Biol* 10:203.
- [122] CA González-Wevar, P Salinas, M Hüne, NI Segovia, L Vargas-Chacoff, M Astorga, JI Cañete, E Poulin (2015) Phylogeography in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) along Two Biogeographical Provinces in the Chilean Coast. *PLoS One* 10 (7):1-20.
- [123] GV Villanova, M Vera, F Brancolini, J Díaz, P Martinez, SE Arranz (2018) Species

- assignment and population genetic studies of Gran Paraná pejerrey (*Odontesthes sp.*, Atheriniformes, Atherinopsidae) from La Plata Basin in South America. *Hydrobiologia* 819 (1):243-257.
- [124] AP Hendry, T Day (2005) Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Mol Ecol* (14):901–916.
- [125] E Crispo, LJ Chapman (2010) Geographic variation in phenotypic plasticity in response to dissolved oxygen in an African cichlid fish. *J Evol Biol* 23 (10):2091-2103.
- [126] CD Schlichting, M Pigliucci, CJ Murren (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209:2362-2367.
- [127] M Pigliucci, KA Preston (2004) Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. Oxford Uni. USA: .
- [128] MJ West-Eberhard (2003) Developmental Plasticity and Evolution Animal Species. Oxford Uni. New York: .
- [129] HE Booke (1981) The Conundrum of the stock concept – are nature and nurture definable in fishery science? *Can J Fish Aquat Sci* (38):1479-1506.
- [130] FW Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD (2004) Geometric morphometrics for biologists: A primer. *Elsevier Acad Press*:433p.
- [131] SX Cadrin, KD Friedland (1999) The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fish Res* 43 (1-3):129-139.
- [132] SX Cadrin (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev Fish Biol Fish* (10):91-112.
- [133] FL Bookstein (1986) Size and Shape Spaces for Landmark Data in Two Dimensions: Rejoinder. *Stat Sci* 1:238-242.
- [134] FL Bookstein (1997) Morphometric tools for landmark data.
- [135] JF Rohlf (1990) Morphometrics. *Annu Rev Ecol Syst* 21:299-316.
- [136] FJ Rohlf (1993) Relative warp analysis and an example of its application to mosquito

- wings. *Contrib to morphometrics*:131-159.
- [137] FJ Rohlf (2000) Statistical Power Comparisons Among Alternative Morphometric Methods. *Am J Phys Anthropol* (111):463-478.
- [138] RA (1999) Bandelt H, Forster P (1999) Software popArt.
- [139] DC Adams, FJ Rohlf, DE Slice (2004) Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Ital J Zool* 71 (1):5-16.
- [140] Piacentino G.L. (1999) Osteología craneana de *Odontesthes nigricans* (Richardson 1845) y *Odontesthes smitti* (Lahille 1929) de la Ría de Puerto Deseado (Santa Cruz, Argentina) (Teleostei, Atherinopsidae). *Bol Lab Hidrobiol* 12 (23e47).
- [141] Dyer and Gosztanyi (1999) Phylogenetic revision of the South American subgenus *Austromeniidia* Hubbs, 1918 (Teleostei, Atherinopsidae, *Odontesthes*) and a study of meristic variation. *Rev Biol Mar Oceanogr* 34 (2):211-232.
- [142] BS. CB Dyer (1996) Phylogenetic relationships among atheriniform shes (Teleostei: Atherinomorpha). *Zool J Linn Soc London B* 117:1-69.
- [143] KM O'Reilly, MH Horn (2004) Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. *J Fish Biol* 64 (4):1117-1135.
- [144] Bookstein FL. (1991) Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. *Cambridge Univ Press*:435.
- [145] F ROHLF (2005) Geometric morphometrics simplified. *Trends Ecol Evol* 20 (1):13-14.
- [146] CP Klingenberg (2009) Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol Dev* 11 (4):405-421.
- [147] AF Ojanguren, F Brana (2003) Effects of size and morphology on swimming performance in juvenile brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecol Freshw Fish* 12 (4):241-246.
- [148] I Plaut (2001) Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp Biochem Physiol* (131):41-50.

- [149] LQ Zeng, ZD Cao, SJ Fu, JL Peng, YX Wang (2009) Effect of temperature on swimming performance in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comp Biochem Physiol* 153:125-130.
- [150] JD Kieffer (2010) Perspective - exercise in fish: 50+ years and going strong. *Comp Biochem Physiol* 156:163-168.
- [151] SJ Fu, ZG Peng, ZD Cao, JL Peng, XK He, DD Xu, AJ Zhang (2012) Habitat-specific locomotor variation among Chinese hook snout carp (*Opsariichthys bidens*) along a river. *PLoS ONE* 7, e40791.
- [152] G V. Lauder (2000) Function of the caudal fin during locomotion in fishes: kinematics, flow visualization, and evolutionary patterns. *Am Zool* 40 (1):101-122.
- [153] R Motani (2002) Scaling effects in caudal fin propulsion and the speed of ichthyosaurs. *Nature* 415:309-312.
- [154] AR Piola, BC Franco, ED Palma, M Saraceno (2013) Multiple jets in the Malvinas current. *J Geophys Res Ocean* 118 (4):2107-2117.
- [155] RL McLaughlin, JWA Grant (1994) Morphological and behavioural differences among recently-emerged brook charr, *Salvelinus fontinalis*, foraging in slow- vs. fast-running water. *Environ Biol Fishes* 39 (3):289-300.
- [156] RL McLaughlin, DLG Noakes (1998) Going against the flow: an examination of the propulsive movements made by young brook charr in streams. *Can J Fish Aquat Sci* 55:853–860.
- [157] JH Rojo (2019) Variación fenotípica , estructura genética poblacional e historias de vida de *Galaxias maculatus* en Tierra del Fuego. Universidad Nacional Mar del Plata, 2019.
- [158] A Keast, D Webb (1966) Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. *J Fish Res Board Canada*, 23:1845-1874.
- [159] SF Norton (1991) Capture success and diet of cottid fishes: the role of predator morphology and attack kinematics. *Ecology* 72:1807-1819.

- [160] SD Gerking (1994) Feeding Ecology of Fish. Academic P. San Diego, CA, USA.: .
- [161] GA Thompson, AV Volpedo (2018) Diet composition and feeding strategy of the New World silverside *Odontesthes argentinensis* in a temperate coastal area (South America). *Mar Coast Fish* 10 (1):80-88.
- [162] JA Walker (1997) Ecological morphology of lacustrine threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. (Gasterosteidae) body shape. *Biol J Linn Soc* 61:3– 50.
- [163] MJ Cavalcanti, LR Monteiro, PRD Lopes (1999) Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei). *Zool Stud* 38 (3):287-294.
- [164] CM Breder (1926) The locomotion of fishes. New York Z.
- [165] D Weihs, PW Webb (1983) Optimization of locomotion in, P. , Eds. 1983, pp. 339– 371., En: *Fish Biomechanics*, (Eds: D Weihs), PW Webb), Praeger, New York: 339-371.
- [166] M Sfakiotakis, DM Lane, JBC Davies (1999) Fish Swimming Techniques. *J Ocean Eng* 24 (2):237-252.
- [167] Lindsey C. C. (1978) Form, function and locomotory habits in fish, En: *Fish Physiology*, (Ed: HWS and RD J.), New York:1-100.
- [168] GAP M. Greek-Walker (1975) A survey of red and white muscle in marine fish. *J Fish Biol* (7):295–300.
- [169] Q Bone (1978) Locomotor Muscle. *Fish Physiol Biochem* 7 (361–424.).
- [170] IA Johnston (1980) Specialization of fish muscle., En: *Development and Specialization of Skeletal Muscle Cambridge University Press., Cambridge., Cambridge:* .
- [171] NC Stickland (1983) Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Anat* 2:323-333.
- [172] and IAJ Q. Hagen, , C. Solberg (2006) Sexual dimorphism of fast muscle fibre recruitment in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 261:1222-1229.

- [173] G Johnston, I. A., Davison, W. & Goldspink (1977) Energy metabolism of carpswimming muscles. *J Comp Physiol* 114:203-216.
- [174] DJ Coughlin, LC Rome (1999) Muscle activity in steady swimming scup, *Stenotomus chrysops*, varies with fiber type and body position. *Biol Bull* 196 (2):145-152.
- [175] IA Altringham, J. D. & Johnston (1990) Modelling muscle power output in a swimming fish. *J Exp Biol* 1448:395-402.
- [176] L Rome, R Funke, R Alexander, G Lutz, H Aldridge, F Scott, M Freadman (1988) Why animals have different muscle fibre types. *Nature* (335):824-827.
- [177] E Gilly, W.F., and Aladjem (1987) Physiological properties of three muscle fibre types controlling dorsal fin movements in a flatfish, *Citharichthys sordidus*. *J Muscle Res Cell Motil* 8:407-417.
- [178] I a Johnston, G Strugnell, ML McCracken, R Johnstone (1999) Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J Exp Biol* 202 (Pt 15):1991-2016.
- [179] A Rowlerson, A Veggetti (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species, En: *Fish Physiology*, 18, (C)103-140.
- [180] JTM Koumans, HA Akster, GHR Booms, CJJ Lemmens, JWM Osse (1991) Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (teleostei). *Am J Anat* 192 (4):418-424.
- [181] IA Johnston, DA Fernández, J Calvo, VLA Vieira, AW North, M Abercromby, T Garland (2003) Reduction in muscle fibre number during the adaptive radiation of notothenioid fishes: A phylogenetic perspective. *J Exp Biol* 206 (15):2595-2609.
- [182] FJ Sánchez-Vázquez, M Azzaydi, FJ Martínez, S Zamora, JA Madrid (1998) Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: Evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol Int* 15 (6):607-622.
- [183] A Abdel, I.; López Albors, O.; Abellan, E.; García-Alcazar (2004) The effect of the temperature regimes on feed response Bass, growth performance during winter months in sea (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Eur Aquac Soc* 34:91-92.

- [184] SP Lall, SM Tibbetts (2009) Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Vet Clin North Am - Exot Anim Pract* 12 (2):361-372.
- [185] CC Boy, E Morriconi, J Calvo (2007) Reproduction in puyen, *Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae), in the southernmost extreme of distribution. *J Appl Ichthyol* 23 (5):547-554.
- [186] FA Vanella, CC Boy, DA Fernández (2012) Temperature effects on growing, feeding, and swimming energetics in the Patagonian blennie *Eleginops maclovinus* (Pisces: Perciformes). *Polar Biol* 35 (12):1861-1868.
- [187] H Guderley, I Johnston (1996) Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. *J Exp Biol* 199 (Pt 6):1311-1317.
- [188] DA Fernández (2000) Caracterización histoquímica, distribución y crecimiento de las fibras musculares en nototénidos subantárticos. Análisis inicial de dos factores relacionados con la natación : flotabilidad y temperatura. UBA, 2000.
- [189] H Guderley (2004) Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79 (May 2004):409-427.
- [190] IA Johnston, J Calvo, H Guderley, D Fernandez, L Palmer (1998) Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J Exp Biol* 201 (1):1-12.
- [191] D O. Conover, ET Schultz (1995) Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends Ecol Evol* 10 (6):248-252.
- [192] MG Greer-Walker (1970) Growth and development of the skeletal muscle fibres of the cod (*Gadus morhua* L.). *J. Cons Perm Int Explor Mer* 33:228-244.
- [193] AH Weatherley, HS Gill, SC Rogers (s. f.) Growth dynamics of mosaic muscle fibres in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to somatic growth rate. *Can J Zool* 58:1535-1541.
- [194] AH Weatherley, HS Gill, SC Rogers (s. f.) The relationship between mosaic muscle fibres and soze in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Biol* (17):603-610.

- [195] G Ramirez Zarzosa, F Gil, F Moreno, JM Vazquez, R Latorre (1991) Estudio histoquímico de las fibras musculares de algunos teleósteos marinos y de agua dulce. *Anatomy, Histol Embryol* 20:169-179.
- [196] AH Weatherley, HS Gill (1987) *The Biology of fish growth*. Academic p. London: .
- [197] IA Johnston, S Manthri, B Robertson, P Campbell (1997) Family and Population Differences in Muscle Fibre Recruitment in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) (1):291-296.
- [198] CC Boy, FA Vanella, ME Lattuca, S Ceballos, DR Aureliano, S Rimbau, M Gutiérrez, DA Fernández (2013) Effect of starvation on growth rate, muscle growth and energy density of puyen, *Galaxias maculatus*. *J Appl Ichthyol* 29 (5):1001-1007.