

Tesis de Posgrado

Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnica de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies de pejerreyes de la República Argentina, género *Odontesthes* (Atherinopsidae, Atherinopsinae, Sargentini)

Abel, María Cecilia

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Abel, María Cecilia. (2002). Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnica de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies de pejerreyes de la República Argentina, género *Odontesthes* (Atherinopsidae, Atherinopsinae, Sargentini). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3507_Abel.pdf

Cita tipo Chicago:

Abel, María Cecilia. "Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnica de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies de pejerreyes de la República Argentina, género *Odontesthes* (Atherinopsidae, Atherinopsinae, Sargentini)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3507_Abel.pdf



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

"Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnicas de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies de pejerreyes de la República Argentina, género *Odontesthes* (Atherinopidae, Atherinopsinae, Sorgentinini)."

Autor: María Cecilia Abel

Directora: Dra. María Cristina Maggese

Directora Asistente: Dra. Graciela García

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Embriología Animal
Departamento de Ciencias Biológicas

Nº 3507

2002

DEDICATORIA

A mi esposo Francisco,
A mi hija María Constanza y
A mis Padres

*Enseñarás a volar
Pero no volarán tu vuelo
Enseñarás a soñar pero no soñaran tu sueño.
Enseñarás a vivir pero no vivirán tu vida
Pero sabrás que cada vez que ellos
vuelen, piensen, sueñen, canten, vivan...
Estará la semilla del camino
Enseñado y aprendido*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en este espacio a las personas que me han ayudado desde lo afectivo y/o desde su conocimiento a que logre este importante objetivo.

A la Dra. María Cristina Maggese, por su apoyo y por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Graciela García, quien me recibió en su laboratorio de Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias, Montevideo, me enseñó a trabajar en ADN (técnicas de extracción, PCR y RAPD), por su constante dirección en el tema y por su ayuda en lo profesional y en lo personal.

A la Dra. Beatriz Saidman, quien me facilitó el aprendizaje de las técnicas de la electroforesis de isoenzimas.

Al Dr. Juan Vilardi, por su constante asesoramiento y guía en el tratamiento estadístico de los resultados isoenzimáticos y de RAPD y por responder siempre a mis dudas con excelente disposición.

A los sistemáticos Dra. Mirta García y Dr. Atila Gosztanyi por la determinación taxonómica de las especies estudiadas.

Al Dr. Enrique Marschoff por modificar parámetros de programas Fortran, imprescindibles para los análisis de RAPD.

A la Dra. Graciela Guerrero y Dra. Paula Vissio, por haberme ayudado siempre incondicionalmente, por su aliento y estímulo.

A la Dra. Fabiana Lonostro por contribuir a la presentación de tesis y estar siempre bien predispuesta en perder parte de su tiempo en ayudarme.

A los Dres. Mario Ravaglia, Dante Paz, Gustavo Somoza, Pablo Carmanchai, Pablo Pica y Víctor Cussac, quienes intervinieron en las campañas de muestreo de pejerreyes.

A mis compañeras de laboratorio que alguna vez incursionaron en la Genética, Lic. Graciela Rey Vázquez y Natalia Moncaut, por escucharme, alentarme y compartir la vida de todos los días.

Al Lic. Fernando Meijide, por ayudarme a recuperar archivos perdidos en la Computadora, solucionar cualquier otro inconveniente con la PC y sus criteriosas observaciones.

A las chicas de Genética, Laura Ferreyra, Graciela Calgagno, Amalia Scataglini, Verónica, Andrea Alberti y Cecilia Bessega, por soportar mis constantes consultas.

A Pablo Rebagliati por ayudarme con las figuras, por sus consejos, por estar siempre de buen ánimo y predisposición.

A Martín Ansaldo por prestarme el espectrofotómetro.

A Alejandra Volpedo por alentarme y guiarme como encarar la redacción del manuscrito.

Quiero agradecer especialmente a mi esposo Francisco por comprenderme, por apoyarme y alentarme constantemente, quien no solo me acompañó en varias campañas de recolección de material sino que también, arregló fuentes de poder y cubas electroforéticas, por compartir la alegría del éxito y la angustia cuando no salen los experimentos.

A mi tesoro, María Constanza por soportar mis ausencias, mi cansancio... por ser la luz y fuerza de mi vida.

También quiero agradecer especialmente a mis Padres, Elina y Oscar, por compartir la alegría del éxito y la angustia cuando no salen los experimentos, por estar siempre presentes en los momentos más difíciles colaborando constantemente con todas sus energías frente a cualquier situación.

También quiero agradecer:

A mi suegra Isabel, que aunque ya no esta con nosotros siempre me alentó y le hubiera gustado verme llegar a la meta.

A mi hermano Carlitos, a mis cuñadas Carmencita e Isa, por el apoyo y afecto que siempre me demuestran.

Este trabajo fue realizado gracias a los subsidios otorgados por la O.E.A., Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica otorgados a la Dra. María Cristina Maggese (CONICET-PIA 0222/92, UBA-EX208., FONICYT-CONICET-PICT N° 0183, UBA-EX141 o TW-41, CONICET-PIP N° 4558/96, CONICET-PIP N° 0539/98, UBA-EX N° 217)

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO.....	II
INDICE.....	IV
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	X
GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	XIII
 INTRODUCCION	
I Campo de Aplicación.....	1
II Requerimientos para programas de Conservación.....	4
III El género <i>Odontesthes</i>.....	6
III.1 Sistemática.....	6
III.2 Distribución.....	7
III.3 Escenarios biogeográficos y relaciones filogenéticas.....	10
III.4 Historia biogeográfica.....	14
III.4.1 Historia biogeográfica de especies de Escamas pequeñas (SS).....	14
III.4.2 Historia biogeográfica de especies de Escamas grandes (LS).....	16
III.5 Características Biológicas, Ecológicas e Importancia Económica.....	18
IV. Empleo de Marcadores Moleculares para la resolución de problemas	
Taxonómicos Evolutivos	20
IV.1. Marcadores Bioquímicos y Moleculares.....	20
IV.2. Electroforesis de Isoenzimas.....	22
IV.2.1. Fundamento de la técnica.....	23
IV.2.2. Aportes de las isoenzimas a estudios evolutivos, taxonómicos y poblacionales.....	24
IV.3. La Técnica de RAPD.....	26
IV.3.1. Fundamento de la técnica.....	26
IV.3.2. Empleo de la técnica de RAPD en estudios poblacionales, taxonómicos y evolutivos.....	31
IV.3.3. Ventajas y desventajas del uso de marcadores RAPD en estudios poblacionales y evolutivos.....	31
IV.4. Estimación de la Variación Genética en poblaciones naturales.....	33
IV.5. Análisis de la Estructura Genética de las poblaciones mediante marcadores de isoenzimas y RAPD.....	34
IV.6. Mecanismos Evolutivos relacionados con la estructura genética de las poblaciones.....	36
IV.6.1. Selección.....	36
IV.6.2. Deriva genética.....	37
IV.6.3. El flujo génico.....	37
 OBJETIVOS.....	 39
 MATERIALES Y METODOS	
I. Muestreo	40
I.1 Especies y poblaciones estudiadas mediante las técnicas de Isoenzimas y RAPD.....	40
I.2 Determinación taxonómica de las especies de <i>Odontesthes</i>	44
II. Técnica de Electroforesis de Isoenzimas.....	44
II.1 Sistemas Isoenzimáticos estudiados.....	44
II.2 Preparación de geles.....	45
II.3 Armado de geles.....	46
II.4 Buffer Corrida y de Geles.....	46
II.5 Preparación de las Muestras.....	46
II.6 Siembra del Material en los geles.....	47
II.7 Corrida Electroforética.....	47
II.8 Revelado, fijación y preservación de los geles.....	47
II.9 Número de Clasificación y designación de las Isoenzimas.....	48
II.10 Tinciones Isoenzimáticas utilizadas.....	49
II.11 Determinación de los probables loci y alelos.....	57
III. Métodos Estadísticos a partir de los datos de Isoenzimas.....	57
III.1 Cálculo de las frecuencias alélicas.....	58

III.2	Estimación de la variabilidad genética.....	58
III.3	Análisis de la Estructura Poblacional.....	59
III.4	Análisis de la Diferenciación Genética entre poblaciones.....	62
III.4.1	Divergencia Genética y Flujo génico.....	62
III.4.2	Análisis jerarquizado de la distribución de la variación genética.....	62
III.5	Análisis del grado de Similitud genética entre poblaciones y/o especies.....	64
III.6	Análisis de las relaciones entre distancia genéticas y distancia geográficas.....	66
IV.	Técnica de RAPD.....	66
IV.1	Extracción de ADN Total.....	66
IV.2	Estimación de la concentración de ADN.....	68
IV.3	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	68
IV.4	Visualización de Fragmentos Amplificados.....	70
IV.4.1	Preparación y armado de los geles.....	70
IV.4.2	Limpieza de geles.....	71
IV.4.3	Colocación de los geles en cuba de corrida.....	71
IV.4.4	Siembra del material en los geles.....	71
IV.4.5	Corrida electroforética.....	72
IV.4.6	Revelado, fijación y preservación de los geles.....	72
IV.5	Soluciones empleadas en las técnicas de RAPD.....	73
V.	Métodos Estadísticos a partir de los datos RAPD.....	76
V.1	Análisis de la divergencia genética.....	77
V.1.1	Distancias Manhattan.....	77
V.1.2	F_{ST} y Flujo génico.....	78
V.1.3	Análisis jerarquizado de la distribución de la variabilidad genética.....	78
V.2	Correlación entre distancia genéticas y geográficas.....	79
V.3	Análisis Fenético.....	79
V.3.1	Análisis Fenético de distancias Manhattan.....	79
V.3.2	Análisis Fenético de índices F_{ST} obtenidos por AMOVA.....	80
V.4	Correlación entre diferenciación genética obtenidas por RAPD y por Isozimas.....	80

RESULTADOS

I.	Resultados de Isoenzimas.....	81
I.1	Afinidad tisular de los diferente loci isoenzimáticos.....	82
I.2	Descripción de los sistemas isoenzimáticos.....	84
I.3	Variabilidad Genética.....	98
I.4	Estructura Genética Intrapoblacional.....	99
I.5	Diferenciación genética entre poblaciones.....	100
I.5.1	Índices de fijación de Wright y Flujo génico.....	100
I.5.2	Análisis jerarquizado de la distribución de la variabilidad genética.....	102
I.5.3	Identidad y Distancias Genéticas de Nei.....	103
I.5.3.1	Distancias Genéticas e Identidad Genéticas de Nei promedio entre especies.....	104
I.6	Correlación entre distancia genéticas y geográficas.....	105
I.6.1	Para todas las poblaciones de <i>O. bonariensis</i> , <i>O. argentinensis</i> y <i>O. hatcheri</i> estudiadas.....	105
I.6.2	Para todas las poblaciones de <i>O. bonariensis</i> estudiadas.....	106
I.6.3	Para todas las poblaciones de <i>O. hatcheri</i> estudiadas.....	106
I.7	Análisis fenéticos de distancias genéticas.....	107
II.	Resultados de RAPD.....	108
II.1	Extracción de ADN total de <i>Odontesthes</i>	108
II.2	Efectos de la concentración de ADN.....	108
II.3	Selección de primers informativos para la identificación de las especies de <i>Odontesthes</i>	108
II.4	Caracterización de las especies de <i>Odontesthes</i>	115
II.5	Diferenciación Genética entre poblaciones y especies.....	123
II.5.1	Divergencia genética.....	123
II.5.1.1	Distancias Manhattan obtenidas entre poblaciones.....	123
II.5.1.2	Divergencia genética por índices F_{ST} y Flujo génico.....	123
II.5.1.2.1	F_{ST} para cada par de poblaciones totales estudiadas.....	123
II.5.1.2.2	F_{ST} promedio para poblaciones de <i>O. bonariensis</i> y <i>O. hatcheri</i>	124
II.5.2	Distribución jerárquica de la variabilidad genética y Flujo Génico de poblaciones Totales.....	125

II.6	Correlación entre distancias Manhattan y distancias geográficas.....	126
II.6.1	Para todas las poblaciones de <i>O. bonariensis</i> , <i>O. argentinensis</i> y <i>O. hatcheri</i> estudiadas.....	126
II.6.2	Para todas las poblaciones de <i>O. bonariensis</i> estudiadas.....	126
II.6.3	Para todas las poblaciones de <i>O. hatcheri</i> estudiadas.....	127
II.7	Análisis fenéticos	127
II.7.1	de Distancias Manhattan	127
II.7.2	de índices F_{ST} obtenidos por AMOVA.....	129
II.8	Correlación entre Divergencia genética obtenida entre Isozimas y RAPD.....	130
DISCUSION.....		131
I	Comparación de los resultados electroforéticos con antecedentes bibliograficos	132
II	Caracterización de poblaciones, grupos y especies.....	133
II.1	Isoenzimas.....	133
II.2	RAPD.....	135
II.3	Isoenzimas versus RAPD.....	136
III	Variabilidad Genética.....	137
III.1	Polimorfismo.....	137
III.2	Heterocigosis media.....	138
IV	Estructura Genética Intrapoblacional.....	140
V	Diferenciación Genética.....	141
VI	Correlación entre Distancia Genética y Distancia Geografica	147
VII	Tiempo de Divergencia.....	149
VIII	Analisis feneticos.....	153
CONCLUSIONES.....		158
BIBLIOGRAFIA.....		163

Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnicas de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies de pejerreyes de la República Argentina, género *Odontesthes* (Atherinopsidae, Atherinopsinae, Sorgentinini).

RESUMEN

Se estudió por medio de electroforesis de Isoenzimas y RAPD la variabilidad, diferenciación y estructura genética en poblaciones naturales de *O. argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri*. Se analizó asimismo si la diferenciación genética entre poblaciones, detectada por Isoenzimas y RAPD, podría estar asociada con las distancias geográficas entre las mismas.

La técnica de Isoenzimas permitió el análisis de 22 loci (19 para cada especie), de los cuales 8 fueron variables. Si bien las frecuencias alélicas de las poblaciones de cada especie para estos 8 loci mostraron algunas diferencias, la población de *O. bonariensis* del Río de la Plata se destacó netamente entre las poblaciones de su especie por la presencia de un alelo fijado y diagnóstico (*LDH-1*3*). La comparación de frecuencias alélicas entre las distintas especies reveló importantes diferencias, siendo la especie más diferenciada *O. hatcheri*. Esta especie se diferenció de *O. bonariensis* y *O. argentinensis* por la presencia de 3 loci GOT exclusivos (diagnósticos) (*GOT-2**, *GOT-3**, *GOT-5**). Además la expresión tisular diferencial permitió distinguir las 3 especies por los patrones de expresión de 3 loci (*MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3**).

La técnica de RAPD permitió el análisis de 220 bandas. De éstas, sólo 4 resultaron monomórficas. La mayoría de las bandas amplificadas fueron compartidas por las especies y poblaciones variando sólo en sus frecuencias. Del análisis de estas frecuencias se deduce que existen 2 importantes grupos: uno conformado por las poblaciones de *O. hatcheri* y el otro compuesto por las poblaciones de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*. Al igual que en el análisis isoenzimático la población de *O. bonariensis* del Río de la Plata fue la más diferenciada dentro de las de su especie.

Los valores de variabilidad genética promedio por especie, calculados por Isoenzimas, fueron menores para *O. bonariensis* ($P= 6.31\%$, $H= 0.034$) que para *O. argentinensis* ($P= 10.5\%$, $H= 0.045$) y *O. hatcheri* ($P= 10.5\%$, $H=0.047$). Esta disminución en los índices de variabilidad fueron asociados al tipo de distribución y a la alta presión pesquera que sufre *O. bonariensis*. La población de *O. bonariensis* de la laguna Salada Grande, fue la excepción a lo antedicho, registrando valores altos de variabilidad ($P= 10.5\%$, $H= 0.06$). Siembras periódicas con alevinos obtenidos por inseminación artificial a partir de gametas parentales de dicha laguna mitigarían la disminución de la variabilidad.

La estructura genética intrapoblacional estimada por el estadístico F_{IS} de Wright (F_{IS} promedio = 0.004^{NS} $p>0.05$) indicó que las frecuencias genotípicas en todas las poblaciones se ajustarían a lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg; por ende el apareamiento sería aleatorio. El comportamiento promiscuo en el apareamiento, durante el cual muchos machos pueden fertilizar los huevos de una única hembra (descrito para otras especies de pejerreyes) ha sido sugerido para las especies en estudio, dado que este favorecería la panmixia.

La diferenciación genética entre poblaciones de la misma y diferentes especies fue estimada por el índice de fijación F_{ST} para ambas metodologías, mientras que los índices de Distancia e Identidad de Nei solo fueron obtenidos para Isoenzimas. Los niveles de diferenciación genética entre poblaciones obtenidos a partir de los datos de Isoenzimas y RAPD fueron similares (F_{ST} promedio para todas las poblaciones igual a 0.807 y 0.78 respectivamente) e indicaron una diferenciación altamente significativa entre poblaciones de diferentes especies. Con ambas metodologías, el flujo génico estimado ($Nm= 0.06$ y 0.07) fue menor que 1 individuo por generación cuando se consideraron todas las poblaciones.

La diferenciación entre poblaciones dentro de cada especie mostró valores de F_{ST} significativos a altamente significativos tanto para isoenzimas ($F_{ST}= 0.022-0.130$) como para

RAPD ($F_{ST} = 0.553-0.687$) pero fue menor que la observada al incluir poblaciones de distintas especies (más evidente en Isoenzimas). Consecuentemente, la estimación indirecta del flujo génico a partir de la diferenciación isoenzimática fue mayor que un migrante por generación ($Nm > 1$). Sin embargo, el Nm estimado a partir de los datos de RAPD ($Nm = 0.114-0.202$), si bien fue más alto que el obtenido considerando todas las poblaciones, no superó 1 migrante por generación. RAPD permitió una mayor diferenciación entre poblaciones de la misma especie que la observada mediante la técnica de Isozimas., como consecuencia del alto polimorfismo (bandas muy variables) encontrado por esta técnica.

En Isoenzimas, la diferenciación también se estimó mediante los índices de Identidad y Distancia de Nei promedio entre especies. Los intervalos de distancias promedio para poblaciones coespecíficas y de distintas especies se ajustaron a los valores encontrados por Shaklee y col. (1982) para peces. En cambio, el intervalo de distancia encontrado entre *O. bonariensis* y *O. argentinensis* ($D = 0.07 - 0.112$) correspondería, según Thorpe (1979), al de poblaciones coespecíficas. De acuerdo al intervalo de distancia genética de Nei (D) obtenido por Thorpe (1979) para especies congénicas, tal vez sería necesario una revisión sistemática de estas poblaciones para dilucidar este problema. Sin embargo, si se tiene en cuenta el intervalo de distancias genéticas de Nei encontrado por Shaklee y col. (1982), para poblaciones de distintas especies, los valores de las asociaciones entre especies se ajustan a lo esperado por la taxonomía.

La varianza genética total fue mayor para RAPD (49.58) que para isoenzimas (3.99). Esto se debió al mayor número de bandas analizadas para RAPD (220) que para isozimas (22 loci). A partir del análisis de la distribución de la variabilidad genética se determinó que la variación entre especies (variación específica) fue la proporción mayor tanto para isoenzimas como para RAPD (73.9% y 44% respectivamente). De la comparación del porcentaje de variación específica obtenido por ambos métodos se desprende que Isoenzimas detecta mejor este tipo de variación, pudiendo separar especies con mayor precisión. El porcentaje de variación entre poblaciones de la misma especie (variación poblacional) fue mayor para RAPD (34%) que para isoenzimas (6.8%), indicando que la variación poblacional fue mejor detectada por la primera técnica. El porcentaje de varianza dentro de las poblaciones (variación individual) fue similar para ambos métodos (19.3% y 22% para Isoenzimas y RAPD respectivamente).

Asumiendo la hipótesis del reloj molecular, se estimó que *O. hatcheri* divergió de su antecesor durante el Plioceno tardío; en cambio la divergencia obtenida entre *O. argentinensis* y *O. bonariensis* indicaría que ésta fue reciente, alrededor de 490.000 años (Pleistoceno medio). Dado el origen de la laguna Salada Grande donde se muestreo una de las poblaciones de *O. bonariensis* y la fuerte asociación entre esta población y *O. argentinensis* obtenida mediante las técnicas de Isoenzimas como de RAPD, se postula un posible evento ancestral de hibridación introgresiva de *O. bonariensis* proveniente de lagunas litorales con *O. argentinensis*.

La falta de correlación entre las distancias geográficas de las poblaciones de cada especie y la diferenciación genética obtenida tanto por RAPD como por Isoenzimas sugirió que la divergencia de las poblaciones de cada especie podría ser explicada por dos mecanismos evolutivos: la Selección o por Eventos fundadores recientes, no habiéndose aún alcanzado el equilibrio entre deriva y migración. En cambio al incluir todas las poblaciones de las distintas especies la correlación positiva, tanto para Isozimas como RAPD, sugiere que pudo existir diferenciación de las mismas por Deriva Genética, aunque no se descarta a la Selección como probable fuerza operante. Al incluir todas las poblaciones de las diferentes especies se plantean distancias geográficas importantes, con ambientes muy disímiles donde las presiones selectivas podrían ser muy diferentes determinando una importante diferenciación genética que se correlacionaría con la distancia geográfica.

El fenograma obtenido por Isoenzimas dejó visualizar 3 clusters correspondientes a las 3 especies estudiadas, permitiéndolo este método una buena agrupación de las poblaciones de cada especie. El fenograma obtenido a partir de RAPD corroboró 2 de los cluster (*O. hatcheri* versus *O. bonariensis* y *O. argentinensis*) pero no tuvo buena resolución al momento de separar las poblaciones de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*.

La técnica de Isoenzimas permitió una mejor agrupación de las poblaciones de cada especie, indicando ser mejores marcadores que los RAPD al momento de comparar diferentes especies.

Study of genetic variability and differentiation by Isozyme and RAPD techniques in natural populations of silverside species of the genus *Odontesthes* (Atherinopsidae, Atherinopsinae, Sorgentinini) from Argentina.

ABSTRACT

Isoenzyme electrophoresis and RAPD techniques were applied to analyze the genetic variability, differentiation and structure of natural populations of *O. argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri*. The present study also evaluated if the genetic distances between populations are associated with geographic distances.

Isozyme technique allowed analyzing 22 loci (19 for each specie), 8 of which were variables. Allelic frequencies of the populations of each species, for these 8 loci, showed some differences. Río de la Plata population was the most differentiated *O. bonariensis* population, showing one fixed and diagnostic allele (*LDH-1*3*). The comparison of allelic frequencies among the different species revealed important differences, *O. hatcheri* being the most differentiated one. This species differed from *O. bonariensis* and *O. argentinensis* by the presence of 3 GOT diagnostic loci (*GOT-2 **, *GOT-3 **, *GOT-5 **). The analysis of tissue specificities also allowed to differentiate the 3 species by the relative expression of 3 loci (*MEP-1 **, *MEP-2 ** and *MEP-3 **).

RAPD technique allowed the analysis of 220 bands. Among them, 4 were monomorphic. Most of the amplified bands were shared by the species and populations, varying only in their frequencies. Two major groups emerged from RAPD analysis: one integrated by populations of *O. hatcheri* and the other including populations of *O. bonariensis* and *O. argentinensis*. Río de la Plata population was the most differentiated within *O. bonariensis* in both Isozyme and RAPD analyses.

The average values of genetic variability for species, based on Isozyme data, were smaller in *O. bonariensis* ($P = 6.31\%$, $H = 0.034$) than in *O. argentinensis* ($P = 10.5\%$, $H = 0.045$) and *O. hatcheri* ($P = 10.5\%$, $H=0.047$). The decrease of the genetic variability in *O. bonariensis* could be associated with its distribution type and the fisheries pressure. The *O. bonariensis* population belonging to the "Salada Grande" lagoon was the exception to the above-mentioned, showing higher values of variability ($P = 10.5\%$, $H = 0.06$). Periodic fingerlings sowing, obtained by artificial insemination from parental gametes of this lagoon, would mitigate the decrease of variability.

The population's genetic structure estimated by F_{IS} Wright statistical (Average $F_{IS} = 0.004$ ^{NS} $p>0.05$) indicated that all the populations would adjust to Hardy-Weinberg, so there would be in random union of gametes. Panmixia could be reinforced through promiscuous behavior during the mating (many males fertilizing the eggs of one female) as was described for other silversides

The genetic differentiation among populations of the same and different species was estimated by the F_{ST} fixation index for both methods. Nei's Distance and Identity indexes were obtained only for Isozymes. The levels of genetic differentiation among populations obtained by means of Isozymes and RAPD data were similar (average F_{ST} for all populations was 0.807 and 0.78 respectively) and indicated a highly significant differentiation among populations of different species. With both methodologies, the genic flow ($Nm = 0.06$ and 0.07) was smaller than 1 individual for generation when all the populations were considered.

The genetic differentiation among populations of each species showed significant to highly significant F_{ST} values, both for the Isozyme ($F_{ST}=0.022 - 0.130$) and RAPD ($F_{ST}=0.553 - 0.687$) analysis. However these values were smaller than the ones observed when including populations of different species (more evident in Isozymes). Consequently, for Isozymes, the

estimation of gene flow among populations of the same species was bigger than a migrant for generation ($Nm > 1$). For RAPD, although it was higher ($Nm = 0.114-0.202$) than the one obtained considering all the populations, it didn't reach 1 migrant for generation. RAPD allowed a higher differentiation among populations of the same species than the one observed by means of the Isozyme technique, as a consequence of the high polymorphism (very variable bands) found by this technique.

In Isozymes, the differentiation also was estimated by means of the Nei average Identity and Distance indexes among species. The ranges of average distances for coespecific populations and for different species were similar to the values found by Shaklee *et al.* (1982) for fishes. On the other hand, according to Thorpe (1979) the range of average distance between *O. bonariensis* and *O. argentinensis* ($D=0.07 - 0.112$) would correspond to that of coespecific populations. According to the range of average Nei distance obtained by Thorpe (1979) it would be necessary a systematic revision of these populations to elucidate this problem. However, applying the range of average Nei distance found by Shaklee *et al.* (1982) for populations of different species, the values adjust perfectly with the taxonomie.

The total genetic variance was higher for RAPD (49.58) than for isozymes (3.99). This was due to the higher number of bands analyzed for RAPD (220) than for isozymes (22 loci). The analysis of the genetic variability's showed that the variation among species (specific variation) was the highest proportion, as much for isozymes as for RAPD (73.9% and 44% respectively). The variation percentage among species was higher for Isozyme (73,9%) than for RAPD (44%), indicating that the species variation is detected better by Isozyme analysis. The variation percentage within species (population variation) was higher for RAPD (34%) than for isozymes (6.8%), indicating that the population variation is detected better by RAPD. The percentage of variance within the populations (individual variation) was similar for both methods (19.3% and 22% for Isozymes and RAPD respectively).

Assuming the hypothesis of the molecular clock, the divergence time was estimated. *O. hatcheri* would have diverged from its predecessor during the late Plioceno; on the other hand, the divergence obtained between *O. argentinensis* and *O. bonariensis* would indicate that this was recent, around 490.000 years (Mid-Pleistoceno). A possible ancestral event of introgressive hibridazation is postuled for litoral lagoons. This could be the case of "Salada Grande" lagoon population (*O. bonariensis*) with *O. argentinensis*., according to the origin of this lagoon and the strong association among the same ones, showed by means of Isozymes and RAPD techniques.

The lack of correlation between geographical distances and genetic differentiation of the populations of each species obtained by RAPD and Isozyme, suggested that the divergence of the populations of each species could be explained by two evolutionary mechanisms: the Selection or by recent Founder Events, yet not having reached the balance between drift and migration. On the other hand, when all the populations of the different species were included, a positive correlation was showed, so much for Isozymes as for RAPD. Then it is suggested that the differentiation of these populations could have taken place by genetic drift, although the Selection could have been another operating force. Important geographical distances with very dissimilar environmental conditions should be consider when all the populations of different species were included. In these areas, the selective pressures could be very different determining an important genetic differentiation that would be correlated with the geographical distance

The phenogram obtained by Isozymes showed 3 clusters corresponding to the 3 studied species. So this method allowed a good grouping of the populations of each species. The phenograms obtained by RAPD confirmed 2 of these clusters (*O. hatcheri* versus *O. bonariensis* and *O. argentinensis*) but didn't have good resolution to separate the populations of *O. bonariensis* and *O. argentinensis*.

Isozymes allowed a better grouping of the populations of each species, indicating to be better markers than the RAPD when comparing different species

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

AMOVA: Análisis Molecular de la Varianza.

bootstrapping: método estadístico basado en el muestreo con reemplazo repetido al azar, a partir de una muestra original para generar una colección de nuevas muestras pseudoreplicadas, a partir de las cuales se puede estimar la varianza de muestreo.

Buffer: Tampón

dNTP: desoxiribonucleósidos trifosfato = dATP +dTTP +dGTP +dCTP.

EDTA: ácido etilen.diamino- tetracético.

fenograma: diagrama ramificado que asocia entidades por la estimación de su similitud total.

hs: horas

μl: microlitro; $1 \mu\text{l} = 10^{-6} \text{l}$.

μM: micromolar; $1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{M}$.

min: minuto.

NBT: Nitroblue-tetrazolium.

ng: nanogramo; $1 \text{ng} = 10^{-9} \text{g}$.

overnight: toda la noche

pb: pares de bases.

PMS: Fenasín metasulfato.

primer/iniciador/cebador: oligonucleótido compuesto por al menos 6 bases. Se utilizan como iniciadores en la amplificación *in vitro* de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

RAPD: (*Random Amplified Polymorphic DNAs*): Amplificación al azar de ADN Polimórficos.

RFLP: (*Restriction Fragment Length Polymorfism*): Polimorfismo para el largo de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

seg.: segundos.

SSR: (*Single Sequence Repeats*):Repeticiones de secuencias únicas. (técnica de microsátélites)

UPGMA (Unweigted pair- group method of arithmetic averages): Técnica de análisis de agrupamiento.

UTO: Unidades Taxonómicas Operativas.

V: voltios

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

INTRODUCCION

L CAMPO DE APLICACIÓN

Gran parte de las lagunas de nuestro país constituyen un área de crianza, reproducción y alimentación para gran variedad de peces. Estos cuerpos de agua tienen importancia tanto en lo que se refiere a producción natural de pescado comercial como a las posibilidades que éstas ofrecen para el desarrollo de la pesca deportiva. La implementación de medidas científicas, que tiendan a la protección de la fauna y de la flora acuática y cuyo objetivo sea el poblamiento y/o repoblamiento de sus aguas con especies de peces biológica y económicamente adecuados, permitirán aumentar dichas actividades.

El inapropiado manejo de los recursos naturales, tal como una pesca exhaustiva tanto por desconocimiento de las especies presentes como de sus aspectos ecológicos y/o biológicos, es una de las principales causas que afectan las poblaciones de faunas silvestres. Estos hechos junto con otros factores de naturaleza diversa como polución de aguas, navegación a motor, obras hidráulicas, acaban por transformar gradualmente aguas inicialmente productivas en improductivas.

Diversos organismos internacionales, tales como el programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales, han desarrollado actividades para combatir este flagelo.

La elaboración de medidas que enfoquen a un aumento de la productividad de los cuerpos de agua deberán estar relacionadas principalmente con el conocimiento previo de las características de las especies que los integran.

Atendiendo a estos aspectos, en la Argentina y en otros países se están llevando a cabo estudios multidisciplinarios en diferentes especies de peces de importancia económica. En

nuestro país, dentro de éstas (ya sea como objeto de pesca comercial y/o deportiva) se destacan los pejerreyes.

En el territorio argentino los pejerreyes se hallan ampliamente distribuidos en aguas continentales y marinas, estos se incluyen en un único género: *Odontesthes*. Una de las especies más estudiadas de este género es *O. bonariensis* (Fig.1), la cual es considerada promisorio para la acuicultura intensiva, aunque su tasa de crecimiento y supervivencia todavía no son satisfactorias.

Hace más de tres décadas el pejerrey (*O. bonariensis*) fue introducido exitosamente en el Japón desde la Argentina, a partir de huevos obtenidos de reproductores de la Laguna de Chascomús, Provincia de Buenos Aires. En la actualidad, en ese país, se produce pejerrey en forma intensiva. Aunque la producción anual y las poblaciones silvestres para la pesca deportiva son todavía escasas, esta especie (*O. bonariensis*) ha sido aceptada inmediatamente para consumo (Del Valle, 1991).

En la Argentina, se llevaron a cabo intentos de cría intensiva de *O. bonariensis*; sin embargo la falta de tradición en la acuicultura, hábitos de alimentación en la población y la abundancia natural de esta especie, limitaron la continuidad de esta tarea. Posteriormente la pesca incontrolada y la ineficiencia en la técnica de cría de alevinos provocó una disminución considerable de las poblaciones naturales.

El conocimiento de la variabilidad, diferenciación y la estructura genética de las poblaciones de una especie constituyen un aspecto clave, siendo esta información relevante para planes de conservación.

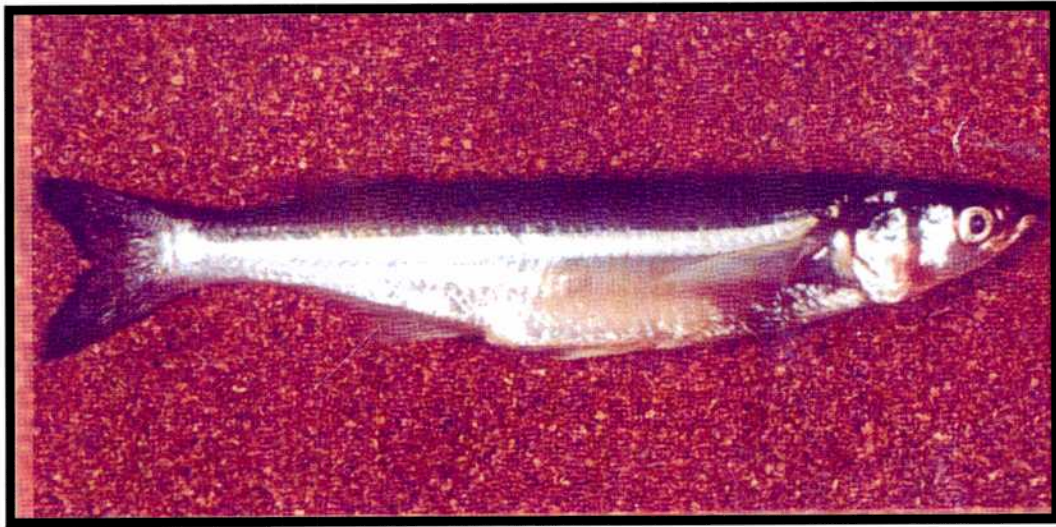


Fig. 1: Ejemplar adulto de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.

II. REQUERIMIENTOS PARA PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN

La formulación de una estrategia apropiada para el uso racional de las especies promisorias así como para el desarrollo de programas de conservación requiere por lo tanto de un profundo conocimiento de la taxonomía y las características biológicas y ecológicas del grupo considerado.

Podemos definir taxonomía como el proceso por el cual se agrupa a la diversidad existente de organismos en un orden significativo. La clasificación taxonómica se basa principalmente en las posibles relaciones o afinidades existentes entre organismos. Estas relaciones (parentesco) pueden implicar o bien que derivan de un ancestro común o que presentan varias características totalmente similares.

Las características o atributos de los organismos que son utilizados para establecer un nivel de parentesco se llaman caracteres.

Los caracteres utilizados en estudios sistemáticos derivan de información en varios niveles: morfológicos, fisiológicos, ecológicos, genéticos, etológicos, parasitológicos, bioquímicos y moleculares. De este modo caracteres que estén presentes en todos los miembros de una especie y no estén presentes en otra especie pueden ser empleados para la separación de las mismas. Determinados caracteres no solo pueden presentar variación entre individuos pertenecientes a distintas poblaciones sino también en individuos de una misma población. Distinguir la variación que ocurre dentro de una especie de la variación que se produce entre especies ha sido uno de los principales problemas de la sistemática. Dos individuos pertenecientes a una misma especie pueden llegar a ser considerados especies distintas debido a variación genética individual, diferencia de edad, de sexo, alimentación, estadio de vida, etc. Muchos errores de clasificación se han cometido debido a la falta de reconocimiento de esta variación intraespecífica. La sistemática ha tratado de minimizar este problema mediante el

análisis de un número significativo de individuos pertenecientes a una misma especie, de modo de conocer el intervalo de amplitud de un dado carácter dentro de una especie.

Entre las principales causas de variación intraespecífica se encuentran los factores ambientales. Estos pueden ocasionar cambios temporales, cíclicos o permanentes en el individuo. Muchas de las características morfológicas de los organismos pueden cambiar durante su ciclo de vida en respuesta a condiciones ambientales como las observadas por Ferguson (1980) en Trucha marrón (*Salmo trutta*) en la cual se registró variación en el número de vértebras y en el número de radios de las aletas bajo distintas condiciones ambientales.

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido estudiar la diversidad dentro y entre poblaciones de especies de peces (Capili y col. 1993; Ward y col. 1994; Gomes y col. 1996; Gomes y col. 1998).

Entre los marcadores moleculares que han sido aplicados con éxito en esta problemática se destacan las técnicas de electroforesis de isoenzimas (Miller y col. 1994), la técnica de amplificación al azar de ADN polimórficos (RAPD) (Gomes y col. 1998) y más recientemente, la técnica de microsatélites (Beheregaray y Sunnucks, 2000). De este modo, la aplicación conjunta de alguna de estas metodologías puede contribuir al conocimiento genético de las especies de *Odontesthes* aportando valiosa información sobre la variabilidad y la diferenciación genética de sus especies y además asistir a otras disciplinas como la taxonomía en la caracterización y delimitación precisa de sus especies, requisitos fundamentales para un mayor conocimiento de este importante género.

III. EL GENERO *ODONTESTHES*

III.1 Sistemática

De todos los vertebrados vivientes, los teleósteos son los más numerosos, aproximadamente 25.770 especies. Dado esta gran diversidad biológica, es importante el estudio de la variabilidad genética de especies autóctonas que presentan importancia económica. Las diferentes especies de pejerreyes en las últimas décadas han sido explotadas como recursos (Grosman, 1995). Con este objetivo se seleccionaron tres especies de pejerreyes, *Odontesthes argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri* como modelo biológico para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, ocupando las mismas diferentes hábitats

Los pejerreyes están ubicados dentro del Orden Atheriniformes. Estos peces fueron tradicionalmente considerados miembros de la familia Atherinidae, grupo muy diverso. Esta clasificación ha cambiado en la última década, debido al no-reconocimiento de relaciones de hermandad entre los pejerreyes del Nuevo Mundo y los del Viejo Mundo. Actualmente se considera que los pejerreyes pertenecen a 2 familias monofiléticas, las cuales son filogenéticamente distantes, siendo estas: la familia *Atherinopsidae* del Nuevo Mundo y la familia *Atherinidae* del Viejo Mundo (Saeed y col. 1994; Dyer y Chernoff 1996).

Los pejerreyes del Nuevo Mundo están representados por dos subfamilias: Atherinopsinae y Menidiinae (Schultz 1948; White 1985; Chernoff 1986; Dyer y Chernoff, 1996). Dentro de Atherinopsinae se reconocen dos tribus: los Atherinopsini de la costa oeste de Norte América y los Sorgentinini distribuidos en aguas dulces, marinas y estuarios de Sudamérica (White 1985; Dyer 1993). Se reconocen 2 géneros para Sorgentinini: *Basilichthys* compuesta por 5 especies restringidas a la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes, en ríos y lagos de Chile y Perú y *Odontesthes* con 17 a 25 especies reconocidas que se encuentran en ambientes costeros marinos, estuarinos y dulceacuícolas del Cono sur de Sudamérica (Dyer, 1998).

La ubicación sistemática propuesta por Nelson (1994) y Dyer y Chernoff (1996) de las especies estudiadas es:

DIVISION	Teleostei
SUB DIVISION	Euteleostei
SUPERORDEN	Acanthopterygii
SERIE	Atherinomorpha (Greenwood, Rosen, Weitzmen, Myers 1996)
ORDEN	Atheriniformes (Rosen, 1964)
FAMILIA	Atherininopsidae (Fowler, 1903)
SUB-FAMILIA	Atherinopsinae (Fowler, 1903)
TRIBU	Sorgentinini (Pianta de Risso y Risso, 1953)
GENERO	<i>Odontesthes</i> (Evermann y Kendall, 1906)

O. argentinensis (Valenciennes 1835)

O. bonariensis (Valenciennes 1835)

O. hatcheri (Eigenmann, 1909)

III.2 Distribución

Odontesthes es el género más diverso de pejerreyes de Sudamérica, sus especies se encuentran en aguas dulces, marinas y estuarinas de áreas subtropicales y templadas de Sudamérica. Del lado Oeste de los Andes las especies de agua dulce se encuentran en drenajes de Chile, y del lado Este se distribuyen en las subregiones Brasileña y Austral. Las subregiones biogeográficas y provincias se basan en Ringuelet (1975) modificados por Arratia y col. (1985) y Cione (1986). Las especies marinas son cercanas a la costa y se distribuyen desde las aguas frías del Perú y el Sur de Brasil hasta Tierra del Fuego, incluyendo las Islas Malvinas y el Archipiélago Juan Fernández (Dyer 1993).

Dado que se seleccionaron 3 especies de pejerreyes, *Odontesthes argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri* como modelo biológico para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, a continuación se especificara la distribución de las mismas (Fig. 2)

Tanto *Odontesthes bonariensis* como *O. hatcheri* son dos especies endémicas de ríos y lagunas que se localizan en áreas subtropicales y templadas del Sudamérica (Campos, 1984 y Martty, 1992). La distribución de estas especies es alopátrica: *Odontesthes hatcheri* esta restringida a las provincias Patagónica y Andino-Cuyana de la subregión Austral, mientras que *O. bonariensis* se encuentra en la provincia Paraná Platense de la subregión Brasileña (centro y norte de la Argentina, Uruguay, Paraguay y Sur de Brasil) (Fig. 2). Sin embargo ambas especies pueden ser ocasionalmente encontradas juntas, localizadas en la transición de las dos áreas, aparentemente debido al resultado de una introducción antropogénica de ambas hacia el sur y norte de su rango nativo (Del Valle y Nuñez, 1990; Ortubay y col., 1994). Registros del año 1988 (Quirós y col.) mencionan la presencia de *O. bonariensis* y *O. hatcheri* en el lago Nihuil, laguna Urrelauquén, Laguna Dulce y lago Pellegrini. En “Expo 90 Argentina – Japón” fue presentado un ejemplar como híbrido de estas 2 especies proveniente del Lago Pellegrini (Prov. de Río Negro). A su vez informes de Saavedra y Piacentino 1991 indicaron la posibilidad de hibridización natural.

La tercera especie estudiada, *O. argentinensis*, es conocida por su distribución marina costera e estuarina desde la ciudad de Santos, Sur del estado de San Pablo, Brasil hasta Rawson, Provincia de Chubut, Argentina (Dyer 1993, García 1988) (Fig. 2).

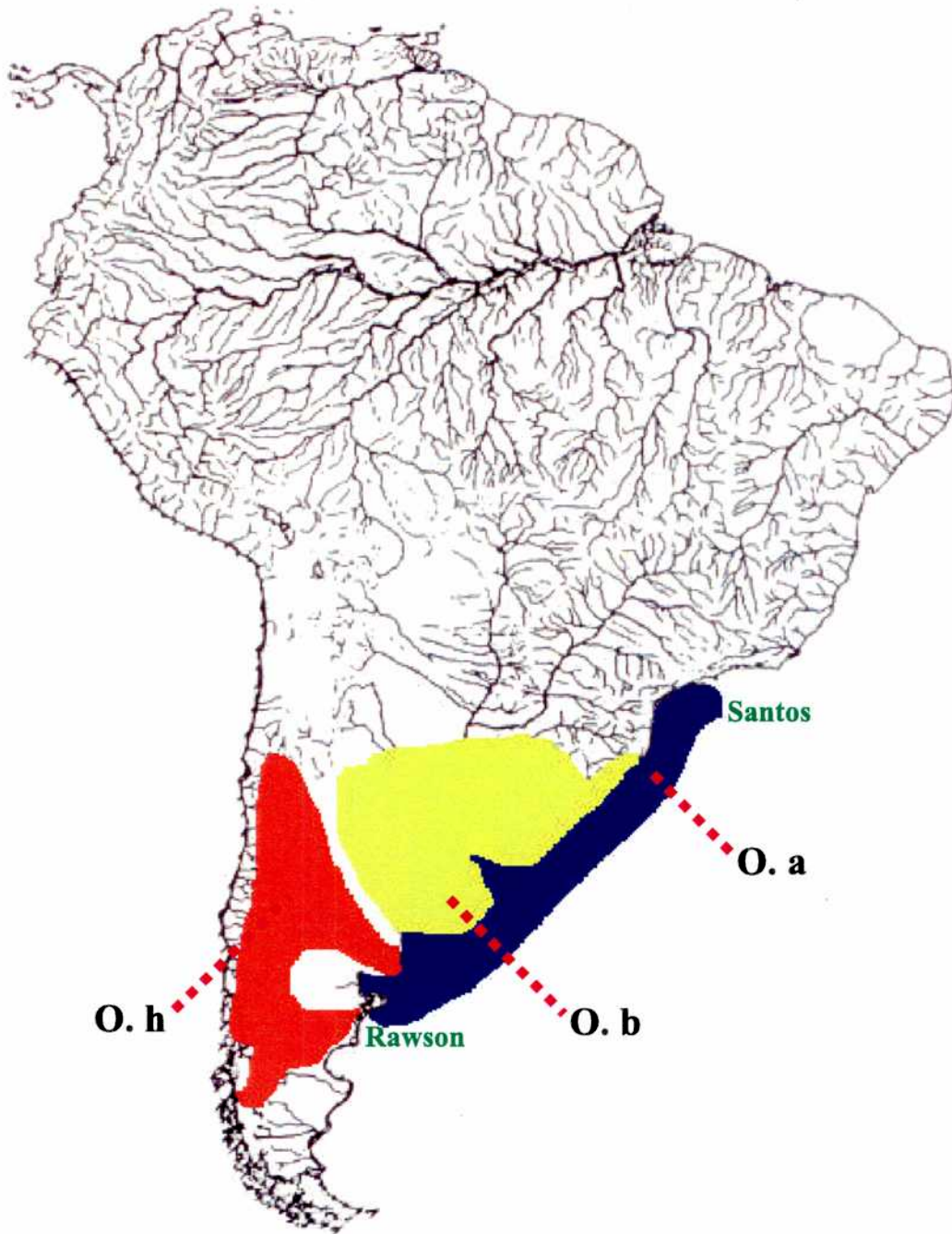


Figura 2

Distribución de las tres especies estudiadas: *O. argentinensis* (O. a) ■, *O. bonariensis* (O. b) ■ y *O. hatcheri* (O. h) ■. Tomado de Dyer 1993 (O.a) y Dyer 1998 (O.b, O.h).

III.3 Escenarios Biogeográficos y Relaciones Filogenéticas

Las especies de *Odontesthes* están distribuidas a lo largo de diferentes áreas biogeográficas; la divergencia de las distintas especies podría estar asociada a los acontecimientos que generaron la biogeografía de Sudamérica. Podría esperarse que grupos de pejerreyes pertenecientes a la zona austral de Sudamérica presenten niveles de divergencia históricos (Beheregaray, 2000), dado que esta área presenta una configuración geográfica e hidrográfica modelada por los eventos del Terciario (Tarling 1980; Uliana y Biddle 1988; Hinojosa y Villagran 1997). Como ejemplo se puede citar el principal levantamiento de la Cordillera de los Andes, el cual empezó durante el Mioceno, alrededor de 10-15 millones de años atrás (Tarling 1980).

Por otro lado divergencias recientes, probablemente podrían haber ocurrido en el grupo de pejerreyes endémicos de “las Pampas” (Beheregaray, 2000) correspondiente a la provincia Paraná Platense de la subregión Brasilica (centro y norte de la Argentina, Uruguay, Paraguay Sur de Brasil). Esta región fue recientemente formada por cambios en el nivel del mar durante el Cuaternario (Schwarzbold y Schaffer 1984).

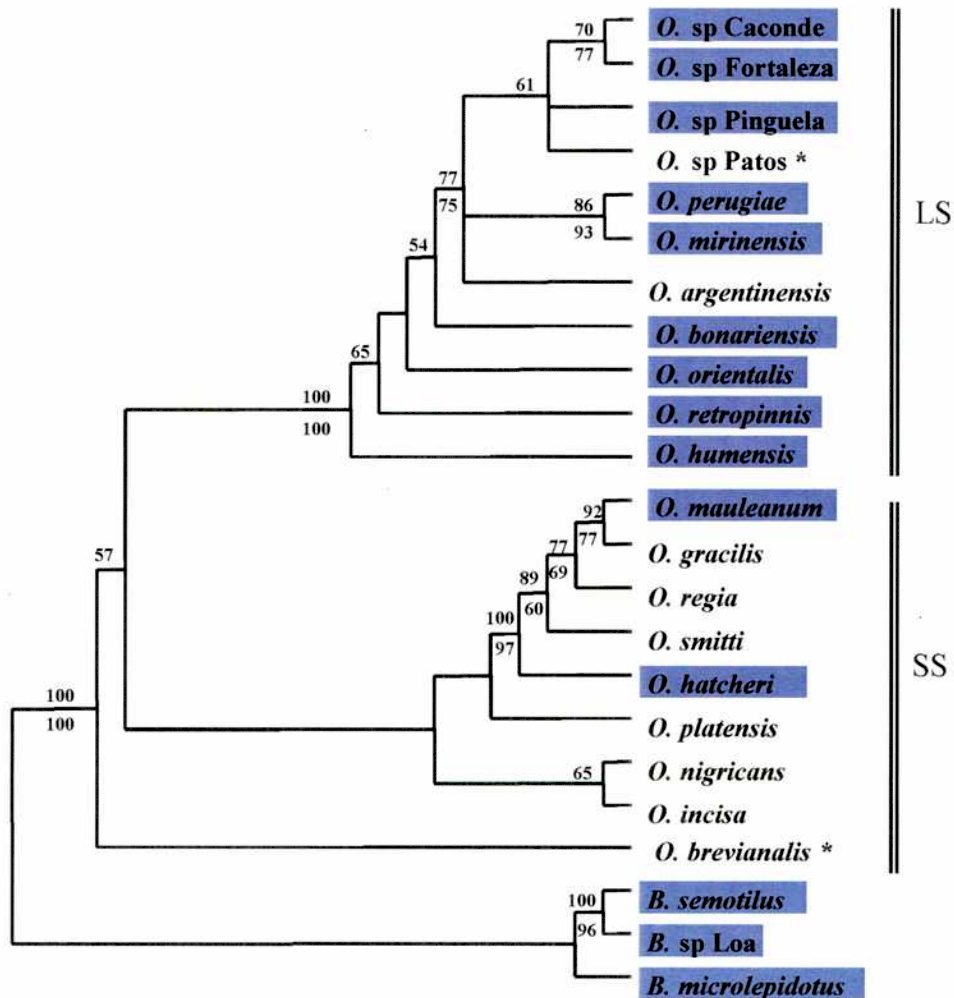
El primer estudio filogenético incluyendo especies de *Odontesthes* fue llevado a cabo por White (1985). Su análisis reveló información a nivel genérico para la subfamilia Atherinopsinae, proponiendo una relación de hermandad entre *Odontesthes* y *Basilichthys*. Esta conclusión fue posteriormente confirmada por un estudio alozimico de Crabtree (1987) y por un trabajo anatómico de Dyer (1993). En 1998 Dyer presentó un análisis filogenético usando información de 125 caracteres tomados de White (1985), Crabtree (1987) y Dyer (1997). Su árbol filogenético tuvo algunas inconsistencias con respecto a escenarios biogeográficos, por ejemplo el grupo de especies endémicas de “las Pampas”, tales como *O. bonariensis*, *O. argentinensis*, fue ubicado en posición más ancestral que el grupo Cauque (subgénero de pejerreyes compuesto por *O. brevianalis* y *O. mauleanum*), endémico del

Oeste de los Andes, área aislada más de 10 millones de años (Beheregaray 2000). Además Dyer no logró validar su hipótesis, anteriormente sugerida por Hubbs (1918), que se basaba en las relaciones naturales de los grupos (Beheregaray 2000); es decir no logró verificar que el grupo de especies con escamas grandes forma un clado. Esta hipótesis está respaldada por el hecho que todos los *Odontesthes* con escamas grandes comparten además 3 caracteres morfológicos: posición posterior de la primera aleta dorsal, ausencia de escamas en la base de la segunda aleta dorsal y primera costilla pleural pequeña (Dyer 1993, 1998)

Recientemente la destacada Tesis Doctoral de Luciano Beheregaray (2000) incluyó un análisis filogenético molecular del género *Odontesthes*. Dicho estudio empleó 1248 caracteres obtenidos de secuencias de ADNmt, incluyó muestras de todas las especies de *Odontesthes* reconocidas por Dyer (1993, 1998) más 5 nuevas especies del Sur de Brasil y fue asociado con la historia geológica de Sudamérica. Todos los métodos filogenéticos de reconstrucción usados por Beheregaray fueron consistentes, indicando que el género es monofilético y compuesto por 2 clados (Fig.3). El primer clado está formado por especies con alto nivel de divergencia en sus secuencias de ADNmt. El segundo clado está compuesto por especies que divergieron recientemente, teniendo bajo nivel de divergencia en sus secuencias de ADNmt. Los resultados de Beheregaray (2000) validaron la hipótesis de Dyer: el primer clado está compuesto únicamente por pejerreyes de escamas pequeñas (SS) y el segundo por especies de escamas grandes (LS). Además estos resultados obtenidos por diferentes genes de ADNmt concordaron con la divergencia fenotípica (especies LS comparten 4 importantes caracteres morfológicos). El análisis llevado a cabo por Beheregaray, reveló que el taxón más ancestral de *Odontesthes* es una especie estuarina del centro-norte de Chile, *O. brevianalis* (especie SS) y que las especies derivadas de éste son marinas del Océano Atlántico. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de White (1989), la cual asume un ancestro marino para los Sorgentinini de Sudamérica y con los modelos de evolución para pejerreyes en variadas

regiones del mundo, para los cuales se postula repetidas invasiones de poblaciones marinas hacia ambientes de agua dulce (Ej. Barbour 1973; Johnson 1975; Echelle y Echelle 1984; Pavlov y col. 1988; Bamber y Henderson 1988; Creech 1991). Para las especies escamas grandes (LS), *O. humensis* corresponde a la especie ancestral. Este clado (LS) está compuesto por casi todas especies de agua dulce a excepción de *O. argentinensis* y *O. sp Patos*. Estas 2 especies marinas están ubicadas en el árbol como derivadas de las especies *O. humensis*, *O. orientalis*, *O. retropinnis* y *O. bonariensis*, esto indicaría que el clado LS es primitivamente de distribución de agua dulce.

Figure 3. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Odontesthes* basadas, en 3 genes de ADNmt. Dos árboles fueron obtenidos, mostrándose el árbol consenso. Las barras verticales separan especies con diferente tamaño de escamas, pertenecientes a 2 clados distintos (LS: escamas grandes y SS escamas pequeñas). Las barras grises indican especies de agua dulce, los asteriscos especies estuarinas, siendo el resto especies marinas. Las especies de *Basilichthys* se emplearon como "outgroup". Tomado de Beheregaray (2000).



Caracteres = 1278 (240 son informativos)

Largo del árbol=882

C. I. = 0.72

III.4 Historia Biogeográfica

El notable trabajo de Beheregaray (2000) postuló varias propuestas biogeográficas para las 23 taxa de *Odontesthes* estudiadas. A continuación mencionaré algunas de sus hipótesis.

III.4.1. Historia Biogeográfica de especies de Escamas pequeñas SS

Dado que de su análisis filogenético se desprende que la especie más primitiva del género es *O. brevianalis*, pejerreyes estuarinos de la costa de Chile, y que las taxa derivadas del mismo son especies marinas del Océano Atlántico, Beheregaray asume que una población de pejerreyes marinos de Chile del Mioceno fue encerrada en aguas dulces de Chile y Perú después de transgresiones ocurridas en esta época del periodo Terciario (Uliana y Biddle 1988), originando al género *Basilichthys*, estrictamente de agua dulce.

Durante el Mioceno medio a tardío, 2 cambios geológicos tuvieron lugar: la separación de Antártida de Sudamérica y la formación del Pasaje de Drake (Tarling 1980). Estos eventos crearon la corriente circumpolar de Antártida, terminando con la entrada de aguas cálidas hacia las costas de la Antártida y culminando en la glaciación del lado Oeste del continente alrededor de 11 a 14 millones de años atrás (Tarling 1980; Kvasov y Verbitsky 1981). Esto resultó en una global reducción de las temperaturas oceánicas y en un flujo de aguas frías a lo largo de la costa Oeste de Sudamérica que se asoció también con la corriente Humboldt (Kvasov y Verbitsky 1981). Este escenario helado dominó la costa Oeste por un periodo de 10 millones de años, desde el Mioceno medio al Plioceno. Este episodio de drástico enfriamiento, es asumido por Beheregaray, como el responsable de la extinción de la ancestral población marina de pejerreyes de las costas sur del Pacífico alrededor de 5 millones de años, pero dejando que algunos individuos de esta población persistieran en aguas estuarinas del Centro y Norte de Chile. Estas poblaciones representan a *O. brevianalis*, las cuales no pudieron competir con el endémico *Basilichthys* y quedaron restringidas a los estuarios.

En el lado Este de Sudamérica, la Corriente Circumpolar Antártica empujó a la población ancestral de pejerreyes marina hacia aguas templadas del Norte de Sudamérica. Esta población se irradió en 3 poblaciones marinas básales distribuidas en diferentes regiones biogeográficas (*O. nigricans* desde el Sur de Buenos Aires hasta el Estrecho de Magallanes, *O. incisa* distribuida en la mayor parte de la costa Argentina, Uruguay y Sur de Brasil, *O. platensis* restringida a la Prov. de Buenos Aires).

Según la hipótesis de Beheregaray una de las regresiones del Plioceno al Este de Sudamérica (Uliana y Biddle 1988) puede haber originado al pejerrey de agua dulce patagónico, *O. hatcheri*, a partir de una ancestral población marina Atlántica, posiblemente relacionada con *O. platensis*. Evidencia molecular del trabajo de Beheregaray indicó que este evento tuvo lugar alrededor de 4 a 6 millones de años. Esto ocurrió luego del mayor cambio geológico en Sudamérica, el levantamiento de la Cordillera Andina. El proceso inicial de orogénesis de este cordón montañoso empezó en el Mioceno (10 a 15 millones atrás), alcanzando su actual configuración a mediados del Plioceno (Tarling 1980; Uliana y Biddle 1988; Jordan y Gardeweg, 1989).

El desarrollo del cordón montañoso Andino elevó enormes áreas de la Patagonia. Esta elevación de la Cordillera andina trajo aparejado cambios climáticos, desarrollándose condiciones de sequía al Este de este sistema montañoso. A esto se le sumó, la regresión del “Mar Patagónico” que también dio lugar a la reducción de humedad, precipitaciones y al aumento de contrastes térmicos entre el verano y invierno (Axelrod 1979; Uliana y Biddle 1988; Hinojosa y Villagran 1997) con el subsiguiente empobrecimiento de la biota (Baez y Scillato Yané 1979; Cione 1986).

Estas condiciones de sequía tuvieron un efecto directo en la reducción de ambientes de aguas dulce y en los bajos niveles de biodiversidad observados en la Patagonia. *O. hatcheri* es la

única especie SS de agua dulce distribuida al Este de los Andes (presentando bajísima tasa de especiación).

El análisis filogenético de Beheregaray muestra que los pejerreyes patagónicos anteriormente incluidos en el subgénero Austromeniidae (*O. smitti*, *O. regiae*, *O. gracilis*), conjuntamente con la especie de agua dulce *O. mauleanum* forman un grupo consistente con alto valor de “bootstrap” que oscila entre 77 a 100. Dada las cercanas relaciones genealógicas entre *O. hatcheri* y *O. smitti*, Beheregaray sugirió que esta última especie podría haber sido originada por una población costera marina que se adaptó a las aguas del sur de la patagonia durante el Plioceno.

O. smitti es la especie del género que se distribuye más al Sur y es la única que se encuentra en ambos Océanos, Pacífico y Atlántico.

En el Océano Pacífico, este linaje dio origen a *O. regiae* (el cual colonizó la costa Oeste de Sudamérica) y *O. gracilis* (pejerrey del Archipiélago de Juan Fernández). Asimismo Beheregaray propuso que un grupo marino adyacente a *O. regiae* colonizó ambientes de agua dulce, originando a la especie estrictamente de agua dulce *O. mauleanum*. Esta especie se ubicó en la zona central y sur de Chile, estando ocupados los nichos más al Norte por las especies primitivas de agua dulce y estuarina, *Basilichthys* y *O. brevianalis* respectivamente.

III.4.2. Historia Biogeográfica de especies de Escamas grandes LS

La mayoría de las especies LS *Odontesthes* son de agua dulce a excepción del taxón marino *O. argentinensis* y estuarino *O. sp Patos*, que dada sus posiciones indican que el clado es primitivamente de agua dulce.

Este grupo de especies LS de la Llanura de las Pampas (Centro Norte de Argentina, Uruguay, Paraguay y Sur de Brasil) está estrechamente emparentado, presentando una divergencia reciente siendo difícil indicar que taxón SS le dio origen. Beheregaray sugirió que una

población ancestral marina quedó atrapada o invadió cuerpos de aguas dulces de la Llanura de las Pampas durante las transgresiones del Pleistoceno (Villwock y Tomazelli 1995). Este linaje pudo haber establecido una población residente de aguas del Estuario del río de La Plata, irradiándose posteriormente y colonizando la mayoría de los ambientes costeros de las Pampas.

Los pejerreyes son un grupo de peces que pueden invadir y especiarse rápidamente en ambientes costeros recientemente formados (Ej. Barbour 1973; Echelle y Echelle 1984; Potter y col. 1986; Bamber y Henderson 1988; Creech 1991; Beheregaray y Levy 2000; Beheregaray 2000). Por lo cual, la colonización y la especiación en la provincia Paraná-Platense de la región Brasilica (Llanura de las Pampas) ocurrió rápidamente posiblemente porque sus áreas costeras presentan una historia geológica reciente, proveyendo ambientes acuáticos vacantes. Por otro lado los pejerreyes no son buenos competidores con fauna preexistente endémica de agua dulce (Bamber y Henderson 1988). Beheregaray resalta que interesantemente ninguna especie LS ha colonizado ríos distantes al río de La Plata, al cual considera una posible y principal ruta de colonización de la Provincia Paraná Platense (Llanura de las Pampas) (posiblemente en los ríos que no se observan pejerreyes, la ictiofauna de los mismos presenta una alta competencia, impidiendo la invasión de poblaciones de *Odontesthes*).

En síntesis a partir del ítem, Historia biogeográfica, se puede concluir que:

Odontesthes esta compuesto por 2 grupos morfológicos diferentes:

- uno compuesto por especies que presentan una divergencia histórica con bajas tasas de especiación y distribuidas en más de una región biogeográfica
- el otro compuesto por especies que han divergido recientemente con rápida tasa de especiación y distribuidas en una única región biogeográfica, la Llanura de las Pampas o Provincia Paraná Platense de la región Brasilica.

III.5 Características Biológicas, Ecológicas e Importancia Económica

Los pejerreyes habitan tanto ambientes marinos como de agua dulce (Nelson, 1994 y Lander y Liem, 1983). Varias están adaptadas a vivir en ambientes con salinidades variables, y otras en ambientes hipersalinos (Ringuelet, 1962; Gunter, 1967; Menni, 1983). Se caracterizan por presentar un cuerpo hidrodinámico, ahusado y algo comprimido, cabeza cónica y alargada, con boca pequeña, con dos aletas dorsales y una franja plateada a lo largo de los flancos (Nelson 1994). El tamaño de los pejerreyes generalmente oscila de pequeño a medio, aunque algunas especies pueden alcanzar más de 40 cm de largo, siendo este el caso de *O. bonariensis*, especie de mayor porte registrada en el Orden Atheriniformes (Dyer 1993). Esta especie en la Provincia de Buenos Aires y en condiciones naturales, presenta dos períodos de actividad reproductiva: uno en primavera, que puede comenzar en Julio y terminar en Diciembre, con su clímax en los meses de Septiembre y Octubre y un segundo período mas corto en otoño, en los meses de Marzo y Abril (Ringuelet, 1943). Estos períodos se mantienen aún en condiciones de cautiverio (Strüssmann, 1989). La amplitud de los períodos de desove, es variable y elástica, por eso es posible encontrar individuos maduros todo el año (Boschi y Fuster de Plaza, 1959). El tipo de alimentación es principalmente planctónica (Ringuelet, 1967; Grosman 1995).

Constituyen un recurso natural considerado por la piscicultura como una de las futuras fuentes de proteínas para consumo a nivel mundial. La aterinicultura se origina en la Argentina a principios de siglo con los trabajos de Tulián (1909) y Valette (1910, 1924, 1933), siendo *O. bonariensis*, la especie sobre la cual se han centrado los trabajos de piscicultura en nuestro país. Esta especie ha sido sembrada, en la mayoría de los casos con éxito, en numerosas lagunas, embalses y cuerpos de agua artificiales de nuestro territorio y en distintos países con propósitos de acuicultura y pesca deportiva (Bonetto y Castello, 1985). Fue introducida y prosperó en Chile, en el Lago Peñuelas del Paraíso, allí Burbidger y col. (1974) realizaron

estudios sobre edad, crecimiento, relación longitud–peso y hábitos alimentarios de esta especie. También se han desarrollado programas de acuicultura en Brasil, Uruguay y Japón (Kleerekoper 1945; De Buen 1953; Tsuzuki y col. 2000). Dos especies de pejerreyes que serán objeto de estudio en esta Tesis, *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, fueron introducidas en Japón. Estudios realizados en dicho país indican que los híbridos de ambas, obtenidos por inseminación artificial por desove natural, son viables y muestran una prometedora aptitud para la acuicultura intensiva (Ijima 1992, Takahashi 1993, Strüssmann y col. 1997). *O. bonariensis* muestra una alta capacidad de hibridar con especies de su género, de este modo Beheregaray (2000) al inseminar artificialmente a *O. bonariensis* con *O. humensis* y *O. retropinnis*, obtiene larvas vigorosas.

El interés en el cultivo del pejerrey y la poca información sobre su biología han generado la necesidad de realizar estudios básicos para determinar y/o mejorar las tasas de crecimiento, de reproducción, desarrollo embrionario, diferenciación sexual, endocrinología, histología, condiciones nutricionales y condiciones de mantenimiento en cautiverio (Ej. Phonlor y Vinagre 1989; Strüssmann y Takashima 1989; Sampaio 1992; Phonlor y Sampaio 1992; Strüssmann y col. 1993; Guandalini y col. 1994; Renard y col. 1994; Strüssmann y col. 1996; Zagarese 1996; Phonlor y Cousin 1997; Strüssmann y col. 1997; Vissio y col. 1997; Strüssmann y col. 1998; Stefano 1999; Vissio 1999; Tsuzuki y col. 2000; Traverso y col. 2001; Vissio y col. 2002).

Las especies marinas de pejerreyes son descritas por Ringuelet y Aramburu (1960) como un grupo de peces nadadores neríticos y por Cervigón (1972) como pelágicos litorales. En general son de hábitos gregarios a pesar de que no forman cardúmenes compactos y se agrupan en las orillas de playas y escolleras protegidas. *O. argentinensis* es una de las especies que compone el Mar Argentino, la cual será analizada en este trabajo.

Características morfométricas, osteológicas y merísticas han sido habitualmente empleadas para distinguir las diferentes especies de este género (Campos, 1984 y Piacentino y Torno, 1987), pero algunos rasgos son tan semejantes que la diferenciación por este método se torna dificultosa. Por lo tanto se consideró importante para alcanzar este objetivo realizar la aplicación de métodos tales como la electroforesis de isozimas y/o la amplificación al azar de ADN polimórfico.

IV. EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS TAXONOMICOS EVOLUTIVOS

IV.1 Marcadores bioquímicos y moleculares

Dentro de una especie, los individuos difieren a nivel de su ADN debido a mutaciones. Entre los cambios más frecuentes del material hereditario se pueden mencionar diferentes clases de mutaciones incluyendo las sustituciones de bases, inserciones, inversiones y deleciones. Todos estos tipos de mutaciones tienen como consecuencia la generación de variabilidad genética.

En el pasado no era posible estudiar la variación a nivel del ADN de una manera sistemática. En las últimas décadas, el desarrollo de una gran variedad de técnicas bioquímicas y moleculares ha permitido a genetistas y sistemáticos estudiar las variaciones a nivel de ADN. Para poder estudiar estas diferencias se utilizan marcadores bioquímicos o moleculares que tienen una base genética y que pueden ser identificados inequívocamente en cualquier individuo en una población.

La detección de estos marcadores se realiza a través de diferentes técnicas como la electroforesis de isozimas, RAPD (Williams y col. 1990), RFLPs (Boltstein y col. 1980).

La electroforesis de isoenzimas es la técnica más ampliamente usada para la detección de marcadores bioquímicos. La misma ha sido, desde la década del 80, una poderosa herramienta en estudios taxonómicos, genéticos y evolutivos debido a su poder para estimar la variabilidad y diferenciación genética presente en las poblaciones naturales de un gran número de organismos (Kobayashi y col. 1984; Thompson, 1985). Esta técnica constituye un método indirecto de estudio del ADN ya que se basa en la detección de polimorfismos a nivel de proteínas enzimáticas que revelan variación a nivel de la secuencia de aminoácidos y, por ende de la secuencia de nucleótidos del ADN de los genes que la codifican.

El desarrollo en los últimos años de técnicas de marcadores moleculares basados en el estudio directo del ADN tiene algunas ventajas adicionales con respecto a las técnicas mencionadas previamente: son independientes del desarrollo ontogenético del individuo y del tipo de tejido a analizar, los patrones obtenidos permiten el estudio de las regiones codificantes y no codificantes del genoma, aportando una fuente prácticamente ilimitada de información en la población a estudiar. Debido a estas características, el uso de marcadores moleculares basados en ADN ha tenido una creciente aplicación. Estos han sido aplicados con éxito en estudios de variabilidad genética, identificación de especies, construcción de mapas genéticos, etc. (Bardakci y Skibinski 1994; Bentzen y col. 1991; Gilbert y col. 1990; Yu y Nguyen 1994)

En peces se utilizan principalmente marcadores basados en ADN tales como polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLPs), amplificación al azar de ADN polimórficos (RAPD) y microsatélites (SSR.)

La técnica de RAPD (William y col. 1990) consiste en la amplificación azarosa de ADN por PCR utilizando “primers” aleatorios que detectan polimorfismos entre genomas. Esta técnica ha sido muy utilizada los últimos años debido a ser rápida, poco costosa y requerir pequeñas cantidades de ADN, sin embargo posee la desventaja de ser marcadores dominantes y en algunos casos poseen baja reproducibilidad.

En este trabajo se escogieron dos técnicas para detectar marcadores bioquímicos y moleculares: un método indirecto de estudio del ADN, la electroforesis de isoenzimas y un método directo, la técnica de RAPD. Ambas técnicas han sido elegidas para este estudio por ser metodologías que permiten detectar polimorfismos de ADN de una manera rápida, simple y poco costosa y además porque han sido aplicadas con éxito en estudios de variabilidad y de diferenciación genética en numerosas especies de peces (Allendorf y col. 1977; Taniguchi y Morita 1979; Naish y col. ,1995; Stott y col. 1997; Gomes y col. 1998).

IV.2 Electroforesis de isoenzimas

Una de las técnicas ampliamente usadas en estudios de estructura poblacional y evolución es la electroforesis de proteínas enzimáticas. Estas técnicas fueron usadas por primera vez por Tiselius (1937) para distinguir fracciones múltiples de proteínas migrando a través de una solución bajo la influencia de un campo eléctrico. A partir de entonces numerosos investigadores mejoraron el método desarrollando la electroforesis de zona en gel de almidón (Smithies, 1955; Smithies y Poulik, 1956) y en poliacrilamida (Ornstein y Davis, 1959).

En el año 1957, Hunter y Markert desarrollaron métodos de tinción histoquímica para localizar las zonas de actividad enzimática directamente en el medio soporte. Su aplicación pronto condujo al importante descubrimiento de las “isoenzimas” o formas moleculares múltiples de una proteína que catalizan una misma reacción enzimática. Prakash y col. (1969) establecieron luego el término “aloenzima” en referencia a las variantes proteicas producidas por diferentes formas alélicas del mismo locus.

Las isoenzimas catalizan reacciones que ocurren en diferentes compartimentos celulares o tejidos, o bajo diferentes condiciones metabólicas u ontogenéticas (Markert y Moller, 1959).

Las tres principales causas de formación de isoenzimas son: a) presencia de más de un locus génico codificante para la enzima, b) presencia de más de un alelo en un mismo locus génico

y c) modificaciones postraduccionales de los polipéptidos, resultando en la formación de isoenzimas secundarias.

Estas técnicas pronto comenzaron a aplicarse en estudios de variabilidad genética (Lewontin y Hubby, 1966) así como en estudios poblacionales, taxonómicos y evolutivos, tanto en animales (Johnson y Selander, 1971; Selander, 1980; Lewontin, 1974) como en vegetales (Marshall y Allard 1970; Hamrick y col. 1979)

IV.2.1 Fundamento de la técnica

La electroforesis es una técnica que permite separar proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico. Las enzimas, como todas las proteínas, están formadas por aminoácidos unidos covalentemente para formar un polipéptido. Como consecuencia de la naturaleza química de las cadenas laterales de los aminoácidos, las proteínas son en general anfóteras, pudiendo llevar carga positiva o negativa, dependiendo de la ionización de los grupos amino y carboxilos libres. Dicha ionización está relacionada con el buffer en el que se hallen inmersas las moléculas proteicas y es la responsable de la migración de las proteínas a través de una matriz (soporte) durante la electroforesis.

La carga neta de la proteína depende del balance de aminoácidos básicos y ácidos presentes en la cadena polipeptídica. Las moléculas cargadas negativamente (aniones) migrarán hacia el electrodo positivo (ánodo) y las positivamente cargadas (cationes) migrarán hacia el electrodo negativo (cátodo)

Luego de la electroforesis, las proteínas enzimáticas son reveladas en el gel mediante una tinción por métodos histoquímicos. Tinciones específicas de la actividad enzimática permiten distinguir en una mezcla de cientos de proteínas de un extracto tisular determinadas isoenzimas. El resultado final de este procedimiento electroforético son bandas coloreadas que indican actividad enzimática. Así, el conjunto de bandas observadas en el gel luego de la

tinción (zimograma), representa múltiples formas de la enzima (isoenzimas) con la misma especificidad catalítica. El patrón de bandeo de un individuo contiene información sobre el genotipo de un locus (loci) el cual codifica dicha particular proteína.

Las matrices soporte más usadas son las de poliacrilamida y el almidón, cuyos tamaños de poros son del mismo orden de magnitud que el tamaño de las moléculas de proteína. El tamizado molecular resultante permite la separación electroforética de proteínas con carga similar y que difieren en el tamaño y forma. Usando distintas concentraciones de poliacrilamida o almidón (con lo cual varía el tamaño del poro del soporte) y con distintos buffers (con lo que se influye en la carga neta de las proteínas), luego de la tinción específica, se obtienen “bandas” discretas para cada tipo proteico.

La consideración básica de la técnica es que los cambios en la movilidad de las enzimas en un campo eléctrico reflejan cambios en la secuencia codificante del ADN. En consecuencia, si el patrón de bandas de los individuos difiere, se asume que estas diferencias tienen base genética y por lo tanto son heredables.

IV.2.2 Aportes de las isoenzimas a estudios evolutivos, taxonómicos y poblacionales

Las isoenzimas han sido los marcadores genéticos más ampliamente usados en el estudio de la variación a nivel poblacional y especie (Hamrick y col. 1991; Jamieson y Teixeira 1991; Ono-Koyanagi y col. 2000, Papatotiropoulos y col. 2001, Basaglia 2002). Las principales razones de su popularidad se basan en que ofrecen las ventajas de una metodología simple y poco costosa, así como su herencia codominante. Este hecho es especialmente importante ya que es posible diferenciar los individuos homocigotas y heterocigotas para diferentes alelos, sin recurrir a experimentos genéticos, calcular las frecuencias alélicas y sobre la base de estos describir la variabilidad y diferenciación genética presente en las poblaciones naturales. Por

estos motivos, las isoenzimas han sido utilizadas en los últimos treinta años y aún hoy son empleadas como marcadores bioquímicos en varios loci, los cuales proveen una fuente variada de información en estudios evolutivos, sistemáticos, genéticos y ecológicos (Yates y col, 1984; Menezes y col, 1990; Shimizu y col, 1993; Merritt y Quattro, 2001)

Las isoenzimas son especialmente valiosas en los estudios poblacionales por su poder para revelar la variabilidad genética acumulada en las poblaciones naturales, indicar el grado de diferenciación entre ellas, estimar la subestructuración dentro de las poblaciones de una especie, discriminar entre poblaciones de taxa relacionadas y contribuir a estimar en forma indirecta el flujo genético entre poblaciones y/o especies.

La electroforesis de isoenzimas, por lo tanto, puede aportar datos de fundamental importancia para la comprensión de interrogantes evolutivos y sistemáticos. Estos estudios son útiles como herramienta para colaborar en la clasificación de grupos con problemas taxonómicos tales como especies sinmórficas, así como aportar datos sobre genomas involucrados en la formación de híbridos (Awise, 1976; Thorpe, 1982; Thorpe y Solé-Cava, 1994; Arnold, 1997)

A pesar de las grandes ventajas que parece presentar este método, existen fuentes de error inherentes a la técnica que deben ser tomados en cuenta en el análisis de los distintos problemas. Uno de ellos es que la carga de una proteína es sólo alterada cuando uno de sus aminoácidos es sustituido por otra carga diferente y por lo tanto puede proveer una subestimación de la cantidad de diferencias genéticas, ya que puede ocurrir que distintas formas moleculares presenten la misma velocidad de migración.

Otro punto a tener en cuenta es que los patrones isoenzimáticos varían con el estado de desarrollo del organismo, el tejido que se analiza, etc. Así factores como la edad del individuo, el ambiente en el cual el organismo se desarrolla, los tejidos y órganos analizados pueden alterar los patrones isoenzimáticos (Scandalios, 1979)

Otro aspecto fundamental consiste en la determinación del tamaño muestral. Dado el grado de polimorfismo en poblaciones naturales en animales y vegetales (Selander, 1980), un estudio isoenzimático destinado a analizar las variaciones interespecíficas requeriría un muestreo que permita captar, en lo posible toda la variación existente dentro de cada especie. En general se ha visto que las poblaciones coespecíficas son extremadamente similares genéticamente. Este hecho sugiere que las evidencias electroforéticas de unas pocas poblaciones constituyen una muestra adecuada de la especie en estudio.

Sin embargo a pesar de las limitaciones aquí presentadas, esta técnica es muy útil y ha aportado datos de fundamental importancia para la comprensión de interrogantes evolutivos y sistemáticos.

IV. 3. La técnica de RAPD

IV. 3.1 Fundamento de la técnica

La detección de polimorfismos de secuencias de ADN representa uno de los avances más significativos en el estudio de relaciones de parentesco y evolutivas entre diferentes taxa. En los últimos años, el desarrollo de la técnica de PCR por Saiki y col. (1988) revolucionó las técnicas de biología molecular existentes hasta el momento. A partir de ella, en el campo de la biología molecular, se desarrollaron varios y novedosos ensayos genéticos basados en la amplificación selectiva del ADN.

William y col. (1990) y Welsh y Mc Clelland (1990) desarrollaron una técnica basada en la metodología de PCR que permitía la amplificación al azar de ADN polimórficos (RAPD) a partir de cortos “primers” de secuencia arbitraria. Debido a la simplicidad de su metodología y a la posibilidad de disponer de un gran número de marcadores genómicos, este procedimiento pronto comenzó a utilizarse en la identificación de grupos de animales

(Bardakci y Skibinski, 1994) así como en estudios poblacionales (Lynch y Milligan, 1994) y de mapeo genético (William y col. 1990)

La técnica de RAPD consiste en una modificación de la técnica de PCR. El método está basado en la amplificación *in Vitro* de ADN. Comenzando con una pequeña cantidad de éste se pueden generar millones de copias de uno a más fragmentos de ADN. Consta de tres pasos de temperatura controlada que se repiten en una serie de 25 a 50 ciclos.

En el primer paso se produce la “desnaturalización” del ADN, o sea que éste es convertido a simple cadena al aumentar en un termociclador la temperatura a 94°C. En el paso siguiente la temperatura desciende hasta alrededor de 36°C para permitir que los “primers” que actúan como cebadores hibriden con su secuencia complementaria en el ADN molde. En una tercera etapa de elongación se selecciona una temperatura donde la actividad de la enzima Taq polimerasa sea óptima (Ej. 72°C). A ésta temperatura la polimerasa agrega desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) al extremo 3' de un primer. Esto ocurre en ambos sitios donde ha hibridado el "primer", en ambas cadenas de ADN y el fragmento comprendido entre los extremos 5' de ambos cebadores es completamente duplicado.

En los próximos ciclos, las dos moléculas de ADN doble cadena son nuevamente desnaturalizadas y ambas cadenas originales así como las cadenas producto actúan como templado. Repitiendo estos ciclos de 25 a 50 veces resulta la amplificación exponencial de un fragmento de ADN.

La técnica de RAPD se diferencia de una PCR tradicional en que se utiliza un único oligonucleótido corto que tiene entre 9 y 10 pares de bases de una secuencia arbitraria, pero que no hibride consigo misma y posea por lo menos un 50% de bases G y C. Esto último se debe a que G-C presentan tres puentes de hidrógeno y A-T sólo dos, por lo tanto un "primer" con un contenido menor del 50% G-C probablemente no soporte la temperatura en la cual la polimerización se realiza (72°C).

Estos “primers” actúan como iniciadores para que actúe la enzima DNA polimerasa e hibridan en diferentes lugares del genoma donde se encuentren secuencias complementarias a sí mismos en cada una de las hebras de ADN. Esto da por resultado la amplificación de determinados fragmentos de ADN cuyo número depende del largo del primer y del ADN analizado, y está basado en la probabilidad que una secuencia (complementaria a la del primer) esté presente en el del ADN molde, con orientación opuesta en cada una de las hebras, a una distancia de amplificación por PCR que se encuentre entre 100 y 1000 pares de bases aproximadamente.

Los productos de amplificación pueden ser resueltos por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida y ser visualizados con tinción de bromuro de etidio y posterior exposición a luz ultravioleta o por tinción con plata respectivamente.

El resultado que brinda esta técnica es, entonces, un determinado patrón de bandas para cada individuo analizado y para cada primer utilizado.

Se obtendrá un polimorfismo representado por la presencia (P) o ausencia (A) de bandas cuando dos muestras de ADN presenten diferentes mutaciones puntuales en algunos sitios en donde hibrida el primer o como consecuencia de alteraciones (deleciones, inserciones o inversiones) que provoquen cambios en el largo de los fragmentos a amplificar; en ambos casos la amplificación se ve impedida la mayoría de las veces (Waugh y Powel, 1992).

Otro aspecto que debe considerarse es que, para evidenciar un polimorfismo, la mutación debe estar en homocigosis (presente en los dos alelos del individuo), lo cual dará como resultado en el gel la ausencia de una banda en relación a un individuo que no posea dicha mutación o la posea en heterocigosis. De acuerdo a esto último los productos de amplificación son marcadores dominantes, lo que significa que no son detectados los individuos heterocigotas para la mutación, ya que basta que haya amplificación en uno de los alelos para que la banda correspondiente este presente en el gel.

En la Fig.4 se observa una representación esquemática de la aplicación de la técnica de RAPD. Pequeñas cantidades de ADN genómico extraído a partir de hígados de los individuos A, B y C (Fig.4 A) se ponen en contacto con el "primer" arbitrario seleccionado para el estudio, la enzima Taq polimerasa, el buffer apropiado para que actúe la enzima, los dNTPs y cloruro de magnesio (Fig.4 B). Luego de la reacción de PCR los fragmentos amplificados son revelados en un gel de poliacrilamida teñido con Plata (Fig. 4 C). Del análisis del patrón de bandas surge claramente que los individuos A y C presentan un fragmento de ADN de 360 pb y otro de 250 pb mientras que en el individuo B, la ausencia de un sitio de unión del primer no permitió la amplificación del fragmento de 250 pb, evidenciándose de esta manera un polimorfismo.

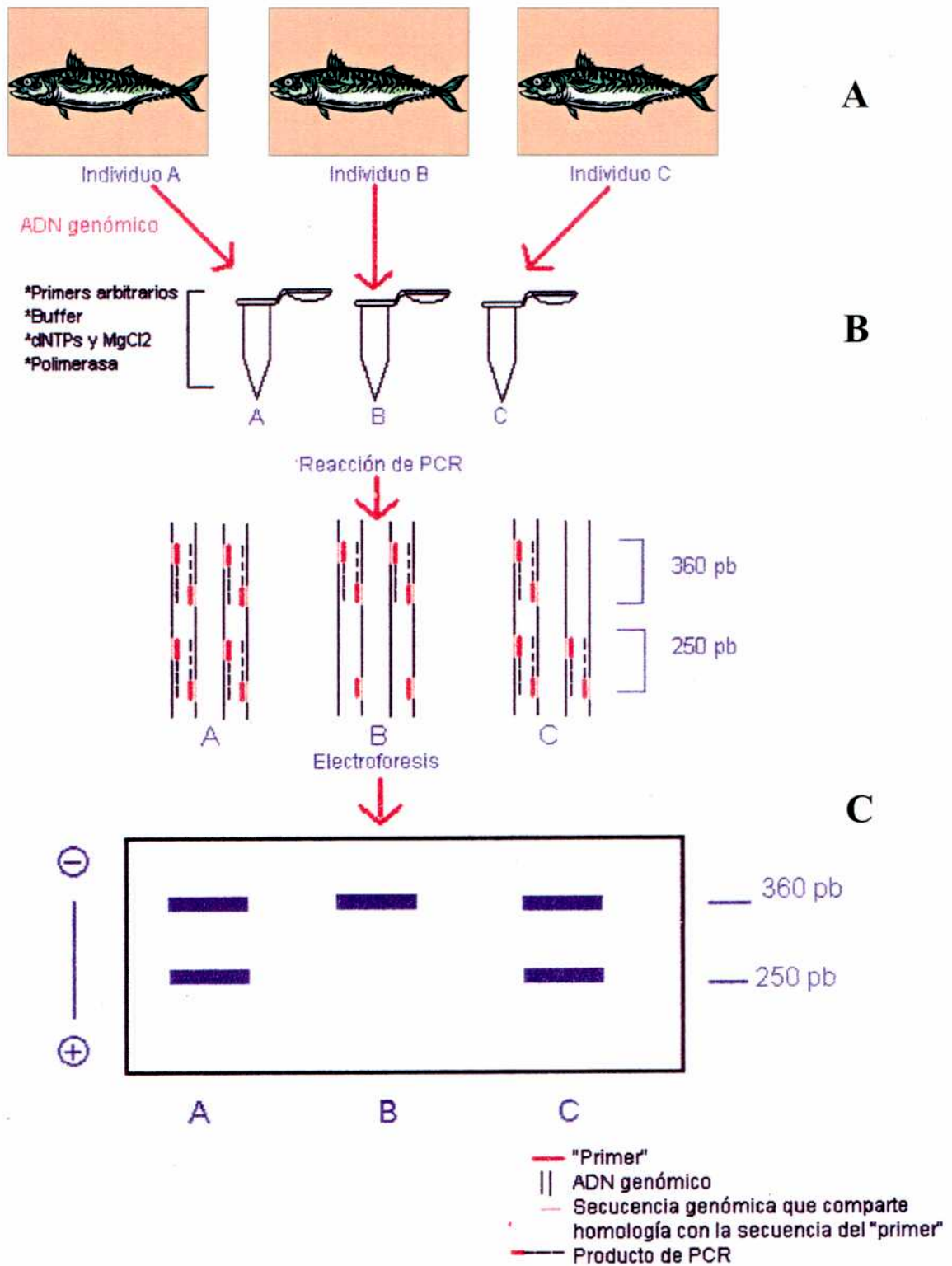


Figura 4 : Representación Esquemática de la técnica RAPD

IV. 3. 2. Empleo de la técnica de RAPD en estudios poblacionales, taxonómicos y evolutivos

La técnica de RAPD ha sido señalada como uno de los más poderosos métodos que permiten obtener un gran número de marcadores genéticos en un amplio rango de especies (Hadrys y col., 1992). Esto se debe fundamentalmente a la posibilidad de utilizar diferentes “primers” de secuencia arbitraria, los cuales permiten un extenso y aleatorio muestreo del genoma (Bucci y Menozzi, 1995). Así este método es particularmente atractivo en el estudio de polimorfismos entre poblaciones y/o especies (Hu y Quirós, 1991; Hunt y Page, 1992; Kaemmer y col., 1992; Wilde y col., 1992; Nesbitt y col., 1995; Bucci y Menozzi, 1995; Aagard y col., 1998; Gomes y col., 1998).

Los marcadores RAPD tienden a proveer más marcadores específicos de poblaciones, razas o especies que las técnicas de electroforesis de isoenzimas (Liu y Furner, 1993). Estas características son importantes para estudios taxonómicos y/o evolutivos (Demeke y col., 1992; Castiglione y col., 1993; Cominicini y col., 1996) así como en estudios de hibridación interespecífica donde pueden aportar marcadores útiles para la diferenciación de las especies parentales e híbridos (Rieseberg y Gerber, 1995; Cottrel y col., 1997).

Demeke y colaboradores (1992) y Heusden y Backmann (1992) comprobaron que los RAPD complementan estudios isoenzimáticos y morfológicos, siendo estos valiosos en estudios evolutivos (Rieseberg y col., 1990; Rieseberg, 1996).

IV. 3. 3. Ventajas y desventajas del uso de marcadores RAPD en estudios poblacionales y evolutivos

Las principales ventajas de este ensayo son que su realización no requiere información previa de la secuencia del ADN, utiliza pequeñas cantidades de éste (15-50 nanogramos) y no

necesita una tecnología sofisticada para su desarrollo. De esta manera, un gran número de loci pueden ser muestreados de una manera rápida y relativamente poco costosa (Crawford, 1997). Varios autores han identificado diversos factores que limitan la repetibilidad de la técnica de RAPD (Ellsworth y col., 1993; Meunier y Grimont, 1993; Penner y col., 1993). Entre los factores que pueden influir en la obtención de patrones consistentes y reproducibles pueden mencionarse, la concentración y pureza de ADN, "primers", desoxinucleótidos trifosfato, concentración de cloruro de magnesio, la temperatura de desnaturalización, hibridación y elongación, y aún el propio termociclador. Sin embargo, en los años recientes las reacciones se han estandarizado y los resultados son a menudo repetibles y transferibles entre investigadores y laboratorios (Bachmann, 1997).

Otra de las desventajas de estos marcadores es que la homología es inferida de la comigración de las bandas, lo cual puede llevar a interpretaciones erróneas de patrones de bandeo. A pesar de ello, Rieserberg (1996) encontró que el 90 % de las bandas presumidas de ser homólogas sobre la base de comigración eran realmente homólogas cuando se las analizó con más detalle usando enzimas de restricción o hibridación con el método de Southern Blot. Otros autores han señalado que una mayor inconsistencia puede ser esperada cuando se analizan relaciones entre especies bien diferenciadas, ya que la probabilidad de que dos fragmentos del mismo tamaño provengan de distintas zonas del ADN es alta (Furman y col., 1997).

Una tercera limitación de los RAPD es su herencia dominante. Esto significa que no pueden diferenciarse los individuos homocigotas de los heterocigotas para un locus génico, con lo cual se reduciría el contenido de la información comparado con los marcadores codominantes tales como las isoenzimas o los microsatélites. Para subsanar esta limitación algunos autores consideran a los productos RAPD (bandas) como rasgos fenéticos y otros emplean las transformaciones de Lynch y Milligan (1994). Estos autores propusieron una manera de estimar las frecuencias alélicas a partir de la frecuencia de individuos homocigotas para el

alelo nulo (con ausencia de banda) asumiendo que la población se halla en equilibrio Hardy Weinberg.

IV. 4. Estimación de la variación genética en poblaciones naturales

La variabilidad genética puede ser expresada utilizando diferentes índices como la proporción de loci polimórficos (P), el número promedio de alelos por locus (A) y la heterocigosis media esperada por locus (H).

En una población panmíctica, la medida más informativa es la heterocigosis media esperada que estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población sean diferentes.

Nei (1987) llamó a esta medida diversidad genética y sugirió que la misma es particularmente útil ya que puede ser aplicable a genes con diferentes niveles de ploidía y a organismos con diferentes sistemas reproductivos.

Otra medida de la variación genética es la proporción de loci polimórficos o simplemente polimorfismo (P). Este parámetro es relativamente ambiguo ya que depende del número de loci analizados y además del criterio adoptado según el cual un locus es considerado polimórfico. En el presente trabajo se calcularon todos estos índices de variabilidad genética para Isoenzimas.

En estudios en donde se aplicaron simultáneamente las metodologías de isoenzimas y RAPD se encontró que éstas últimas eran más eficientes en la detección de polimorfismos que las isoenzimas (Liu y Furnier, 1993). Sin embargo, en trabajos recientes, Isabel y col. (1995) examinaron la diversidad alozimica y de marcadores RAPD y encontraron total congruencia entre ambos grupos de datos. Estos resultados son interesantes ya que sugieren que tanto las isoenzimas como los RAPD podrían aportar resultados comparables para estimar la diversidad genética.

IV. 5. Análisis de la estructura genética en poblaciones mediante marcadores de isoenzimas y RAPD

La utilización de los recursos genéticos de las poblaciones naturales requiere de un detallado conocimiento de la cantidad y distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones.

Roderick (1996) define la estructura genética de las poblaciones como la distribución de la variación genética resultante de los procesos de migración, selección, mutación y deriva genética.

Los estadísticos más comúnmente usados para estimar la estructura de la población son los estadísticos F desarrollados por Wright (1951) y reexaminados por Weir y Cockerham (1984).

Estos consisten en tres diferentes coeficientes: F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} relacionados entre sí (si hay panmixia, $F_{IS} = 0$ y $F_{IT} = F_{ST}$). F_{ST} es una medida de la diferenciación genética de subpoblaciones y es siempre positivo; F_{IS} estima la endogamia dentro de cada subpoblación, mientras que el coeficiente F_{IT} estima la desviación del conjunto global de las subpoblaciones de la panmixia. Los valores positivos de F_{IS} indican una deficiencia de heterocigotas y los valores negativos indican un exceso de los mismos.

Los estadísticos F pueden ser extendidos a otros grados de subdivisión de las poblaciones. Así es posible realizar un análisis jerarquizado de la distribución de la diversidad genética de tal manera que ésta puede ser particionada entre otros, en sus componentes entre especies y entre poblaciones dentro de cada especie y dentro de las poblaciones de una misma especie (Wright, 1978).

Para algunos autores, la estima de diferenciación genética mediante la aplicación de las técnicas de isoenzimas y RAPD, les ha proporcionado valores semejantes. De este modo, Mamuris y col. (1999) estimaron la diferenciación genética entre poblaciones de peces marinos, *Mullus surmuletus*, a través de isoenzimas y RAPD, encontrando valores similares

con ambas metodologías. En cambio Latta y Mitton 1997 obtienen mejor diferenciación de poblaciones de *Pinus flexilis*, mediante el empleo de RAPD que la obtenida por Isoenzimas.

Los estudios de diferenciación son particularmente útiles para establecer relaciones fenéticas entre especies que presentan muy poca o ninguna diferenciación morfológica (especies sinmórficas) o entre especies que pueden hibridar dificultando su determinación en base a criterios morfológicos.

Otra medida de diferenciación genética comúnmente usada es la de Nei (1972). Este autor desarrolló un método estadístico a partir del cual las relaciones entre poblaciones pueden expresarse como una medida de similitud, la identidad normalizada de Nei (I) o de distancia de Nei (D)

Esta identidad se calcula a partir de los datos de frecuencias alélicas y expresa la probabilidad de que dos alelos, tomados al azar de dos poblaciones sean iguales (proporción de genes que son idénticos en dos poblaciones) y su valor oscila entre 0 (las poblaciones no tienen alelos comunes) a 1 (las dos poblaciones tienen los mismos alelos con igual frecuencia).

La distancia genética (D) estima la proporción de sustituciones alélicas por locus que han acumulado dos poblaciones desde que se separaron, a partir de un antepasado común; su valor oscila entre 0 (sin diferenciación genética) e infinito.

Una vez conocidas las frecuencias alélicas de cada alelo en la población, es posible cuantificar el grado de similitud genética entre cada par posible de muestras analizadas sobre la base de todas las bandas o marcadores obtenidos con los “primers” (en caso de RAPD) o loci isoenzimáticos analizados. Con los datos de distancia genética obtenidos mediante ambas metodologías, puede realizarse un análisis de agrupamiento que da como resultado un árbol que relaciona fenéticamente las poblaciones, es decir que agrupa en base a la similitud.

Algunos autores consideran que los productos de amplificación obtenidos mediante RAPD no pueden homologarse a loci, dado que al usar “primers” arbitrarios, las regiones amplificadas

proviene de zonas distribuidas al azar en el ADN y por lo tanto estas no tienen necesariamente que corresponder a determinados genes. Al no aplicar la transformación de Lynch y Milligan 1994 que permite obtener la frecuencia alélica para cada producto de amplificación, no se puede calcular los índices de similitud de Nei (I, D). En dichos casos una de las medidas de distancia fenética más empleada es la Distancia Manhattan calculada a partir de matriz de ausencia – presencia de bandas. Con estos valores de distancias fenéticas también puede realizarse un análisis de agrupamiento.

Existen diferentes algoritmos para la confección del árbol como el del Neighbor-Joining o el de UPGMA. Cuando se utilizan datos isoenzimáticos, el algoritmo más empleado es el UPGMA. Para el análisis de datos a partir de marcadores RAPD, se aplica tanto NJ (Clausing y col. 2000.) como UPGMA (Haig y col. 1994, Cagigas y col. 1999, Heibel y col. 1999, Nocelli y col. 1999, Reddy y col. 1999, Zuo y col. 2000, Chiappero. y Gardenal 2001, Freitas y Brehm 2001 o ambos algoritmos (Chen y col. 1998).

IV. 6. Mecanismos evolutivos relacionados con la estructura genética de las poblaciones

IV. 6. 1. La selección

El descubrimiento de niveles de variación alozímica mayores que los esperados en las poblaciones naturales, llevó a controvertidas opiniones a los genetistas de poblaciones para explicar el mantenimiento de esa variación.

La interpretación de los neutralistas (Kimura y Ohta, 1971; Nei, 1975), es que los cambios mutacionales a nivel molecular y la gran mayoría de los polimorfismos encontrados en las poblaciones naturales serían neutros desde el punto de vista adaptativo. Su destino en las poblaciones estaría determinado por los procesos de deriva genética y por lo tanto las poblaciones podrían acumular sin restricción alguna, cantidades muy importantes de variabilidad genética

En contraposición a la teoría neutralista, los seleccionistas consideran que la mayor parte de la variabilidad genética sería mantenida por diferentes formas de selección equilibradora. En la actualidad, la discusión entre los sostenedores de ambas teorías continúa. Kimura (1983) propone una nueva versión de la teoría neutralista en la que defiende la idea de que la selección a nivel molecular actúa eliminando las variantes nuevas que surgen por mutación y que perjudican la funcionalidad de la molécula, pero no aquellas que afectan las regiones de las proteínas menos sujetas a restricciones funcionales. De esta manera se podrían fijar mutaciones neutras por deriva genética. Los polimorfismos proteicos, de acuerdo a esta hipótesis, serían una fase de transición de la evolución molecular y en el caso de existir modificaciones ambientales, parte de los alelos neutros podrían ser seleccionados.

IV. 6. 2. Deriva genética

La deriva genética es el cambio al azar en las frecuencias alélicas en una población de una generación a la otra. Se produce como consecuencia de muestreo aleatorio de gametas entre generaciones y su efecto es mayor en la medida en que el tamaño poblacional es más pequeño.

Debido a que las muestras pequeñas no son frecuentemente representativas de la población, la frecuencia de un alelo en una muestra puede diferir de aquella en la población entera de gametas. Al cabo de varias generaciones, puede haber cambios en la frecuencia alélicas de una población en un patrón impredecible que puede resultar en la fijación o pérdida de un alelo (Hedrick, 1999).

IV. 6. 3. Flujo génico

El flujo génico constituye una poderosa fuerza evolutiva que tiende a homogeneizar las frecuencias alélicas entre poblaciones, disminuyendo la diferenciación genética entre

poblaciones. Este proceso puede inhibir la evolución genética impidiendo que la selección y la deriva actúen estableciendo diferencias genéticas locales o bien puede promover la evolución extendiendo nuevos genes y combinaciones de genes a través del rango de la distribución de la especie (Ellstrand , 1992).

Los genetistas de poblaciones tienen dos clases de métodos para estimar el flujo génico. Los métodos directos usan estimaciones de las distancias de dispersión y éxito de apareamiento para inferir cuánto flujo génico está ocurriendo en el momento en que las mediciones son hechas. Los métodos indirectos usan las frecuencias alélicas o más recientemente las diferentes secuencias de ADN, para estimar los niveles de flujo génico que deben haber ocurrido para producir los patrones observados (Slatkin, 1980).

Uno de los métodos indirectos para estimar el flujo génico se basa en la relación $F_{ST}=1/(4Nm)$ y depende de la distribución de alelos comunes (Wright, 1951) mientras que un segundo método se basa en la distribución de los alelos exclusivos o sea aquellos que se encuentran presentes en una sola población (Slatkin, 1980).

Slatkin y Barton, 1989, compararon la efectividad de ambos métodos usando una variedad de datos simulados y encontraron que tanto el método de F_{ST} y el método de alelos raros proveyeron estimaciones similares de flujo génico bajo un amplio rango de condiciones cuando las poblaciones muestreadas eran demográficamente estables.

Objetivos

Para ampliar los conocimientos sobre el género *Odontesthes*, en este trabajo se utilizaron las técnicas de electroforesis de isoenzimas y RAPD con el objeto de:

- 1.- Caracterizar polimorfismos de isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de este género en Argentina.
- 2.- Detectar loci diagnóstico que permitan caracterizar a las especies y posibles híbridos interespecíficos.
- 3.-Estudiar la variabilidad y estructura genética de las poblaciones.
- 4.- Estimar la diferenciación genética y el flujo génico entre poblaciones de igual y diferente especie.
- 5.- Determinar si la diferenciación genética está correlacionada con las distancias geográficas entre poblaciones.

MATERIALES
Y
METODOS

MATERIALES Y METODOS

I. MUESTREO

I.1 Especies y poblaciones estudiadas mediante las técnicas de isoenzimas y RAPD.

Se muestrearon un total de 10 poblaciones de pejerreyes pertenecientes a 3 especies :

2 poblaciones de *Odontesthes argentinensis*

5 poblaciones de *O. bonariensis*

3 poblaciones de *O. hatcheri*

Se analizaron el total de las poblaciones para isozimas, mientras que para RAPD se seleccionaron 7 poblaciones, Las especies y poblaciones analizadas mediante ambas técnicas figuran en la Tabla 1.

Se capturaron un total de 273 ejemplares adultos de ambos sexos empleando redes o caña de pescar en diferentes localidades y departamentos de la República Argentina (Tabla 2) entre Noviembre de 1995 y Diciembre de 1999. El muestreo abarcó las provincias de Buenos Aires (zona continental y costera), Río Negro y Neuquen (Fig 5). En este trabajo se utilizaron individuos adultos para evitar posibles problemas de variación ontogenética para el análisis de los resultados de isoenzimas (Avisé 1974).

Durante el momento de recolección se extrajeron hígado y músculo esquelético de cada ejemplar, se almacenaron en hielo seco hasta transporte al laboratorio. En el laboratorio todas las muestra fueron mantenidas en nitrógeno líquido hasta la aplicación de las técnicas de Isoenzimas y RAPD.

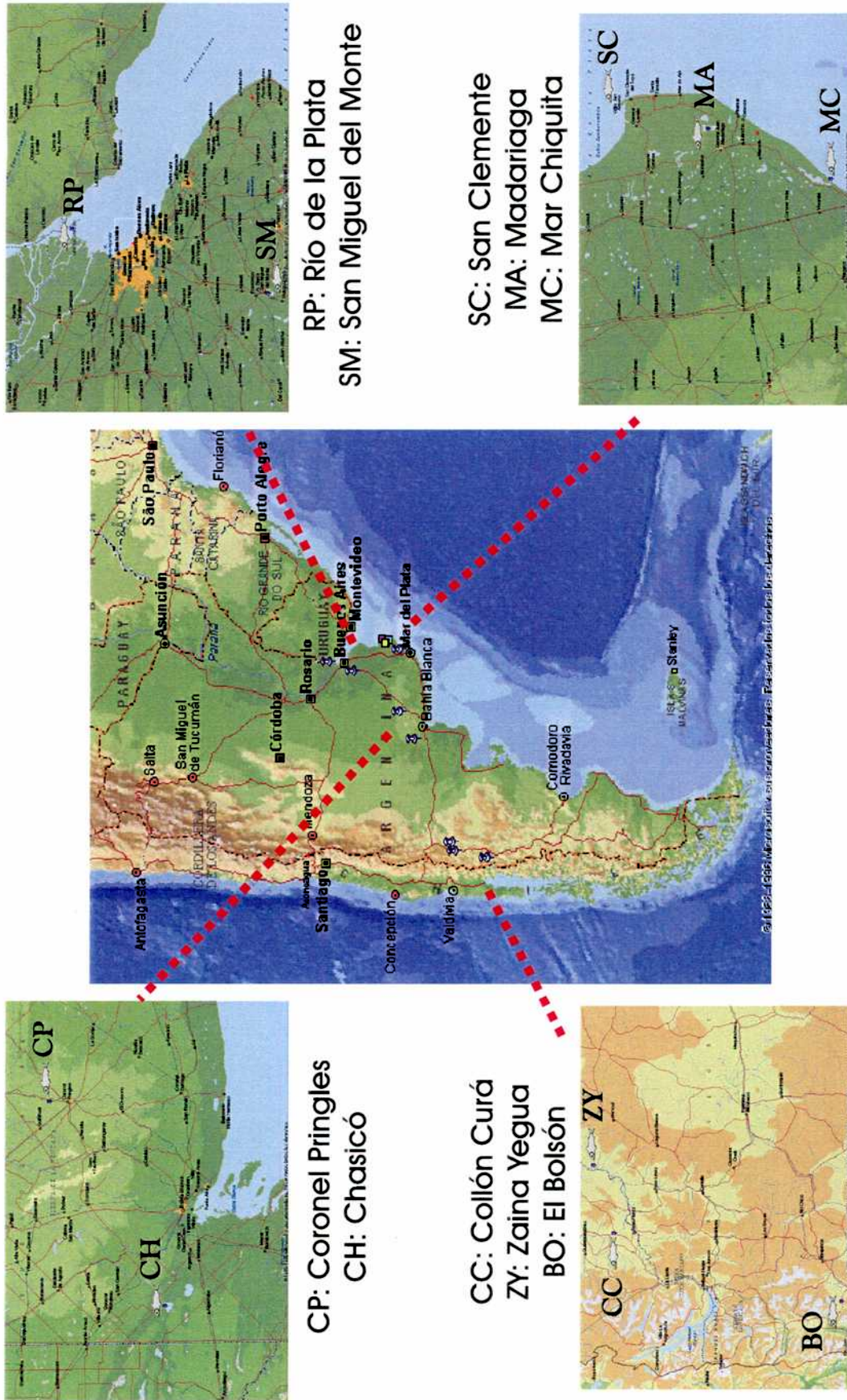
Tabla 1. Especies y poblaciones estudiadas mediante Isoenzimas y RAPD (N= número de individuos analizados, L.T.= intervalo de longitud total de los individuos analizados en cm)

Especies	Población	Simbolo	N	L.T.(cm)	Técnicas empleadas
<i>O. bonariensis</i>	Laguna "Salada Grande"	MA	40	30-77	Isoenzimas-RAPD
	Lago "EL Laguito"	CP	30	23-41	Isoenzimas
	Laguna "De Monte"	SM	20	29-44	Isoenzimas
	Laguna "Chasicó"	CH	34	27-41	Isoenzimas-RAPD
	"Río de la Plata"	RP	31	23-39	Isoenzimas-RAPD
<i>O. argentinensis</i>	Zona costera de Punta Rasa	SC	31	12-26	Isoenzimas-RAPD
	Zona costera en la desembocadura de la laguna "Mar Chiquita"	MC	30	12-16	Isoenzimas
<i>O. hatcheri</i>	Laguna de Ruiz	BO	40	15-18	Isoenzimas-RAPD
	Bahia Zaina Yegua del Dique Piedra del Aguila	ZY	7	31-35.5	Isoenzimas-RAPD
	Río Collón Curá	CC	10	40-44	Isoenzimas-RAPD

Tabla 2. Ubicación geográfica de las poblaciones estudiadas

Especies	Población (símbolo)	Localidad o Departamento	Provincia	Latitud	Longitud
<i>O. bonariensis</i>	MA	Madariaga,	Buenos Aires.	36° 55' S	58° 50' O
	CP	Coronel Pringles	Buenos Aires.	37° 52' S	61° 22' O
	SM	San Miguel del Monte	Buenos Aires.	35° 27' S	58° 47' O
	CH	Villarino	Buenos Aires.	38° 37' S	63° 05' O
	RP	"A la altura de la Isla Martín García"	Buenos Aires.	34° 48' S	58° 15' O
<i>O. argentinensis</i>	SC	"En la costa de Punta Rasa (cerca de San Clemente)"	Buenos Aires.	36° 17' S	56° 46' O
	MC	"En la desembocadura de laguna de Mar Chiquita"	Buenos Aires.	37° 44' S	57° 24' O
<i>O. hatcheri</i>	BO	Dep. Pilcaniyeu (a 15Km de El Bolson)	Rio Negro	41° 55' S	71° 24' O
	ZY	Dep. Pilcaniyeu	Rio Negro	40° 20' S	70° 10' O
	CC	Dep. Collón Curá	Neuquen	40° 27' S	70° 39' O

FIGURA 5



UBICACION GEOGRAFICA DE LAS POBLACIONES ANALIZADAS

L2 Determinación taxonómica de las especies de *Odontesthes*

La determinación taxonómica de las poblaciones de las diferentes especies estudiadas fue realizado por la Doctora Mirta García (Profesora Adjunta de Zoología III Vertebrados – Fac. de Ciencias Naturales y Museo de la Univ. Nacional de La Plata) y por el Doctor Atila Gosztanyi (Investigador Independiente del CONICET en el Centro Nacional Patagónico - Miembro del Comité Académico de la Maestría en Ecología Bentónica, Docente en Ictiología y Profesor Asesor la Carrera de la Univ. Nac. de Patagonia San Juan Bosco).

II. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

II.1 Sistemas Isoenzimáticos estudiados

Los sistemas isoenzimáticos analizados se presentan en la Tabla 3

Tabla 3. Sistemas isoenzimáticos analizados para las 3 especies del género *Odontesthes*, abreviaturas, numeración recomendada por la Comisión de Enzimas (E.C.), Concentración del gel (G) y Locus.

Sistema	Abreviatura	E.C.	G	Locus
Alcohol deshidrogenasa	ADH	1.1.1.1	5%	<i>ADH*</i>
Aldehído deshidrogenasa	ALDH	1.2.1.3	5%	<i>ALDH*</i>
Aldehído oxidasa	AO	1.2.3.1	10%	<i>AO*</i>
Esterasa	EST	3.1.1	7%	<i>EST*</i>
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PD	1.1.1.4.9	7%	<i>G6PD*</i>
Glutamato Oxalacetato Transaminasa	GOT	2.6.1.1	5%	<i>GOT*</i>
Lactato deshidrogenasa	LDH	1.1.1.27	5%	<i>LDH*</i>
Malato deshidrogenasa	MDH	1.1.1.37	7%	<i>MDH*</i>
Enzima Malica NADP	MEP	1.1.1.40	5%	<i>MEP*</i>
Superóxido dismutasa	SOD	1.15.1.1	10%	<i>SOD*</i>

II.2 Preparación de los geles

Se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida. Los geles se prepararon al 5 %, 7 % y 10 % dependiendo del sistema analizado (Tabla 3). Cada gel fue preparado de la siguiente manera:

Para preparar geles al 5% . utilizó:

Buffer	105 ml.
Acrilamida	5.11 gr.
Bis-acrilamida	0.14 gr.
TEMED (diamina de N,N,N,N'-Tetrametiletieno)	0.14 ml.
Persulfato de Amonio	punta de espátula

Los geles al 7 % se prepararon del siguiente modo:

Buffer	105 ml.
Acrilamida	7.15 gr.
Bis-acrilamida	0.20 gr.
TEMED (diamina de N,N,N,N'-Tetrametiletieno)	0.14 ml.
Persulfato de Amonio	punta de espátula

Los geles al 10 % se prepararon del siguiente modo:

Buffer	105 ml.
Acrilamida	10.21 gr.
Bis-acrilamida	0.29 gr.
TEMED (diamina de N,N,N,N'-Tetrametiletieno)	0.14 ml.
Persulfato de Amonio	punta de espátula

II.3 Armado de geles

La acrilamida y la bis-acrilamida se disolvieron en el buffer elegido y se agregaron el TEMED y el persulfato de amonio como agentes gelificantes. Se agitó la solución y se volcó sobre una cubeta de vidrio. La polimerización se produjo en ausencia de aire, lo cual se logró cubriendo la cubeta con una placa de vidrio evitando la formación de burbujas. Los geles se dejaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

II.4 Buffer Corrida y de Geles

Los buffers utilizados para corrida y preparación de geles se prepararon a partir de diluciones de una solución stock (pH= 8.6) compuesta por Tris (0.9M), Edta (0.02M), Ácido Bórico (0.5M) y Cl_2Mg (0.025M). Para 500ml de solución Stock se pesaron: 54.495 gr de Tris, 3.723 gr de Edta y 15.46 gr de Ac Bórico, se agregó 16,6 ml de una solución de 0.75M de Cl_2Mg y finalmente se llevo todo a 500ml con agua destilada

En la mayoría de los sistemas se empleo una dilución 1:20 tanto para Buffer Gel como Corrida, a excepción de Esterasa en la cual se empleo 1:15 para ambos buffers.

II.5 Preparación de las Muestras

Previo a la electroforesis, se retiraron muestras de hígado y músculo esquelético del tanque de nitrógeno. Se tomaron aproximadamente 0.4 cm^3 de cada tejido congelado, se colocaron en tubos tipo "eppendorf" y se maceraron mecánicamente con bastón de vidrio a 4°C en presencia de 1ml de buffer de extracción (Tris-HCl 0.2M pH:7.1). Posteriormente todos los homogenatos fueron centrifugados a 4°C a 9000 r.p.m durante 10 minutos.

II.6 Siembra del Material en los geles

Los sobrenadantes fueron absorbidos en papeles de filtro (Whatman N° 3) de 2 mm. de ancho x 4 mm. de largo, estos se insertaron en orificios practicados sobre el gel con un peine de acero inoxidable (20 muestras por gel). En todos los geles se colocaron dos muestras testigos de poblaciones previamente analizadas para poder homologar las bandas. También se colocaron en ambos extremos papelitos embebidos en solución de bromofenol. Debido al intenso color azul que presenta el bromofenol, este permite visualizar hasta donde avanza el frente de corrida, impidiendo de este modo perder las isoenzimas durante la corrida electroforética.

II.7 Corrida Electroforética

La corrida electroforética se realizó en heladera a 5°C para evitar el calentamiento de los geles durante la migración y la consecuente desnaturalización de las proteínas. Se colocaron por cada cuba electroforética dos geles sembrados. Los puentes de contacto entre el buffer de la cuba y los geles se realizaron utilizando paños esponja absorbentes de 18 x 12 cm, los cuales fueron enjuagados con agua destilada luego de cada corrida. Colocadas las mechas sobre los geles se cubrió todo con papel "Saran Wrapp" y una placa de vidrio para evitar la evaporación. Se reguló el voltaje para que los geles estuvieran sometidos a una intensidad de corriente constante (25 mA), durante aproximadamente 5 horas, hasta que el frente marcado con azul de bromofenol llegó a 1 cm de la mecha del extremo anódico, luego de la cual se procedió a revelar las diferentes zonas de actividad.

II.8 Revelado, fijación y preservación de los geles

Concluida la corrida electroforética se retiraron los geles de la heladera, se quitaron los papeles y se procedió al revelado siguiendo diferentes protocolos de tinción. Una vez

sumergidos en la solución de revelado correspondiente, la mayoría de los geles se incubaron en estufa a 37°C en completa oscuridad hasta completarse la aparición de las bandas. El procedimiento fue realizado para todos los sistemas con excepción de ALDH y AO que se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en oscuridad, y SOD el cual debe ser revelado exponiendo el gel a luz intensa.

La fijación de los geles, proceso que evita la pérdida de color en la zona de actividad y previene la proliferación de hongos, se llevó a cabo sumergiéndolos en una solución 5: 5: 1 Etanol: Agua: Ac. Acético durante aproximadamente 12 hs.

Por último cada gel se envolvió en bolsas plásticas, se rotuló con fecha y sistema y almacenó en cajas de cierre hermético en heladera

II.9 Número de Clasificación y designación de las Isoenzimas

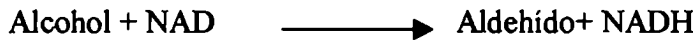
Para cada sistema isoenzimático se utilizaron los números de clasificación de las isoenzimas de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC-IUB (Enzyme Nomenclature, 1984)(Tabla 3).

Para designar los distintos loci y alelos se siguió la nomenclatura propuesta por Shaklee y col. (1990) para peces (Tabla-3). Los loci se designaron con el nombre del sistema isoenzimático con las letras en imprenta e itálica y con un asterisco de finalización. Para enzimas con múltiples loci, el locus con mayor migración anódica fue designado como "1", el siguiente como "2" y así sucesivamente, por ejemplo *ADH-1**, *ADH-2**, etc.. Los alelos fueron denominados por código de secuencia numérica en base su movilidad anódica decreciente, estos fueron colocado a continuación del asterisco, por ejemplo *LDH-1*1*, *LDH-1*2*, *LDH-1*3*, etc..

II.10 Tinciones Isoenzimáticas utilizadas**ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) E.C. 1.1.1.1.**

La enzima alcohol deshidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994) Es una enzima que reacciona con un gran número de alcoholes: primarios y secundarios, de cadenas lineales y ramificadas, alifáticos y aromáticos.

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones) y NADH, el NBT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

Mezcla de revelación:

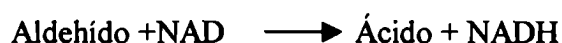
Tris HCl 05M pH : 7.1	15 ml.
Agua destilada	82 ml
NBT	0.03 gr
NAD	0.05 gr.
PMS	0.002 gr.
Etanol	3 ml

Para la tinción se disolvieron los reactivos en el buffer y agua, a último momento se volcó el etanol y finalmente se incubo el gel con esta solución en estufa a 37°C en oscuridad hasta aparición de bandas azules (aproximadamente 30 min).

ALDEHIDO DESHIDROGENASA (ALDH) EC:1.2.1.3

La enzima aldehído deshidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994).

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones) y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

Solución de tinción:

Tris HCl (0.05M) pH:8.24	100 ml.
Benzaldehído	0.15 ml
NAD	0.05 gr.
MTT	0.012 gr.
PMS	0.004 gr.

Se mezcla primero el buffer con el Benzaldehído, luego se disuelven los reactivos y está solución se vuelca en el gel, el cual se deja a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en oscuridad durante 16 hs.

ALDEHIDO OXIDASA (AO) E.C. 1.2.3.1

La enzima aldehído oxidasa se encuentra distribuida en invertebrados y vertebrados (Manchenko, 1994).

Visualización esquemática de la reacción:

Aldehído \longrightarrow Ácido

En presencia de PMS (transportador de electrones), el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color negras. Solución de tinción:

Tris HCl (0.2M) pH:8	100 ml.
Benzaldehído	2 ml
MTT	0.012 gr.
PMS	0.004 gr.

Se mezcla primero el buffer con el Benzaldehído, luego se disuelven los reactivos y esta solución se vierte en el gel, el cual se deja a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en oscuridad durante 16 hs.

ESTERASAS (EST) E.C. 3.1.1

La enzima esterasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Las esterasas son enzimas no específicas que hidrolizan uniones ésteres de varios ésteres carboxílicos, poseen una especificidad de sustrato muy amplia.

Visualización esquemática de la reacción:



Durante la tinción, el alfa o beta naftil acetato que se utiliza como sustrato, se transforma en alfa o beta naftol y un anión ácido carboxílico. El producto alfa o beta naftol reacciona con la sal Fast Blue RR, hecho que permite la aparición de bandas en la zona de actividad. Cuando son utilizados dos sustratos simultáneamente (alfa y beta naftilacetato) en iguales proporciones aparecen bandas de diferente color. En el caso que reaccionen con el alfa-naftil acetato las bandas son de color marrón y cuando reaccionan con el beta naftilacetato de color rojo. Esta reacción diferencial, indica la presencia de diferentes loci.

Posibles soluciones de tinción:

1)	Tris HCl pH: 6.04	100 ml.
	Fast blue RR salt	0.05 gr.
	beta naftil acetato	0.06 gr disuelto en 2ml de acetona

2)	Tris HCl pH: 6.04	100 ml.
	Fast blue RR salt	0.05 gr.
	alfa naftil acetato	0.06 gr disuelto en 2ml de acetona
3)	Tris HCl 0.1M pH: 6.04	100 ml.
	Fast blue RR salt	0.05 gr.
	alfa naftil acetato	0.03 gr disuelto en 1ml de acetona
	beta naftil acetato	0.03 gr disuelto en 1ml de acetona

En el presente estudio se probaron inicialmente las 3 posibilidades de tinción, luego de deducir que el sistema esterasa presentaba un único locus se prosiguió con la Solución 1, dado que el sustrato beta-naftil acetato permitió la obtención de bandas más nítidas que el sustrato alfa-naftil acetato

GLUCOSA-6-FOSFATO DEHIDROGENASA (G6PD) E.C. 1.1.1.4.9

La enzima glucosa-6-fosfato dehidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones), el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de azules. Solución de tinción:

Tris HCl (0.2M) pH:8	75 ml.
0.75M de Cl ₂ Mg	4 ml
Glucosa 6-fosfato	0.03 gr.
NADP	0.015 gr.

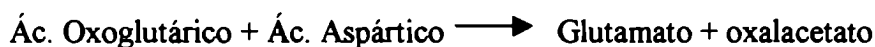
MTT	0.0225 gr.
PMS	0.015 gr.

Para la tinción se disolvieron los reactivos en la solución, esta se volcó sobre el gel, la cuba de tinción se cubrió con papel plástico autoadherente para evitar la evaporación y se incubó en una estufa (37°C) en oscuridad durante 16 hs hasta aparición de bandas azules.

GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA (GOT) E.C. 2.6.1.1

La enzima glutamato oxalacetato transaminasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Visualización esquemática de la reacción:



Durante la tinción el oxalacetato reacciona con la sal Fast Blue B dando un precipitado en la región de actividad .

Solución de tinción:

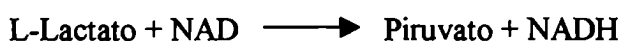
Tris HCl (0.2M) pH:8	100 ml.
5 Fosfato de piridoxal	0.001 gr.
Ácido L - aspártico	0.4 gr.
Ácido L - cetoglutámico	0.2 gr.

Para la tinción se disolvieron los reactivos en 80 ml del buffer Tris HCl, posteriormente se volcó dicha solución sobre el gel incubándose durante 30 min a temperatura ambiente. El último paso consistió en disolver 0.16 gr de Fast Blue BB en los 20 ml restantes de buffer Tris HCl, volcar esta solución en el gel y llevar a estufa (37°C) en oscuridad hasta aparición de bandas color azul (aproximadamente 10 min).

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) E.C. 1.1.1.27

La enzima lactato deshidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones), el NBT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de azules.

Solución de Tinción

Tris HCl (0.2M) pH:8	40 ml
Lactato de sodio (0.5M)	18ml
Agua destilada	60 ml
NAD	0.04 gr.
NBT	0.008 gr.
PMS	0.016 gr.

Para la tinción se disolvieron los reactivos en la solución, ésta se volco sobre el gel, el cual se llevo a estufa (37°C) en oscuridad hasta aparición de bandas azules (aproximadamente 3 hs)

MALATO DESHIDROGENASA (MDH) E.C. 1.1.1.37

La enzima malato deshidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones) y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

Solución de tinción:

Tris HCl (0.05M) pH:8.22	80 ml
NAD	0.02 gr.
MTT	0.01 gr.
PMS	0.004 gr.
Malato monosódico (0.5M)	6 ml

Para la tinción se disolvieron los reactivos en el Buffer Tris, a último momento se mezcló el malato monosódico y finalmente se volcó esta solución en el gel, llevándose a estufa (37°C) en oscuridad hasta aparición de bandas azules (aproximadamente 1 hs)

ENZIMA MALICA NADP (MEP) E.C. 1.1.1.40

La enzima málica se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Manchenko, 1994)

Visualización esquemática de la reacción:



En presencia de PMS (transportador de electrones) y NADPH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

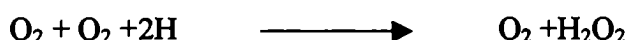
Solución de tinción:

Tris HCl (0.2M) pH:8	80 ml
Cl ₂ Mg (0.75M)	0.7 ml
NADP	0.02 gr.
MTT	0.01 gr.
PMS	0.004 gr.
Malato monosódico (0.5M)	6 ml

Para la tinción se disolvieron los reactivos en el Buffer Tris y Cl_2Mg , a último momento se mezcló el malato monosódico y finalmente se volcó esta solución en el gel. La cuba de tinción se cubrió con papel plástico autoadherente para evitar la evaporación y se incubó en a estufa (37°C) en oscuridad durante 16 hs hasta aparición de bandas azules.

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) E.C. 1.15.1.1

Estas enzimas han sido detectadas en una amplia serie de organismos y están implicadas en el sistema de defensa esencial contra la toxicidad potencial del oxígeno molecular al catalizarse la siguiente reacción:



Esta enzima comprende una clase de metaloproteína que cataliza la formación de peróxido de H_2 . En presencia de luz y PMS, el NBT se convierte en formazán originando un precipitado azul y produciendo oxígeno. La superóxido dismutasa reacciona con el formazán y con el oxígeno liberado, regenerando el NBT. Las zonas donde se produce la reacción se observan como bandas claras sobre el fondo azul intenso

Mezcla de revelación:

Tris HCl 05M pH : 7.1	15 ml.
Agua destilada	82 ml
NBT	0.03 gr
NAD	0.05 gr.
PMS	0.002 gr.

Para la tinción se disolvieron los reactivos en la solución, está se volcó sobre el gel, se cubrió con papel plástico autoadherente para evitar la evaporación y se incubó bajo la luz de una lámpara de 75 W hasta la aparición de dichas bandas claras sobre fondo azul (aproximadamente 3 hs 30min).

II.11 Determinación de los probables loci y alelos

La caracterización del sistema genético de las especies implica estimar el número de loci y alelos involucrados de las isozimas consideradas. El método más preciso para lograr este objetivo es el análisis de la progenie, es decir el análisis genético de individuos con distintas movilidades electroforéticas y verificación de los patrones presentados por la progenie de la primera y segunda generación.

Debido a que programas de cruzamientos controlados llevarían un largo tiempo y exigirían una infraestructura costosa para el mantenimiento de larvas y adultos, en el presente trabajo no se llevo acabo ningún análisis genético de la herencia de las isoenzimas. Sin embargo algunos sistemas pueden ser analizados por métodos deductivos, basados en la afinidad diferencial de sustratos y en la especificidad tisular de cada banda. Por ejemplo, para el sistema Esterasa, la posibilidad de emplear variados sustratos (esteres) permite estimar las bases genéticas de cada banda con alta certeza. Por otra parte la diferenciación entre tejidos también contribuye a confirmar hipótesis en cuanto a número de loci y alelos. Este tipo de análisis, conjuntamente con la comparación de la velocidad de migración relativa de las bandas (la misma velocidad de migración relativa es un indicio de homología entre las bandas) permitieron estimar el sistema genético de las poblaciones estudiadas.

III. MÉTODOS ESTADÍSTICOS A PARTIR DE LOS DATOS DE ISOENZIMAS

Una vez determinados los posibles loci y alelos correspondientes a las bandas isoenzimáticas, se construyó una matriz básica de datos a partir de las frecuencias genotípicas observadas en todos los loci para cada una de las poblaciones estudiadas.

III. 1 Cálculo de las frecuencias alélicas

Luego de identificar los posibles loci y alelos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas. Se realizó una prueba de χ^2 de bondad de ajuste para cada uno de los locus a fin de determinar si las poblaciones se hallaban en equilibrio Hardy- Weinberg.

III. 2 Estimación de la variabilidad genética

Esta fue estimada a través de la Heterocigosis media (H) (Nei, 1978), el Porcentaje de loci Polimórficos (P) y el Número promedio de alelos por locus (A)

Heterocigosis media esperada por locus

La Heterocigosis de una población se estimó a partir de las frecuencias alélicas utilizando el método descrito por Nei (1978).

$$H = 1/L \sum (1 - \sum p_{ij}^2) \quad \text{Donde:}$$

L: N° de loci analizados

P_{ij}: frecuencia del alelo i-ésimo del locus j-ésimo

Siendo: $0 < H < 1$

Porcentaje de locis polimórficos (P)

El porcentaje de loci polimórfico se calculó según la ecuación:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ de loci polimórficos}}{\text{Total de loci analizados}} \times 100$$

Para su interpretación se debe tener en cuenta el criterio de polimorfismo a adoptar (99% o 95%). En este estudio se consideró a un locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común fue igual o menor al 95 %.

Número promedio de alelos por locus

El número promedio de alelos por locus se calculó según la ecuación:

$$A = \frac{\text{Número de alelos}}{\text{Total de loci analizados}}$$

Los cálculos y estimaciones se realizaron usando el programa BIOSYS-1 (version 1.7) (Swofford y Selander, 1981)

III. 3 Análisis de la estructura poblacional

Para los loci que resultaron polimórficos, la estructura poblacional fue analizada a través de los índices de Fijación de Wright (1951) (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) estimados el método Weir y Cockerham (1984) usando el programa .

Nei (1977) ha mostrado que los estadísticos F pueden ser reformulados y definidos como función de las diferencias de las frecuencias observadas y esperadas de heterocigotas.

El coeficiente F_{IT} expresa en qué medida se desvían el conjunto global de subpoblaciones de la panmixia, es una medida del exceso o defecto de homocigotas en el conjunto total de individuos muestreados y se calcula como:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

Este tiene dos componentes:

El coeficiente F_{IS} mide la endogamia dentro de cada población y es una medida del apareamiento no aleatorio dentro de éstas y está dado por la fórmula:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$$

El coeficiente F_{ST} mide la divergencia entre poblaciones y se calcula como:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

Donde:

H_S : Heterocigosis esperada promedio por población.

H_T : Heterocigosis esperada en la población total.

H_O : Heterocigosis observada promedio.

H_{Si} : Heterocigosis esperada en la subpoblación i

$$H_{Si} = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Donde:

P_{ij} = es la frecuencia del alelo j en la población i

n = N° de alelos

H_S : promedio de H_{Si}

$$H_S = \frac{\sum_{i=1}^s H_{Si}}{S}$$

donde S = N° de poblaciones estudiadas

H_T : heterocigosis total

$$H_T = 1 - \sum_{j=1}^n P \cdot j^2$$

Donde:

$$P \cdot j = \frac{\sum_{i=1}^s P_{ij}}{S} \quad (1)$$

i = población

j = alelo

P_{ij} = frec del alelo j en la población i .

Heterocigosis observada

H_o = N° total de het. observados / N

Donde N = tamaño muestral

Heterocigosis para cada especie

Para cada especie se estima H_{ck}

$$H_{ck} = 1 - \sum_{j=1}^n P_{.j}^2$$

Donde los $p_{.j}$ se calculan igual que en (1) pero considerando sólo poblaciones de la especie k .

$$H_c = \frac{\sum_{k=1}^c H_{ck}}{c}$$

Donde:

C = N° de especies.

Los valores de F_{IS} y F_{IT} varían entre -1 y 1 . Valores negativos indican exceso de heterocigotas y por el contrario, valores positivos indican exceso de homocigotas. Se espera que F_{ST} varíe entre 0 y 1 .

Estos índices guardan la siguiente relación:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

La significación estadística de los valores de F_{IS} fueron calculadas usando el test de probabilidad de Haldane (1954), Weir (1990) y Guo y Thompson (1992), empleando el programa de Genepop (version 3).

La significación estadística de los valores de F_{ST} fueron calculadas usando la opción de diferenciación génica del programa Genepop (versión 3), el cual emplea el test exacto de Fischer descrito por Raymond y Rousset (1995).

III. 4 Análisis de la diferenciación genética entre poblaciones

III. 4. 1 Divergencia genética y flujo génico

Como se dijo anteriormente, la divergencia genética entre poblaciones se calcula a través del coeficiente F_{ST} . El valor de F_{ST} se incrementa a lo largo de las generaciones hasta llegar a un equilibrio que resulta de la interacción entre la deriva genética y la tasa de migración. Wright (1939) demostró que dicho valor es:

$$F_{ST} \cong \frac{1}{4Nm + 1}$$

Donde:

N: tamaño efectivo promedio de las subpoblaciones.

m: tasa de migración.

El producto Nm se denomina **flujo génico** y representa el número de migrantes por generación entre las subpoblaciones analizadas:

$$Nm = \frac{[(1/F_{ST}) - 1]}{4}$$

III. 4. 2 Análisis jerarquizado de la distribución de la variación genética

El concepto de estructura poblacional jerárquica y los distintos niveles de heterocigosis fueron originalmente desarrollados por Wright para cuantificar las diferencias genéticas entre subpoblaciones en varios niveles.

Los estadísticos F de Wright mencionados anteriormente, consideraron un solo grado de subdivisión jerárquica de la población. Sin embargo, estos modelos pueden ser extendidos para otros grados de subdivisión como, por ejemplo, subpoblación, población y especie.

Nei (1977) propone subdividir la diversidad total en diferentes niveles jerárquicos en términos de la proporción de la diversidad total representada en cada uno de estos niveles, por ejemplo:

- i) Diversidad dentro de las poblaciones de cada especie
- ii) Diversidad entre poblaciones de cada especie
- iii) Diversidad entre especies

Para cuantificar el efecto de la estructuración jerárquica se pueden definir los índices de fijación que seguidamente se mencionan.

El índice F_{ST} mide la **divergencia entre todas las poblaciones**. Es la medida más inclusiva de estructuración del conjunto de poblaciones. Compara la heterocigosis en el nivel jerárquico más inclusivo (el conjunto total de poblaciones) con el menos inclusivo (la población) y mide el efecto combinado de la subestructuración de la población.

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

El índice F_{SC} mide la **divergencia entre poblaciones dentro de la especie** o sea la reducción de la heterocigosis en la especie como consecuencia de la estructuración en poblaciones dentro de éstas.

$$F_{SC} = \frac{H_c - H_s}{H_c}$$

El índice F_{CT} mide la **divergencia entre especies** o sea la reducción proporcional de la heterocigosis total (H_T) como consecuencia de la subdivisión en especies.

$$F_{CT} = \frac{H_T - H_c}{H_T}$$

Los estadísticos F se relacionan entre sí de la siguiente manera:

$$(1 - F_S) = (1 - F_C)(1 - F_{SC})$$

En este trabajo la divergencia entre todas las poblaciones (F_{ST}) fue particionada en sus componentes entre especies (F_{CT}) y entre poblaciones dentro de cada especie (F_{SC}) y éstos fueron expresados en término de diversidad genética (Nei, 1973, 1977) como diversidad dentro de las poblaciones dentro de la especie ($1 - F_{ST}$) y diversidad entre poblaciones dentro de la especie ($F_{ST} - F_{CT}$).

El análisis jerárquico fue realizado usando el programa BIOSYS-1 (versión 1.7) (Swofford y Selander 1981).

III. 5 Análisis del grado de similitud genética entre poblaciones y/o especies

La medida relativa del grado de similitud entre poblaciones fue medida por la identidad genética de Nei (1978), dada por la fórmula:

$$I_N = \frac{\sum_j^L \sum_i^K (p_{jix} p_{jiy})}{\sqrt{\left(\sum_j \sum_i (p_{jix})^2\right) \left(\sum_j \sum_i (p_{jiy})^2\right)}}$$

Donde:

L : es el número de loci

K : es el número de alelos de un locus particular

p_{jix} y p_{jiy} : son las frecuencias alélicas en el locus j de las poblaciones x e y .

El valor I varía entre 0 y 1. La identidad máxima (1) entre dos grupos indica que tienen todos los alelos en común con las mismas frecuencias (máxima similitud), mientras que la identidad mínima (0) ocurre cuando no tienen ningún alelo en común (máxima divergencia).

Las relaciones entre poblaciones pueden también expresarse como distancias genéticas aplicando la fórmula:

$$D_N = -\ln I_N$$

Esta distancia es una estimación mínima del número de sustituciones de codones por locus acumulado desde el tiempo de divergencia de dos poblaciones (Nei, 1972).

La distancia (D) genética representa el número promedio de sustituciones alélicas por locus acumuladas en el genoma desde que las dos poblaciones iniciaron su separación o divergencia; varía entre 0 e ∞ . Para valores de $D < 1$ y suponiendo una tasa constante de sustitución de aminoácidos, la distancia genética sería una función lineal del tiempo evolutivo.

Los cálculos de estos índices (I , D) se realizaron usando el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981)

A partir de las distancias de Nei, se realizó un análisis de agrupamiento (“análisis de cluster”).

A partir de esta se construyó un fenograma por el método de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). Este análisis fue realizado mediante el programa STATISTICA (Statsoft, 1996).

Este método considera que el valor de similitud entre la UTO (Unidad Taxonómica Operativa) candidata a incorporarse y el grupo o núcleo, es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. Si el candidato a incorporarse es un grupo o núcleo en sí mismo, el valor de similitud será un promedio de los valores de similitud entre los pares posibles de UTOS provenientes uno de cada grupo o núcleo (Crisci y Armengol, 1983).

A partir de los datos de frecuencias alélicas se obtuvieron 100 pseudoreplicas de la matriz de frecuencias alélicas por la técnica de "Bootstrap" . A partir de estas se obtuvieron 100 matrices de distancia genética de Nei usando el programa Seqboot y Genedist. A partir de estas matrices, se obtuvieron 100 árboles UPGMA con el programa Neighbor y un árbol consenso fue generado con el programa Consense. Todos estos programas están incluidos en el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1993).

III. 6 Análisis de las relaciones entre distancias genéticas y distancias geográficas

La hipótesis de que la diferenciación genética entre las poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia fue puesta a prueba comparando la matriz de distancias geográficas con la matriz de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951). El método usado fue el test de Mantel usando la rutina ISOLDE del programa GENEPOP (Raimond & Rousset 1995). Para el mencionado análisis se examinaron los siguientes conjuntos poblacionales: i) se incluyeron todas las poblaciones analizadas en este estudio ii) se incluyeron solamente las poblaciones de *O. bonariensis* iii) se incluyeron solamente las poblaciones de *O. hatcheri*.

IV. TECNICA DE RAPD

IV. 1 Extracción de ADN total

El ADN fue extraído a partir de un pequeño trozo de hígado inmerso en alcohol absoluto (aproximadamente 2 gramos de tejido), empleando digestión con proteinasa K, precipitación de proteínas con alta concentración salina (NaCl 5M) y precipitación de ADN con etanol, metodología modificada de Medrano y col. (1990).

El método seleccionado para la preparación de ADN consistió en los siguientes pasos (siempre teniendo en cuenta que todo el material a usar debe estar autoclavado de modo de evitar contaminación):

- 1) se colocó cada trozo de hígado en un tubo Eppendorf (rotulado por número de individuo)
- 2) se lavó 2 veces con STE (1X) en frío, desechándose este rápidamente
- 3) se agregó 550 μ l de buffer lisis e inmediatamente 11 μ l de proteinasa K
- 4) se homogeneizó con un vástago de vidrio, previamente esterilizado y flameado con alcohol 70°
- 5) se incubó en estufa a 55° C por un mínimo de 3 horas hasta “overnight”, hasta la desintegración del tejido
- 6) una hora antes de acabar con la incubación, se colocó en cada tubo 5.5 μ l de RNAsa
- 7) se centrifugó durante 10 min en microcentrifuga(12000 rpm)
- 8) se transfiere el sobrenadante (aproximadamente 550 μ l) a otro tubo previamente rotulado y se le agrega 350 μ l de NaCl (2M). Se agita por unos segundos y se centrifuga por 30 min a 12000 rpm, temperatura ambiente.
- 9) se coloca el volumen de sobrenadante que se pueda recuperar sin levantar el pellet (aproximadamente 400 μ l) en un nuevo tubo (2 por muestra), previamente rotulado. Se agrega etanol en frío, siendo el volumen de este el doble que el del sobrenadante recuperado. Se agita el tubo lentamente, permitiendo que la interfase con el alcohol se vaya mezclando paulatinamente, y se pueda visualizar el ADN precipitado. Para que la precipitación sea completa se deja a 5° C toda la noche.
- 10) se centrifuga a 12000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. El ADN precipita en forma de pellet. Se tira el sobrenadante. Se deja escurrir el pellet sin que se deslice en el tubo.

- 11) se lava el pellet por 2 veces agregando 1ml de Etanol 70°(se resuspende tratando que el pellet se suelte de la pared) . Se centrifuga (6000 rpm por 5 min) cada vez y se retira el etanol. Se deja secar el pellet en estufa a 55° C
- 12) se agrega 100 ul de TE (1X) y se colocan los tubos en baño a 55° C (para ayudar a disolver el pellet) por 30 min, luego se resuspende el pellet. Si el ADN no va ser usado a la brevedad se coloca a -20° C.

IV. 2 Estimación de la concentración de ADN

Se utilizó 10 ul de la muestra de ADN en 990 ul de agua o buffer TE (1X). Se tomó la densidad optica (O.D.) leyendo en un espectrofotómetro a 260 nm. Se calculó la concentración, multiplicando el valor leído por el factor de dilución (100) y por 50 dado que a 260 nm 1 O.D.= 50 ug/ml.

IV. 3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El siguiente protocolo para la amplificación de marcadores RAPD, es una adaptación del propuesto por Williams y col. (1990), y ajustado para peces.

Volumen total de la mezcla de reacción

El volumen total por tubo fue de 10 ul., constituido por 1 ul. de ADN molde y 9 ul. de la mezcla de reacción. En el tubo control negativo se sustituyó el ADN por 1 ul. de agua destilada

a) ADN molde

Las amplificaciones incluyeron diluciones de 1:10 o 1:100 a partir de los stocks de ADN

b) Mezcla de reacción por tubo

Agua estéril

6.9 ul.

10X tampón Taq	1 ul.
Cl ₂ Mg 50mM	0.3 ul.
10 mM de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)	0.2 ul.
25 pM Oligonucleótido (decamero) dilución 1:4	0.5 ul.
Taq polimerasa (5 U./ ul.)	0.1 ul

La dilución 1:4 del oligonucleótido se realiza con agua estéril. Para evitar que éste forme estructura secundaria, antes de ser introducidos en la mezcla de reacción, el oligonucleótido debe ser colocado durante 10 min. en baño a 65° C

Condiciones de la reacción

La mezcla se colocó en el termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer) programado del siguiente modo

Desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C

30 ciclos con: Desnaturalización a 94° C, 1 min. por ciclo

Hibridación del oligonucleótido a 36° C, 1 min. por ciclo

Extensión de la cadena a 72° C, 1 min. por ciclo

Extensión final de 7 min. a 72° C

Concluida la reacción se se guardaron los productos (rotulados con la fecha, nombre de oligonucleótido y número de experimento) en freezer -20° C hasta la corrida del gel correspondiente.

Se realizaron varias amplificaciones para asegurar la reproducibilidad de los patrones de bandas. En todas las amplificaciones se colocaron tubos controles sin ADN para controlar que no existiera contaminación en los reactivos empleados.

Se probaron arbitrariamente 7 "primers" (Kit E de Operon Life Technology) diferentes y se eligieron seis que presentaron patrones de polimorfismo evidentes: OPE-01 (5' -CCCAAGGTCC- 3'), OPE-02 (5' -GGTGCGGGAA- 3'), OPE-03 (5' -CCAGATGCAC- 3'), OPE-04 (5' -GTGACATGCC- 3'), OPE-06 (5' -AAGACCCCTC- 3') y OPE-09 (5' -CTTCACCCGA- 3'). El total de bandas analizadas con estos seis "primers" fue 220

IV. 4 Visualización de Fragmentos Amplificados

Para la visualización de los productos de amplificación se procedió a la siembra de estos en geles de poliacrilamida y tinción de los mismos con la técnica de plata (Sanguineti y col. 1994).

IV. 4. 1.Preparación y armado de los geles

Se empleó la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6%. Cada gel fue corrido en tampón TBE (1X). Previo a ello se limpiaron: el peine, separadores y vidrios de ambos lados con Etanol 96°. Posteriormente se le paso a las caras de los vidrios en las cuales apoyara el gel, SDS (10%). El vidrio de mayor tamaño se ubico apoyado sobre una cuba de tinción, y en la cara superior de este vidrio se colocaron los separadores (2 separadores laterales con gomas salientes en sus extremos y 1 separador correspondiente a la zona de abajo del gel). Las gomas salientes de los separadores laterales se colocaron hacia arriba. Posteriormente se coloco encima de este vidrio otro de menor tamaño haciendo coincidir los extremos finales y laterales de ambos, quedando las gomas salientes expuestas. En esta posición horizontal se procedio a volcar la solución de Acrilamida al 6% en TBE con APS y TEMED, evitando la formación de burbujas. Finalmente se introdujo el peine. Los geles se dejaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente; para evitar la deshidratación de estos se procedio a cubrir los vidrios con papel adherente.

IV. 4. 2. Limpieza de geles

Para quitar la acrilamida pegada a las placas de vidrio se le pasaron a ambos vidrios que sostienen el gel TBE (1X). Se retiró el separador de abajo y el peine, limpiándose dichas zonas con agua destilada.

IV. 4. 3. Colocación de los geles en cuba de corrida

Los geles limpios se colocaron con las gomas salientes de los separadores laterales pegadas hacia los vidrios de la cuba. Estos y los vidrios superiores de cada gel (máximo 2 geles por cuba) y fueron enganchados mediante potentes ganchos.

Se colocó buffer corrida, TBE (1X), en el compartimiento inferior de la cuba y posteriormente en el superior (aproximadamente a 1 cm. por arriba de las muescas del peine). Se eliminaron burbujas en la parte de debajo de los geles, mediante movimientos laterales de la cuba.

Se controló que el sistema no pierda buffer hacia la zona inferior, para ello se marcó el nivel del buffer del compartimiento superior.

Se sacaron burbujas o acrilamida de las muescas, para ello se empleó una micropipeta (P1000), colocándose esta en cada muesca y burbujeando la zona hasta eliminación de las mismas.

IV. 4. 4. Siembra del material en los geles

Se agregó a cada tubo constituido por 9 ul. de mezcla de reacción y 1 ul de ADN molde, 1.5 ul. de loading buffer, centrifugándose en forma breve (aproximadamente 1 segundo) de modo de homogenizar el contenido. El buffer loading contiene colorantes, y glicerol para aumentar la densidad de la muestra evitando que se escape de las calles durante la siembra. Se sembró cada muesca con 6 ul. de la mezcla mencionada anteriormente. Esta tarea debe ser realizada rápidamente para evitar difusión de las muestras. También se sembró en una de las calles, 1.5

ul. de un marcador de peso molecular diluido 1:10 (GIBCO BRL – Life Technologies Cat-Nº 15615-016). El objeto de esto es poder calcular el tamaño de cada fragmento amplificado. Al igual que con los otros tubos, se le agregó al marcador 1.5 ul. de buffer loading.

IV. 4. 5. Corrida electroforética

Se seteo la fuente de poder a 130 volt. La corrida electroforética duró cuatro horas aproximadamente (se detuvo cuando el colorante más veloz llegó al extremo inferior del gel). Se ubicó el polo positivo hacia la parte inferior del gel de manera que el ADN, que está cargado negativamente, se desplace hacia abajo a través del gel. De esta forma se van separando por tamaño los diferentes fragmentos amplificados.

IV. 4. 6. Revelado, fijación y preservación de los geles

Una vez finalizada la corrida:

- 1) se transfirieron los geles a cubas con fijador (150 ml. de Agua destilada + 20 ml. de Etanol 96° + 750 ul. de ácido Acético por cuba). Al cabo de 15 minutos como tiempo mínimo, se retiró el fijador
- 2) se procedió a realizar tinción con Plata al 2% (0.3 gr. de Ag se llevan a 150ml con agua destilada). Esta solución de Plata se volcó en la cuba con uno de los geles, utilizándose la misma solución para el otro gel (más de 2 veces no conviene reusar la solución dado que se corre riesgo de formación de precipitados indefinidos, ensuciando el gel). La duración de la tinción es de 10 minutos exactos y debe ser con agitación constante.
- 3) Luego de retirar la solución de Plata se procedió a lavar rápidamente los geles con agua destilada

- 4) Se volcó en las cubas con los geles solución Reveladora (150 ml. de agua destilada + 4.5 gr. de NaOH +750 ul. de Formaldehido), se mantuvo agitación esporádica. La duración de este paso es hasta la aparición de bandas nítidas.
- 5) Se retiró el revelador y se agregó fijador (se volvió a usar el empleado en el paso 1) durante 15 minutos como mínimo
- 6) Se colocaron los geles en un soporte de vidrio forrado con celofán humedecido y se envolvieron con otra hoja de celofán humedecida. Se dejaron secar, se desprendieron del vidrio, conservándose de este modo por tiempo indeterminado.
- 7) Se fotografiaron con cámara digital para su posterior análisis.

IV. 5. Soluciones empleadas en las técnicas de RAPD

STE (1X)

Tris Cl (1M) pH: 8	0.1 ml. (100 ul.)
EDTA (0.5M) pH:8	0.02 ml. (20 ul.)
NaCl (2M)	0.5 ml. (500 ul.)
Agua Bidestilada	9.38 ml.

TRIS CLH (1M) pH: 8

121 gr. de Tris

llevar a 1000 ml. con agua destilada

ajustar pH: 8 con HCl fumante

EDTA (0.5M) pH: 8

186.15 gr. de EDTA

llevar 700 ml. con agua destilada

ajustar pH con NaOH

completar a 1000ml. con agua destilada

ClNa (2M)

117 gr. Cl Na

llevar con agua destilada a 1000 ml.

Buffer de Lisis (Maniatis y col, 1982)

Tris Cl (1 M) pH: 8	0.5 ml. (500 ul.)
EDTA (0.5 M) pH: 8	1 ml. (1000 ul.)
SDS (10%)	1 ml. (1000 ul.)
ClNa (2M)	0.5 ml. (500 ul.)
Agua Bidestilada	7 ml.

SDS (10 %) (Lauryl sulfato sodium salt) (Maniatis y col, 1982)

Disolver 100 gr. de SDS en 900 ml. de agua destilada

Calentar a 68° C para acelerar la dilución

Ajustar a pH: 7.2 con HCl fumante

Llevar a 1000ml con agua destilada

ClNa (5M)

14.62 gr. Cl Na

llevar con agua destilada a 50 ml.

TE (1X)

Tris Cl (1M) pH: 8	0.1 ml. (100 ul)
EDTA (0.5M) pH: 8	0.02 ml. (20 ul.)
Agua bidestilada	9.88 ml.

Gel de Poliacrilamida al 6%

Acrilamida al 30%	10 ml.
Agua destilada	30 ml.
TBE (5X)	10 ml.

A 50 ml de solución de acrilamida al 6%, se le agregan a último momento, 500 ul. de Persulfato de amonio (APS) al 10% y 50 ul de TEMED (para gel de espesor de 1.5 mm)

Stock de Acrilamida al 30%

29 gr. de Acrilamida

1 gr. de Bisacrilamida

llevar a 100 ml. con agua destilada

TBE (5X)

Tris Base	54 gr.
Ác. Bórico	27.5 gr.
EDTA (0.5M) pH: 8	20 ml.

Llevar a 1000 ml. con agua destilada

TBE (1X)

Tomar 200 ml. de TBE (5X) y llevar a 1000 ml.

APS (10%)

2 gr. de APS

Llevar a 20 ml. con agua destilada

Loading Buffer (Maniatis y col, 1982)

0.25% Azul de Bromofenol

0.25% Xilencianol FF

30% Glicerol en agua

V. MÉTODOS ESTADÍSTICOS A PARTIR DE LOS DATOS DE RAPD

A partir de los datos obtenidos se construyó una matriz de presencia (1) o ausencia de bandas (0) RAPD. Esta matriz se convirtió en frecuencias fenotípicas calculadas de la siguiente forma:

$$F_{ij} = \frac{\text{Número de individuos con banda } j}{\text{Total de individuos analizados en población } i}$$

F= frecuencia fenotípica

i= población

j= banda

V.1. Analisis de la divergencia genética

Dado que los RAPD son marcadores dominantes y que sus productos de amplificación provienen de zonas distribuidas al azar en el ADN, las cuales no tienen necesariamente que corresponder a determinados genes, se considero a los productos RAPD como rasgos fénéticos.

V. 1.1 Distancias Manhattan

Se aplicó el programa fortran RAPDDIST (Black,1997) el cual permite, entre otras opciones, considerar a las bandas obtenidas por RAPD como datos fenotípicos sin realizar ninguna suposición genética. La distancia elegida fue la de Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978). Dentro de las medidas de distancia esta es el método más simple de sumar las diferencias. Se trata de una distancia algebraica sencilla, cuyo cálculo para las UTO A y B está representado por la fórmula:

$$D(A,B) = \sum_{i=1}^n |X(A, i) - X(B, i)|$$

donde:

$X(A, i)$ = es el estado del carácter i para la UTO A

$X(B, i)$ = es el estado del carácter i para la OTU B

n = número de caracteres.

En síntesis, esta distancia corresponde a la sumatoria del valor absoluto de la diferencia entre cada estado de los caracteres de las OTU. De esto surge, que la máxima similitud posible para este coeficiente de distancia es cero.

V. 1. 2 F_{ST} y Flujo génico

La diferenciación genética fue estimada mediante los índices F_{ST} (Wright, 1931) obtenidos a partir del análisis de la varianza molecular (AMOVA 1.5) (Excoffier y col., 1992). Este programa fue realizado utilizando el programa AMOVAPREP (Miller, 1998) y WINAMOVA (Excoffier y col., 1995). Se estimó de este modo: el F_{ST} entre cada par de poblaciones totales estudiadas y el F_{ST} promedio tanto para las poblaciones de *O. bonariensis* como las de *O. hatcheri*. Las estimaciones indirectas del flujo génico (Nm) fueron obtenidas a partir de la expresión:

$$Nm = \frac{[(1/F_{ST}) - 1]}{4}$$

V. 1. 3. Análisis jerarquizado de la distribución de la variabilidad genética

El método empleado para analizar la proporción de la varianza fenotípica en los diferentes niveles jerárquicos fue el del análisis de la varianza molecular (AMOVA 1.5) (Excoffier y col., 1992).

La diferenciación total entre poblaciones (F_{ST}) fue particionada por este método en sus componentes entre especies (F_{CT}) y entre poblaciones dentro de cada especie (F_{SC}). Estos resultados fueron expresados en término del análisis de la diversidad genética de Nei (1973, 1977) como:

- i) Diversidad dentro de poblaciones ($1 - F_{ST}$)
- ii) Diversidad entre poblaciones dentro de la especie ($F_{ST} - F_{CT}$)
- iii) Diversidad entre especies (F_{CT})

AMOVA 1.5 fue realizado utilizando el programa AMOVAPREP (Miller, 1998) y WINAMOVA (Excoffier y col., 1995)

V.2 Correlación entre distancia genéticas y geográficas

La hipótesis de que la diferenciación genética entre las poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia fue puesta a prueba comparando la matriz de distancias geográficas con la matriz de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright 1978). El método usado fue el test de Mantel usando la rutina ISOLDE del programa GENEPOP (Raimond & Rousset 1995). Para el mencionado análisis se examinaron los siguientes conjuntos poblacionales: i) se incluyeron todas las poblaciones analizadas en este estudio ii) se incluyeron solamente las poblaciones de *O. bonariensis* iii) se incluyeron solamente las poblaciones de *O. hatcheri*.

V.3 Analisis Fenético

V.3.1 Analisis Fenético de distancias Manhattan

A partir de las distancias de Manhattan, se realizó un análisis de agrupamiento (“análisis de cluster”). A partir de esta se construyó un fenograma por el método de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). Este análisis fue realizado mediante el programa STATISTICA (Statsoft, 1996).

A partir de matriz de distancias Manhattan se obtuvieron 100 seudoreplicas de la misma empleando el programa RAPDDIST (Black,1997) el cual remuestrea al azar los datos obtenidos por RAPD generando muchas seudo replicas, proceso conocido como "bootstrapping". Este set de matrices obtenidas fue leído empleando el programa PHYLIP3.5C.. A partir de estas matrices, se obtuvieron 100 árboles UPGMA con el programa Neighbor y un árbol consenso fue generado con el programa Consense. Todos estos programas están incluidos en el paquete PHYLIP (Felsestein, 1993).

V.3.2 Analisis Fenético de índices F_{ST} obtenidos por AMOVA

A partir de los índices F_{ST} obtenidos por AMOVA, se realizo un análisis de agrupamiento (“análisis de cluster”). A partir de éste se construyó un fenograma por el método de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). Este análisis fue realizado mediante el programa STATISTICA (Statsoft, 1996).

En este caso no se realizo bootstrapping debido a que el programa AMOVA no incluye programas que lo permitan.

V. 4. Correlación entre diferenciación genética obtenidas por RAPD y por Isozimas

Para comprobar la consistencia de los resultados obtenidos por RAPD e Isozimas, se correlacionaron las matrices de diferenciación genética (F_{ST}) para cada par de población estudiada por el método de RAPD y por el de Isozimas. El método usado fue el test de Mantel usando la rutina ISOLDE del programa GENEPOP (Raimond & Rousset 1995).

RESULTADOS

RESULTADOS

I RESULTADOS DE ISOZIMAS

En todas las poblaciones estudiadas, se realizó el análisis de afinidad tisular en músculo esquelético e hígado para los diferentes sistemas isoenzimáticos (Tabla 4). Este tipo de análisis conjuntamente con la observación del patrón de bandas obtenidas permitió interpretar los zimogramas o patrones electroforéticos y determinar el número de loci presentes en cada población.

En las figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se muestran los zimogramas electroforéticos correspondientes a todos los sistemas isoenzimáticos estudiados.

Para designar los distintos loci y alelos se siguió la nomenclatura propuesta por Shaklee y col. (1990). Para enzimas con múltiples loci, el locus con mayor migración anódica fue designado como "1", el siguiente como "2" y así sucesivamente. Los alelos fueron denominados por código de secuencia numérica en base su movilidad anódica decreciente.

El análisis de los zimogramas para los diferentes sistemas isoenzimáticos permitió detectar 22 loci considerando a todas las especies y poblaciones estudiadas de *Odontesthes*, siendo 19 para cada especie (Tabla 4). De los 22 loci, los patrones fenotípicos de 14 fueron invariables, es decir todas las poblaciones estudiadas en las 3 especies presentaron el mismo alelo en *ADH-1**, *ADH-2**, *ALDH**, *AO**, *G6PD-1**, *G6PD-2**, *LDH-2**, *MDH-1**, *MDH-2**, *MEP-1**, *MEP-2**, *MEP-3**, *SOD-1**, *SOD-2**. Los 8 restantes loci fueron variables, 4 de ellos (*EST**, *GOT-4**, *GOT-5**, *LDH-1**) fueron polimórficos (variables dentro de las poblaciones) mientras que los restantes (*GOT-1**, *GOT-2**, *GOT-3** y *GOT-6**) no variaron dentro de las poblaciones pero si entre especies. *O. bonariensis* y *O. argentinensis* presentaron los mismos

loci, sin embargo *O. hatcheri* se diferenció de estas especies en la presencia de 3 GOT loci diferentes (*GOT-2**, *GOT-3**, *GOT-5**).

A partir del número de individuos observados con diferentes genotipos, se calcularon las frecuencias alélicas que se encuentran en la Tabla 5

I.1 Afinidad tisular de los diferentes loci isoenzimáticos

Casi todos los loci, salvo para *GOT-1**, presentaron especificidad tisular para cuatro poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CP, SMM, y CH) (Tabla 4). En cambio no solamente *GOT-1** pero también *LDH-2** no presentaron especificidad tisular para la remanente población de *O. bonariensis* (RP). *O. argentinensis* y *O. hatcheri* mostraron en todos los loci especificidad tisular. Casi todos los loci mostraron en todas las poblaciones la misma especificidad tisular, salvo en los siguientes casos (Tabla 4):

- La población RP (*O. bonariensis*) se diferencia no solo de las otras 2 especies sino también de las restantes poblaciones de *O. bonariensis* en la expresión relativa de *LDH-1** y *LDH-2** en músculo esquelético).
- *O. argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri* se diferenciaron entre ellas por la expresión relativa de *MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3**.
- En el caso de *O. bonariensis* y *O. argentinensis* que presentan iguales loci GOT, se observa expresión diferencial tanto en músculo esquelético como en hígado para el locus *GOT-1**.

Tabla 4. Especificidad tisular para cada sistema isoenzimático en *O. bonariensis* (poblaciones de MA, CP, SMM, CH y RP), *O. argentinensis* (poblaciones de SC y MC) y *O. hatcheri* (poblaciones de BO, CC y ZY).

Locus	<i>O. bonariensis</i> MA, CP, SM, CH		<i>O. bonariensis</i> RP		<i>O. argentinensis</i> SC, MC		<i>O. hatcheri</i> BO, ZY, CC	
	M	L	M	L	M	L	M	H
ADH-1*	-	++	-	++	-	++	-	++
ADH-2*	-	++	-	++	-	++	-	++
ALDH*	-	+	-	+	-	+	-	+
AO*	-	+	-	+	-	+	-	+
EST*	-	++	-	++	-	++	-	++
G6PD-1*	-	++	-	++	-	++	-	++
G6PD-2*	-	++	-	++	-	++	-	++
GOT-1*	+	+	+	+	++	+	-	-
GOT-2*	-	-	-	-	-	-	++	++
GOT-3*	-	-	-	-	-	-	-	+
GOT-4*	-	++	-	++	-	++	-	-
GOT-5*	-	-	-	-	-	-	+	++
GOT-6*	-	++	-	++	-	++	-	-
LDH-1*	++	-	+	-	++	-	++	-
LDH-2*	+	++	++	++	+	++	+	++
MDH-1*	++	-	++	-	++	-	++	-
MDH-2*	+	++	+	++	+	++	+	++
MEP-1*	-	++	-	++	-	+/	-	+
MEP-2*	++	+	++	+	-	+/	-	++
MEP-3*	++	+/-	++	+/-	-	+/	+	++
SOD-1*	-	++	-	++	-	++	-	++
SOD-2*	-	+	-	+	-	+	-	+

+/: débilmente positivo +: positivo ++: intenso --: no reacciona
M: músculo esquelético L: hígado

L2 Descripción de los sistemas isoenzimáticos

ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) EC: 1.1.1.1

Diversos autores postularon que esta enzima sería dimérica (Pasteur, 1988; Harris y Hopkinson, 1978 y Gajardo, 1988).

En todas las poblaciones estudiadas, el análisis de los zimogramas en hígado (Fig. 6) permitió la identificación de dos zonas de actividad (zona I y zona II) que corresponden a dos loci diferentes. Los 2 loci, *ADH-1** y *ADH-2**, fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.

ALDEHIDO DESHIDROGENA (ALDH) EC: 1.2.1.3

En las poblaciones estudiadas el análisis de los zimogramas en hígado (Fig. 7) permitió la identificación de una única zona de actividad que corresponden a un locus, *ALDH**, siendo esté constante y monomórfico en todas las poblaciones estudiadas.

ALDEHIDO OXIDASA (AO) EC: 1.2.3.1

En todas las poblaciones estudiadas se obtuvo una única banda sin ninguna variación que corresponde a un locus monomórfico (*AO**).

La figura 8 representa el zimograma electroforético en hígado de AO.

Fig. 6 Zimograma electroforético en hígado correspondiente a ADH

Fig. 7 Zimograma electroforético en hígado correspondiente a ALDH

Fig. 8 Zimograma electroforético en hígado correspondiente a AO

Figura 6

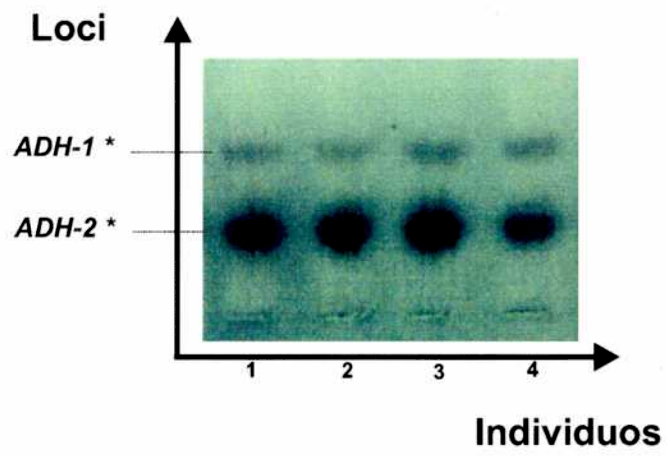


Figura 7

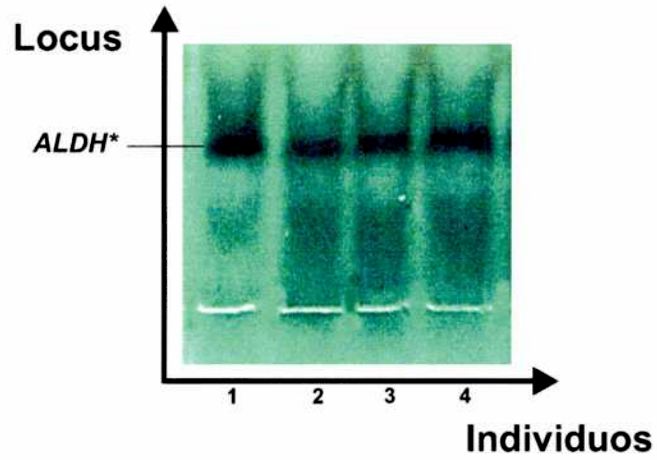
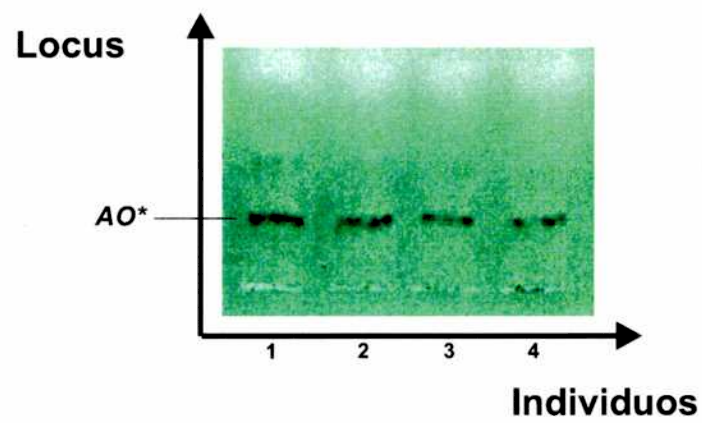


Figura 8



ESTERASA (EST) EC: 3.1.1

En estudios previos se ha postulado que estas enzimas serían monómeros y en algunos casos dímeros. En estudios realizados en especies del Orden Atheriniformes se propuso que esta enzima estaría formada por una única subunidad (Gajardo, 1988).

En todas las poblaciones estudiadas el análisis de los zimogramas en hígado obtenidos para este sistema permitió reconocer una única zona de actividad, el locus *EST** (Fig. 9). Las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) presentaron 4 alelos (*EST*1*, *EST*2*, *EST*3*, *EST*4*). En *O. bonariensis* las poblaciones de CP, SM, CH, RP mostraron únicamente 3 alelos (*EST*3*, *EST*4*, *EST*5*), en cambio la población de MA presentó el máximo número, 5 (*EST*1*, *EST*2*, *EST*3*, *EST*4*, *EST*5*) (Fig. 9). Las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, ZY, CC) presentaron 2 alelos (*EST*2*, *EST*3*). A partir del número de individuos observados con diferentes genotipos, se calcularon las frecuencias alélicas que se encuentran en la Tabla 5.

Como puede observarse en la Tabla 5 las diferentes poblaciones difirieron en algunos casos en los alelos que presentaban y/o en las frecuencias de los mismos. El alelo *EST*1* se registra en las 2 poblaciones de *O. argentinensis* en baja frecuencia, es raro en *O. bonariensis* observándose únicamente en la población de MA en menor frecuencia y esta ausente en todas las poblaciones de *O. hatcheri*. El alelo *EST*2* esta en frecuencia intermedia en las poblaciones de *O. argentinensis* y *O. hatcheri*, y ausente para la mayoría de las poblaciones de *O. bonariensis*, salvo en MA en donde se encuentra en baja frecuencia. El alelo *EST*3* es común a las 3 especies estudiadas encontrándose en frecuencia intermedia a alta. El alelo *EST*4* se encuentra en baja frecuencia en todas las poblaciones de *O. argentinensis* y *O. bonariensis*, y ausente en todas las poblaciones de *O. hatcheri*. El alelo *EST*5* esta ausente en *O. argentinensis* y *O. hatcheri* y en frecuencia del orden de 0.3 en todas las poblaciones de *O. bonariensis*.

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PD) EC:1.1.1.4.9

En las poblaciones estudiadas, el análisis de los zimogramas (Fig. 10) permitió la identificación de dos zonas de actividad (zona I y zona II) que corresponden a dos loci diferentes. Los 2 loci, *G6PD-1** y *G6PD-2**, fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.

Fig. 9 Zimograma de algunos de los fenotipos electroforéticos en hígado hallados en la población de MA (*O. bonariensis*) correspondiente a EST

Fig. 10 Zimograma electroforético en hígado correspondiente G6PD

Figura 9

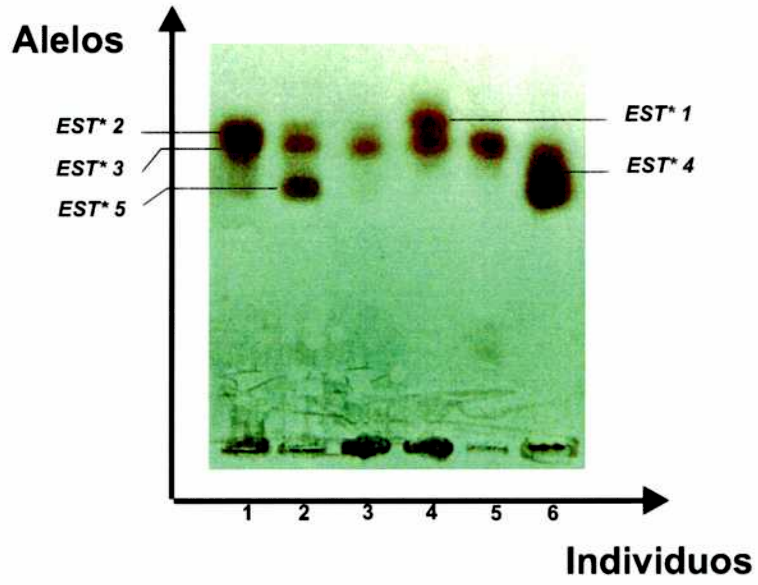
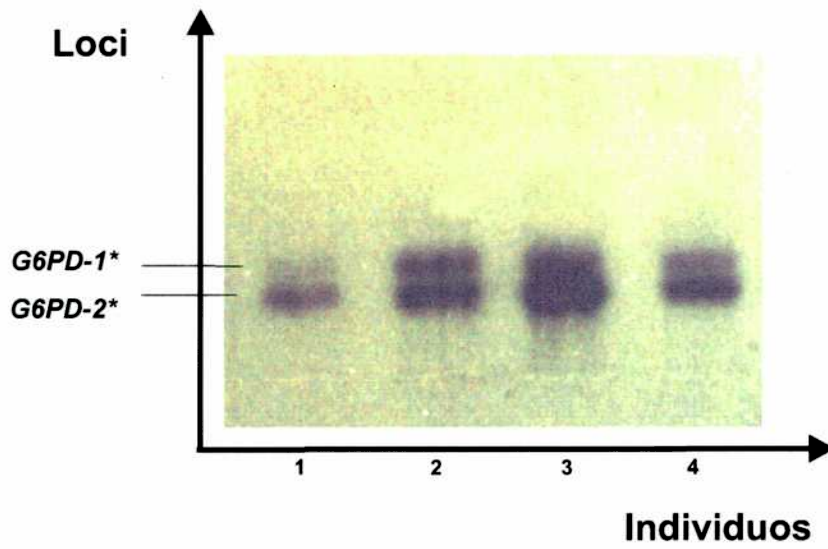


Figura 10



GLUTAMICO-OXALACETICO TRANSAMINASA (GOT) EC: 2.6.1.1

En estudios previos en peces se postulo que esta enzima es dimérica (Shimizu y col. , 1993). El análisis de este sistema permitió detectar 7 zonas de actividad, 4 correspondientes a *O. bonariensis* y *O. argentinensis* y 3 pertenecientes a *O. hatcheri*. De las 4 zonas detectadas en *O. bonariensis* y *O. argentinensis* , la zona I, III y IV correspondieron a los loci *GOT-1**, *GOT-4** y *GOT-6**, la zona II correspondió a un heteropolimero de interacción no alélica (producto de interacción entre los loci *GOT-1** y *GOT-4**) (Fig.11). Los loci *GOT-1** y *GOT-6** fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones de *O. bonariensis* y *O. argentinensis* estudiadas; en cambio el locus *GOT-4** presentó 3 alelos (*GOT-4*1*, *GOT-4*2* y *GOT-4*3*) en todas las poblaciones de *O. argentinensis* mientras que el alelo *GOT-4*1* se halló fijado en todas las poblaciones de *O. bonariensis* (Fig. 11 a₁ y b₁). En *O. hatcheri* las 3 zonas de actividad correspondieron a los loci *GOT-2**, *GOT-3** y *GOT-5** (Fig. 11 a₂ y b₂). Los loci *GOT-2** y *GOT-3** fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones de *O. hatcheri*. El locus *GOT-5** presentó 2 alelos (*GOT-5*1* y *GOT-5*2*) en todas las poblaciones de *O.hatcheri* (Fig. 11 a₂ y b₂). Las frecuencias alélicas de los loci variables se encuentran en la Tabla 5.

Como puede observarse en la Tabla 5 las poblaciones de *O.hatcheri* (BO, ZY y CC) difirieron de las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) y de las de *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH, RP) en los loci presentes, siendo los loci *GOT-1**, *GOT-4** y *GOT-6** exclusivos de *O. argentinensis* y *O. bonariensis* y los loci *GOT-2**, *GOT-3** y *GOT-5** exclusivos de *O.hatcheri*.

En cuanto al locus *GOT-4** se observa (Tabla 5) que:

El alelo *GOT-4*1* se halló fijado en todas las poblaciones de *O.bonariensis* y en muy baja frecuencia en las poblaciones de *O. argentinensis*.

El alelo *GOT-4*2* está ausente en todas las poblaciones de *O. bonariensis*, mientras que en las poblaciones de *O. argentinensis* su frecuencia osciló alrededor de 0.85.

El alelo *GOT-4*3* está ausente en todas las poblaciones de *O. bonariensis*, mientras que en las poblaciones de *O. argentinensis* su frecuencia osciló alrededor de 0.13.

En las poblaciones de *O. hatcheri* el alelo *GOT-5*1* varió entre 0.15 y 0.50, mientras que el alelo *GOT-5*2* varió entre 0.50 a 0.85 (Tabla 5).

Este sistema es diagnóstico permitiéndome diferenciar *O. hatcheri* de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*. Si bien *O. bonariensis* presenta los mismo loci que *O. argentinensis* estas especies se diferencian en las frecuencias alélicas de *GOT-4**: estando el alelo *GOT-4*1* fijado en *O. bonariensis* y en muy baja frecuencia en *O. argentinensis* (Tabla 5).

Fig. 11

- A₁)** Zimograma de algunos de los fenotipos electroforéticos en hígado correspondiente a GOT, hallados en las poblaciones de *O. bonariensis* (*O.b*), *O. argentinensis* (*O.a*) y *O.hatcheri* (*O.h*). Los individuos 1 y 2 corresponden a los fenotipos de individuos *O. bonariensis* (*O.b*), el individuo 3 corresponde a un fenotipo de *O. hatcheri* (*O.h*), mientras que los individuos 4 al 12 corresponden a fenotipos de *O. argentinensis*. La zona marcada 1-4 corresponde a la banda de interacción no alélica, de movilidad intermedia entre locus *GOT-1** y locus *GOT-4**.
- B₁)** Representación esquemática de algunos de los fenotipos mostrados en la Fig. a₁, en el eje de abscisa se indica individuos seleccionados a partir de la misma.

Fig. 11

- A₂)** Zimograma de algunos de los fenotipos electroforéticos en hígado correspondiente a GOT, hallados en las poblaciones de *O. bonariensis* (*O.b*), *O. argentinensis* (*O.a*) y *O.hatcheri* (*O.h*). Los individuos 10 y 11 corresponden respectivamente a los fenotipos de individuos *O. bonariensis* (*O.b*) y *O. argentinensis* (*O.a*), mientras que los individuos 1 al 9, 12 y 13 corresponden a fenotipos de *O.hatcheri* (*O.h*). La zona marcada 1-4 corresponde a la banda de interacción no alélica, de movilidad intermedia entre locus *GOT-1** y locus *GOT-4**.
- B₂)** Representación esquemática de algunos de los fenotipos mostrados en la Fig. a₂, en el eje de abscisa se indica individuos seleccionados a partir de la misma.

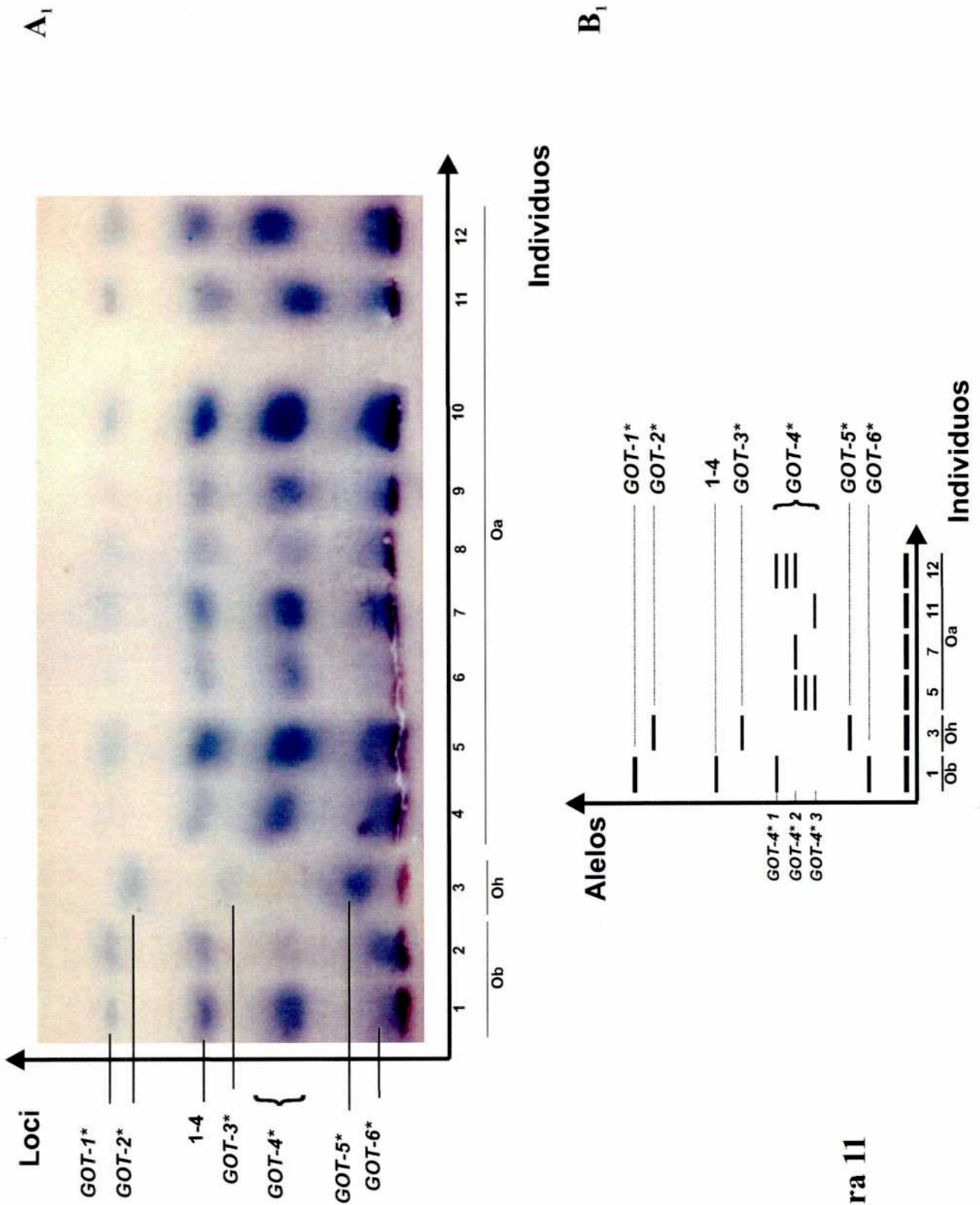


Figura 11

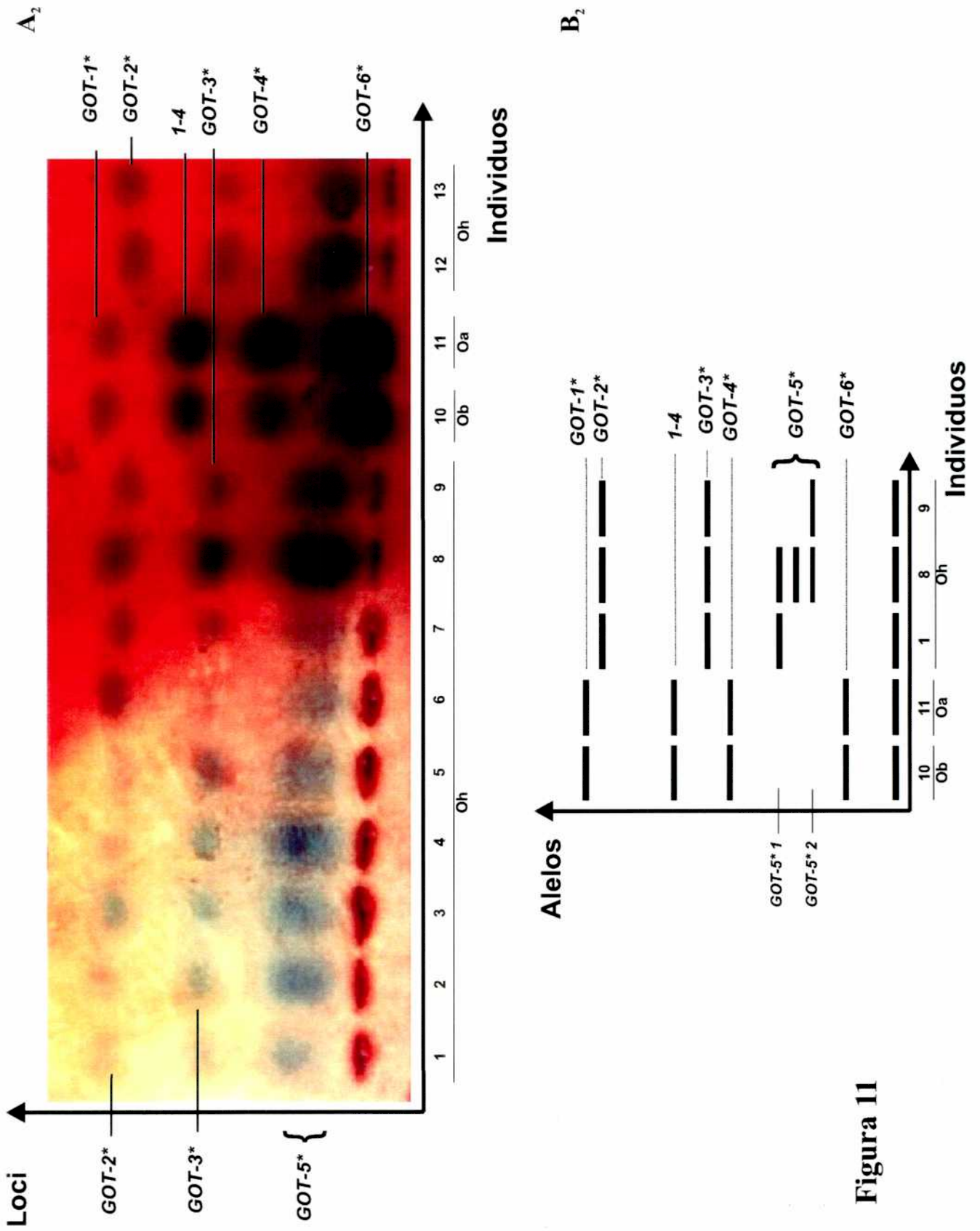


Figura 11

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) EC: 1.1.1.27

En estudios previos en peces se postuló que esta enzima es tetramérica (Shaklee y col., 1990).

En todas las poblaciones estudiadas, el análisis de este sistema permitió detectar 2 zonas de actividad, correspondientes a los loci *LDH-1** y *LDH-2**.

El locus *LDH-1** es polimórfico registrando un total de 3 alelos. En la Tabla 5 se muestran las frecuencias alélicas en el locus *LDH-1*1*. Las diferentes poblaciones presentaron fijado uno de estos tres alelos, salvo la población de MA en la cual se pudo registrar individuos heterocigotas (Fig. 12 a y b). El alelo *LDH-1*1* se encontró en muy baja frecuencia en la población de MA (*O. bonariensis*) y fijado en todas las poblaciones de *O. argentinensis* y *O. hatcheri* (Tabla 5). El alelo *LDH-1*2* esta en alta proporción en la población de MA (*O. bonariensis*) y fijado en las en las restantes poblaciones de *O. bonariensis* (Fig. 12 c), a excepción de la población RP en la cual esta ausente. El alelo *LDH-1*3* esta fijado en la población de RP (*O. bonariensis*) siendo diagnóstico de la misma (Tabla 5, Fig. 12 c).

El locus *LDH-2** es constante y monomórfico para todas las poblaciones estudiadas (Fig. 12 a, b y c).

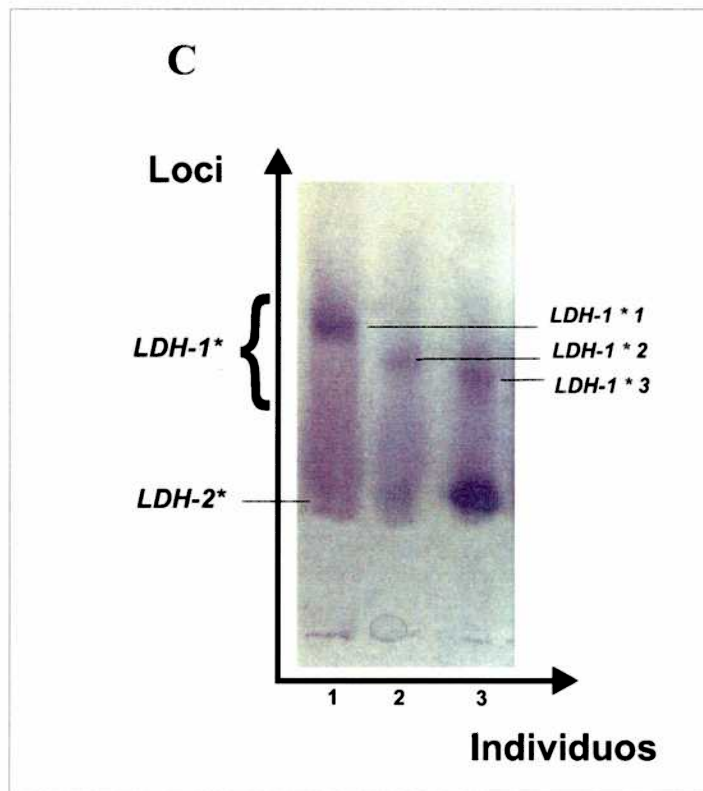
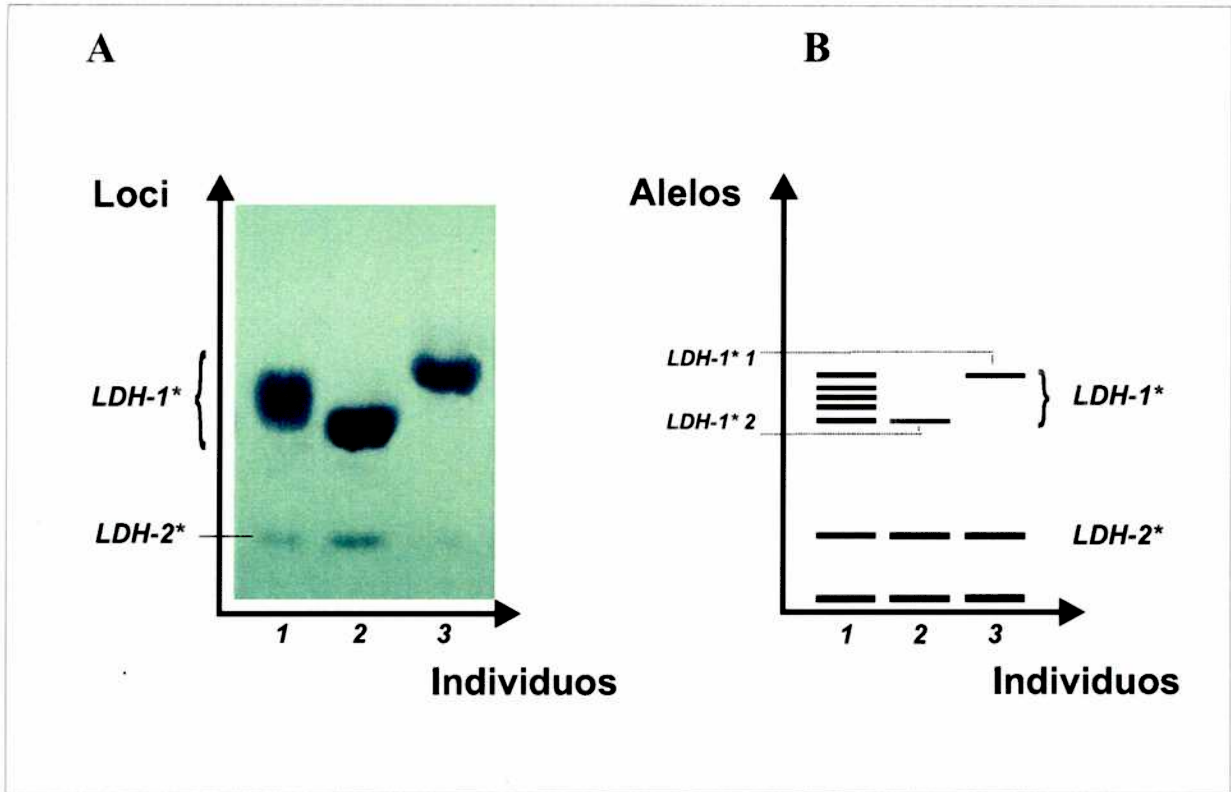
Fig.12

- a) Zimograma de 3 individuos de la población de MA (*O. bonariensis*) correspondiente al sistema LDH en músculo esquelético.

- b) Esquema representativo de los fenotipos observados en “a.”

- c) Zimograma correspondiente al sistema LDH en músculo esquelético. Individuos 1, 2 y 3 corresponden a fenotipos de las poblaciones de MA, CP y RP respectivamente.

Figura 12



MALATO DESHIDROGENASA (MDH) EC:1.1.1.37

En estudios previos en peces se postulo que esta enzima es dimérica (Shaklee y col., 1990).

En todas las poblaciones estudiadas, el análisis de este sistema permitió detectar 3 zonas de actividad. Las zonas I y III correspondieron respectivamente a los loci *MDH-1** y *MDH-2**, la zona II correspondió a un heteropolimero de interacción no alélica (producto de interacción entre los loci *MDH-1** y *MDH-2**) (Fig. 13). Estos 2 loci fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.

ENZYMA MALICA NADP (MEP) EC:1.1.1.40

En estudios previos en peces se postulo que esta enzima es tetramérica (Shaklee y col., 1990).

En todas las poblaciones estudiadas, el análisis de este sistema permitió detectar 4 zonas de actividad, correspondientes a los loci *MEP-1**, *MEP-2**, *MEP-3** (Fig. 14). *MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3** fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.

En *O. bonariensis*, *MEP-1** se expresa únicamente en hígado mientras que *MEP-3** solo en músculo esquelético y *MEP-2** en ambos tejidos (Tabla 4). En *O. argentinensis* los 3 loci se expresan únicamente en hígado; lo mismo sucede en el caso de *O. hatcheri* para *MEP-1**, *MEP-2**, mientras que *MEP-3** se expresa en ambos tejidos.

SUPEROXIDE DISMUTASE; SOD (EC:1.15.1.1.)

En estudios previos en peces se postulo que esta enzima es dimérica (Takata y col, 1987).

En las poblaciones estudiadas, el análisis de los zimogramas en hígado (Fig. 15) permitió la identificación de dos zonas de actividad (zona I y zona II) que corresponden a dos loci diferentes. Los 2 loci, *SOD-1** y *SOD-2**, fueron constantes y monomórficos en todas las poblaciones estudiadas.

Fig. 13 Zimograma electroforético de MDH en músculo esquelético. La zona marcada 1-2 corresponde a la banda de interacción no alélica, de movilidad intermedia entre locus *MDH-1** y locus *MDH-2**.

Fig. 14 Zimograma electroforético de MEP en músculo esquelético (M) y en hígado (H) para individuos de *O. bonariensis*.

Fig.15 Zimograma electroforético en hígado correspondiente a SOD.

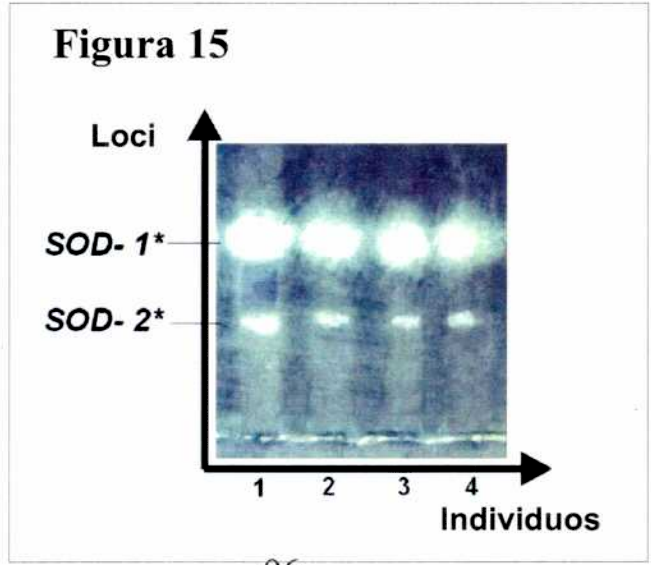
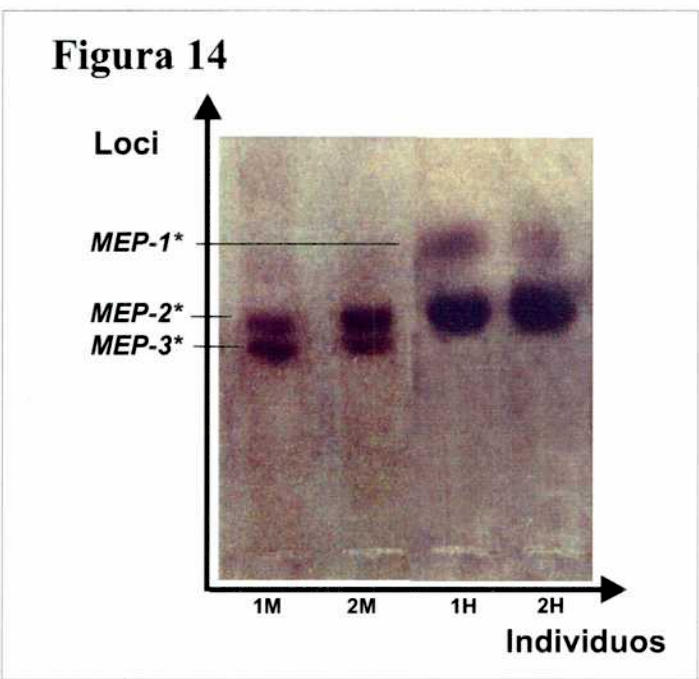
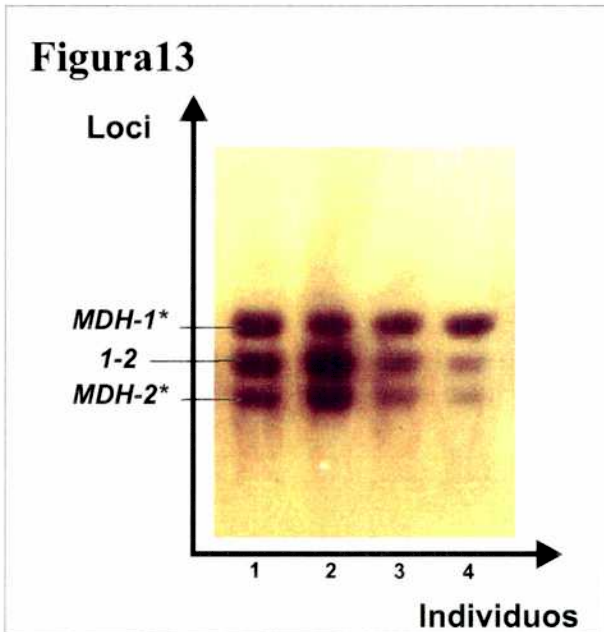


Tabla 5. Frecuencias alélicas de los loci variables en las poblaciones estudiadas, Al: alelos, p: frecuencia alélica, N: número de individuos analizados

		MA	CP	SM	CH	RP	SC	MC	BO	CC	ZY
N		40	30	20	34	30	31	30	40	10	7
Locus	Al	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
<i>LDH-1*</i>	1	0.28	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	2	0.72	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>EST*</i>	1	0.05	0	0	0	0	0.1	0.14	0	0	0
	2	0.14	0	0	0	0	0.37	0.70	0.39	0.55	0.43
	3	0.41	0.65	0.75	0.68	0.43	0.45	0.14	0.61	0.45	0.57
	4	0.11	0.08	0.07	0.06	0.22	0.08	0.02	0	0	0
	5	0.29	0.27	0.18	0.26	0.35	0	0	0	0	0
<i>GOT-1*</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>GOT-2*</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>GOT-3*</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>GOT-4*</i>	1	1	1	1	1	1	0.03	0.03	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0.84	0.85	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0.13	0.12	0	0	0
<i>GOT-5*</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0.47	0.15	0.50
	2	0	0	0	0	0	0	0	0.53	0.85	0.50
<i>GOT-6*</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

L 3 Variabilidad Genética

La variabilidad genética fue cuantificada a partir de los datos de frecuencias alélicas.

El número promedio de alelos por locus (A) varió entre 1.3 en las poblaciones de *O. bonariensis* (CP, SM, CH y RP) y *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) y 1.4 en las poblaciones de *O. bonariensis* (MA) y *O. argentinensis* (SC y MC).

La heterocigosis media (H) varió para *O. bonariensis* entre 0.02 (SM) y 0.06 (MA) con error estándar entre 0.02 y 0.04, para *O. argentinensis* entre 0.04 (MC) y 0.05 (SC) con error estándar de 0.03 y para *O. hatcheri* entre 0.04 (CC) y 0.05 (BO y ZY) con error estándar de 0.03.

Tabla 6. Variabilidad genética en 22 loci de las poblaciones. N: Número de la muestra por locus. A: Número medio de alelos por locus y su error estándar (+/-). P: Porcentaje de loci polimórficos (criterio 95%). H: Heterocigosis media esperada y su error estándar (+/-).

Población	N	A	P	H
<i>O. bonariensis</i> - MA	40	1.4 (0.2)	10.5%	0.06 (0.04)
<i>O. bonariensis</i> - CP	30	1.3 (0.1)	5.26%	0.03 (0.02)
<i>O. bonariensis</i> - SM	20	1.3 (0.1)	5.26%	0.02 (0.02)
<i>O. bonariensis</i> - CH	34	1.3 (0.1)	5.26%	0.03 (0.02)
<i>O. bonariensis</i> - RP	30	1.3 (0.1)	5.26%	0.03 (0.03)
<i>O. argentinensis</i> - SC	31	1.4 (0.2)	10.5%	0.05 (0.03)
<i>O. argentinensis</i> - MC	30	1.4 (0.2)	10.5%	0.04 (0.03)
<i>O. hatcheri</i> - BO	40	1.3 (0.1)	10.5%	0.05 (0.03)
<i>O. hatcheri</i> - ZY	7	1.3 (0.1)	10.5%	0.05 (0.03)
<i>O. hatcheri</i> - CC	10	1.3 (0.1)	10.5%	0.04 (0.03)

L4 Estructura genética intrapoblacional

Se analizó la estructura intrapoblacional por medio del estadístico F_{IS} de Wright (1951) que mide la endogamia dentro de cada población. El F_{IS} esperado debería ser cero para poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg y la probabilidad de valores positivos y negativos debido a errores de muestreo deberían ser las mismas.

La tabla 7 muestra los valores de F_{IS} totales para cada locus y la significación de los desvíos. *EST** y *LDH-1** ajustan al equilibrio de Hardy-Weinberg, en cambio las estimaciones de F_{IS} para *GOT-4** y *GOT-5** fueron positivas.

Para cada población, los valores de F_{IS} promedio ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción de 3 poblaciones. CP y CH dieron valores negativos lo cual indica una tendencia al exceso de heterocigotas dentro de las poblaciones, en cambio MC dio valor positivo marcando una tendencia al exceso de homocigotas dentro de dicha población (Tabla 7, última fila). Siendo la tendencia general no significativa.

Al promediarse las diferencias para todas las poblaciones, el F_{IS} promedio da que todas ellas ajustan a Hardy-Weinberg.

Tabla 7 Índices de Fijación (F_{IS}) estimado para los loci variables para todas las poblaciones estudiadas de *Odontesthes* empleando el programa Genepop. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

LOCUS	MA	CP	SM	CH	RP	SC	MC	BO	CC	ZY	TOTAL
<i>EST</i> *	+0.07 NS	-0.39 **	-0.1 NS	-0.37 **	-0.23 NS	-0.02 NS	+0.11 NS	-0.09 NS	+0.04 NS	-0.09 NS	-0.11 NS
<i>LDH-1</i> *	+0.14 NS	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.14 NS
<i>GOT-1</i> *	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>GOT-2</i> *	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>GOT-3</i> *	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>GOT-4</i> *	--	--	--	--	--	+0.32 NS	+0.38 *	--	--	--	0.351 *
<i>GOT-5</i> *	--	--	--	--	--	--	--	+0.31 *	+0.64 NS	-0.36 NS	0.248 *
<i>GOT-6</i> *	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	+0.10 NS	-0.39 **	-0.1 NS	-0.37 **	-0.23 NS	+0.15 NS	0.25 *	+0.11 NS	+0.34 NS	-0.22 NS	0.004 NS

I.5 Diferenciación genética entre poblaciones

I.5.1 Índices de fijación de Wright y flujo génico

El grado de diferenciación entre cada par de población (Tabla 8) y entre todas las poblaciones fue analizado a través del índice de fijación F_{ST} para todos los loci variables en las poblaciones consideradas en estudio. Además, a partir de estos valores se estimó en forma indirecta los niveles de flujo génico (Nm) promedio entre todas las poblaciones.

En la Tabla 9 se observan los valores de diferenciación genética F_{ST} para cada locus de todas las poblaciones analizadas los cuales fueron altamente significativos.

El F_{ST} promedio para todas las poblaciones fue 0.343 altamente significativo, indicando que existe diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. A partir de los datos del F_{ST} , se estimó en forma indirecta el flujo génico (Nm) el cual fue menor que 1 (0.48) lo que indica menos de un migrante por generación entre poblaciones.

Además se calculó el F_{ST} entre poblaciones de igual especie los cuales fueron significativos, y a partir de ellos los correspondientes flujos génicos (Nm) (Tabla 10). En todos los casos los resultados muestran un $Nm > 1$ lo que indica más de un migrante por generación de acuerdo a lo esperado para poblaciones coespecíficas.

Tabla 8. Matriz de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951) entre las poblaciones estudiadas empleando el programa Genepop.

Población	MA	CP	SM	CH	RP	SC	MC	BO	ZY	CC
MA	***									
CP	0.072	***								
SM	0.056	0.056	***							
CH	0.070	0.036	0.050	***						
RP	0.462	0.452	0.505	0.456	***					
SC	0.548	0.729	0.721	0.725	0.864	***				
MC	0.656	0.826	0.831	0.820	0.913	0.181	***			
BO	1.039	1.041	1.041	1.041	1.041	1.041	1.041	***		
ZY	1.036	1.040	1.041	1.040	1.040	1.040	1.041	0.000	***	
CC	1.037	1.041	1.041	1.040	1.041	1.040	1.041	0.138	0.127	***

Tabla 9. Coeficientes F_{ST} , empleando el programa Genepop y flujo génico (Nm) para los loci variables de todas las poblaciones estudiadas

Locus	F_{ST}	Nm
<i>EST*</i>	0.023 **	10.62
<i>LDH-1*</i>	0.527 **	0.22
<i>GOT-1*</i>	1 **	0
<i>GOT-2*</i>	1 **	0
<i>GOT-3*</i>	1 **	0
<i>GOT-4*</i>	0.516 **	0.23
<i>GOT-5*</i>	0.247 **	0.76
<i>GOT-6*</i>	1 **	0
Promedio	0.343 **	0.48

Tabla 10. Valores de diferenciación genética (F_{ST}) empleando el programa Genepop y flujo génico (Nm) considerando todas las poblaciones estudiadas de cada especie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Especie	F_{ST}	Nm
<i>O. argentinensis</i>	0.092**	2.46
<i>O. bonariensis</i>	0.130**	1.67
<i>O. hatcheri</i>	0.022*	11.11

1.5.2 Análisis jerarquizado de la distribución de la variabilidad genética

La distribución de la variabilidad genética fue analizada a partir del método de Wright (1978). La divergencia entre todas las poblaciones (F_{ST}) fue particionada en sus componentes entre especies (F_{CT}) y entre poblaciones dentro de cada especie (F_{SC}) (Tabla 11). Del total de la variación entre poblaciones (3.22) cerca del 74% (2.94) representa la variación entre especies y el 6.8% (0.27) es la diferenciación entre poblaciones de la misma especie.

Tabla 11. Análisis Jerarquizado de la distribución de la variación genética (Wright, 1978) a través de los loci , empleando el programa Biosys y calculo del porcentaje de varianza.

Nivel jerárquico	F	Varianza	% Varianza
Entre Poblaciones – Total (F _{ST})	0.807	3.22	80.7
Entre Especies – Total (F _{CT})	0.739	2.94	73.9
Entre Poblaciones – Especie (F _{SC})	0.261	0.27	6.8
Dentro Poblaciones – Total	—	0.77	19,3
Total (V entre y dentro)		3.99	100

I.5.3 Identidad y Distancias Genéticas de Nei

Los índices de identidad y distancia genética entre las 10 poblaciones estudiadas varían entre 0.667 a 1.000 y entre 0.405 a 0.000 respectivamente (Tabla 12).

Tabla. 12. Matriz de coeficientes de similitud y distancia genética entre las poblaciones estudiadas empleando el programa Biosys. Debajo de la diagonal están los valores de identidad genética no sesgados de Nei (1978) y arriba dela diagonal los valores de distancia genética no sesgados de Nei (1978).

Población	MA	CP	SM	CH	RP	SC	MC	BO	ZY	CC
MA	***	0.005	0.006	0.005	0.039	0.070	0.078	0.362	0.361	0.370
CP	0.995	***	0.000	0.000	0.049	0.096	0.111	0.389	0.389	0.401
SM	0.994	1.000	***	0.000	0.051	0.096	0.112	0.387	0.388	0.400
CH	0.995	1.000	1.000	***	0.050	0.096	0.111	0.389	0.389	0.401
RP	0.962	0.952	0.950	0.952	***	0.097	0.109	0.395	0.395	0.405
SC	0.933	0.909	0.909	0.908	0.908	***	0.004	0.311	0.309	0.316
MC	0.925	0.895	0.894	0.895	0.897	0.996	***	0.319	0.316	0.318
BO	0.696	0.678	0.679	0.678	0.674	0.733	0.727	***	0.000	0.005
ZY	0.697	0.678	0.679	0.678	0.674	0.734	0.729	1.00	***	0.004
CC	0.691	0.669	0.670	0.669	0.667	0.729	0.728	0.995	0.996	***

L5.3.1 Distancias Genéticas e Identidad Genéticas de Nei promedio entre especies

En la Tabla 13 se registran las distancias genéticas promedio entre especies.

Las mayores distancias provienen de la comparación de especies diferentes (0.388 para *O. bonariensis* con *O. hatcheri*, 0.315 para *O. argentinensis* con *O. hatcheri* y 0.098 para *O. bonariensis* y *O. argentinensis*). Las distancias genéticas de las especies comparadas entre si presentan bajos valores.

La Tabla 13 también permite observar los valores entre los cuales oscilan las distancias genéticas entre especies: las distancias genéticas provenientes de la comparación únicamente de poblaciones pertenecientes a la misma especie varían entre 0.000 a 0.051 para *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH y RP), entre 0.000 a 0.005 para *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) y siendo de 0.004 para *O. argentinensis* (SC y MC). Al compararse las distancias genéticas para poblaciones de diferentes especies se registran altos valores tanto cuando se compara poblaciones de *O. hatcheri* con *O. bonariensis* (entre 0.362 a 0.405) como cuando se comparan poblaciones de *O. hatcheri* con *O. argentinensis* (entre 0.309 a 0.318); valores menores se observan al comparar poblaciones de *O. bonariensis* con *O. argentinensis* (entre 0.070 a 0.112).

Tabla. 13. Matriz de coeficientes de distancia genética promedio no segados de Nei (1978) entre las especies estudiadas.

Especies	Número de poblaciones	<i>O. bonariensis</i>	<i>O. argentinensis</i>	<i>O. hatcheri</i>
<i>O. bonariensis</i>	5	0.020 (0.000 a 0.051)		
<i>O. argentinensis</i>	2	0.098 (0.070 a 0.112)	0.004 (0.004 a 0.004)	
<i>O. hatcheri</i>	3	0.388 (0.361 a 0.405)	0.315 (0.309 a 0.319)	0.003 (0.000 a 0.005)

A partir de la matriz de distancias genéticas promedio de Nei (Tabla 13) se puede obtener la matriz de identidad genética promedio de Nei (Tabla 14) empleando $I=e^{-D}$

Tabla. 14. Matriz de coeficientes de identidad genética promedio de Nei (1978) entre las especies estudiadas.

Especies	Número de poblaciones	<i>O. bonariensis</i>	<i>O. argentinensis</i>	<i>O. hatcheri</i>
<i>O. bonariensis</i>	5	0.98 (0.95 a 1)		
<i>O. argentinensis</i>	2	0.90 (0.894 a 0.909)	0.99 (0.99 a 0.99)	
<i>O. hatcheri</i>	3	0.68 (0.667 a 0.697)	0.73 (0.727 a 0.734)	0.97 (0.995 a 1)

I.6 Correlación entre distancia genéticas y geográficas

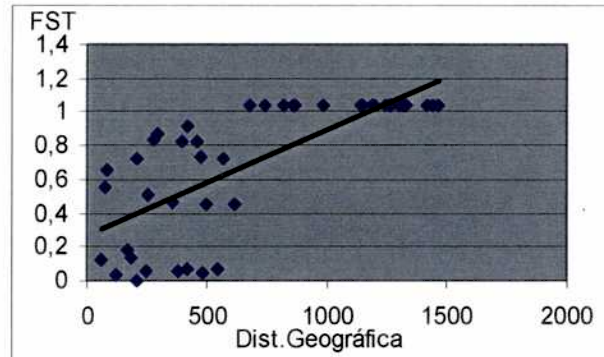
I.6.1 Para todas las poblaciones de *O. bonariensis*, *O. argentinensis* y *O. hatcheri*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951) entre todas las poblaciones estudiadas (Tabla 8) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue altamente significativa ($p=0.000$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada podría deberse al resultado de aislamiento por distancia. En la figura 16 se muestra la recta de regresión de las distancias geográficas y genéticas medidas a través del coeficiente F_{ST} .

Fig. 16. Recta de regresión de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951) sobre distancias geográficas (en Km) de muestras de *O. argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri*



I.6.2 Para todas las poblaciones de *O. bonariensis*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951) entre todas las poblaciones de *O. bonariensis* estudiadas (Tabla 8) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue no significativa ($p=0.18$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada no se debería al resultado de aislamiento por distancia.

I.6.3 Para todas las poblaciones de *O. hatcheri*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de índices de fijación F_{ST} de Wright (1951) entre todas las poblaciones de *O. hatcheri* estudiadas (Tabla 8) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue no significativa ($p=0.82$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

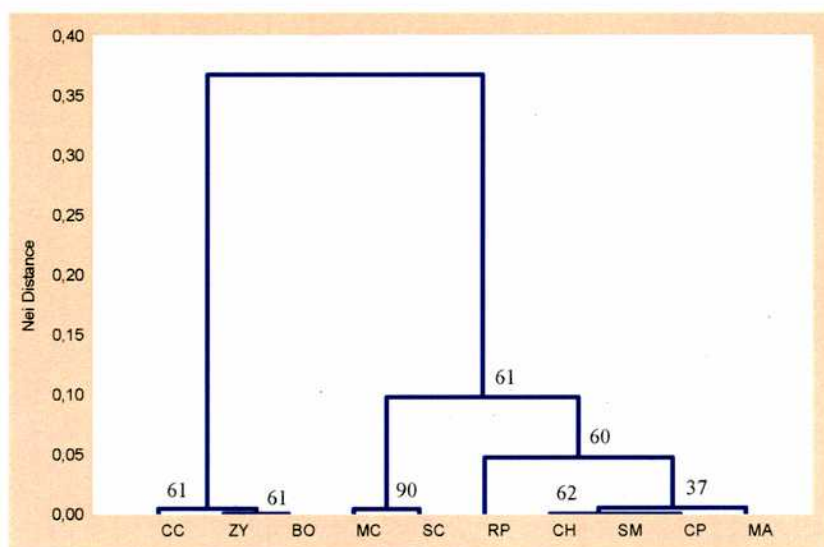
En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada no se debería al resultado de aislamiento por distancia.

I.7 Análisis fenéticos de distancias genéticas

En la Fig. 17 se representa un análisis de cluster utilizando los valores de distancias genética de Nei (1978). Dicho fenograma se construyó por el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), utilizando los 22 loci obtenidos para las 10 poblaciones. La principal dicotomía separa en un cluster las poblaciones patagónicas, especie *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) de las poblaciones pertenecientes a la Prov. de Buenos Aires (SC y MC, MA, SM, CP, CH y RP). A su vez éste último cluster muestra dicotomía separando las poblaciones de *O. argentinensis* (SC y MC) de las de *O. bonariensis* (MA, SM, CP, CH y RP).

Los números observados sobre los agrupamientos representan la confiabilidad de las ramas obtenidas por el método de remuestreo (bootstrapping) de los datos originales. Estos números indican la cantidad de veces en que las poblaciones de ese grupo están asociadas sobre un total de 100 árboles obtenidos por bootstrapping.

Fig. 17. Fenograma construido por el método UPGMA, basado en las distancias genéticas de Nei entre las poblaciones de las especies estudiadas del género *Odontesthes*.



II. RESULTADOS DE RAPD

II.1 Extracción de ADN total de *Odontesthes*

La concentración media de ADN fue de 0.424 ug/mgr de tejido

H.2 Efecto de la concentración

Para ensayar los efectos de la concentración de ADN en la reacción de amplificación, la misma se llevó a cabo en dos diluciones (1:10 y 1:100). Para la mayoría de las poblaciones se seleccionó 1:10 dado que con mayor dilución 1:100 (menor concentración) no se obtenían resultados de amplificación. La única población en la cual se obtuvieron resultados satisfactorios de amplificación con dilución 1:100 fue la de Collón Curá (CC).

II 3. Selección de primers informativos para la identificación de las especies de *Odontesthes*

Se ensayaron 7 iniciadores cebadores o "primers" de 10pb de longitud (Kit E de Operon Life Technology), de los cuales uno de ellos resultó no útil para detectar polimorfismos, seleccionándose finalmente 6 cebadores (Tabla 15). El total de bandas analizadas con estos seis "primers" fueron 220 (45 para el cebador OPE-01, 28 para OPE-02, 61 para OPE-03, 36 para OPE-04, 22 para OPE-06 y 28 para OPE-09).

En la Tabla 15 se muestran los primers ensayados y en negrita los seleccionados para este estudio.

Las bandas fueron denominadas con el código del "primer" (OPE1 al OPE4, OPE6 y OPE9) y con un número a continuación que corresponde al peso molecular de la banda que amplifica para dicho primer.

La mayoría de las bandas amplificadas por estos primers fueron compartidas por las especies y poblaciones estudiadas variando en su frecuencia fenotípica (Tabla 13R),

De las 220 bandas solo 4 resultaron monomorficas (OPE1-465, OP2-298, OP4-281, OP9-483).

Tabla 15. Primers ensayados en la búsqueda de polimorfismos en las especies de *Odontesthes*

Código del primer	Secuencia 5' a 3'
OPE1	CCCAAGGTCC
OPE2	GGTGCGGGAA
OPE3	CCAGATGCAC
OPE4	GTGACATGCC
OPE5	TCAGGGAGGT
OPE6	AAGACCCCTC
OPE9	CTTCACCCGA

Tabla 16. Frecuencias de las 220 bandas obtenidas por RAPD para las 7 poblaciones estudiadas: *O. argentinensis* (población de SC), *O. bonariensis* (poblaciones de MA, CH y RP) y *O. hatcheri* (poblaciones de BO, CC y ZY) de Argentina

	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
OPE1-154	0,5	0	0	0,6	0,4	0,83	0
OPE1-180	0,5	0	0	0,25	0	0,83	0
OPE1-220	0,16	0	0	0	0	0	0
OPE1-243	0,5	1	0,8	0,6	0	0,16	0
OPE1-244	0	0	0	0,5	0,17	0,33	0
OPE1-254	0	0	0	0	0	0	1
OPE1-259	1	1	1	0,8	0,4	1	0,83
OPE1-273	0	0	0	0,83	0	0,66	0
OPE1-278	0	0	0	0,8	0,2	0,66	0,5
OPE1-283	0,5	1	1	0	0	0	0
OPE1-288	0	0	0	0,6	0,2	0,66	0,83
OPE1-298	0	0	0	0,4	0	0,5	0
OPE1-306	0,5	1	1	0	0	0	0
OPE1-320	0,33	0,66	0	0	0	0	0
OPE1-344	0	0	0	0,8	0	0,33	0
OPE1-353	0,5	1	1	0,4	0,4	0,66	1
OPE1-368	0,5	1	1	0	0	0	0
OPE1-381	0,5	1	1	0	0	0	0
OPE1-396	1	1	1	0,6	0,4	0,83	0
OPE1-412	0	0	0	1	0,8	1	1
OPE1-424	0	0	0	1	0,6	0	0
OPE1-441	1	1	1	1	0,83	1	1
OPE1-465	1	1	1	1	1	1	1
OPE1-481	1	1	1	0,8	1	0,83	0,5
OPE1-488	0,33	0,33	0	0	0	0	0
OPE1-490	0	0	0	0,8	0,6	0,33	0,5
OPE1-492	0,33	0,5	1	0	0	0	0
OPE1-506	0	0	0	0,2	0,6	0,5	0,83
OPE1-510	0,66	0,33	0,2	0,2	0,2	0,66	0,16
OPE1-517	0	0	0	0,2	0	0,83	0,5
OPE1-555	1	1	0,8	0,4	0	0,66	0
OPE1-580	0	1	0,8	0	0	0	0
OPE1-605	1	1	0,8	0	0	0	0
OPE1-630	0,5	1	0,8	0	0,8	1	1
OPE1-680	1	1	1	0	0	0	0
OPE1-706	0	0	0	1	0,4	1	0,83
OPE1-729	0	0	0	1	0,4	1	0,83
OPE1-753	1	1	1	1	0,4	1	1
OPE1-768	1	0,83	1	0	0	0	0
OPE1-818	1	1	1	0	0	0	0

	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
OPE1-845	1	1	1	0	0,4	1	1
OPE1-868	1	0,83	0,4	0,8	0,2	0,5	0
OPE1-905	1	1	1	0,2	0,2	0,66	0,83
OPE1-955	1	1	0,4	0,8	0,4	0	1
OPE1-993	1	1	1	0,8	0,4	1	1
OPE2-175	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-184	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-192	1	0,83	1	1	1	1	1
OPE2-234	0,16	0	0	1	1	1	0
OPE2-255	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-268	0	0	0	1	0,4	0	0
OPE2-272	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-281	0	0	0	1	0	0	0
OPE2-289	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-298	1	1	1	1	1	1	1
OPE2-310	0	0	0	0,4	0,6	0	0
OPE2-316	0	0	0	0,6	1	0,83	0
OPE2-321	0	0	0	1	0,83	0	0
OPE2-330	0	0	0	0,8	1	0,83	0
OPE2-339	0	0,5	0,4	0	0	0	0
OPE2-344	1	1	1	1	0,6	0	0
OPE2-355	0	0	0	1	1	0,33	1
OPE2-368	0	0	0	0	0	0	0,83
OPE2-374	0,83	1	0,8	1	1	1	1
OPE2-396	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-405	0	0	0	0,8	0,6	0,66	0
OPE2-436	0	0	0	0,6	0,6	0,66	0
OPE2-457	0	0	0	1	1	1	0
OPE2-474	1	1	1	1	1	1	0
OPE2-498	1	1	0	0	0	0	0
OPE2-506	1	1	1	1	1	1	0
OPE2-510	0	0	0	1	1	1	1
OPE2-517	0,33	0,66	1	1	1	1	0
OPE3-143	0	0,5	0	0	0	0	0
OPE3-154	0	0,5	0	0	0	0	0
OPE3-161	0	0	0	0,8	0	0	0
OPE3-165	1	1	1	0	0	0,83	0,16
OPE3-172	0,16	1	0	0	1	0,83	0
OPE3-175	0,16	1	0	0	0	0	0,16
OPE3-181	0,5	1	0	0	0	0	0
OPE3-188	1	0,66	0	0	1	0	0
OPE3-198	0,83	0,16	0	0	1	0	0
OPE3-209	0	0	0	0,8	0	0	0
OPE3-220	0	0	0	0	1	1	0
OPE3-225	0,83	0	0	0	0	0	0

	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
OPE3-230	0	0	0	0	0	0	0,16
OPE3-254	0	0	0	0	0	0	0,16
OPE3-270	0	0	0	0,8	1	0	0
OPE3-276	0	0	0	0	0	0	0,16
OPE3-279	1	1	1	0,8	0,6	1	0
OPE3-283	0	0	0	0,2	0,4	0	0
OPE3-288	0	0	0	0	0	0	0,16
OPE3-289	1	1	1	0	1	1	0
OPE3-298	0	0	0	1	1	1	1
OPE3-303	1	1	1	0	0	1	0
OPE3-309	0,83	0	0	0	0	0	0
OPE3-316	0,16	1	0	0	0	0	0
OPE3-323	0,16	0,66	0	0	0	0	0
OPE3-335	0,16	1	1	0,6	0	0,83	0
OPE3-344	1	0,5	0,2	0	1	1	0,5
OPE3-351	0	0	0	1	0	0	0
OPE3-356	0,83	0	0	0	0	0	0
OPE3-358	0	0	0	0,6	1	0	0
OPE3-368	1	1	1	0	0,6	1	0
OPE3-376	0	0	0	0	0	0	1
OPE3-396	1	0,5	0	0	0	0	0
OPE3-404	1	0,2	0	0	0	0	0
OPE3-420	0,83	0,83	0,4	0	0	0	0
OPE3-426	0	0	0	0	0	0	0,16
OPE3-427	0,16	1	0	0	0	0	0
OPE3-428	0	0	0	0,4	0,6	0,5	0
OPE3-439	0,16	0,83	0,2	0	0	0	0
OPE3-442	0	0	0	0,4	0,6	1	0
OPE3-443	0,5	0,66	0,6	0	0	0	0
OPE3-449	0	0	0	0	0	0	1
OPE3-460	0	0	0	0	0	0	1
OPE3-492	1	0	0	0	1	1	0
OPE3-495	0	0	0	0	0	0	1
OPE3-506	0,16	1	0	0,8	1	1	0
OPE3-510	1	1	1	0,6	0,8	1	0
OPE3-513	0,16	1	0	0,6	0,8	1	0
OPE3-517	0	0,5	0	0,6	0,2	1	0
OPE3-528	0,33	0,16	0,8	0	0	0	0
OPE3-550	0,66	1	0,4	0,6	0,8	0,83	0
OPE3-560	1	0,33	0	0	0	0	0
OPE3-582	1	0,16	1	0	0	0	0
OPE3-615	0,83	0	0	1	0	0	0
OPE3-636	0,16	1	1	1	0	0,33	0
OPE3-658	0,83	0	0	0,6	1	1	0
OPE3-663	0	0	0	0	0	0	1

	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
OPE3-680	1	1	1	0,4	1	0,66	0
OPE3-735	0,16	1	0	0	0	0	0
OPE3-742	0	0	0	0	0,6	1	0
OPE3-747	1	1	1	0	0	0	1
OPE4-154	0,5	0,5	0,4	0	0	0	0
OPE4-184	0	0	0	1	0,2	0	1
OPE4-188	0,16	0	0	0	0,2	0,5	0
OPE4-192	0	0	0	1	1	1	1
OPE4-201	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-214	0	0	1	0	0	0	0
OPE4-236	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-241	1	1	0,4	0	0	1	0
OPE4-252	1	1	0	0	0	0	0
OPE4-258	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-260	0	0	0	1	1	1	1
OPE4-279	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-281	1	1	1	1	1	1	1
OPE4-298	1	1	0,8	0	0	0	0
OPE4-302	0	0	0,2	0	0	1	0,83
OPE4-305	0	0	0,2	0,8	0,8	1	1
OPE4-312	1	1	0,8	0	0	0	0
OPE4-340	1	1	0	0,2	1	1	1
OPE4-344	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-348	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-372	0	0	0	0,4	0,8	0,66	1
OPE4-388	0	0	0	0,8	1	0	1
OPE4-400	1	1	1	0	0,2	1	1
OPE4-406	0	0	0	0	0	0	1
OPE4-412	1	1	1	0	0	0	0
OPE4-424	0,16	1	1	0	0	0,16	0,66
OPE4-433	1	1	1	0	1	1	1
OPE4-440	0	0	0	0,2	0,2	0	0
OPE4-450	0	0	0	0,2	0,6	0	0
OPE4-462	0	0	0	0,8	0,6	1	1
OPE4-471	0	0	0	0	0	0	0,33
OPE4-488	0	0	0	0	1	0,66	1
OPE4-496	0	0	0	1	0	0	0
OPE4-502	0	0	0	1	0,2	0	0
OPE4-506	1	1	1	0	0,8	0,66	1
OPE4-512	0	0	0	0	0,8	0,66	0,83
OPE6-132	0	0	0	0,6	0,2	0	0
OPE6-144	0	0	0	1	0,8	0	0
OPE6-148	0	0	0	0,6	0,6	0	0
OPE6-175	0	0	0	0,2	0,2	0	0
OPE6-182	0	0	0	0,2	0	0	0

	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
OPE6-193	0	0	0	0,2	0,6	0	0
OPE6-196	0	0	0	0,2	0,6	0	0
OPE6-201	0	0	0	0,4	0,6	0	0
OPE6-230	0	0	0	0,2	0	0	0
OPE6-238	0	0	0	0,2	1	1	0
OPE6-250	0	0	0	0,8	0	0,16	0
OPE6-254	0	0	0	0,8	1	0	0
OPE6-258	0	0	0	0,2	0	1	0
OPE6-268	0	0	0	1	1	0	0
OPE6-272	1	0,5	0	0	0	0	0
OPE6-298	0	0	0	0,4	0,6	0	0
OPE6-344	0	0	0	1	0,83	1	1
OPE6-396	0	0	0	1	1	1	0,83
OPE6-478	0	0	0	1	1	1	1
OPE6-485	0	0	0	0,2	0	0	0
OPE6-498	1	1	1	0	0	0	0
OPE6-508	0	0	0	1	1	1	1
OPE9-144	0	0	0	0,8	0	0	0
OPE9-195	0	0	0	1	1	0,83	0
OPE9-198	0	0	0	0	0,6	0,8	0
OPE9-201	1	0,16	0,6	0	0,6	0	0
OPE9-220	1	1	1	0	0	0	0
OPE9-236	0	0	0	0,6	0,6	0,83	0
OPE9-253	0,83	0	1	0	0,6	0,83	0
OPE9-269	0	0	0	0,2	0,6	0,83	0
OPE9-289	0	0	0	0,2	0,6	0,16	0
OPE9-298	0	0	0	0,4	0	0	0
OPE9-313	0	0	0	1	1	0,83	0
OPE9-318	0	0	0	1	1	0,83	0
OPE9-333	0	0	0	0,2	1	0,83	0
OPE9-337	0	0	0	0,8	1	0,66	0,66
OPE9-344	0	0	0	0,2	0	0	0
OPE9-356	0	0,16	0	0,4	1	0,83	0
OPE9-364	1	1	1	0,4	1	0,66	0
OPE9-384	1	1	1	1	1	1	0
OPE9-396	0	0	0	0,6	0,6	0	0
OPE9-403	0	0	0	0,6	0,4	0,33	0
OPE9-420	0	0	0	0,6	0,4	1	0
OPE9-438	0	0	0	0,8	0,6	1	0
OPE9-453	0	0	0	0,6	1	1	0
OPE9-464	0	0	0	0,6	0,6	0	0
OPE9-483	1	1	1	1	1	1	1
OPE9-506	0	0	0	1	1	1	0
OPE9-513	1	0,16	0,8	0	0	0	0
OPE9-517	0,16	0,83	0,4	1	0,8	1	0

II 4. Caracterización de las especies de *Odontesthes*

Para caracterizar las poblaciones, clusters y/o especies estudiadas se tuvieron en cuenta aquellas bandas que se registraban en determinados grupos exclusivamente. Del análisis de las bandas se deduce que existen 2 importantes grupos: uno formado por las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, CC, ZY) (Fig. 18 a y Fig. 19 a) y el otro formado por las poblaciones de *O. argentinensis* y *O. bonariensis* (SC, MA, CH, RP) (Fig. 18 b,c y Fig. 19 b,c). Estos 2 grupos presentan bandas exclusivas registrando algunas de ellas frecuencia igual a 1, en dichos casos se podría sugerir que dichas bandas podrían ser diagnósticas (pero se debe tener en cuenta que la diversidad dentro de las poblaciones es alta, por lo tanto un número mayor de individuos analizados podría cambiarle el estatus de banda diagnóstica). El grupo compuesto por las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, CC y ZY) comparte 27 bandas de las cuales 11 serían bandas diagnósticas. El grupo compuesto por las poblaciones de *O. argentinensis* y *O. bonariensis* (SC, MA, CH, RP) comparte 19 bandas de las cuales 6 serían diagnósticas.

Aquellas bandas que están presentes en todas o en algunas de las poblaciones de estos 2 grupos representan bandas conservativas. En total se registraron 65 bandas conservativas, entre las cuales se encontraron 4 monomórficas (frecuencia igual a 1 en todas las poblaciones).

Las poblaciones de *O. hatcheri* se asociaron en 2 grupos:

- BO-CC cuyas poblaciones compartieron 13 bandas exclusivas, de las cuales 2 de ellas se hallaron en frecuencia igual 1 en las 2 poblaciones.
- CC-ZY cuyas poblaciones compartieron 2 bandas exclusivas.

La asociación RP, MA, CH correspondiente al total de poblaciones de *O. bonariensis* estudiadas por RAPD, presentó tan solo 2 bandas exclusivas. Se buscó otro tipo de asociaciones entre las poblaciones de *O. bonariensis*, encontrándose únicamente la asociación

MA-CH, representada por 3 bandas exclusivas de las cuales una de ellas poseía frecuencia igual a 1 en las 2 poblaciones.

En cambio la asociación SC-MA-CH fue fuerte, presentando 27 bandas exclusivas de las cuales 8 se hallaban en las 3 poblaciones en frecuencia igual a 1. Se buscó asociaciones de la población de *O. argentinensis* (SC) con MA o con CH, encontrándose 5 bandas exclusivas para el grupo SC-CH y 22 bandas exclusivas para el grupo SC-MA de las cuales una de ellas presentaba en las 2 poblaciones frecuencia igual a 1.

También se registraron 2 asociaciones débiles, una de ellas SC-CH-RP con 1 única banda exclusiva (OPE1-517) y la otra SC-MA-RP con 2 bandas exclusivas (OPE4-184, OPE4-388).

La mayoría de las poblaciones presentaron bandas características excepto MA y CH. En este sentido RP presentó 14 bandas exclusivas de las cuales 7 podrían considerarse diagnósticas; SC presentó 11 bandas exclusivas de las cuales 3 podrían considerarse diagnósticas; BO presentó 4 bandas exclusivas; CC presentó 2 bandas exclusivas y ZY presentó 1 banda exclusiva y diagnóstica.

A continuación se mencionan el número y el tipo de bandas que caracterizan a dichos grupos, aquellas que figuran en negrilla son las posibles bandas diagnósticas:

BO-ZY-CC(*O. hatcheri*): 27 bandas (Fig. 18 a y Fig. 19 a)

OPE1-283, OPE1-306, OPE1-368, OPE1-381, OPE1-492, OPE1-605, **OPE1-680**, OPE1-768, **OPE1-818**, OPE3-420, OPE3-439, OPE3-443, OPE3-528, OPE3-582, OPE4-154, **OPE4-201**, **OPE4-236**, **OPE4-258**, **OPE4-279**, OPE4-298, OPE4-312, **OPE4-344**, **OPE4-348**, **OPE4-412**, **OPE6-498**, **OPE9-220**, OPE9-513.

SC-MA-CH-RP (*O. argentinensis*-*O. bonariensis*): 19 Bandas (Fig. 18 b,c y Fig. 19 b,c)

OPE1-278, OPE1-288, OPE1-412, OPE1-490, OPE1-506, OPE1-706, OPE1-729, OPE2-355, **OPE2-510**, **OPE3-298**, **OPE4-192**, **OPE4-260**, OPE4-372, OPE4-462, OPE6-344, OPE6-396, **OPE6-478**, **OPE6-508**, OPE9-337.

Bandas Conservativas: 65 bandas

OPE1-154, OPE1-180, OPE1-243, OPE1-259, OPE1-353, OPE1-396, OPE1-441, **OPE1-465**, OPE1-481, OPE1-510, OPE1-555, OPE1-630, OPE1-753, OPE1-845, OPE1-868, OPE1-905, OPE1-955, OPE1-993, OPE2-192, OPE2-234, **OPE2-298**, OPE2-344, OPE2-374, OPE2-474,

OPE2-506, OPE2-517, OPE3-165, OPE3-172, OPE3-175, OPE3-188, OPE3-198, OPE3-279, OPE3-289, OPE3-303, OPE3-335, OPE3-344, OPE3-368, OPE3-492, OPE3-506, OPE3-510, OPE3-513, OPE3-517, OPE3-550, OPE3-615, OPE3-636, OPE3-658, OPE3-680, OPE3-747, OPE4-188, OPE4-241, **OPE4-281**, OPE4-302, OPE4-305, OPE4-340, OPE4-400, OPE4-424, OPE4-433, OPE4-506, OPE9-201, OPE9-253, OPE9-356, OPE9-364, OPE9-384, **OPE9-483**, OPE9-517.

BO-CC: 13 bandas

OPE1-320, OPE1-488, **OPE2-498**, OPE3-181, OPE3-316, OPE3-323, OPE3-396, OPE3-404, OPE3-427, OPE3-560, OPE3-735, **OPE4-252**, OPE6-272.

CC-ZY: 2 bandas

OPE1-580, OPE2-339.

RP-MA-CH (*O. bonariensis*): 2 bandas

OPE4-488, OPE4-512.

MA-CH: 3 bandas

OPE3-220, OPE3-742, OPE9-198.

SC-MA-CH: 27 bandas

OPE1-244, **OPE2-175**, **OPE2-184**, **OPE2-255**, **OPE2-272**, **OPE2-289**, OPE2-316, OPE2-330, **OPE2-396**, OPE2-405, OPE2-436, **OPE2-457**, OPE3-428, OPE3-442, OPE6-238, OPE9-195, OPE9-236, OPE9-269, OPE9-289, OPE9-313, OPE9-318, OPE9-333, OPE9-403, OPE9-420, OPE9-438, OPE9-453, **OPE9-506**.

SC-CH: 5 bandas

OPE1-273, OPE1-298, OPE1-344, OPE6-250, OPE6-258.

SC-MA: 22 bandas

OPE1-424, OPE2-268, OPE2-310, OPE2-321, OPE3-270, OPE3-283, OPE3-358, OPE4-440, OPE4-450, OPE4-502, OPE6-132, OPE6-144, OPE6-148, OPE6-175, OPE6-193, OPE6-196, OPE6-201, OPE6-254, **OPE6-268**, OPE6-298, OPE9-396, OPE9-464.

SC-CH-RP: 1 banda

OPE1-517

SC-MA-RP: 2 bandas

OPE4-184, OPE4-388.

RP: 14 bandas

OPE1-254, OPE2-368, OPE3-230, OPE3-254, OPE3-276, OPE3-288, OPE3-376, OPE3-426, OPE3-449, OPE3-460, OPE3-495, OPE3-663, OPE4-406, OPE4-471.

SC: 11 bandas

OPE2-281, OPE3-161, OPE3-209, OPE3-351, OPE4-496, OPE6-182, OPE6-230, OPE6-485, OPE9-144, OPE9-298, OPE9-344.

BO: 4 bandas

OPE1-220, OPE3-225, OPE3-309, OPE3-356.

CC: 2 bandas

OPE3-143, OPE3-154.

ZY: 1 banda

OPE4-214.

En síntesis las especies *O. argentinensis* y *O. hatcheri* se reconocieron por presencia de bandas exclusivas obtenidas con diferentes "primers".

Las bandas diagnósticas presentadas por *O. argentinensis* fueron OP2-281, OP3-351 y OP4-496 (Tabla 16). En el caso de *O. hatcheri* las bandas diagnósticas fueron OP1-680, OP1-818, OP4-201, OP4-236, OP4-258, OP4-279, OP4-344, OP4-348, OP4-412, OP6-498, OP9-220 (Tabla 16, Fig. 18 a).

Si bien *O. bonariensis* se distingue de *O. hatcheri*, no puede ser diferenciada inequívocamente de *O. argentinensis*, dado que comparte con esta especie numerosas bandas (Tabla 16).

Fig. 18: Productos de amplificación por RAPD usando "primer" OPE-01

a) correspondiente a 3 poblaciones de *O. hatcheri*

b) correspondiente a la población de Río de la Plata (*O. bonariensis*)

c) correspondiente a una población de *O. argentinensis* (SC) y a dos poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CH)

Fig. 19: Productos de amplificación por RAPD usando "primer" OPE-03

a) correspondiente a 3 poblaciones de *O. hatcheri*

b) correspondiente a la población de Río de la Plata (*O. bonariensis*)

c) correspondiente a una población de *O. argentinensis* (SC) y a dos poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CH)

FIGURA 18a

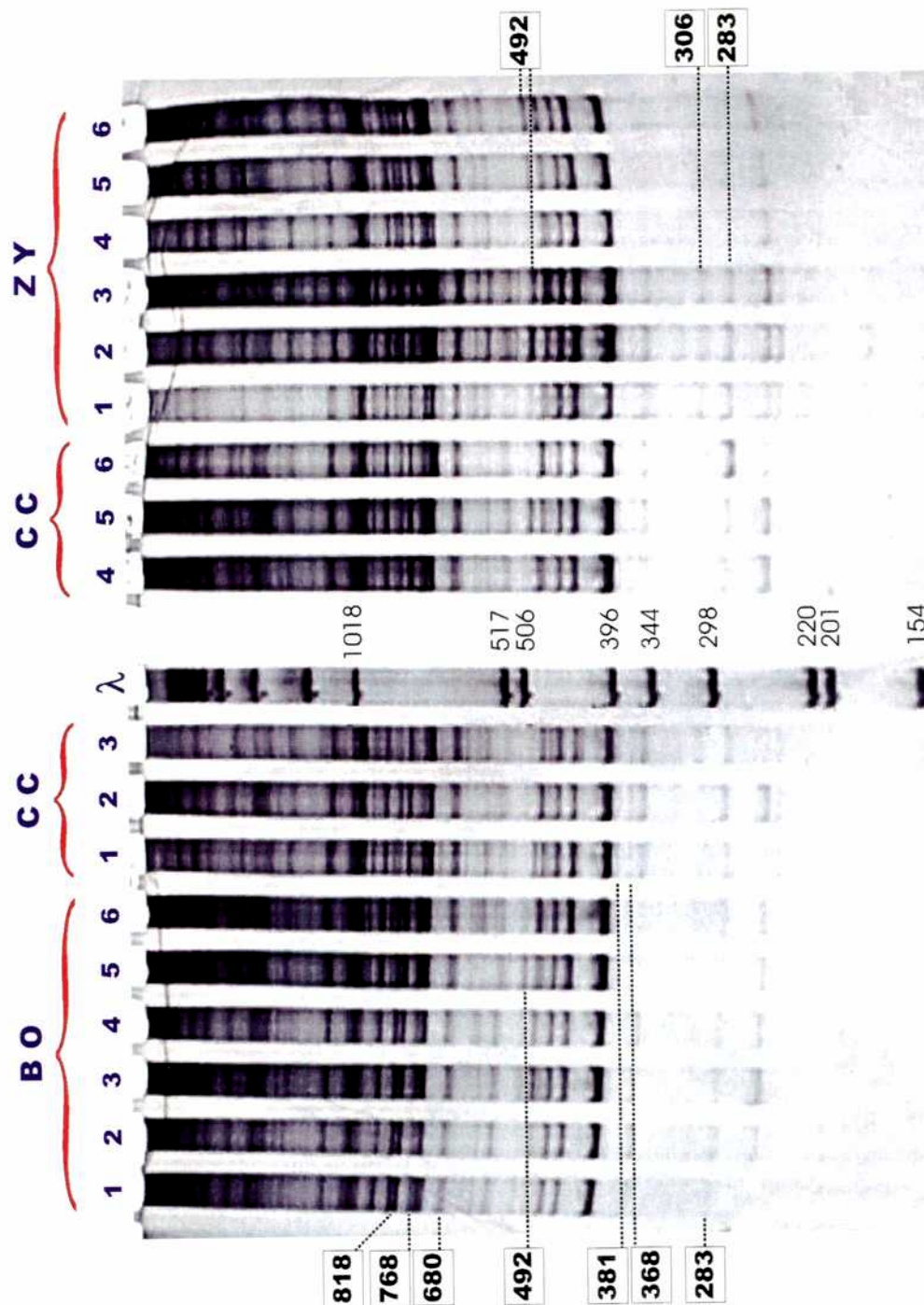


FIGURA 18c

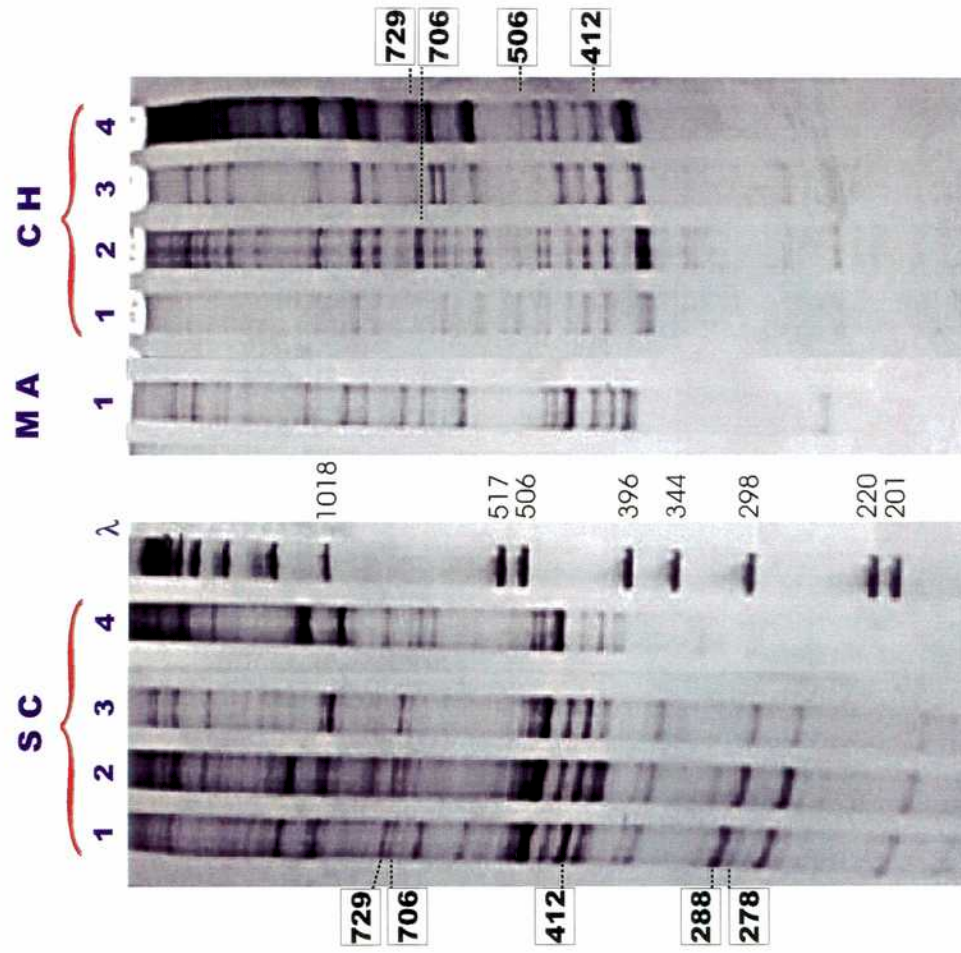


FIGURA 18b

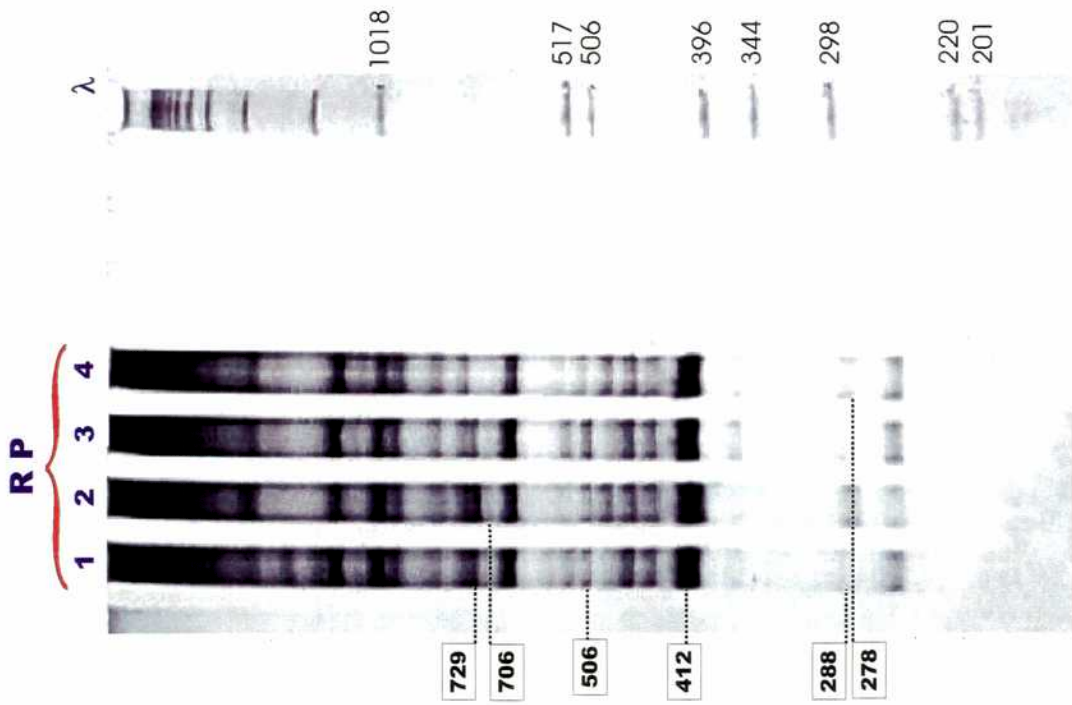


FIGURA 19a

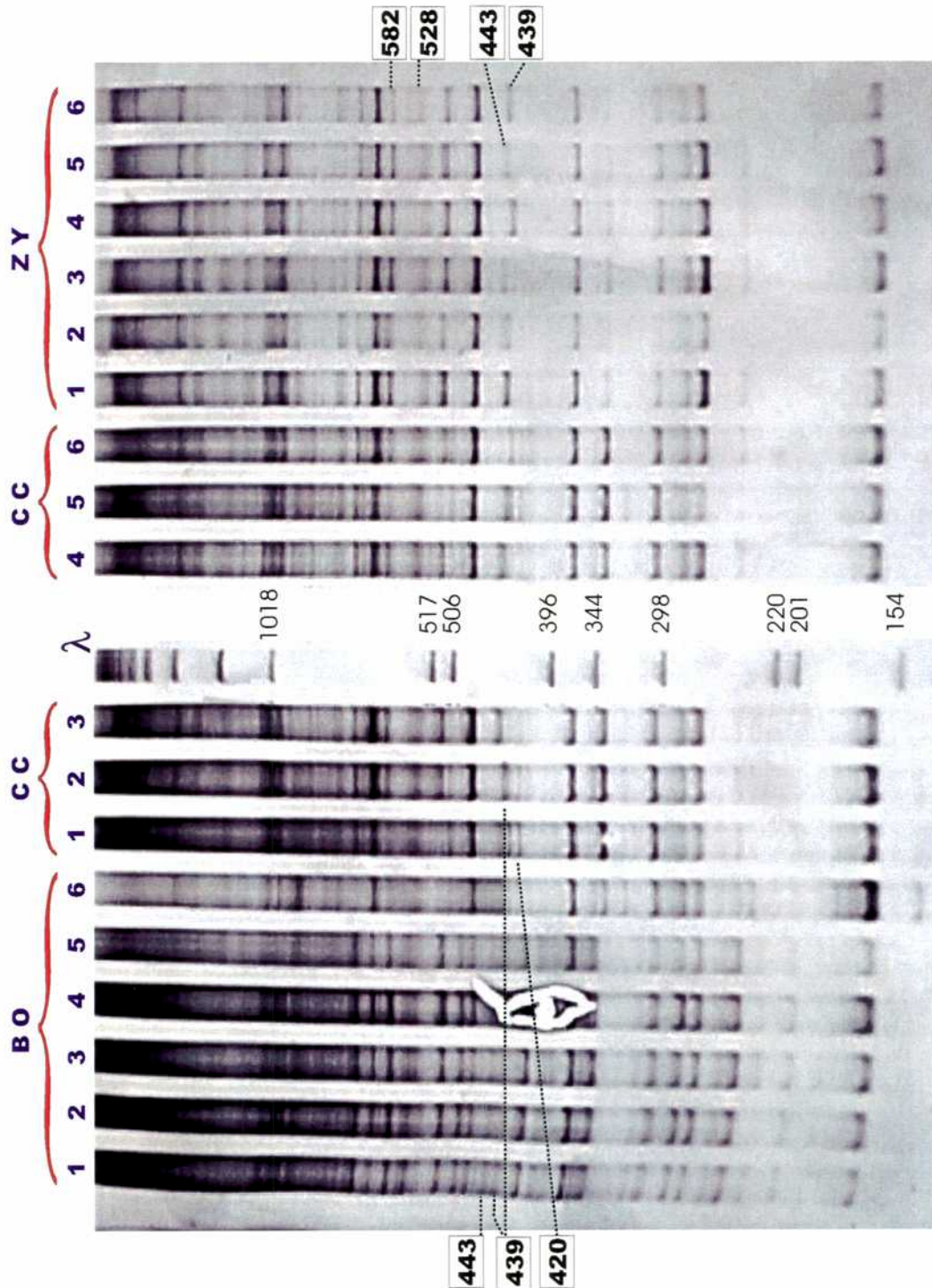


FIGURA 19c

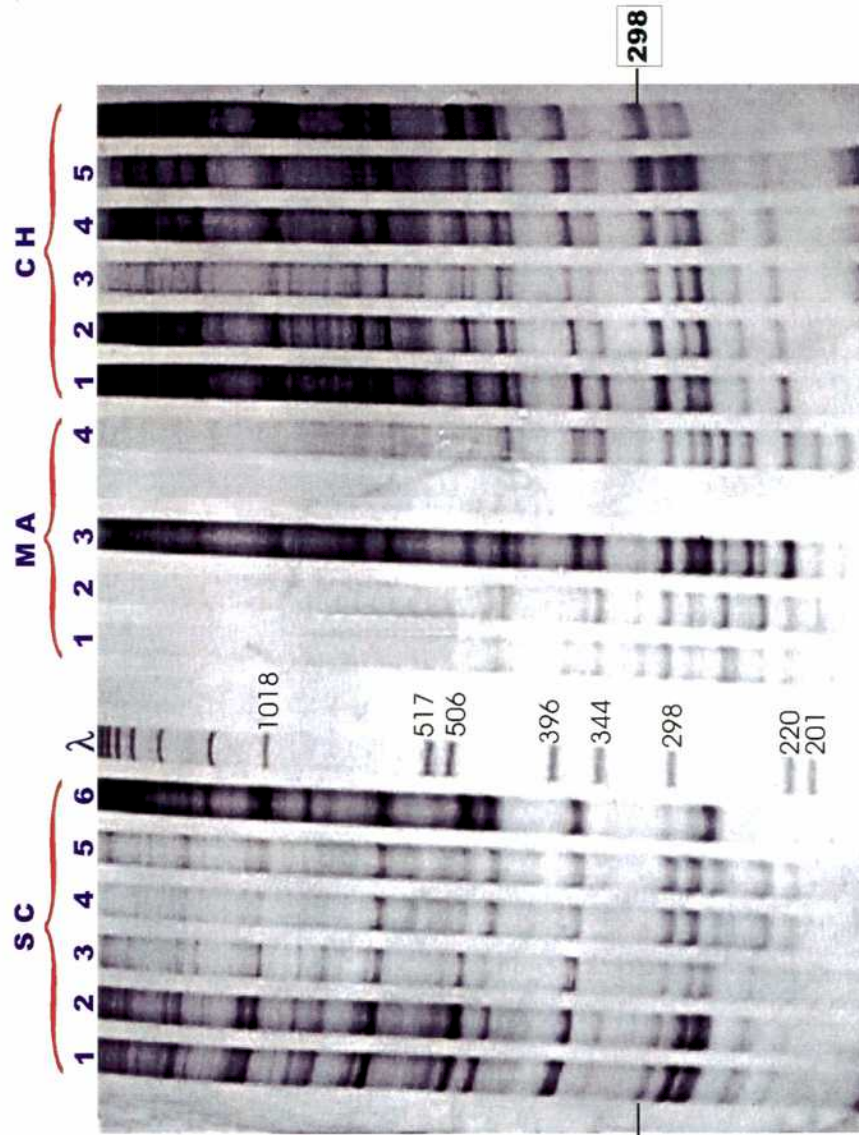
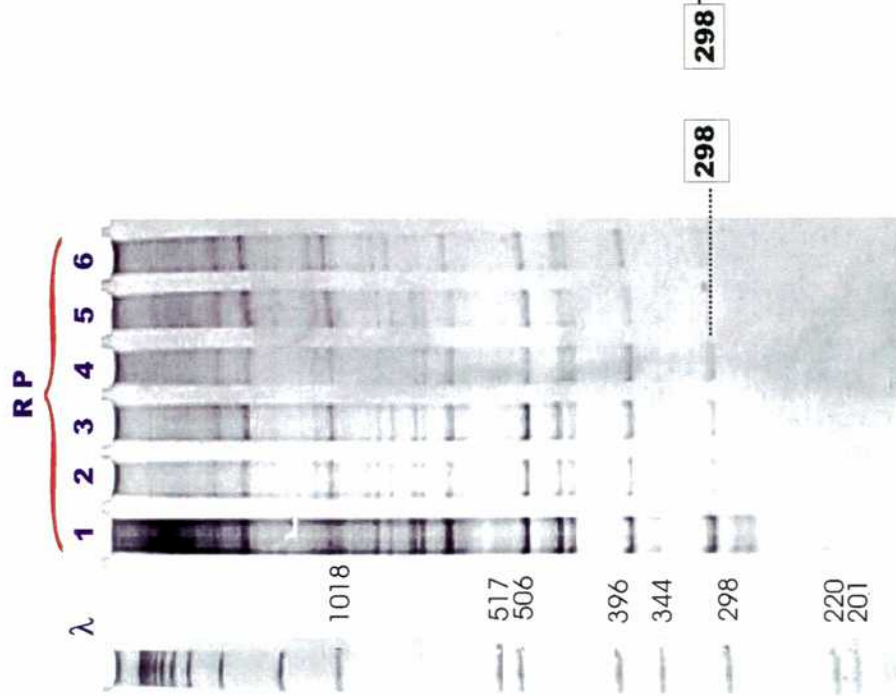


FIGURA 19b



II 5. Diferenciación genética entre poblaciones y especies

II.5.1 Divergencia genética

Para evaluar la diferenciación genética entre todas las poblaciones y entre poblaciones de la misma especie se utilizaron dos métodos. El primero estuvo basado en obtención de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978), el segundo se realizó a través de los índices F_{ST} obtenidos al aplicar el análisis de la varianza molecular AMOVA (Excoffier y col. 1992).

II 5.1.1 Distancias Manhattan obtenidas entre poblaciones

Se aplicó el programa fortran RAPDDIST (Black, 1997) el cual permite, entre otras opciones, considerar a las bandas obtenidas por RAPD como datos fenotípicos, la distancia elegida de Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978) no realiza ninguna suposición genética. La matriz de distancias Manhattan obtenidas por RAPDDIST se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Matriz de distancias Manhattan entre las poblaciones estudiadas para RAPD empleando el programa RAPDDIST.

Poblaciones	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
BO	0						
CC	0,1218	0					
ZY	0,1157	0,0998	0				
SC	0,5857	0,6032	0,4996	0			
MA	0,5084	0,5696	0,5112	0,1779	0		
CH	0,4596	0,4738	0,4344	0,2171	0,1531	0	
RP	0,4289	0,452	0,3747	0,3119	0,3333	0,3078	0

II.5.1.2 Divergencia genética por índices F_{ST} y flujo génico

II.5.1.2.1 F_{ST} para cada par de poblaciones totales estudiadas

Los valores de diferenciación genética (F_{ST}) para cada par de población estudiada, fueron obtenidos a partir del programa AMOVA (Tabla 18). A partir de estos valores se estimaron en forma indirecta los niveles de flujo génico (Nm) (Tabla 19)

Tabla 18. Valores de diferenciación genética (F_{ST}) para cada par de poblaciones estudiadas, empleando AMOVA

Poblaciones	BO	CC	ZY	SC	MA	CH	RP
BO	0						
CC	0,5419	0					
ZY	0,5507	0,5754	0				
SC	0,771	0,795	0,7733	0			
MA	0,7545	0,7919	0,7782	0,4167	0		
CH	0,7893	0,8172	0,8095	0,5578	0,4465	0	
RP	0,839	0,8711	0,8616	0,7311	0,7345	0,7818	0

Tabla 19. Valores de Flujo Génico a partir de los marcadores RAPD

Poblaciones	BO	CC	ZY	SC	MA	CH
CC	0,2					
ZY	0,2	0,18				
SC	0,07	0,06	0,07			
MA	0,08	0,06	0,07	0,35		
CH	0,06	0,05	0,06	0,2	0,31	
RP	0,05	0,04	0,04	0,09	0,09	0,07

II.5.1.2.2 F_{ST} promedio para poblaciones de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*

La diferenciación genética (F_{ST}) promedio para las 3 poblaciones de *O. bonariensis* estudiadas (MA, CH, RP) obtenida a partir del programa AMOVA tuvo el valor de 0.687 y fue altamente significativa, correspondiéndole el 68.71% de varianza entre las poblaciones. A partir de este F_{ST} se estimó en forma indirecta el nivel de flujo génico (Nm), obteniéndose $Nm = 0.114$.

La diferenciación genética (F_{ST}) promedio para las 3 poblaciones de *O. hatcheri* estudiadas (BO, CC y ZY) obtenida a partir del programa AMOVA tuvo el valor de 0.553 y fue altamente significativa, correspondiéndole el 55.26% de varianza entre las poblaciones. A partir de este F_{ST} se estimó en forma indirecta el nivel de flujo génico (Nm), obteniéndose $Nm = 0.202$.

II 5.2 Distribución jerárquica de la variabilidad y Flujo Génico de poblaciones

Totales

Para evaluar la cantidad de variación genética representada entre especies, entre poblaciones de cada especie y dentro de poblaciones totales se utilizó el análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier y col. 1992).

La diferenciación total entre poblaciones (F_{ST}) fue particionada en sus componentes entre especies (F_{CT}), y entre poblaciones dentro de cada especie (F_{SC}) (Tabla 20).

Los resultados del análisis de AMOVA indican que el 22% de la diversidad total ($1 - F_{ST}$) ocurre dentro de las poblaciones, el 34% está representado entre poblaciones dentro de cada especie y el 44% se observa entre especies (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis Jerarquizado de la distribución de la variación genética estimada por Win-Amova.

Nivel jerárquico	F	Varianza	% Varianza
Entre Poblaciones – Total (F_{ST})	0.78	38.74	78
Entre Especies – Total (F_{CT})	0.44	21.72**	44
Entre Poblaciones – Especie (F_{SC})	0.61	17.02**	34
Dentro Poblaciones – Total	—	10.84**	22
Total		49.58	100

A partir del valor obtenido promedio de F_{ST} se estimó en forma indirecta el nivel de flujo génico promedio, siendo $Nm=0.07$

II 6. Correlación entre distancias Manhattan y distancias geográficas

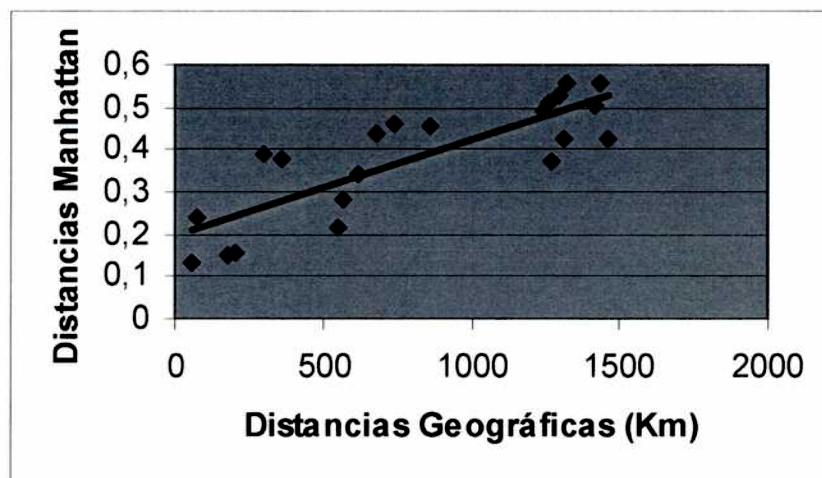
II 6.1 Para las poblaciones de *O. bonariensis*, *O. argentinensis* y *O. hatcheri*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978) entre todas las poblaciones estudiadas (Tabla 17) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue significativa ($p=0.01$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada podría deberse al resultado de aislamiento por distancia. En la figura 20 se muestra la recta de regresión de las distancias geográficas y genéticas medidas a través de las distancias Manhattan.

Fig.20. Recta de regresión de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978) sobre distancias geográficas (en Km.) de muestras de *O. argentinensis*, *O. bonariensis* y *O. hatcheri*



II 6.2 Para las poblaciones de *O. bonariensis*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en

Wright, 1978) entre todas las poblaciones estudiadas de *O. bonariensis* (Tabla 17) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue no significativa ($p=0.81$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada no se debería al resultado de aislamiento por distancia

II 6.3 Para las poblaciones de *O. hatcheri*

Para comprobar si la diferenciación genética entre poblaciones es el resultado de aislamiento por distancia, se compararon las matrices de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978) entre todas las poblaciones estudiadas de *O. hatcheri* (Tabla 17) y la de distancias geográficas entre los sitios de muestreo evaluando la correlación entre las mismas a través del Test de Mantel.

La significación de la correlación entre las matrices fue no significativa ($p=0.18$) de acuerdo con la prueba de Mantel basada en 500 permutaciones.

En base a estos resultados la diferenciación genética encontrada no se debería al resultado de aislamiento por distancia

II. 7 Análisis fenéticos

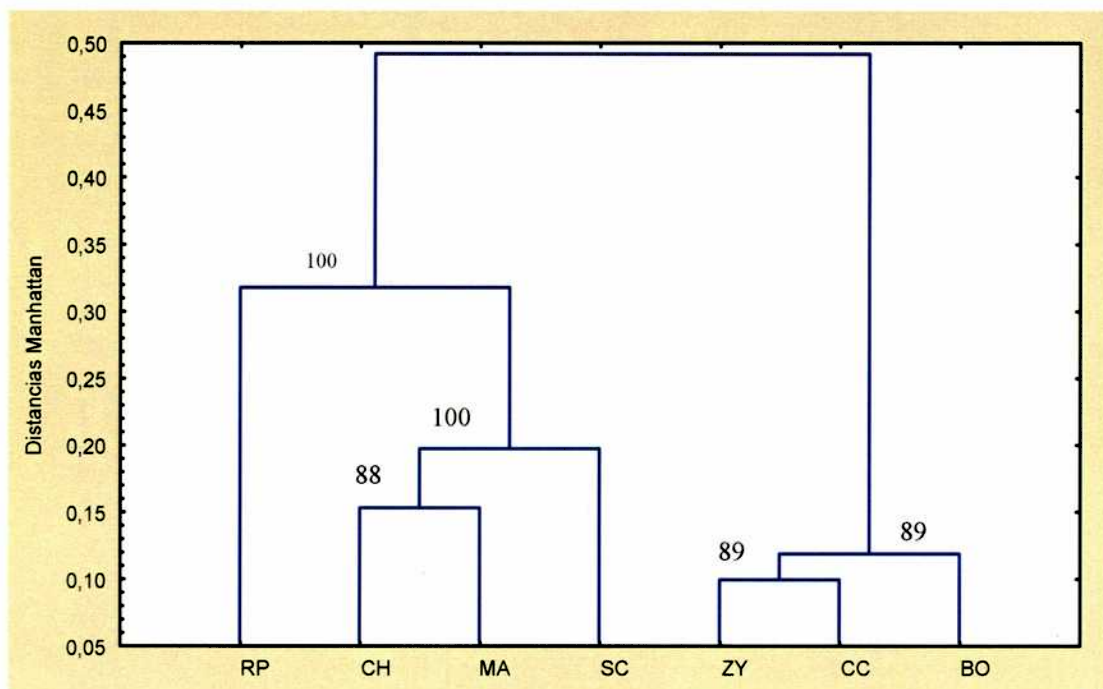
II.7.1 A partir de distancias Manhattan

En la Fig.21 se representa un análisis de cluster utilizando los valores de distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978). Dicho fenograma se construyó por el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), utilizando las 220 bandas obtenidos para las 7 poblaciones estudiadas. La principal dicotomía separa en un cluster las poblaciones patagónicas, especie *O.hatcheri*

(BO, ZY y CC) de las poblaciones pertenecientes a la Prov. de Buenos Aires (SC, MA, CH y RP). A su vez éste último cluster muestra dicotomía separando una de las poblaciones (RP), determinada sistemáticamente como *O. bonariensis*, de las restantes poblaciones (CH y MA) de esta misma especie conjuntamente con la población de *O. argentinensis* (SC). Finalmente se observa un pequeño cluster que separa las poblaciones de CH y MA pertenecientes a *O. bonariensis* de la población de SC, *O. argentinensis*.

Los números observados sobre los agrupamientos representan la confiabilidad de las ramas obtenidas por el método de remuestreo (bootstrapping) de los datos originales. Estos números indican la cantidad de veces en que las poblaciones de ese grupo están asociadas sobre un total de 100 árboles obtenidos por bootstrapping. El programa empleado fue RAPDDIST el cual remuestra al azar los datos obtenidos por RAPD generando muchas pseudo replicas, proceso conocido como "bootstrapping". Este set de matrices obtenidas fue leído empleando el programa PHYLIP3.5C. el cual generó un árbol consenso.

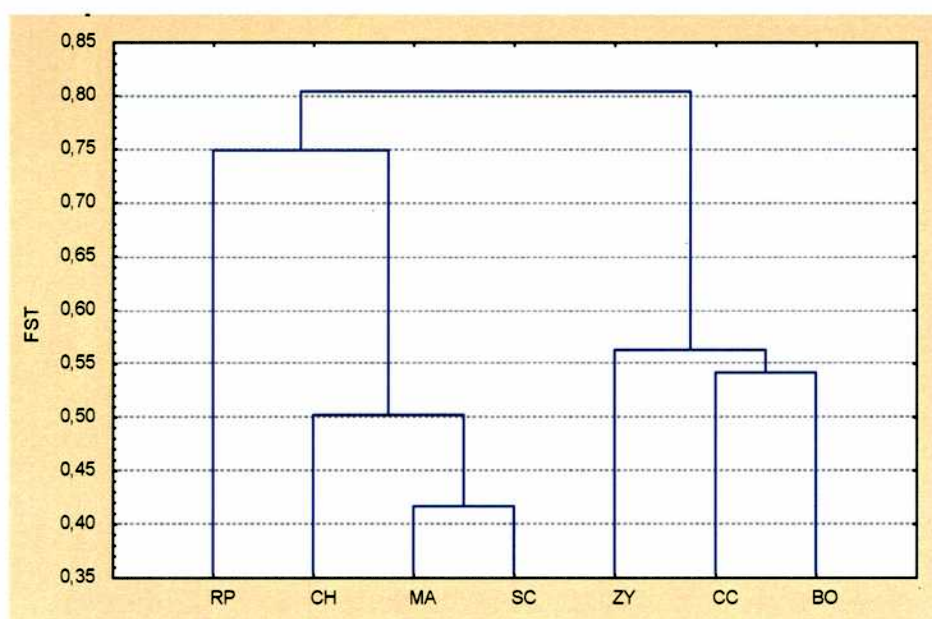
Fig. 21. Fenograma construido por el método UPGMA, basado en las distancias Manhattan (Distancias Prevosti en Wright, 1978) entre 7 poblaciones de las especies estudiadas del género *Odontesthes*.



II.7.2 A partir de índices F_{ST} obtenidos por AMOVA

En la Fig.22 se representa un análisis de cluster utilizando los índices F_{ST} obtenidos por AMOVA. Dicho fenograma se construyó por el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), utilizando las 220 bandas obtenidos para las 7 poblaciones estudiadas. La principal dicotomía separa en un cluster las poblaciones patagónicas, especie *O.hatcheri* (BO, ZY y CC) de las poblaciones pertenecientes a la Prov. de Buenos Aires (SC, MA, CH y RP). A su vez éste último cluster muestra dicotomía separando una de las poblaciones (RP), determinada sistemáticamente como *O.bonariensis*, de las restantes poblaciones(CH y MA)de esta misma especie conjuntamente con la población de *O. argentinensis* (SC). Finalmente se observa un pequeño cluster que separa las poblaciones de SC y MA pertenecientes a *O. argentinensis* y *bonariensis* respectivamente de la población de CH, *O. bonariensis*.

Fig. 22. Fenograma construido por el método UPGMA, basado en índices F_{ST} obtenidos por AMOVA para cada par de poblaciones estudiadas del género *Odontesthes*.

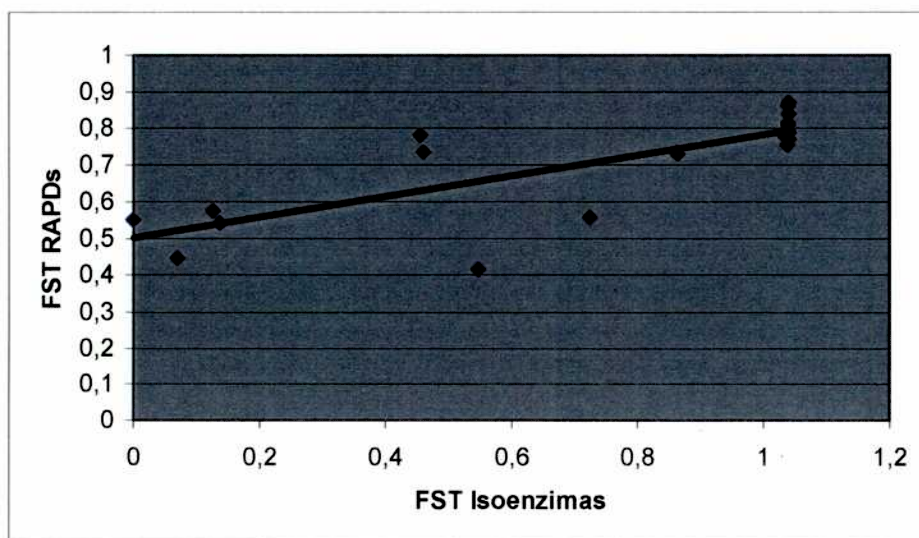


II 8. Correlación entre diferenciación genética obtenidas por RAPD y por Isozimas

Para comprobar si los resultados obtenidos por RAPD e Isozimas son consistentes, se correlacionaron las matrices de diferenciación genética (F_{ST}) para cada par de población estudiada por el método de RAPD (Tabla 18) y por el de Isozimas (Tabla 8). La significación de la correlación entre matrices obtenida, mediante el test de Mantel, fue altamente significativa ($p=0.008$).

En la figura 23 se muestra la recta de regresión de los índices de diferenciación genética (F_{ST}) para RAPD e Isozimas

Fig. 23. Recta de regresión de los índices de diferenciación genética (F_{ST}) para RAPD e Isozimas



**DISCUSIÓN
Y
CONCLUSIONES**

DISCUSIÓN

En este capítulo se discutirá los resultados obtenidos mediante las técnicas de Isoenzima y Rapd. Si bien ambas metodologías permiten estudiar la variabilidad, estructura y diferenciación genética de las poblaciones, al momento de discutir los resultados es necesario tener en cuenta las limitaciones de ambas técnicas.

Una desventaja que presentan las Isoenzimas es que distintas formas moleculares pueden presentar la misma velocidad de migración, de modo que esto puede proveer una subestimación de las diferencias genéticas. A pesar de ello las Isoenzimas presentan una importante ventaja, su herencia codominante, hecho importante ya que es posible diferenciar individuos homocigotas de heterocigotas para diferentes alelos y por ende calcular frecuencias alélicas y sobre la base de estos describir la variabilidad y diferenciación genética presente en poblaciones naturales. En RAPD, una desventaja es que la homología de bandas es inferida de la comigración de bandas. Esta limitación tiene que ser tenida en cuenta cuando se analizan relaciones de especies bien diferenciadas, ya que la probabilidad de que los fragmentos del mismo tamaño provengan de distintas zonas del ADN es alta. Otra desventaja de RAPD es su herencia dominante, no pudiéndose distinguir los individuos homocigotas de los heterocigotas para un locus génico. Para subsanar esta limitación algunos autores consideran a los productos RAPD (bandas) como rasgos fenéticos, y otros emplean las transformaciones de Lynch y Milligan (1994), asumiendo equilibrio de Hardy Weinberg. En este trabajo se optó por la primer postura.

I. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS CON ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Existen numerosos antecedentes bibliográficos en genética de poblaciones, empleando la técnica de electroforesis de Isoenzimas para el Orden Atheriniformes, en cambio para RAPD no existen estudios previos para este taxón, siendo este trabajo original en la aplicación de dicha metodología para dicho grupo de peces.

De la comparación de trabajos en los cuales se realiza electroforesis de isoenzimas en gel de poliacrilamida con buffers de pH semejante a los empleados en este estudio, los resultados obtenidos para la mayor parte de los loci son similares. De este modo Prodohl y Levy (1989) obtuvieron idéntico resultado al presente trabajo para el sistema EST y MDH en lo que se refiere a número de loci para la especie *Odontesthes bonariensis*. Del mismo modo los resultados de Strüssmann y col. (1997) para los sistemas AO y LDH son coincidentes no solo en cuanto a número de loci sino también en cuanto a número de alelos y a la expresión de los mismos en las especies *O. bonariensis* y *O.hatcheri*. Strüssmann y col. 1997 detectaron para uno de los loci del sistema LDH dos alelos, uno de ellos se hallaba en bajísima frecuencia en *O. bonariensis* y el otro fijado en *O.hatcheri*, situación semejante a la encontrada en el presente estudio para *LDH-1*1* (Tabla 5). Si bien los sistemas ADH, G6PD, MEP, SOD, coincidieron en no presentar polimorfismo en el presente estudio así como en los trabajos Prodohl y Levy 1989, Strüssmann y col. 1997 y Beheregaray y Levy 2000, fue detectado un mayor número de loci para los mismos que los obtenidos por los autores mencionados anteriormente

II. CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES, GRUPOS Y ESPECIES

II.1 Isoenzimas

La aplicación de las técnicas de electroforesis de isoenzimas ha permitido en numerosos estudios la caracterización de las especies a través de la detección de loci diagnósticos. En el género *Odontesthes*, estudios isoenzimáticos previos (Prodhon y Levy, 1989; Strüssmann y col., 1997) hacen referencia a la presencia de marcadores alozímicos característicos de especie.

Prodhon y Levy (1989) analizaron 11 sistemas isoenzimáticos en 4 morfotipos de pejerreyes identificados como *O. bonariensis* (pequeño y normal), *O. humensis* y *Yaci retropinnis*, encontrando que solo 2 de los 19 loci analizados presentaban alelos diagnósticos.

Strüssmann y col., 1997 analizaron 15 sistemas isoenzimáticos en una población de *O. bonariensis* y en otra de *O. hatcheri*, encontrando que solo 2 de los 20 loci analizados presentaban alelos diagnósticos (Fosfoglucomutasa PGM, Creatinina Kinasa CK).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron similitud con Prodhon y Levy (1989), encontrándose loci diagnósticos para los mismos sistemas isoenzimáticos (Glutamato oxalacetotransferasa, GOT y Lactato deshidrogenasa, LDH).

El sistema GOT fue diagnóstico permitiéndome diferenciar *O. hatcheri* de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*. Las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) difirieron de las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) y de las de *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH, RP) en los loci presentes, siendo los loci *GOT-1**, *GOT-4** y *GOT-6** exclusivos de *O. argentinensis* y *O. bonariensis* y los loci *GOT-2**, *GOT-3** y *GOT-5** exclusivos de *O. hatcheri*.

Si bien *O. bonariensis* presenta los mismos loci que *O. argentinensis* estas especies se diferencian en las frecuencias alélicas de *GOT-4**: estando el alelo *GOT-4*1* fijado en *O. bonariensis* y en muy baja frecuencia en *O. argentinensis* (Tabla 5).

En cuanto al sistema LDH: *O. argentinensis* y *O. hatcheri* presentaron el alelo *LDH-1*1* fijado, mientras que la mayoría de las poblaciones de *O. bonariensis* (CP, SM, CH) presentaron el alelo *LDH-1*2* fijado, a excepción de la población de MA y RP. En MA se observó al igual que *O. argentinensis* y *O. hatcheri* el alelo *LDH-1*1*, pero diferenciándose de estas por estar en baja frecuencia; la población RP presentó el alelo *LDH-1*3* fijado, siendo éste diagnóstico de la misma (Tabla 5).

El locus *EST** si bien no fue diagnóstico permitió caracterizar especies y grupos, mostrando:

- un alelo común a las 3 especies (*EST*3*)
- un alelo que se comparte con el grupo conformado por todas las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) y por todas las poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH, RP) (*EST*4*).
- un alelo que se comparte con el grupo conformado por las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) y la población de MA (*O. bonariensis*) (*EST*1*)
- un alelo que se comparte con el grupo conformado por las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) y la población de MA (*O. bonariensis*) y las poblaciones de *O. hatcheri* (*EST*2*)
- un alelo exclusivo de *O. bonariensis* (*EST*5*)

Otra forma de caracterizar a las especies es mediante la expresión diferencial de sus genes en los distintos tejidos. La aplicación de estos métodos deductivos ha permitido en numerosos estudios la caracterización de especies (Ej. Arai y col. 1979; Arai 1984). De los resultados obtenidos en el ítem de afinidad tisular se concluyó:

O. argentinensis, *O. bonariensis* y *O. hatcheri* se diferencian entre ellas por la expresión de *MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3** (Tabla 4).

El sistema GOT, en cuanto afinidad tisular, no es analizado para comparar *O. hatcheri* con las restantes especies, ya que los loci encontrados son diagnósticos. Pero en el

caso de *O. bonariensis* y *O. argentinensis* que presentan iguales loci GOT, se observa expresión diferencial tanto en músculo esquelético como en hígado para el locus *GOT-1** (Tabla 4).

- La población RP (*O. bonariensis*) se diferencia no solo de las otras 2 especies sino también de las restantes poblaciones de *O. bonariensis* en la expresión relativa de *LDH-1** y *LDH-2** en músculo esquelético (Tabla 4).

II.2 RAPD

Con esta técnica se pudo distinguir, por medio de frecuencias fenotípicas, dos grandes grupos: uno formado por la especie *O. hatcheri* y el otro conformado por *O. bonariensis* y *O. argentinensis*.

En este estudio se encontraron bandas diagnósticas para 2 de las especies estudiadas: *O. hatcheri* y *O. argentinensis*, no registrándose ninguna para *O. bonariensis*. Sin embargo teniendo en cuenta que la diversidad dentro de las poblaciones por especie es alta (40%) se debe tener cuidado con el estatus de banda diagnóstica dado que un número mayor de individuos analizados podría cambiar dicha designación. Teniendo presente lo dicho se procederá al análisis de las mismas.

Se observó asociación fuerte entre SC, MA y CH (27 bandas de las cuales 8 son diagnósticas) y débil entre las 3 poblaciones de *O. bonariensis* estudiadas (MA, CH y RP) (2 bandas). La población de *O. argentinensis* (SC) está fuertemente vinculada con 2 de las poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CH). Al analizar cual asociación fue más fuerte, si la de SC/MA o la de SC/CH se observó que la primera fue más robusta dado que presentó 22 bandas (una de ellas diagnóstica), en cambio SC/CH registró 5 bandas.

La restante población de *O. bonariensis* estudiada (RP) presentó asociación inexistente entre las poblaciones de su misma especie (RP/MA, RP/CH) y entre *O. argentinensis* (SC/RP). La población de RP presentó 14 bandas que la caracterizaron de las cuales 7 fueron diagnósticas.

II.3 Isoenzimas versus RAPD

Los 2 marcadores permitieron diferenciar nítidamente 2 grandes grupos: uno conformado por las poblaciones de *O. hatcheri* y el otro por las poblaciones de *O. argentinensis* y de *O. bonariensis*.

Isozimas fue el mejor marcador que permitió apreciar diferencias entre *O. argentinensis* y *O. bonariensis* (alelo *GOT-4*1* fijado en la segunda especie, alelo *EST*5* exclusivo y expresión relativa de *GOT-1**, *MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3** diferente en músculo esquelético e hígado).

En RAPD si bien se obtuvieron 3 bandas “diagnósticas” para *O. argentinensis*, estas no fueron consideradas buenas indicadoras, dado que la diversidad dentro de las poblaciones por especie fue alta y que el número de individuos por población estudiado fue bajo.

Beheregaray (2000) obtiene alta diferenciación entre las especies de escamas grandes (LS), entre ellas: *O. argentinensis* y *O. bonariensis*, pero no encuentra ninguno alelo diagnóstico para 8 loci de microsatélite estudiados en ninguna de las 10 especies LS. La gran cantidad de alelos compartidos por las especies LS y el análisis de secuencias de 3 genes de ADNmt sugieren una radiación reciente de este grupo (Beheregaray 2000)

Para ambos marcadores la población RP fue la más diferenciada entre las poblaciones de su especie, siendo fácilmente diagnosticable (alelo diagnóstico para isoenzimas *LDH-1*3*, expresión relativa de *LDH-1** y *LDH-2** diferente en músculo esquelético y 7 bandas “diagnósticas” para RAPD).

Otra similitud entre ambos marcadores es la asociación que se observo entre la población de MA (*O. bonariensis*) con *O. argentinensis* (alelos isoenzimáticos compartidos *EST*1*, *EST*2* y *LDH-1** y 22 bandas para RAPD).

III VARIABILIDAD GENÉTICA

III.1 Polimorfismo

El valor del polimorfismo para *O. argentinensis* y *O. hatcheri* P=10.5% y el valor medio para las poblaciones de *O. bonariensis* P=6.31% pueden considerarse bajos cuando se compara con el valor existente para 51 especies de teleósteos P=15,2% (Nevo,1978). Sin embargo este rango de valores de polimorfismo se observan en diversos trabajos en especies del Orden Atheriniformes:

Prodhon y Levy (1989) encuentran en 19 loci analizados, para 2 morfotipos de *O. bonariensis*, un solo locus polimórfico, es decir un P=5.26% el cual coincide con los valores obtenidos para las poblaciones CP, SM, CH y RP.

Strüssmann y col.(1997) encuentran en 20 loci analizados, 2 loci polimórficos para *O. bonariensis* P=10% y ninguno para *O. hatcheri* P=0%. A pesar de ello encuentra que estas especies se diferencian en 3 loci, dado que tienen diferentes alelos fijados.

Gajardo (1988) para comparar 2 especies chilenas, *Basilichthys microlepidotus* y *B. australis*, analiza 37 loci de los cuales solo 5 son polimorficos con un criterio del 99% (P=13.5%) o 2 con criterio del 95%(P=5.4%).

- Crabtree (1987) compara 7 especies de América del Norte y 3 de América del Sur. Para ello analiza 17 loci y encuentra que los loci polimórficos para cada especie oscilan entre 0 y 5 (entre P=0% y P=29%).

La proporción de loci polimórficos normalmente no es considerada una buena medida de variabilidad genética dado que esta basada en una definición arbitraria de polimorfismo y puede presentar un gran margen de error cuando el número de loci analizados no es grande (Nei, 1987). Por lo tanto el análisis de diversidad genética en poblaciones naturales generalmente emplea el cálculo de la heterocigosis en lugar del polimorfismo (Chakraborty y Leimar, 1987; Nei 1987; Hartl y Clark, 1989).

III.2 Heterocigosis media

La heterocigosis H es una de las medidas más usadas para evaluar variabilidad genética en las poblaciones (Chakraborty y Leimar, 1987; Nei 1987; Hartl y Clark, 1989; Hedgecock y col., 1989).

La heterocigosis media considerando todas las poblaciones de *O. bonariensis* dio 0.034, para todas las poblaciones de *O. argentinensis* $H = 0.045$ y para todas las poblaciones de *O. hatcheri* $H = 0.047$, el error estándar fue semejante para las 3 especies (0.03). Los valores de heterocigosis encontrados para *O. argentinensis* y *O. hatcheri* se ajustan al encontrado para peces teleósteos, calculado para 51 especies $H=0.051$ (Nevo, 1978), en cambio el H medio obtenido para todas las poblaciones de *O. bonariensis* es inferior. Inclusive si se realiza el promedio de este índice sin tener en cuenta el valor de una de las poblaciones de esta especie (MA) (0.06), el H medio es aun más bajo (0.027) dado que esta población presenta un índice de variabilidad elevado ($H = 0.06$) (Tabla 6)

Valores de heterocigosis bajos están normalmente asociados con pequeños tamaños poblacionales y con bajas tasas de mutación (Kimura 1983).

No existen motivos aparentes para suponer que la tasa de mutación isoenzimática en *O. bonariensis* sea menor a la observada en organismos en general, la cual es de 10^{-7} (Kimura 1983). Por lo tanto la baja variabilidad podría deberse a una disminución del tamaño efectivo

poblacional de *O. bonariensis* generado por una fuerte presión de pesca deportiva que se ejerce sobre esta especie en las distintas lagunas pampásicas, superando las capturas la propia capacidad de consumo del producto de pesca (Ej. en la ciudad de Azul, Provincia de Buenos Aires, son capturados mediante caña 362.631 Kg/año de pejerrey, valor que supera el expendio anual de las pescaderías de la ciudad (Grosman 1995). En el caso de la población de MA el elevado valor de heterocigosis, asumiendo igual tasa de mutación para todas las poblaciones, puede deberse a un aumento del tamaño efectivo poblacional como consecuencia de que en dicha laguna el grupo de investigación del INIDEP conducido por el Dr. Spinach realiza siembras periódicas con alevinos obtenidos de inseminación artificial a partir de gametas parentales de la misma laguna, hecho que aumenta la posibilidad de supervivencia y por ende el tamaño efectivo poblacional.

Especies de agua dulce muestran más baja variabilidad de ADN nuclear que especies marinas (DeWoody y Avise 2000). Esto concuerda con una revisión en microsatélites (DeWoody y Avise 2000) y variación alozimica (Ward y col.1994) en 131 especies de peces marinos y de agua dulce. Esta diferencia en la diversidad genética esta interpretada como una consecuencia del tamaño efectivo poblacional de los peces marinos (Ward y col. 1994; DeWoody y Avise 2000). Existe amplia evidencia que la variación genética está relacionada con el tamaño poblacional y que especies con amplio rango de distribución tienen mayor variabilidad que las que se encuentran restringidas (Frankham 1996). *O. argentinensis* tiene una amplia distribución, encontrándose a lo largo de las costas desde el Sur de Brasil hasta la Provincia de Chubut, Argentina (Dyer 1993; García 1988, Bemvenutti 1987), mientras que *O. bonariensis* está confinada a la periferia de lagos o lagunas de la Provincia Paraná Platense de modo que presiones pesqueras que se ejerzan sobre dichos cuerpos de agua repercuten inmediatamente en su tamaño efectivo poblacional. *O. hatcheri* presenta una situación similar ya que también queda confinado a lagos y lagunas (en dicho caso de las provincias Patagónica

y Andino-Cuyana), pero a diferencia del pejerrey pampásico esta especie no sufre presión pesquera dado que las pesquerías del sur argentino optan por los salmónidos; por ende el tamaño efectivo poblacional no se ve afectado como en el caso de *O. bonariensis*.

IV ESTRUCTURA GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

La estructura genética de una población ha sido definida como la distribución de la variación genética resultante de una compleja interacción entre procesos microevolutivos como la mutación, migración, deriva y selección (Roderick, 1996).

En los peces, entre los factores que tienen un poderoso efecto sobre la estructura genética de una población, se encuentra la ecología reproductiva y el comportamiento de desove.

Los estadísticos F de Wright (1951) son comúnmente utilizados para analizar la estructura de las poblaciones. Entre éstos, el coeficiente F_{IS} mide la endogamia dentro de una población. Valores de F_{IS} positivo sugieren exceso de homocigotas y valores de F_{IS} negativos exceso de heterocigotas.

Los F_{IS} totales para cada locus variable (Tabla 7) mostraron valores positivos para 2 de ellos (*GOT-4** y *GOT-5**). Una explicación a esto podría ser que estos genes estarían sujetos a alguna presión selectiva. Los valores de F_{IS} promedio para cada población ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción de 3 poblaciones: CP y CH dieron valores negativos lo cual indica una tendencia al exceso de heterocigotas dentro de las poblaciones, en cambio MC dio valor positivo marcando una tendencia al exceso de homocigotas dentro de dicha población (Tabla 7, última fila). Esta falta de ajuste puede deberse a un problema de muestreo ya que al promediarse las diferencias para todas las poblaciones, el F_{IS} Total da 0.004 no significativo ($p > 0.05$) indicando una tendencia hacia el ajuste a Hardy-Weinberg, por ende habría un apareamiento al azar de individuos. Este resultado es concordante con el

de Beheregaray (1995), quien realiza un estudio poblacional por medio de isoenzimas para 5 poblaciones de *O. argentinensis*, encontrando un valor medio de $F_{IS} = 0$, concluyendo que las frecuencias alélicas están en equilibrio.

Uno de los factores que puede influir en el coeficiente de endogamia es el sistema de apareamiento y el comportamiento de desove (Yoshiyama, 1993). Machos con comportamiento territorial que peleen por sitios de desove garantizaran la transmisión de sus genes de una generación a la siguiente pudiendo generar un mayor porcentaje de individuos homocigotas. En cambio machos que migren a diferentes sitios de desove tenderán a homogeneizar diferencias poblacionales locales. Información detallada de la ecología reproductiva y del comportamiento desove en pejerreyes estuarinos y marinos de Norte América (Conover y Kynard 1984 y Middaugh y Hemmer 1987) indica que las poblaciones de estas especies son verdaderamente promiscuas (muchos machos pueden fertilizar los huevos de una única hembra). El exceso de machos capturados en zonas de desove (promedio 10:1, Conover y Kynard 1984) sugiere la presencia de individuos migrantes durante la época reproductiva. Este comportamiento promiscuo permite una fusión al azar de gametas, el cual es corroborado por el resultado obtenido en el presente estudio.

V. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

La distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones, está relacionada con capacidad de migración. La transmisión de genes en peces puede realizarse por movimiento de éstos en diferentes cuerpos de agua o por transporte de ovas por algún organismo o fenómenos naturales (Ej. siembra por el hombre o tornados).

El flujo génico restringido permite la diversificación de las poblaciones en respuesta a la selección natural local o a la deriva genética, mientras que el flujo génico sobre largas distancias promueve la homogeneidad genética (Slatkin, 1980).

En estudios de niveles de diferenciación genética los índices de fijación de Wright (1951) se emplean para grupos de organismos en los cuales se sabe que existe posibilidad de intercambio genético, es decir para poblaciones pertenecientes a una misma especie. En este trabajo se ha decidido realizar dicho análisis, a pesar de que las poblaciones muestreadas pertenezcan a diferentes especies, dado que las especies estudiadas forman híbridos naturales es decir presentan potencialidad para realizar intercambio genético (Saavedra y Piacentino 1991, Ijima 1992, Takahashi 1993, Strüssmann y col. 1997, Beheregaray 2000)

En este estudio los niveles de diferenciación genética obtenidos entre poblaciones a partir de datos de isoenzimas y RAPD (F_{ST} promedio para todas las poblaciones igual a 0.807 y 0.78, Tabla 11 y 20, por método de Wright, 1978 y AMOVA, Excoffier y col. 1992 respectivamente) fueron similares e indicaron una diferenciación altamente significativa entre poblaciones de diferentes especies. Consecuentemente en ambos casos el flujo génico estimado ($Nm=0.06$ y 0.07 para isoenzimas y RAPD respectivamente) fue menor que un migrante por generación entre poblaciones de diferentes especies. Similares resultados de diferenciación genética obtuvieron Prodhon y Levy (1989) al estudiar mediante electroforesis de isoenzimas poblaciones simpátricas de especies diferentes con capacidad de hibridar. También Beheregaray (2000), basándose en 8 loci de microsatélites y en haplotipos de ADNmt, observó diferenciación genética para 10 especies de escamas grandes, entre ellas *O. bonariensis* y *O. argentinensis*.

Cuando se analizó en el presente estudio la diferenciación entre poblaciones dentro de cada especie, los valores de F_{ST} fueron altamente significativos (*O. argentinensis* y *O. bonariensis*) o significativos (*O. hatcheri*) para isozimas (Tabla 10); para RAPD fueron altamente

significativos para *O.bonariensis* y *O.hatcheri*, no obteniéndose datos para *O.argentinensis* dado que únicamente se estudió una población. Sin embargo los F_{ST} entre poblaciones de la misma especie fueron siempre menores que el obtenido para el conjunto total de poblaciones. Esto se evidenció netamente para Isozimas siendo para RAPD la diferencia muy leve. Para Isozimas el flujo génico estimado entre poblaciones de la misma especie fue en todos los casos mayor que un migrante por generación, para RAPD sí bien fue superior al calculado para el conjunto total de poblaciones no logró superar el de un migrante por población.

En nuestro caso, mediante la técnica de Isoenzimas se confirma lo expuesto por Whitlock y McCauley (1999) en cuanto a que ellas indican que el flujo génico interespecífico ($Nm < 1$) es menor que el intraespecífico ($Nm > 1$).

En este trabajo los RAPD permitieron una mayor diferenciación entre poblaciones de la misma especie que la observada mediante las técnicas de isozimas. Esta mayor diferenciación de los RAPD (valores de F_{ST} superiores) es producto del alto polimorfismo (bandas muy variables) encontrado por esta técnica.

Las estimaciones indirectas del flujo génico representan un promedio histórico, no siendo una buena medida de las actuales tasas de migración y parten del supuesto que se haya alcanzado el equilibrio entre deriva y migración. La falta de ajuste al modelo de aislamiento por distancia para poblaciones de cada especie (discutida posteriormente) permite inferir que es posible que no se cumpla dicho supuesto, por lo tanto se debe tener cuidado con los valores de Nm obtenidos para cada especie, siendo estos poco confiables. Teniendo presente lo dicho se procederá al análisis de los mismos.

En el presente estudio, la estimación indirecta de flujo génico para *O. argentinensis* solo se realizó mediante Isoenzimas. El resultado Nm fue superior a uno (Tabla 10), al igual que el obtenido por Beheregaray (1995), quien estudio mediante electroforesis de isoenzimas 5 poblaciones de la misma especie. *O. argentinensis* presenta una amplia distribución a lo largo

de la costa sudoeste del Océano Atlántico (Dyer 1993) y una alta capacidad de migración durante el estadio adulto (Beheregaray y Levy 2000). Sin embargo tanto en este trabajo, como Beheregaray 1995 y Beheregaray 2000, se comprueba que las poblaciones presentan diferenciación genética. Palumbi (1992) atribuye la divergencia genética en animales marinos, aún en aquellos que presentan altos niveles de dispersión, al efecto de aislamiento por grandes distancias, selección, deriva génica o comportamientos territoriales relacionados con zona de desove (Sinclair y Iles 1989). En cuanto a *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, tanto por Isoenzimas como por RAPD, la especie que muestra menor diferenciación entre sus poblaciones es *O. hatcheri*. En esta especie el valor de flujo génico intraespecífico fue alto para isoenzimas ($Nm = 11.11$). Dos de las poblaciones de *O. hatcheri* (CC y ZY) se encuentran conectadas a través del río Limay a una distancia de alrededor de 62 Km. El río Collón Curá, de donde se obtuvo la muestra CC, es un afluente del río Limay. ZY representa una pequeña bahía del Embalse Piedra del Águila (embalse del río Limay). La restante población (BO) de *O. hatcheri* se encuentra confinada a un cuerpo de agua que no presenta ni afluentes ni efluentes; el origen de la población se debe a una siembra realizada a partir de una piscicultura del Río Limay, ubicándose a una distancia de alrededor de 200 Km con respecto a las anteriores poblaciones. Dada la cercanía de CC y ZY y la dirección del flujo del Río Limay (drena hacia el Océano Atlántico) es de esperar un elevado flujo génico como el obtenido. En la población BO el flujo génico ha sido mediado por el hombre. Sin embargo las poblaciones de *O. hatcheri* se encuentran diferenciadas siendo el F_{ST} altamente significativo o significativo para RAPD e isoenzimas respectivamente, hecho que indica que algunas de las fuerzas evolutivas estaría operando

Otro de los aspectos a tener en cuenta en este tipo de estudios es el análisis de la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones. En el presente estudio el análisis de la

estructura poblacional permitió estimar la variabilidad genética en diferentes niveles. Así la divergencia entre todas las poblaciones fue particionada en sus componentes entre especies (F_{CT}) y entre poblaciones de cada especie (F_{SC}). La varianza total es mayor para RAPD (49.58) que para isoenzimas (3.99) (Tabla 11 y 20), esto se debe al mayor número de bandas analizadas para RAPD (220) que para isozimas (22 loci). Del total de la variación genética, la variación entre especies (variación específica) es la proporción mayor tanto para isoenzimas como para RAPD (73.9% y 44% respectivamente). El porcentaje de variación entre poblaciones de la misma especie (variación poblacional) es mayor para RAPD (34%) que para isoenzimas (6.8%). Esto nos indica que la variación poblacional es mejor detectada por RAPD. El porcentaje de varianza dentro de las poblaciones (variación individual) es similar para ambos métodos (19.3% y 22% para isoenzimas y RAPD respectivamente) (Tabla 11 y 20).

En este estudio se ha empleado también para medir la divergencia genética: la distancia e identidad de Nei dado que éstas medidas se emplean universalmente y por lo tanto permiten comparar los datos obtenidos con los de otros autores. Los índices de identidad y distancias genéticas de Nei (1978) entre las 10 poblaciones estudiadas se presentan en la Tabla 12, las distancias genéticas de Nei promedio entre especies se presentan en la Tabla 13 y las identidades genéticas de Nei promedio entre especies se presentan en la Tabla 14. Las distancias genéticas obtenidas en éste estudio para las poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH y RP) varían entre 0.000 a 0.051, para las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) entre 0.000 a 0.005 y para *O. argentinensis* (SC y MC) D es igual 0.004 (Tabla 12). Las mayores distancias provienen de la comparación de especies diferentes (0.388 para *O. bonariensis* con *O. hatcheri*, 0.315 para *O. argentinensis* con *O. hatcheri* y 0.098 para *O. bonariensis* y *O. argentinensis*) (Tabla 13). Estos intervalos de distancias están dentro de los valores encontrados por Shaklee y col. (1982) que van de 0.002 a 0.065 para diferentes

poblaciones de peces de una misma especie y mayores a 0.065 para poblaciones de peces de distinta especie.

Se calculó la identidad promedio por especie dado que existen numerosas publicaciones que proveen información sobre frecuencias de diferentes valores de I Nei para distintos niveles de divergencia sistemática. Esta información fue compilada por Thorpe (1979) quien elaboró un gráfico de probabilidades de valores de I entre géneros de una misma familia, especies congénicas y poblaciones coespecíficas. Según este gráfico las poblaciones coespecíficas tienen una alta probabilidad de tener valores de I por encima de 0.85, estando las especies congénicas por debajo de 0.85 y las de géneros diferentes por debajo de 0.35.

Las identidades genéticas obtenidas en éste estudio para las poblaciones de *O. bonariensis* (MA, CP, SM, CH y RP) varían entre 0.95 a 1, para las poblaciones de *O. hatcheri* (BO, ZY y CC) entre 0.995 a 1 y para *O. argentinensis* (SC y MC) I es igual 0.99 (Tabla 12). Las menores identidades provienen de la comparación de especies diferentes (0.68 para *O. bonariensis* con *O. hatcheri*, 0.73 para *O. argentinensis* con *O. hatcheri* y 0.90 para *O. bonariensis* y *O. argentinensis*) (Tabla 14). Estos intervalos de identidad están dentro de los valores encontrados por Thorpe (1979), excepto el encontrado entre *O. bonariensis* y *O. argentinensis* ($I=0.9$) que correspondería al de poblaciones coespecíficas. De acuerdo al intervalo de identidad genética de Nei (I) obtenido por Thorpe (1979) para especies congénicas, tal vez sería necesario una revisión sistemática de estas poblaciones para dilucidar este problema. Sin embargo si se tiene en cuenta el intervalo de distancias genéticas de Nei (D) encontrado por Shaklee y col. (1982) para poblaciones de distinta especie, los valores de las asociaciones entre especies se ajustan con lo esperado por la taxonomía.

VI. CORRELACION ENTRE DISTANCIA GENETICA Y DISTANCIA GEOGRAFICA

Otro de los aspectos de la genética poblacional es determinar si existe correlación entre distancias genéticas y las distancias geográficas. Wright, 1943 desarrolló el modelo matemático de aislamiento por distancia en el cual mostró que la acumulación de diferencias locales en loci neutro incrementa con la distancia geográfica. Así una especie presenta dispersión geográfica restringida mostrará diferencias entre sus poblaciones si ha ocurrido el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio entre migración y deriva genética. Si el flujo génico entre poblaciones fuera constante a lo largo del tiempo y sólo dependiera de la distancia, las más cercanas geográficamente deberían estar menos diferenciadas que las más distantes.

Para determinar si la diferenciación genética observada en este estudio fue resultado de aislamiento por distancia, se analizó la correlación entre las matrices de distancia genética y geográficas a través del Test de Mantel. Si bien este tipo de análisis está diseñado para poblaciones coespecíficas, en este trabajo además de realizar el test para las poblaciones de cada especie se analizó la correlación incluyendo todas las poblaciones de las 3 especies dado que como se mencionó anteriormente éstas presentan la posibilidad de hibridarse y obtener descendientes fértiles (Saavedra y Piacentino 1991, Ijima 1992, Takahashi 1993, Strüssmann y col. 1997, Beheregaray 2000).

Al analizar únicamente poblaciones coespecíficas, *O. bonariensis* como *O. hatcheri* presentaron correlaciones no significativas al emplearse el análisis matrices de distancia basadas en datos tanto de isoenzimas como de RAPD (*O. argentinensis* no pudo ser evaluada dado el bajo número de poblaciones estudiadas). En cambio cuando se incluyeron todas las poblaciones de diferentes especies la correlación fue significativa o altamente significativa al

emplearse en el análisis matrices de distancia basadas en datos de RAPD e Isoenzimas respectivamente.

En este último caso no se rechaza la hipótesis nula, pudiendo ser la deriva, la fuerza evolutiva que esta operando en la diferenciación de las poblaciones. Otra posibilidad es que la fuerza evolutiva operante sea la selección, dado que al incluir todas las poblaciones de las diferentes especies se plantean distancias geográficas importantes que superan los 1000Km, con ambientes muy disímiles (Patagonia con lagos oligotróficos y la Prov. de Buenos Aires con lagos eutróficos). En dicho caso las presiones selectivas podrían ser muy diferentes lo cual determinaría una importante diferenciación génica que se correlacionaría con la distancia geográfica.

En el caso de poblaciones coespecíficas la falta de correlación de distancias genéticas con distancias geográficas anula la hipótesis nula, pudiendo ser la selección, la fuerza evolutiva que esta operando en la diferenciación de las poblaciones. Otra posibilidad es que la diferenciación de las poblaciones se deba a posibles eventos de fundación reciente y que aun no se halla alcanzado el equilibrio entre deriva y migración. La primera explicación concuerda con los resultados obtenidos por Beheregaray 2000, quien postula al observar diferencias ecológicas entre poblaciones estuarinas y costeras de *O. argentinensis*, la acción de una fuerte selección divergente.

La discrepancia entre los resultados del análisis de únicamente poblaciones coespecíficas y de todas las poblaciones de diferentes especies podría deberse a que en el primer caso no se analizaron suficiente número de poblaciones por especie en ambientes lo suficientemente alejados como para realizar un análisis confiable.

VII. TIEMPO DE DIVERGENCIA

Diversos autores han estimado el tiempo de divergencia entre diferentes grupos encontrando correspondencia entre esta estima y dataciones establecidas con fósiles (Sullivan, 1985).

Este tiempo de divergencia puede ser estimado a partir de distancias genéticas de Nei. Para este autor existe una relación entre divergencias taxonómicas y distancias genéticas, siendo ambas función del tiempo evolutivo, propone una relación en la cual una unidad de D Nei, correspondería a 5 millones de años. Consecuentemente la divergencia de moléculas proteicas, sería dependiente del tiempo y por lo tanto podría ser relacionada con el tiempo evolutivo. Esta relación a su vez esta basada en la Hipótesis del Reloj Molecular (Nei 1971, Ferguson 1980, Thorpe 1982)

En forma resumida esta hipótesis propone que las sustituciones de aminoácidos en moléculas proteicas consisten en un proceso regular. De este modo el número de sustituciones que ocurren entre proteínas homologas podría estar relacionado con el tiempo evolutivo.

La formula general, obtenida por Nei (1971) se expresa a través de la ecuación $D = 2 \times \alpha \times T$, donde α sería el número de sustituciones de aminoácidos electroforéticamente detectadas por año y T es el tiempo transcurrido desde el aislamiento de 2 poblaciones consideradas. Nei estimo el valor medio de α entorno a 10^{-7} , por lo tanto $T = 5 \times 10^6 \times D$.

Esta formula esta basada en que la tasa de sustitución de aminoácidos por año sea constante y que las 2 poblaciones estén en equilibrio con respecto a mutación, selección y deriva génica, de este modo las distancias genéticas entre las 2 poblaciones estarán linealmente relacionadas con el tiempo de divergencia.

Debemos considerar, que en realidad las tasas de sustitución de aminoácidos en proteínas, no son constantes, existiendo enzimas que presentan tasa de sustitución más rápida y otras más lentas (Dayhoff 1972). Este hecho puede alterar significativamente el resultado de estimas.

Varios autores sostienen que esta relación proporciona una subestima de los tiempos reales de divergencia (Yang 1974, Fitch 1976, Sarich 1977, Maxson y Maxson 1979). Igualmente la estima de Nei provee una indicación razonable y juntamente con otros datos, como por ejemplo datos geológicos, puede ser bastante útil. En el presente trabajo se estimaron los tiempos de divergencia entre las especies estudiadas a fin de compararlos con los hallados por Beheregaray (2000). En el reciente análisis molecular efectuado por dicho autor, se realizó una investigación de las relaciones filogenéticas del pejerrey, género *Odontesthes*, y se estimó el tiempo de divergencia de acuerdo a la hipótesis del reloj molecular, integrándose con la historia geológica de Sudamérica.

Como mencionamos anteriormente, de acuerdo con la teoría del reloj molecular, las diferencias genético moleculares entre dos linajes evolutivos aumentan de una forma aproximadamente lineal con relación al tiempo de divergencia entre estos linajes. Los tiempos de divergencia calculados aplicando la relación propuesta por Nei (1971), donde $1D = 5$ millones de años, reflejan que *O. hatcheri* se separó de su antecesor ancestral alrededor de 1.7×10^6 años (Plioceno tardío), y que la divergencia entre *O. argentinesis* y *O. bonariensis* es reciente, alrededor de 490.000 años (Pleistoceno medio).

Según la hipótesis de Beheregaray una de las regresiones del Plioceno al Este de Sudamérica (Uliana y Biddle 1988) puede haber originado al pejerrey de agua dulce patagónico, *O. hatcheri*, a partir de una ancestral población marina Atlántica, posiblemente relacionada con *O. platensis*. Evidencias moleculares del trabajo de Beheregaray indicaron que este evento tuvo lugar alrededor de 4 a 6 millones de años (Plioceno medio a tardío), estimación que coincide con la Época del Terciario obtenida en el presente estudio (1,7 millones de años). Esto ocurrió luego del mayor cambio geológico en Sudamérica, el levantamiento de la Cordillera Andina. El proceso inicial de orogénesis de este cordón montañoso empezó en el

Mioceno (10 a 15 millones atrás), alcanzando su actual configuración a mediados del Plioceno (Tarling 1980; Uliana y Biddle 1988; Jordan y Gardeweg, 1989).

El desarrollo del cordón montañoso Andino elevó enormes áreas de la Patagonia. Esta elevación de la Cordillera andina trajo aparejado cambios climáticos, desarrollándose condiciones de sequía al Este de este sistema montañoso. A esto se le sumo, la regresión del “Mar Patagónico” que también dio lugar a la reducción de humedad, precipitaciones y al aumento de contrastes térmicos entre el verano y invierno (Axelrod 1979; Uliana y Biddle 1988; Hinojosa y Villagran 1997) con el subsiguiente empobrecimiento de la biota (Baez y Scillato Yané, 1979; Cione, 1986).

Estas condiciones de sequía tuvieron un efecto directo en la reducción de ambientes de aguas dulce y en los bajos niveles de biodiversidad observados en la Patagonia. *O. hatcheri* es la única especie de escamas pequeñas (SS) y de agua dulce distribuida al Este de los Andes (presentando bajísima tasa de especiación).

La divergencia encontrada, en el presente estudio, entre *O. argentinensis* y *O. bonariensis*, alrededor de 490.000 años (mediados del Pleistoceno) coincide con la época del Cuaternario mencionada por Beheregaray, en la cual se inicia la radiación del grupo de peces con escamas grandes (entre los cuales se ubican *O. argentinensis* y *O. bonariensis*). Transgresiones y regresiones del Pleistoceno crearon una barrera litoral en la costa del Sur de Brasil, cuya antigüedad esta datada en 400.000 años (Beheregaray 2000). Asimismo existen numerosos antecedentes geológicos que hacen referencia a la presencia de sedimentos continentales y marinos del Pleistoceno (Periodo Cuaternario) en el litoral bonaerense (Dangavs, 1983). Beheregaray propuso que estos eventos produjeron ambientes salobres protegidos, permitiendo que los pejerreyes de río se desplazaran hacia al Este (Océano Atlántico) y se adaptaran a estas condiciones salobres, originando un linaje proto-*argentinensis*. Los análisis filogenéticos basados en microsátélites (Beheregaray 2000) indicaron que los pejerreyes de

río invasores provienen de una población de *O. bonariensis*, especie exitosa y de amplia distribución que presenta capacidad de migrar a aguas salobres (Dyer 1993; Tsuzuki y col. 2000). Evidencias en ADNmt indicaron que los pejerreyes de la Provincia Paraná Platense provienen de un grupo ancestral de agua dulce.

Una segunda transgresión formó un amplio sistema de lagunas con aperturas hacia el Océano Atlántico (Ej. segunda barrera de la costa Sur de Brasil, datada en 325.000 años). Beheregaray propone que en este período el proto-*argentinensis* se expandió hacia aguas marinas originando a *O. argentinensis*. La génesis de una de las lagunas estudiadas en el presente estudio (Salada Grande, de donde se obtuvo la población MA) está relacionada con las transgresiones y regresiones del Pleistoceno. En 1965 Pascual y colaboradores realizaron algunas observaciones en Salada Grande, señalando que la mencionada laguna tuvo libre comunicación con el mar, basando dicha afirmación en la presencia de moluscos fósiles en ella pertenecientes a la transgresión Querandina. La actual laguna Salada Grande constituiría un remanente de un antiguo litoral marino, que habría quedado durante una de las regresiones del Pleistoceno desconectada del mar. En el presente estudio cuando se calculó tiempo de divergencia de la población de MA (*O. bonariensis*) con respecto a las poblaciones de *O. argentinensis* (SC, MC) se obtuvo $T = 370.000$ años, valor menor que el hallado para el conjunto total de poblaciones de *O. bonariensis* (490.000 años). Lo cual sugeriría que de las poblaciones de *O. bonariensis* estudiadas, la más emparentada con *O. argentinensis* sería MA.

A pesar que el número de loci variables detectados en el presente trabajo mediante isoenzimas, fue bajo y teóricamente no representarían una buena muestra para estimar el tiempo de divergencia entre las especies estudiadas, se pudo verificar resultados bastantes similares a los obtenidos por Beheregaray (2000).

VIII. ANALISIS FENETICOS

Los fenogramas obtenidos en este estudio mediante las dos metodologías empleadas (Isoenzimas y RAPD) separaron 2 grandes grupos: los pejerreyes de las provincias Patagónica y Andino-Cuyana (*O. hatcheri*) de los pejerreyes de la provincia Paraná Platense (*O. bonariensis* y *O. argentinensis*). Este resultado es concordante con el análisis filogenético realizado por Beheregaray 2000, quien concluye que *Odontesthes* esta compuesto por 2 grupos morfológicos diferentes: uno compuesto por especies que presentan una divergencia histórica con bajas tasas de especiación y distribuidas en más de una región biogeográfica (especies de escamas pequeñas SS) y el otro compuesto por especies que han divergido recientemente con rápida tasa de especiación y distribuidas en una única región biogeográfica, la Llanura de las Pampas o Provincia Paraná Platense (especies de escamas grandes LS). Este resultado también verifica la hipótesis de Dyer, anteriormente sugerida por Hubbs (1918), que se basa en las relaciones naturales de los grupos; es decir todos los *Odontesthes* con escamas grandes forman un clado debido a que además comparten otros 3 caracteres morfológicos: posición posterior de la primera aleta dorsal, ausencia de escamas en la base de la segunda aleta dorsal y primera costilla pleural pequeña (Dyer 1993, 1998).

Todos los fenogramas mostraron que la población RP fue la más diferenciada entre las poblaciones de su especie (*O. bonariensis*) (con soporte de bootstrap de 60% para Isoenzimas y de 100% para RAPD), siendo fácilmente diagnosticable (alelo diagnóstico para isoenzimas *LDH-1*3*, expresión relativa de *LDH-1** y *LDH-2** diferente en músculo esquelético y 7 bandas “diagnóstica” para RAPD). Asumiendo que las distancias genéticas están correlacionadas con el Tiempo de divergencia, esta población se habría aislado más tempranamente del resto. Beheregaray 2000 resalta que interesantemente ninguna especie de escamas grandes (LS) ha colonizado ríos distantes al río de La Plata, al cual considera una posible y principal ruta de colonización de la Provincia Paraná Platense (Llanura de las

Pampas). Los pejerreyes no son buenos competidores con fauna preexistente endémica de agua dulce (Bamber y Henderson 1988), por lo tanto Beheregaray concluye que posiblemente en los ríos que no se observan pejerreyes, la ictiofauna de los mismos presenta una alta competencia, impidiendo la invasión de poblaciones de *Odontesthes*.

Los fenogramas mostraron tendencias similares en cuanto agrupación de poblaciones coespecíficas, sin embargo el árbol obtenido mediante Isoenzimas permitió una mejor agrupación de las poblaciones de cada especie. Si bien la información de los distintos árboles es consistente, estos presentan una diferencia en la ubicación de la especie *O. argentinensis*. En el árbol de isoenzimas esta especie se separa de *O. bonariensis*, en cambio en RAPD, en el fenograma construido en base a las distancias Manhattan, *O. argentinensis* (SC) queda formando parte de un cluster que incluye poblaciones de *O. bonariensis* (CH, MA). Situación aun más paradójica se encuentra en el fenograma de RAPD construido en base a F_{ST} , en donde *O. argentinensis* (SC) queda formando cluster con la población de MA (*O. bonariensis*) y a su vez este grupo queda incluido en otro cluster, en el cual se ubica otra población de *O. bonariensis* (CH). Estas discrepancias entre los distintos fenogramas se deben a que las Isoenzimas son mejores marcadores que los RAPD al momento de comparar diferentes especies. Las Isoenzimas permiten la comparación de genes homologables (misma función enzimática, especificidad tisular y tamaño). En cambio las bandas obtenidas por RAPD se homologan únicamente por tamaño, lo cual no garantiza que los productos obtenidos por amplificación con igual tamaño sean equivalentes, siendo menos confiables en el análisis de especies diferentes.

Otra posible explicación a la discrepancia de los resultados entre RAPD e Isozimas podría estar relacionada con los resultados obtenidos por Beheregaray 2000. En el análisis filogenético (Beheregaray 2000), *O. argentinensis* y *O. bonariensis* se ubican en un clado correspondiente al de especies de escamas grandes (LS). Si bien Beheregaray encuentra que

este clado presenta muy alto valor de bootstrap, también concluye que las relaciones entre las especies de escamas grandes son muy inestables debido a los bajo niveles de divergencia en las secuencias de genes de ADNmt. Beheregaray también investiga las relaciones entre estas especies (LS) empleando 8 loci de microsatélites, si bien encuentra divergencia entre ellas, no obtiene en ninguno de los loci de microsatélites alelos diagnósticos. Otro dato que obtiene al estudiar 10 especies de escamas grandes (LS) (entre ellas *O. argentinensis* y *O. bonariensis*) es que estas comparten numerosos alelos. Esto es consistente con los resultados obtenidos respecto a la baja divergencia en la secuencia de genes de ADNmt de dichas especies y señala la reciente radiación de dicho grupo. Estos resultados podrían concordar con la falta de precisión de los RAPD en identificar *O. argentinensis* y *O. bonariensis*. Cabría preguntarse porque las isoenzimas permiten una mejor diferenciación: una posible explicación sería postular selección para algún locus de isoenzimas. En un trabajo de Beheregaray y Levy (2000) en el cual se empleo electroforesis de isoenzimas, en las mismas poblaciones estuarinas y costeras de *O. argentinensis* que fueron analizadas con ADNmt y microsatélites (Beheregaray 2000), las alozimas mostraron niveles más altos de diferenciación que los registrados para ADNmt y microsatélites (un locus de alozima con 1 alelo fijado para poblaciones estuarinas y 2 alelos comunes para las poblaciones costeras marcaron las diferencias en los F_{ST} obtenidos por los distintos métodos). Numerosos estudios han informado que los loci alozimicos están sujetos a fuerzas selectivas. Lemair y colaboradores (2000) comparan información alozimica con datos de 6 loci de microsatélites para poblaciones de peces estuarinos y marinos, proponiendo que 6 de los 28 loci alozimicos son no neutrales debido a los elevados F_{ST} obtenidos comparado con los de microsatélite. La alta diferenciación fue atribuida a que el ciclo de vida de especies estuarinas promovería la selección de algunos loci alozimicos debido al rol de estos en la adaptación a cambios de salinidad y resistencia al estrés ambiental (Lemaire y col. 2000).

El fenograma de RAPD construido en base a F_{ST} , no se le ha podido calcular los valores de bootstrap dado que el programa AMOVA no lo permite. Por lo tanto a la hora de analizar los resultados estos no resultan tan confiable como los obtenidos en base a distancias Manhattan, en donde todos los nodos presentan valores superiores a 88%. Igualmente, a partir del árbol de RAPD construido en base a F_{ST} , podemos inferir que existe una fuerte asociación de la población SC (*O. argentinensis*) con la población de MA (*O. bonariensis*), dado que éste vínculo también se observa al momento de caracterizar las poblaciones por ambos marcadores (alelos isoenzimáticos compartidos por MA y SC: *EST*1*, *EST*2* y *LDH-1** y 22 bandas para RAPD). El origen de la laguna Salada Grande, de donde se obtuvo la muestra de la población de MA esta relacionada con las transgresiones y regresiones del Pleistoceno. Como se menciono anteriormente la Salada Grande constituiría un remanente de un antiguo litoral marino, que habría quedado durante una de las regresiones del Pleistoceno desconectada del mar. No sería sorprendente pensar que individuos de *O. argentinensis* pudieron haber quedado encerrados en este ambiente. El contacto genético ocurrido en dicha zona podría postularse como un evento ancestral de hibridización. Beheregaray 2000 sugirió que 2 especies de escamas grandes, *O. bonariensis* y *O. perugiae*, habrían estado sometidas a hibridización introgresiva en situación semejante: *O. bonariensis* es la probable especie ancestral estuarinas que tanto dio origen a *O. perugiae* como a *O. argentinensis*. Históricamente la hibridización puede esperarse en tiempos tempranos cuando las barreras de aislamiento reproductivo son todavía débiles. Una dirección en la hibridización introgresiva implica que exista apareamientos con sexos asimétricos. Tales asimetrías son conocidas en otros pejerreyes (Conover y Kynard 1984). Los machos de *O. bonariensis* siendo más grande que machos de *O. argentinensis*, inducirían más fácilmente el desove de hembras de *O. argentinensis*. La hibridización por introgresión justificaría que MA (*O. bonariensis*) comparta más caracteres con *O. argentinensis*, pero dado que este evento fue ancestral sería de esperar que dichos

caracteres se pierdan en el transcurso de las generaciones, a menos que exista una presión selectiva favorable para alguna de las combinaciones híbridas que favorezca su mantenimiento. (Ej. dado que la salinidad de la Salada Grande es semejante a la de la Bahía de Samborombón, Dangavs 1983, es posible que algún locus de los estudiados o alguno relacionado con ellos, este sujeto a un mecanismo de selección a favor de dicho parámetro de salinidad)

Para concluir podríamos decir que queda claro que el género *Odontesthes* presenta 2 grupos morfológicos, los cuales se ubican en distintas regiones geográficas con ambientes muy disímiles. Asumiendo la hipótesis de reloj molecular, uno de los grupos de escamas pequeñas conformado por *O. hatcheri* divergió históricamente y el otro, de escamas grandes (*O. argentinensis* y *O. bonariensis*) divergió recientemente.

Los pejerreyes son un grupo de peces que pueden invadir y especiarse rápidamente en ambientes costeros recientemente formados (Ej. Barbour 1973; Echelle y Echelle 1984; Potter y col. 1986; Bamber y Henderson 1988; Creech 1991; Beheregaray y Levy 2000; Beheregaray 2000). Por lo cual, la colonización y la especiación en la Provincia Paraná Platense (región a la cual pertenece el grupo de escamas grandes, *O. argentinensis* y *O. bonariensis*) estaría ocurriendo rápidamente, posiblemente porque sus áreas costeras presentan una historia geológica reciente, proveyendo ambientes acuáticos vacantes.

Si bien este trabajo ha aportado el esclarecimiento en cuanto a variabilidad, estructura genética y diferenciación de 3 especies de *Odontesthes*, sería interesante elucidar que sucede con *O. platensis*, especie de escamas pequeña y posible antecesora de *O. hatcheri* (Beheregaray 2000), pero que quedo restringida a la Provincia de Buenos Aires (área de historia geológica reciente). Estudios de genética poblacional de esta especie, conjuntamente con los de sus taxa hermanas, *O. nigricans* y *O. incisa*, complementado con información preexistente podrían dar una idea de la tendencia evolutiva de estas especies.

CONCLUSIONES

La formulación de una estrategia apropiada para el uso racional de las especies promisorias así como para el desarrollo de programas de conservación requiere de un profundo conocimiento de la taxonomía y las características biológicas y ecológicas del grupo considerado. En nuestro país, dentro de las especies de peces de importancia económica (ya sea como objeto de pesca comercial y/o deportiva) se destacan los pejerreyes, género *Odontesthes*. La elaboración de medidas que enfoquen un aumento de la productividad de los cuerpos de agua deberá estar relacionados principalmente con el conocimiento previo de las características de las especies que lo integran.

En este trabajo se aportó al conocimiento de algunas de las especies del género *Odontesthes* desde un enfoque genético poblacional. Se utilizaron las técnicas de electroforesis de isoenzimas y RAPD para estudiar la variabilidad, diferenciación y estructura genética de poblaciones naturales de *O. argentinensis*, *O. bonariensis*, *O. hatcheri*.

Se estudió además, para ambos marcadores (Isoenzimas y RAPD), si la diferenciación genética entre poblaciones pudiese estar asociada con las distancias geográficas. A partir del análisis experimental y de la consecuente discusión de los datos se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1) Del análisis de 22 loci isoenzimáticos, 8 de ellos fueron variables, permitiéndome diferenciar las 3 especies del género *Odontesthes* estudiadas en el presente trabajo. Si bien *O. bonariensis* y *O. argentinensis* presentaron los mismos loci, estas taxa se diferenciaron en las frecuencias de sus alelos (Ej. el alelo *GOT-4*1* está fijado en *O. bonariensis* y en muy baja frecuencia en *O. argentinensis*, alelo *EST*5* exclusivo de *O. bonariensis*). En

cambio *O. hatcheri* se diferenci6 nítidamente de estas especies dado que presento 3 GOT loci exclusivos (diagn6sticos) (*GOT-2**, *GOT-3**, *GOT-5**).

- 2) El an6lisis de la expresi3n tisular diferencial permiti3 diferenciar a las 3 especies por los patrones de 3 loci (*MEP-1**, *MEP-2** y *MEP-3**).
- 3) *O. bonariensis* registro los menores valores de variabilidad gen6tica al compararse con las 2 restantes taxa.. Esta disminuci3n de los índices de variabilidad fue asociada a la distribuci3n de dicha especie y a la alta presi3n pesquera que sufren la mayoría de las lagunas de la Provincia de Buenos Aires, siendo una excepci3n de la laguna Salada Grande. La poblaci3n de MA (*O. bonariensis*), proveniente de dicha laguna, registro el m6s alto índice de variabilidad. Se sugiere que las siembras peri3dicas con alevinos obtenidos de inseminaci3n artificial a partir de gametas parentales de la misma laguna, realizada por INDEP, aumentarían el tamaño efectivo poblacional de MA.
- 4) La estructura gen6tica intrapoblacional estimada por el estadístico F_{IS} de Wright (F_{IS} promedio = 0.004^{NS} $p > 0.05$) indico que las frecuencias genotípicas en todas las poblaciones se ajustarían a lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg, por ende el apareamiento seria aleatorio. Comportamiento promiscuo en el apareamiento, durante el cual muchos machos pueden fertilizar los huevos de una única hembra (descrito para otras especies de pejerreyes), ha sido sugerido para las especies en estudio, dado que este favorecería la panmixia.
- 5) A partir de la amplificaci3n al azar de ADN polim3rfico empleando 6 primers se obtuvieron 220 bandas. La mayoría de las bandas amplificadas fueron compartidas por las especies y poblaciones variando en su frecuencia fenotípica. Del an6lisis de las bandas se deduce que existen 2 importantes grupos: uno conformado por las poblaciones de *O. hatcheri* y el otro compuesto por las poblaciones de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*. Si bien *O. hatcheri* se distingue de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*, estas 2 últimas

especies no pueden ser diferenciada inequívocamente dado que comparten numerosas bandas.

- 6) La diferenciación genética detectada entre poblaciones de distintas especies fue similar para ambos métodos
- 7) Cuando se analizo las poblaciones de cada especie, los 2 métodos mostraron diferenciación de sus poblaciones. En este trabajo los RAPD permitieron una mayor diferenciación entre poblaciones de la misma especie que la observada mediante las técnicas de isozimas. Esta mayor diferenciación de los RAPD (valores de F_{ST} superiores) es producto del alto polimorfismo (bandas muy variables) encontrado por esta técnica
- 8) A partir del análisis de la distribución de la variabilidad genética se observa que la variación entre especies (variación específica) es la proporción mayor tanto para isoenzimas como para RAPD (73.9% y 44% respectivamente). De la comparación del porcentaje de variación específica obtenido por ambos métodos se desprende que isoenzimas detecta mejor este tipo de variación, pudiendo separar con más precisión especies . El porcentaje de variación entre poblaciones de la misma especie (variación poblacional) es mayor para RAPD (34%) que para isoenzimas (6.8%). Esto nos indica que la variación poblacional es mejor detectada por RAPD. El porcentaje de varianza dentro de las poblaciones (variación individual) es similar para ambos métodos (19.3% y 22% para isoenzimas y RAPD respectivamente).
- 9) La falta decorrelación de diferenciación genética obtenida tanto por RAPD como por Isoenzimas con distancias geográficas de las poblaciones de cada especie sugieren que la divergencia de las poblaciones de cada especie podría ser explicada por 2 mecanismos evolutivos: la Selección o por Eventos fundadores recientes no habiendose aún alcanzado el equilibrio entre deriva y migración. Al incluir todas las poblaciones de las distintas especies la correlación positiva sugiere que pudo existir diferenciación de estas por deriva

genética, aunque no se descarta a la Selección como probable fuerza operante. Al incluir todas las poblaciones de las diferentes especies se plantean distancias geográficas importantes que superan los 1000Km, con ambientes muy disímiles (Patagonia con lagos oligotróficos y la Prov. de Buenos Aires con lagos eutróficos) donde las presiones selectivas podrían ser muy diferentes determinando una importante diferenciación génica que se correlacionaría con la distancia geográfica

- 10) Si se asume que las divergencias moleculares observadas entre las taxa están relacionadas con el Tiempo de divergencia de las mismas:

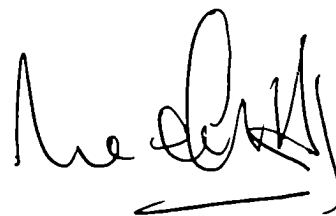

O. hatcheri es la especie más ancestral de las estudiadas que divergió de su antecesor en el Plioceno tardío (Terciario), luego de que ocurrió el mayor cambio geológico en Sudamérica, el levantamiento de la Cordillera Andina. (proceso que empezó en el Mioceno alcanzando su actual configuración a mediados del Plioceno).

O. argentinesis y *O. bonariensis* presentan una divergencia reciente, que se estima a mediados del Pleistoceno (Cuaternario).

Transgresiones y regresiones de esta Época (pleistoceno) crearon deposiciones en el litoral de la Provincia Paraná-Platense que conformaron sistemas de lagunas con aperturas hacia el Océano Atlántico. Una de las lagunas formadas durante esta Época fue la Salada Grande, la cual tuvo libre comunicación con el mar. Este hecho sumado a la fuerte asociación, encontrada mediante las técnicas de isoenzimas como de RAPD, de la población de la Salada Grande (MA - *O. bonariensis*) con *O. argentinensis* hace presumir de un posible evento ancestral de hibridización introgresiva de las mismas.

- 11) El análisis fenético a partir de distancias genéticas de Nei obtenidas por Isoenzimas dejó visualizar 3 clusters correspondientes a las 3 especies estudiadas, permitiéndome este método una buena agrupación de las poblaciones de cada especie.

- 12) Los fenogramas obtenidos, tanto por Isoenzimas como por RAPD, permitieron visualizar que la población de Río de la Plata (RP - *O. bonariensis*), se separa netamente de las restantes poblaciones de su especie, siendo fácilmente diagnosticable (alelo diagnóstico para isoenzimas *LDH-1*3*, expresión relativa de *LDH-1** y *LDH-2** diferente en músculo esquelético y 7 bandas “diagnostica” para RAPD). Asumiendo que las distancias genéticas están correlacionadas con el Tiempo de divergencia, esta población se habría aislado más tempranamente del resto.
- 13) Los análisis fenéticos a partir de RAPD corroboraron 2 de los cluster (*O. hatcheri* versus *O. bonariensis* y *O. argentinensis*) pero no tuvieron buena resolución al momento de separar las poblaciones de *O. bonariensis* y *O. argentinensis*.
- 14) Isoenzimas permitió una mejor agrupación de las poblaciones de cada especie Estas fueron mejores marcadores que los RAPD al momento de comparar diferentes especies, dado que estas permiten la comparación de genes homologables (misma función enzimática, especificidad tisular y tamaño), en cambio las bandas obtenidas por RAPD no son necesariamente homologables siendo menos confiables en el análisis de especies diferentes.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aagaard, J., Konstantin, U., Krutovskii, V., Strauss, S.H. 1998. RAPD and allozyme exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas and ir. *Heredity* 81: 69- 78.
- Allendorf, F.; Mitchell, N.; Ryman, N. and Sthal, G. 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas* 86:179-190.
- Arnold, M.L. 1997. Natural hibridization and evolution. Oxford university Press, Oxford.
- Arai, K. and Yamazaki, F. 1979. Developmental changes of Lactate Dehydrogenase (LDH) Isozymes in the hybrid between Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) and Pink Salmon (*O. gorbuscha*). *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, Vol. 30, 2, pp. 124-128.
- Arai, K. 1984. Developmental genetic studies on Salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos. *Memoir of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, Vol. 31, 1, 2, pp. 1-94.
- Arratia, G. M., Peñafort, B. and Menu-Marque, S. 1985. Peces de la región sureste de los Andes y sus probables relaciones biogeográficas actuales. *Deserta* 7, 1983: 48-108.
- Avise, J.C. 1974. Systematics value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23(4): 465-481.
- Avise, J.C. 1976. Diferenciación genética durante la especiación. In Ayala, J.F. (ed) *Evolución Molecular*. Ediciones Omega: 110 –127.
- Axelrod, D. 1979. Desert vegetation, its age and origin. In: *Arid land resources*. International center for arid and semi-arid land studies. (eds. Goodin, J.R.; Northington, D.K.) pp.1-72. Texas University, Lubbock, Texas.

- Bachmann, K. 1997. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. *Opera botanica*. 132: 137-148.
- Báez, A.M. and Scillato Yané, G.J. 1979. Late Cenozoic Environmental Changes in Temperate Argentina. Pp 141-156 in: W. E. Duellman (ed), *The South American Herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal*. Monograph Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas, 7.
- Bamber, R.N. and Henderson, P.A. 1988. Pre-adaptative plasticity in atherinids and the estuarine seat of teleost evolution. *Journal of Fish Biology*, 33, 17-23.
- Barbour, C.D. 1973. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 1973, 533-556.
- Bardakci, F. and Skibinski, D.O.F. 1994. The application of RAPDs technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*: 73, 117-123.
- Basaglia, F. 2002. Multilocus isozyme systems in African lungfish, *Protopterus annectens*: distribution, differential expression and variation in dipnoans. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 131 (1): 89-102.
- Beheregaray, L.B. 1995. Estudo genético-populacional do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* (Atheriniforme: Atherinidae) na lagoa dos patos e zona costeira adjacente. Dissertação (Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade do Rio Grande, (Orientador) Jose Alberto Levy.
- Beheregaray, L.B. 2000. Molecular evolution, biogeography and speciation of the neotropical fish genus *Odontesthes*. Ph. D. Thesis. Department of Biological Sciences, Division of Environmental and Life Science, Macquarie University.
- Beheregaray, L.B. and Levy, J.A. 2000. Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Atheriniformes): evidence for speciation in a estuary of southern brazil. *Copeia*, v.2, p.441-447.

- Beheregaray, L.B. and Sunnucks, P. 2000. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and *Odontesthes perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology* 9, 629-644.
- Bemvenuti, M.A. 1987. Rediscricao do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes) Pisces: Atherinidae, na costa do Rio Grande do Sul. *Atlântica*, 15, 17-35.
- Bentzen, P.; Harris, A.S. and Wright, J.M. 1991. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and tilapia. In *DNA fingerprinting: Approaches and Applications* (eds Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolf R.), pp243-262. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Black, B. 1997. Fortran Program for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University. Fort Collins.
- Bonetto, A.A. and Castello, H.P. 1985. Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. Secretaría general de los Estados Americanos (OEA), Washington D.C., pp118.
- Boschi, E.E. 1959. Estudio biológico pesquero del pejerrey del Embalse del Río Tercero (*Basilichthys bonariensis*). Departamento de Investigaciones Pesqueras, Secretaría de Agricultura y Ganaderia. Buenos Aires, Pub. N°8, pp 61.
- Botstein, D.; White, R.L.; Scolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J-Hm.*32: 314-331.
- Bucci, G.; Menozzi, P. 1995. Genetic variation of RAPD markers in *Picea abies* Kaist. *Population. Heredity* 75: 188- 197.

- Burbidge, R.G.; Carrasco, M.C. and Brown, P.A. 1974. Age, growth, length-weight relationship, sex ratio and food habitats of the argentine pejerrey, *Basilichthys bonariensis* (Cuv. y Val.) from lake Peñuelas, Paraíso, Chile. *J. Fish Biol.*, 6:299-305.
- Cagigas, M.E.; Vazquez, E.; Blanco, G. and Sanchez, J.A. 1999. Combined Assessment of Genetic Variability in Populations of Brown Trout (*Salmo trutta* L.) Based on Allozymes, Microsatellites, and RAPD Markers. *Mar. Biotechnol*, 1 (3): 286-296.
- Campos, H. 1984. Los géneros de atherinidos (Pisces: Atherinidae) del sur de Sudamerica [The atherinid genera (Pisces: Atherinidae) of the South America]. *Revista Argentina de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Buenos Aires) Serie Zoología*, 13 (6), 71-84 (in spanish)
- Capili, J.B. and Skibinski, D.O.F. 1993. Mitochondrial DNA restriction endonuclease and isozyme analysis of three strains of *Oreochromis niloticus*. In: The Third International Symposium on Tilapia in aquaculture (eds Pullin R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon Kothias J.B.) ICLARM Conference Proceedings N°41.
- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisofa, S., Sala, E. 1993. RAPD fingerprinting identification for taxonomic studies of *Populus spp.* clones. *Theor. Appl. Genet.* 87: 54-59.
- Clausing, G.; Vickers, K. and Kadereit, J.W. 2000. Historical biogeography in a linear system: genetic variation of sea rocket (*Cakile maritima*) and sea holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. *Mol Ecol.*, 9 (11): 1823-33.
- Cervigon, F. 1972. Los peces. En: Hno. Ginés y R. Margalef (eds.) *Ecología Marina*, Fund. La Salle, Monog. 14: 309-355.
- Chakraborty, R. and Leimar, O. 1987. Genetic variation within a subdivided population. *Population Genetic and Fishery Management*. p 89-120 N. Ryman and F. Utter, eds. Washington Sea Grant Program. University of Washington Press.

- Chen, Y.J.; Zhang, Y.P.; Qi, J. and Liu, R.Q. 1998. [Genetic relationships of *Nyctereutes procyonoides*: as inferred from random amplified polymorphic DNA analysis] *Yi Chuan Xue Bao*, 25 (1): 16-21. Chinese.
- Chernoff, B. 1986. Systematics of American atherinid fishes of the genus *Atherinella*. I. The subgenus *Atherinella*. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 138, 86-188.
- Chiappero, M.B. and Gardenal, C.N. 2001. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population genetic studies of *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Hereditas*, 135 (1): 85-93.
- Cione, A.L. 1986. Los peces continentales del Cenozoico de Argentina. *Actas del Congreso Argentino de Paleontología y Bioestatigrafía*, 42(2): 101-106.
- Cominicini, S.; Sironi, M.; Bandi, C.; Giunta, C.; Rubini, M. and Fontana, F. 1996. RAPD analysis of sistematic relationships among the cervidae. *Heredity* 76: 215- 221.
- Conover, D.O. and Kynard, B.E. 1984. Field and laboratory observations of spawning periodicity and behaviour of a northern population of the Atlantica silverside, *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae). *Environmental Biology of Fishes*, 11,161 –171.
- Cottrell, G.; Forrest, G.I. and White, M.S. 1997. The use of RAPD analysis to study diversity in British black poplar (*Populus nigra* L. Subsp. *Betulifolia*) (Pursh) W. Wettst. (Salicaceae) in great Britain. *Watsonia* 218: 305- 312.
- Crabtree, C.B. 1987. Allozyme evidence for the phylogenetic relationships within the silverside subfamily Atherinopsinae. *Copeia*, (4): 860-867
- Crawford, D.J. 1997. Molecular marker for the study of genetic variation within and between populations of rare plants. *Opera Botanica* 132, 149-157.

- Creech, S. 1991. An electrophoretic investigation of populations *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829 (Teleostei: Atherinidae): genetic evidence in support of the two species. *Journal of Fish Biology*, 39,807-816.
- Crisci, J.V. and Armengol, M.F. 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Serie Biología. Monografía N° 26 O.E.A.
- Dangavs, N.V. 1983. Geología , sedimentología y limnología del complejo lagunar Salada Grande. Estudio de recursos acuáticos superficiales de la Pampa Deprimida. Ministerio de Asuntos Agrario de la Provincia de Buenos Aires. Asociación Geológica Argentina, T.38, V2, pp 161-174.
- Dayhoff, M.O. 1972. Atlas of protein sequence and structure, Washington, D.C. Natl. Biomed. Res. Found. A, V. 5.
- De Buen, F. 1953. Los pejerreyes (familia Atherinidae) en la fauna uruguaya, con descripción de nuevas especies. *Boletín do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo*, 4, 3-80.
- Del Valle, A.E. y Núñez, P. 1990. Los peces de la Provincia de Neuquen [The fishes of Neuquen Prefecture]. *Hemisferio Sur*, Buenos Aires, 86pp. (in Spanish).
- Del Valle, A. 1991. Cría de pejerrey en Japón. Informe técnico. JICA (Agencia de Cooperación Internacional de Japón).
- Demeke, T.; Adams, R.P. and Chibbar, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) a case study in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 84, 990-994.
- DeWoody, J.A. and Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromus fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, 461-473.

- Dyer, B.S. 1993. Phylogenetic systematics of the South American silverside genus *Odontesthes* Evermann & Kendall, 1906 (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae). Ph. D. Thesis. Chapter III, University of Michigan, Ann. Arbor.
- Dyer, B.S. and Chernoff, B. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 117, 1-69.
- Dyer, B.S. 1997. Phylogenetic Revision of Atherinopsinae (Teleostei: Atherinopsidae), with comments on the systematics of the South American freshwater fish genus *Basilichthys* Girard. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan, Ann Arbor.*, November 8, N^o. 185.
- Dyer, B.S. 1998. Phylogenetic Systematics and Historical Biogeography of the Neotropical Silverside Family Atherinopsidae (Teleostei: Atheriniformes). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Part 6 - Atherinomorpha*. Malabarta, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena & C.A.S. Lucena, (eds). Porto Alegre, Edipucr, 603 p.
- Echelle, A.A. and Echelle, A.F. 1984. Evolutionary genetics of a "species flock": atherinid fishes on the Mesa Central of Mexico. In: *Evolution of fish species flocks* (ed Echelle, A.A. and Kornfield, I.) pp.93-110. Univ. Maine at Orono Press, Orono.
- Ellstrand, N.C. 1992. Geneflow among seed plant population. *New Forest* 6: 241-256.
- Ellsworth, D.L.; Rittenhouse, K.D.; Honeycutt, R.L. 1993. Artifactual Variation in Randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques* 14 : 214-217.
- Encarta. Atlas Mundial . 1999. Vol.2.
- Eschmeyer, W.N. 1990. *Catalog of the Genera of Recent Fishes*. California Academy of Sciences, San Francisco, 697pp.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E. and Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131:479.491.

- Excoffier, L. and Slatkin, M. 1995. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.*, 12 (5): 921-7.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v. 3.5c, Department of Genetics, The University of Washington. Seattle, WA.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical Systematic and Evolution*. Glasgow Blackie.
- Fitch, W.M. 1976. Molecular evolutionary clock. In: *Molecular Evolution*. Ayala, F.J. (ed), pp. 160 -178. Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10,1500-1508.
- Freitas, H. and Brehm, A. 2001. Genetic diversity of the Macaronesian leafy liverwort *Porella canariensis* inferred from RAPD markers. *J Hered.*; 92 (4): 339-45.
- Furman, B.J.; Gratta Pagia, P.; Ovorak, W. and O'Malley, M. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology*, 6: 321-331.
- Gajardo, G.M. 1988. Genetic divergence and speciation in *Basilichthys microlepidotus* Jenyns, 1842 and *B. australis* Eigenmann, 1927 (Pisces, Atherinidae) *Genetica* 76, 121-126.
- García, M.L. 1988. Contribución al conocimiento sistematico y biologico de los Atherinidae del Mar Argentino. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo Nacional de la Plata. La Plata. Argentina
- Gilbert, D.A.; Lehman, N.; O'Brien, S.J. and Wayne, R.K. 1990. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*: 344, 746-767.
- Gomes, C.; Oxenford, H.A. and Dales, R.B.G. 1996. The use of DNA markers in the determination of stock structure of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis*, and its implications for fisheries management in the central western Atlantic. In

- Developing and Sustaining World Fisheries Resources: the State of Science and Management (ed. Beumer JP), pp 49-50. Proceedings of the 2nd World Fisheries Congress, Vol. 1.
- Gomes, C.; Dales, R.B.G. and Oxenford, H.A. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology* 7, 1029-1039.
- Gomes, C.; Oxenford, H.A. and Dales, R.B.G. 1998. Mitochondrial DNA D-loop variation and implications for stock structure of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis*, in the central western Atlantic. *Bulletin of Marine Science*, 6.
- Grosman, F. 1995. El pejerrey. Ecología, cultivo, pesca y explotación. Editorial Astyanax.
- Gunter, G. 1967. Vertebrates in hypersaline waters. *Cont. Mar. Sci. Univ. Texas*, 12: 230-241.
- Guandalani, E.; Mantovani, A.; Fazzi, P.; Gelosi, E.; Colombari, P.T.; Mazzini, M. and Fausto A.M. 1994. Histological study on the oocyte filaments of the silversides *Odontesthes bonariensis*. *Journal of Fish Biology*, 44,673-682.
- Guo, S.W. and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Hadrys, H.; Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1, 55 – 63.
- Haig, S.M.; Rhymer, J.M. and Heckel, D.G. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol Ecol*, 3 (6): 581-95
- Haldane J B S, 1954. An exact test for randomness of mating. *J Genet* 52: 631-635.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.; Murawski, D.A and Loveless, M.D. 1991. Correlation between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk, D.A.

- Hamrick, J.L.; Linhart, B. and Mitton, J.B. 1979. Relationship between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 10:173-200.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. 1978. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, New York, Oxford.
- Hartl, D. and Clark, A.G. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Hedgecok, D.; Hutchinson, E.S.; Li, G.; Sly, F.L. and Nelson, K. 1989. Genetic and morphometric variation in the pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: comparison and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Fishery bulletin*, 87 (3): 653-671.
- Hedrick, P.W. 1999. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett publishers.
- Heibel, E.; Lumbsch, H.T. and Schmitt, I.I. 1999. Genetic variation of *Usnea filipendula* (Parmeliaceae) populations in western Germany investigated by RAPDs suggests reinvasion from various sources. *Am J Bot.*, 86 (5): 753
- Heusden, A.W. and Backmann, K. 1992. Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) reverified by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant system Evol.* 179, 221-233.
- Hinojosa, L.F. and Villagran, C. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural*, 70, 225-239.
- Hu, J. and Quirós, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505- 511.

- Hubbs, C.L. 1918. *Colpichthys*, *Thyrinops*, and *Austromenidia*. New genera of atherinoid fishes from the New World. Proceeding of the Academy of Sciences of Philadelphia, 67, 305-308.
- Hunt, G.J. and Page, R.E. 1992. Pattern of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theo. Appl. Genet.*, 85, 15 – 20.
- Hunter, L. and Markert, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zones electrophoresis in starch gels. *Science*, 125: 1294-1295.
- Ijima, K. 1992. Peherei ni okeru senshokutai sosa giho ni kan suru kisoteki kenkyu [Basic studies on chromosome manipulation of pejerrey]. Master of Science Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 74 pp. (in Japanese).
- Innis, M.A.; Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* by Academic Press. Inc.
- Isabel, N.; Beaulieu, J. and Bousquet J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 3; 92 (14): 6369-73.
- IUBNC (International Union of Biochemistry, nomenclature Committee). 1984. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, Orlando, Florida.
- Jamieson, A. and Teixeira, A.S. 1991. Eye lens proteins as genetic markers in anguillids. *Animal Genetics*, 22: 45-52.
- Johnson, M.S. 1975. Biochemical systematics of the atherinid genus *Menidia*. *Copeia*, 1975, 662-691.
- Johnson, W.E. and Selander, R.K. 1971. Protein variation and systematics in kangaroo rats (genus *Dipodomys*). *Syst. Zool.*, 20: 377-405.

- Jordan, T.E. and Gardeweg, M. 1989. Tectonic evolution of the Late Cenozoic Central Andes (20-30°S). Pp 193-207 in: Z. Ben-Avraham (ed), The Evolution of the Pacific Ocean Margins. Oxford University Press, New York.
- Kaemnner, P.; Weising, K. and Nojok, G. 1992. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa spp.*) Biotechnology 10: 1030- 1035.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. En: Nei, M. Koehn, R. K. (eds.) Evolution of genes and proteins. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 208-233.
- Kimura, M.T. and Ohta, T. 1971. Theoretical aspects of populations genetics. Princeton Univ. Press.
- Kleerekoper, H. 1945. O. Peixe Rei. Pp:2-102. Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro.
- Kobayashi, T.; Milner, G.B.; Teel and Utter, F.M. 1984. Genetic basis for electrophoretic variation of adenosine deaminase in chinook salmon. Transactions of the American Fisheries Society 113: 86-89.
- Kvasov, D.D. and Verbitski, M. 1981. Cause of Antarctic glaciation in the Cenozoic. Quaternary Research, 15, 1-164.
- Lander, G.C. and Liem, K.F. 1983. The evolution and interrelationships of the actinoptergian fishes. Bull. Mus. Comp. Zool., 150, 95-197.
- Latta, R.G. and Mitton, J.B. 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). Genetics, 146 (3) : 1153-63.
- Lemaire, C.; Allegrucci, C.; Naciri, M.; Bahri-Sfar, L.; Kara, H. and Bonhomme, F. 2000. Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential

- selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology*, 2, 121–129.
- Lewontin, R.C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54:595-609.
- Liu, Z. and Furnier, G. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 97- 105.
- Lynch, M. 1991. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: Burke, T.; Dolf, G.; Jeffreys, A.J. and Wolf, R. (eds). *DNA fingerprinting Approaches and Applications*. pp 113-126. Basel Switzerland.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPDs markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.
- Mamuris, Z.; Stamatis, C. and Triantaphyllidis C. 1999. Intraspecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) in the mediterranean sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Heredity*. ;83 (Pt 1):30-8.
- Machenko, G.P. 1994. "Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels". CRC Press, Inc.
- Maniatis, T.; Fritsch E.F.; Sambrook, Y.J. 1982. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor.

- Markert, C.L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes tissue ontogenic and species patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45: 753-763.
- Marshall, D.R. and Allard, R.W. 1970^a. Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* and *Avena barbata*. Heredity 25: 373-382.
- Martty, H. 1992. Manual del pejerrey, nomenclatura - reproducción - pesca [Handbook of pejerrey, nomenclature - reproduction - fishery]. Albatros, Buenos Aires, 159 (in Spanish)
- Maxson, L.R. and Maxson, R.D. 1979. Comparative albuminand biochemical evolution in plethodontid salamanders. Evolution 33: 1057 -1067.
- Medrano, J.F.; Aasen, E. and Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. Biotechniques 8, 43.
- Menezes, M.R.; Taniguchi, N. and Seki, S. 1990. Degree of intraspecific genetic divergence and variability in three Sciaenid species. Japanese Journal of Ichthyology, Vol 37, N°1: 39-48.
- Menni, R.C. 1983. Los peces en el medio marino. Est. Sigma, B. Aires, 169 pp.
- Merritt, T.J. and Quattro, J.M.. 2001 Evidence for a period of directional selection following gene duplication in a neurally expressed locus of triosephosphate isomerase. Genetics, 159(2):689-97.
- Meunier, J.R.P. and Grimont, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA finger printing. Res. Microbiol. 144: 373-379.
- Middaugh, D.P. and Hemmer, M.J. 1987. Reproductive ecology of the tidewater silverside *Menidia peninsula* (Pisces: Atherinidae) from Santa Rosa Island, Florida. Copeia, 727-732.

- Miller, P.J.; Serventi, M.; Soregaroli, D.; Torricelli, P. and Gandolfi, G. 1994. Isozymes genetics and the phylogeny of Italian freshwater gobies (Teleostei: Gobioidae). *Journal of Fish Biology* 44, 439-451.
- Mitton, J.B. 1994. Molecular approaches to population biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 45-69.
- Muñiz Saavedra, J. y Piacentino, G. 1991. Estudio del desarrollo ontogenético de *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes, 1983). *Medio Ambiente* 11 (2):61-68.
- Naish, K.A.; Warren, M.; Bardakci, F.; Carvalho, G.R. and Mair, G.C. 1995. Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molecular Ecology* 4, 271-274.
- Nei, M: 1971. Interspecific gene differences and evolutionary time estimate from electrophoretic data on protein identity. *The American Naturalist*, Vol. 105, No 949, pp. 385-398.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
- Nei, M. 1977. F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41 : 225-233.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.
- Nei, M. 1987. Genetic distance and Molecular Phylogeny. *Population Genetic and Fishery Management*. p 193-215. N. Ryman and F. Utter, eds. Washington Sea Grant Program. University of Washington Press.
- Nelson, J. 1994. *Fishes of the world*. 3rd Ed. Editado por J. Wiley and Sons, Inc. New York. pp 260.

- Nessbitt, K.A.; Potts, M.B.; Vailancourt, R.E.; West, A.K. and Reid, J.B. 1995. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* 74: 628- 637.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13:121-177.
- Nevo, E.; Belles A. and Ben-Shlomo, R., 1984. Evolutionary dynamics of genetic diversity. *Lecture Notes in Biomathematics*, (Mani, G. S., ed.), 53: 13-213.
- Nocelli, E.; Giovannini, T.; Bioni, M. and Alicchio, R. 1999. RFLP- and RAPD-based genetic relationships of seven diploid species of *Avena* with the A genome. *Genome*, 42 (5): 950-9.
- Ono-Koyanagi, K.; Suga, H.; Katoh, K. and Miyata, T. 2000. Nucleotide, Protein, Books, LinkOut Protein tyrosine phosphatases from amphioxus, hagfish, and ray: divergence of tissue-specific isoform genes in the early evolution of vertebrates. *J Mol Evol.*; 50 (3): 302-11.
- Ornstein, L. and Davis, B.J. 1959. *Disc Electrophoresis*, Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodok Co.).
- Ortubay, S.G.; Semenas, L.G.; Ubeda, C. A.; Quaggiotto, A.E. and Viozzi, G. P. 1994. *Catalogo de peces dulceacuicolas de la Patagonia Argentina y sus parasitos metazoos*. Dirección de Pesca - Ministerio de Economía, Rio Negro (Argentina), 110pp.
- Palumbi, S.R. 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 114 –118.
- Palunbi, S.R. 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 114-118.

- Papasotiropoulos, V.; Klossa-Kilia, E.; Kiliyas, G. and Alahiotis S. 2001. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) using allozyme data. *Biochem Genet*, 39 (5-6):155-68.
- Pascual, R.; Oriega, E.; Gondar, D. and Tonni, E. 1965. Las edades del Cenozoico de la Argentina. *An. Com. Inv. Cient.* 6: 165 – 193.
- Pasteur, N.; Pasteur, G.; Bonhomme, F.; Catalan J. and Britton Davidian J. 1998. Practical isozyme genetics. Ellis Horwood Limited (Publishers-Chichester).
- Pavlov, A.; Ivantsoff, W.; Last, P.R. and Crowley, L.E.L.M. 1988. *Krestratherina brevoristris*, a new genus and species of silverside (Pisces, Atherinidae) with a review of atherinid marine and estuarine genera of southern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 39, 385-397.
- Penner, G.A.; Bush, A.; Wise, K.; Kim, W.; Domier, L.; Kasha, K.; Laroche, A.; Scoles, G.; Molner, S. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Applie* 2: 341-345.
- Phonlor, G. and Vinagre, L.E.C. 1989. Efeito do retarde da primeira alimentação sobre crescimento e a sobrevivencia de larva de *Odontesthes argentinensis* (Cuv. E Val., 1835). *Atlântica*, 11, 63-75.
- Phonlor, G. and Sampaio, L.A. 1992. Effect of salinity on growth and survival of *Odontesthes argentinensis* larvae. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 35, 153-138.
- Phonlor, G. and Cousin, J.C. 1997. Early life history of silverside fishes. In: Subtropical convergence environments: the coast and sea in Southwestern Atlantic (eds. Seeliger U.; Odebrecht C. And castello J.P. pp. 136-141. Springer-Verlag, Berlin.
- Piacentino, G. L. and Torno, A. E. 1987. Osteological observations of the vertebral column in some species of South American Atherinids (Osteichthyes, Atheriniformes). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 22 (2), 93-98.

- Potter, I.C.; Ivantsoff, W.; Cameron, R. and Minard J. 1986. Life cycles and distribution of atherinids in the marine and estuarine waters of southern Australia. *Hydrobiologia*, 139, 23-40.
- Prakash, S.; Lewonin, R.C. and Hubby, J.L. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in Central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61: 841-858.
- Proehl, P.A. 1989. Estudo genético bioquímico dos Peixes Atherinídeos da Lagoa Mangueira (RS-Brasil) Dissertação (Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade do Rio Grande, (Orientador) Jose Alberto Levy
- Proehl, P. A. and Levy J.A. 1989. Genetic study of Atherinidae fishes of Mangueira Lagoon (RS-Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology* 94B(3), 423-426.
- Quiros, R. et al. 1988. Informe técnico Num.1. Serie Informes Técnicos Departamento de aguas continentales. INIDEP. Evaluación del Rendimiento Pesquero potencial de la República Argentina.
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Heredity* 86, 248-249.
- Reddy, K.D.; Nagaraju, J. and Abraham, E.G. 1999 Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity*; 83 (Pt 6): 681-7.
- Renard, P.; Strüssmann, C.A.; Ling, H. and Takashima, F. 1994. Evaluation of extenders for pejerrey *Odontesthes bonariensis* sperm. *Fisheries Science*, 60,661-666.
- Rieseberg, L.H. and Gerber, D. 1995. Hybridization in the Catalina island Mountain mahogany (*Cercocarpus traskiae*): RAPD evidence. *Conservation Biology* 9: 199-203.

- Rieseberg, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interespecific comparasons. *Molecular Ecology* 5: 99- 105.
- Rieseberg, L.H.; Carter, R. and Zona, S. 1990. Molecular test of the hypothesized hybrid origin of two diploid *Helianthus* species (Asteraceae). *Evolution*. 44: 1498-1511
- Ringuelet, R.A. 1943. Piscicultura del pejerrey o aterinicultura. Colección Agro, Editorial Suelo Argentino, pp 162.
- Ringuelet, R.A. y Aramburu R.H. 1960. Peces marinos de la República Argentina. *Agro*, II(5):1-141.
- Ringuelet, R.A. 1962. *Ecología acuática continental*. Eudeba, i-xi, 1-138.
- Ringuelet, R.A. 1967. Peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, pp 467-473.
- Ringuelet, R. A. 1975. Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. *Ecosur*, 2 (3): 1-122
- Roderick, G.H. 1996. Geographic structure of insects populations: Gene flow, Phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 325-352.
- Rousset, F. and Raymond, M. 1995. Testing heterocygote excess and deficiency. *Genetics* 140, 1413-1419.
- Saavedra, J.M. and Piacentino, G.L. 1991. Estadio del desarrollo ontogenetico de odontesthes bonariensis (Cuvier y Valenciennes,1835). *Medio Ambiente (Argentina)*, 11 (2), 61-68.
- Saeed, B.; Ivantsoff, W. and Croley, L.E.L.M. 1994. Systematic relationships of Atheriniform Families within Division of the Series Atherinomorpha (Acanthopterygii) with Relevant Historical Perspectives. *Voprosi Ikhtiol.* 34 ,(4):1-32.

- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.H.; Hain, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sampaio, L.A.N. 1992. Fertilização artificial, incubação e crescimento larval de *Odontesthes sp* e *O. argentinensis*: efeitos da salinidade e densidade de estocagem. MSc Thesis, Fundação Universidade do Rio Grande
- Sanguinetti, C.J.; Neto, E.D. and Simpson, A.J.G. 1994. Rapid Silver Staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio Techniques* 17: 915-918.]
- Sarich, V.M. 1977. Rates, samples size and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. *Nature* 265: 24 - 26.
- Scandalios, J.G. 1979. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: Scandalios, J.G. (ed). *Physiological genetics*. Academic Press, New York: 64-105.
- Schultz, L.P. 1948. A revision of six subfamilies of atherine fishes, with descriptions of new genera and species. *Proceeding of the United States National Museum*, 98, 1-48.
- Schwarzbold, A. and Schaeffer, A. 1984. Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Amazoniana*, 9,81-104.
- Selander, R.K. 1980. Variación genética en poblaciones naturales. En Ayala, F.J. (ed.) *Evolución Molecular* . Omega.
- Shaklee, J.B.; Tamaru, C.S. and Waples, R.S. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*. 36: 141 – 157.
- Shaklee, J.B.; Allendorf, F.W.; Morizot, D.C. and Whitt, G.S. 1990. Gene Nomenclature for Protein-Coding Loci in Fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 119: 2-15
- Shimizu, T.; Taniguchi, N. and Mizuno, N. 1993. An electrophoretic study of genetic differentiation of a Japanese freshwater Goby, *Rhinogobius flumineus*. *Japanese Journal of Ichthyology*, Vol.39, Nº 4:329-343.

- Sinclair, M. and Iles, T.D. 1989 Population regulation and speciation in the oceans. *Journal of Conseil International Exploration Mer*, 45, 165-175.
- Slatkin, M. 1980. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, 99: 323-335.
- Slatkin, M., Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1367.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum protein of normal human adults. *Bioch. J.* 61: 629-640.
- Smithies, O. and Poulik, M.D. 1956. Two dimensional electroph of proteins. *Nature*, 177:1033.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* Freeman W.H. and San Francisco. Ca., pp 573
- Stefano, A.V.; Vissio, P.G.; Paz, D.A.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. and Barrantes, G.E. 1999. Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropins, somatotropin, somatolactin and prolactin expressing cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*. 116(1): 133-139.
- Statsoft 1996. *Statistica for Window. Release 5.0.* Copyright Statsoft. Inc Tulsa, OK7410
- Stott, W.; Ihssen, P.E. and White, B.N. 1997. Inheritance of RAPD molecular makers in lake trout *Salvelinus namaycush*. *Molecular Ecology* 6, 609-613.
- Strüssmann, C.A. and Takashima, F. 1989. PNR, histology and morphometry of starved pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55,237-246.
- Strüssmann, C.A.; Choon, N. B.; Takashima, F. & Oshiro, T. 1993. Triploidy induction in an Atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Progressive Fish-Culturist*, 55, 83-89.

- Strüssmann, C.A.; Takashima, F. and Toda, K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139, 31-45.
- Strüssmann, C.A.; Akaba, T.; Ijima, K.; Yamaguchi, K.; Yoshizaki, G. and Takashima, F. 1997. Spontaneous hybridization in the laboratory and genetic markers for the identification of hybrids between two atherinid species, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) and *Patagonina hatcheri* (Eigenmann,1909). *Aquaculture Research* 28, 291-300.
- Strüssmann, C.A.; Saito T. and Takashima, F. 1998. Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119, 637-644.
- Sullivan, R.M. 1985. Phyletic, biogeographic and ecologic relationships among montane populations of least chipmunks (*Eutamias minimus*) in the southwest. *Syst. Zool.* 34 (4): 419-448.
- Sunnucks, P.; Wilson, A.C.C.; Beheregaray, L.B.; Zenger, P.; French, J. and Taylor A. C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9, 1699-1710.
- Swofford, D.L and Selander, R.B. 1981. Biosys-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis for electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Hered* 72:281-283.
- Takahashi, A. 1993. Peheri no hinshu kairyo - III Kotzatsu nibaitai to kotzatsu sanbaitaigyo schichigyoki no seicho [Improvement of strains of pejerrey - III. Growth of diploid and triploid hybrids during larval and juvenile stages] Kanagawa Prefecture Freshwater Fish Propagation Experimental Station Report, 29, 5-9 (in Japanese).

- Takata, K.; Goto, A. and Yamazaki, F. 1987. Biochemical Identification of a Brackish Water Type of *Pungitius pungitius*, and Morphological and Ecological Features in Hokkaido, Japan. Japanese Journal of Ichthyology, Vol. 34, 2: 176-183.
- Taniguchi, N. and Morita, T. 1979. Identification of European, American and Japanese eels by lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45:37-41.
- Tarling, D.H. 1980. The geological evolution of South America with special reference to the last 200 million years. In: Evolutionary biology of the New World monkeys and continental drift. (eds. Ciochon R.L. and Chiarelli A.B.) pp.1-41. Plenum Press, New York.
- Tejedor, E.D.; Quinteros, I.R.; Antonini de Ruiz, A.G.; Argerich, M.C.; Ballestra, N.A. and Ramina, A.G. 1982. Fraccionamiento electroforético de extracto muscular de pejerrey género *Basilichthys*. Analecta veterinaria (Argentina) 14(1-3),19-33.
- Tejedor, E.D.; Quinteros, I.R.; Antonini de Ruiz, A.G.; Domínguez, M.T. and Ramina, A.G. 1982. Fraccionamiento electroforético de suero de pejerreyes del género *Basilichthys* de Argentina.. Analecta veterinaria (Argentina) 14(1-3), 47-63.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In: Otte, D. and Endler, J.A. (De). Speciation and its Consequences. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, D. 1985. Genetic identification of trout strains. Aquaculture, 46: 341-351.
- Thorpe, J.P. 1979. Enzyme variation and taxonomy: the estimation of sampling errors in measurement of interespecific genetic similarity. Biol. J. Linn. Soc. II: 369-386.
- Thorpe, J.P. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13: 139-168.

- Thorpe, J.P. and Sole- Cava. 1994 . The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool. Scripta* 23: 3-18.
- Tiselius, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of collodal mixtures. *Trans. Faraday Soc*, 33,24.
- Traverso, J.; Ravaglia, M.; Vissio, P.G.; Maggese, M.C. and Paz, D.A. 2001. Distribution of neuropeptide Y neuron and fibers in the brain of the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae). Aceptado con modificaciones a *Anatomía, Histología & Embryologia*.
- Tsuzuki, M.Y.; Aikawa H.; Strüssmann, C.A. and Takashima, F. 2000. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes hatcheri* at different salinities. *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 126-130.
- Tsuzuki, M.Y.; Aikawa H.; Strüssmann, C.A. and Takashima, F. 2001. Physiological responses to salinity increases in the freshwater silversides *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes hatcheri* (Pisces, Atherinidae). *Revista Brasileira de Oceanografia*, 27, 132-137.
- Tulian, E. 1909. Piscicultura argentina. Sus comienzos 1904-1909. *The Standard*, B. Aires, 1-17.
- Uliana, M.A. and Biddle, K.T. 1988. Mesozoic- Cenozoic paleogeographic and geodynamic evolution of southern south America. *Revists Brasileira de Geociencias*, 18, 172-190.
- Valette, L. 1910. La cría del pejerrey. *Bol. Min. Agric.*, B. Aires, XII, (1): 28-53.
- _____ 1924. Servicio de piscicultura. Sus resultados hasta el año 1922 inclusive. *Min. Agric.Gan. e Ind.*, B. Aires, 338:1-64.
- _____ 1933. Racionamiento artificial para el pejerrey cultivado. *Dir. Agric. Gan. E Ind.*, B. Aires, La Plata, 1-66.

- Villwock, J.A. and Tomazelli, L.J. 1995. Geologia costeira do Rio Grande do Sul. Notas Técnicas, 8, 1-45.
- Vissio, P.G.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C.; Strussmann, C.A. and Paz, D.A. 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Fisheries Sciences, vol 63(1), 64-68.
- Vissio, P.G.; Stefano, A.V.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. and Paz, D.A. 1999. Close association among GnRH fibers and GtH, GH, PRL and SL expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Fish Physiology and Biochemistry. 21(2): 121-127.
- Vissio, P.G.; Andreone, L.; Paz, D.A.; Maggese, M.C.; Somoza, G.M. and Strussmann, C. 2002. Relation between the reproductive status and somatolactin cell activity in the pituitary of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Aceptado en Journal of Experimental Zoology.
- Ward, R.D.; Elliot, N.C. and Grewe P.M. 1994. Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. Marine Biology, 118: 531-539.
- Waugh, R. and Powel, W. 1992. Using RAPDs markers for crop improvement trends. Biotechnol. 10: 186-191.
- Weir, B.S. and Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38(6): 1358-1370.
- Weir BS, 1990. Genetic data analysis. Sinauer Publ., Sunderland, MA.
- Welsh, J. and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. Vol. 24: 7213-7218.
- Wilde, J.; Waugh, R. and Powell, W. 1992. Genetic fingerprinting of theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 83: 871- 877.

- William, J.; Kubelik, A.; Livak, K.; Rafalski J.A. and Tingey SV 1990. DNA Polimorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleid Acid Research*. 18: 6531-6535.
- White, B.N. 1985. Evolutionary relationships of the Atherinopsinae (Pisces, Atherinidae). *Contrib. Sci.*, 368: 1-20.
- White, B.N. 1989. Sargentiniinae Risso & Risso, 1953: a family group name senior to Basilichthyini White, 1985 (Pisces, Atherinidae). *Copeia*, 1989, 744.
- Whitlock, M.C. and McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration. *Heredity* 82: 117 – 125.
- William, J.; Kubelik, A. and Livak, K. 1990. DNA Polimorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleid Acid Research*. 18: 6531-6535.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of population. *Ann. Eugen.* 15: 313-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of population*. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chigaco.
- Yang, S.Y.; Soulé, M. and Gorman, G.L. 1974. *Anolis* Lizards of the Eastern Caribbean: A case study in Evolution I. Genetic relationships, phylogeny and colonization sequence of Roquet Group. *Syst. Zool.* 23: 287 - 299.
- Yates, T.L.; Lewis, M.A. and Hatch, M.D. 1984. Biochemical Systematics of three species of catfish (Genus *Ictalurus*) in New Mexico. *Copeia* 1: 97-101.
- Yoshiyama, R.M. 1993. Levels of genetic variability in sculpins (Cottidae: Teleostei) of The North American Pacific coast and assessment of potential correlates. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 275-294.

- Yoshizaki, G.; Yamaguchi, K.; Oota, T.; Strüssmann, C.A. and Takashima, F. 1997. Cloning and characterization of pejerrey mitochondrial DNA and its application for RFLP. *Journal of Fish Biology* 51, 193-203.
- Yu, L-X. and Nguyen, H.T. 1994. Genetic variation detected with RAPDs markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza saliva* L.) *Theoretical and Applied Genetics*:87, 668-672.
- Zagarese, H.E. 1996. Growth of *Odontesthes bonariensis* (Atherinidae) larvae feeding on suboptimal zooplankton densities. *Environmental Biology of Fishes*, 45, 191-198.
- Zaro C.H. 1974. Electroforegramas miogenos de pejerreyes Argentinos. *Neotropica* 20(63), 122-125.
- Zuo, K.J.; Sun, J.Z.; Zhang, J.F.; Nie, Y.C. and Liu, J.L. 2000. Genetic diversity evaluation of some Chinese elite cotton varieties with RAPD markers. *Yi Chuan Xue Bao*; 27 (9): 817-23.