

Tesis Doctoral

# Estructura genética poblacional, historia demográfica y variación fenotípica del róbalo, *Eleginops maclovinus* (Perciformes)

Ceballos, Santiago Guillermo

2011

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ceballos, Santiago Guillermo. (2011). Estructura genética poblacional, historia demográfica y variación fenotípica del róbalo, *Eleginops maclovinus* (Perciformes). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ceballos, Santiago Guillermo. "Estructura genética poblacional, historia demográfica y variación fenotípica del róbalo, *Eleginops maclovinus* (Perciformes)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Estructura genética poblacional, historia  
demográfica y variación fenotípica del róbalo,  
*Eleginops maclovinus* (Perciformes)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Autor: Lic. Santiago Guillermo Ceballos**

Director de tesis: Dr. Daniel Alfredo Fernández

Codirector de beca de postgrado: Dr. Enrique Pablo Lessa

Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-  
CONICET)

Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.

Buenos Aires, 2011.

## **Estructura genética poblacional, historia demográfica y variación fenotípica del róbalo, *Eleginops maclovinus* (Perciformes)**

### **Resumen**

Para comprender los fenómenos involucrados en la evolución de las especies es importante estudiar los patrones de variación geográfica de los atributos genéticos y fenotípicos de las poblaciones. El presente trabajo analiza la estructura genética y la variación fenotípica en el pez marino, *Eleginops maclovinus* (róbalo), una especie endémica del sur de Sudamérica que constituye uno de los recursos marinos costeros de mayor importancia socioeconómica de la región. El estudio genético se realizó con individuos colectados a lo largo de casi todo el rango latitudinal de la especie en la costa atlántica y pacífica. Se obtuvieron secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo b de un total de 261 individuos provenientes de 9 localidades y también se analizaron 9 loci de microsatélites en 239 individuos provenientes de 5 localidades. El estudio de la variación fenotípica se realizó mediante morfometría geométrica en 140 individuos provenientes de 4 localidades ubicadas a lo largo de la costa atlántica. El ADN mitocondrial reveló un patrón general de baja estructuración poblacional y una clara señal de expansión demográfica ocurrida, probablemente, durante el Pleistoceno Medio. El análisis de microsatélites sugirió la existencia de dos grupos genéticos, uno principalmente de origen pacífico y otro atlántico. Considerando ambos tipos de marcadores fue posible modelar la historia de la especie a lo largo de diferentes ciclos glaciares. El estudio fenotípico permitió discriminar todas las poblaciones estudiadas. Futuros análisis serán necesarios para establecer la importancia relativa de los factores ambientales y genéticos en la variación fenotípica.

Palabras clave: *Eleginops maclovinus*, róbalo patagónico, filogeografía, ADN mitocondrial, microsatélites, morfometría geométrica.

## **Geographic genetic structure, demographic history and phenotypic variation of the Patagonian blenny *Eleginops maclovinus***

### **Abstract**

In order to understand the evolution of species it is important to study the patterns of geographic variation in phenotypic and genetic attributes of populations. This Thesis analyzes the genetic structure and phenotypic variation in the marine fish, *Eleginops maclovinus* (sea bass), an endemic species of southern South America and one of the most important coastal marine economic resources in the region. The genetic study was conducted with individuals collected throughout almost the entire latitudinal range of the species in the Atlantic and Pacific coasts. We obtained partial sequences of the mitochondrial gene cytochrome b from a total of 261 individuals from 9 localities, and we also analyzed 9 microsatellite loci in 239 individuals from 5 localities. The study of the phenotypic variation was performed using geometric morphometrics in 140 individuals from 4 localities along the Atlantic coast. The mitochondrial DNA revealed a general pattern of low population structure and a clear signal of population expansion occurred probably during the Middle Pleistocene. The microsatellite analysis suggested the existence of two genetic groups, one mainly from a Pacific origin and the other Atlantic. Taking into account both markers we were able to model the history of the species along different glacial cycles. The phenotypic study was able to discriminate all the populations studied. Future analysis will be required to establish the relative importance of environmental and genetic factors on phenotypic variation.

Key words: *Eleginops maclovinus*, Patagonian blenny, phylogeography, mitochondrial DNA, microsatellites, geometric morphometric.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Daniel Alfredo Fernández por su constante guía y por ayudarme a progresar durante todos estos años. Me considero un afortunado por haber tenido un director como él y por pertenecer a un grupo de trabajo como el del laboratorio de Ecofisiología del CADIC. Quiero agradecer especialmente a Jorge Calvo y a Elba Morriconi porque me permitieron, cuando yo era todavía un estudiante de secundaria, ingresar como ayudante al laboratorio donde hoy, 16 años después, estoy entregando mi tesis doctoral. Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio por la ayuda que me brindaron durante todos estos años: Fabián Vanella, Daniel Aureliano, Sonia Rimbau, Marcelo Gutierrez, María Eugenia Lattuca, Claudia Boy, Claudia Duarte y especialmente a las chicas que tuvieron que soportarme más de cerca Mariela Victorio y Eli Gonzalez.

Durante todo el desarrollo de la tesis tuve el gusto de contar con la co-dirección del Dr. Enrique Lessa quien fue generoso con sus conocimientos y estuvo siempre inmediatamente disponible para cualquier pregunta o corrección. Le agradezco a él y a todo su grupo de trabajo por haberme recibido en el laboratorio de Evolución de la Universidad de la Republica y por haberme ayudado a desempeñar mis tareas allá, en especial a Carolina Abud, Alejandro D'Anatro y Matías Feijoo.

También agradezco enormemente a Roberto Licandeo por su valiosa colaboración en la obtención de muestras que fueron muy importantes para este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a Natalia, a mis amigos y a toda mi familia por el apoyo constante durante todos estos años.

A mis padres

## ÍNDICE

### Capítulo 1. Introducción general.

1.1 Filogeografía.....	8
1.2 Características del róbalo.....	12
1.3 Historia geológica y clima de la región marina patagónica .....	20
1.4 Importancia y objetivos.....	25

### Capítulo 2. Marcadores moleculares mitocondriales

2.1 Introducción.....	28
2.2 Materiales y métodos.....	29
2.3 Resultados.....	34
2.4 Discusión.....	42

### Capítulo 3. Marcadores moleculares nucleares: Microsatélites

3.1 Introducción.....	48
3.2 Materiales y métodos.....	49
3.3 Resultados.....	53
3.4 Discusión.....	69

### Capítulo 4. Morfometría geométrica

4.1 Introducción.....	72
4.2 Materiales y métodos.....	72
4.3 Resultados.....	74
4.4 Discusión.....	82

### Capítulo 5. Discusión general..... 85

Referencias.....	91
------------------	----

Anexo.....	99
------------	----

# CAPÍTULO I

## Introducción General



## 1.1 FILOGEOGRAFÍA

*15 mil millones de años de evolución cósmica  
que transformaron la materia en vida y conciencia.  
Carl Sagan, Cosmos 1980.*

La teoría de la evolución es una de las ideas de la biología más fascinantes y estimulantes intelectualmente. Según esta teoría toda la biodiversidad que actualmente existe sobre la tierra desciende de una misma forma ancestral de vida, mediante procesos y mecanismos de especiación que son el foco de grandes debates. El proceso por el cual una especie evoluciona en dos (especiación) implica, para organismos de reproducción sexual, el desarrollo de algún tipo de mecanismo de aislamiento reproductivo. La especiación puede ocurrir teóricamente en tres contextos geográficos diferentes. Si una nueva especie evoluciona dentro del rango geográfico de su ancestro el proceso se denomina **especiación simpátrica**. Si la nueva especie evoluciona en un rango geográfico contiguo a la especie ancestral se denomina **especiación parapátrica**. Si la nueva especie evoluciona en aislamiento geográfico de la especie ancestral se denomina **especiación alopátrica**. Los modelos de especiación simpátrica implican, generalmente, algún tipo de selección natural disruptiva, por ejemplo en el consumo de dos tipos de alimentos, llevando a la población hacia dos trayectorias evolutivas diferentes. El modelo de especiación parapátrica se plantea en especies que mantienen una distribución continua a través de un abrupto cambio ambiental. La adaptación a las condiciones ambientales en un lado o el otro del ambiente propiciaría la divergencia de los linajes. En el modelo alopátrico la ausencia de flujo génico permitiría gradualmente la aparición de mecanismos de aislamiento reproductivo como una consecuencia de la mutación, la deriva génica y la adaptación a las condiciones ambientales locales. Si posteriormente la barrera geográfica desaparece las poblaciones diferenciadas podrían expandirse hasta generar una zona de contacto secundario o incluso una amplia zona de superposición. Si el aislamiento reproductivo fue completo la selección natural podría incrementar la diferenciación en el uso del hábitat para evitar la competencia. Si, alternativamente, el grado de especiación es solo incipiente y

por lo tanto el aislamiento reproductivo alcanzado es incompleto, y si además la adecuación biológica de los híbridos es menor a la de los progenitores, entonces la selección natural podría favorecer el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo completando el proceso de especiación. Los modelos de especiación simpátrica y parapátrica, aunque teóricamente posibles, son más controvertidos que el modelo alopátrico y cuentan con menos ejemplos en la naturaleza (Coyne & Orr 2004; Ridley 2004).

Un abordaje que puede ser utilizado para intentar comprender los distintos procesos involucrados en la evolución de las especies es el análisis de la variación intraespecífica, ya que es esta variación la que en última instancia se convierte en variación entre especies. Una aproximación posible para el análisis de la variación intraespecífica es la Filogeografía. Esta subdisciplina de la biogeografía consiste en analizar los linajes genealógicos de una determinada especie en el contexto de su distribución geográfica. Los patrones geográficos de variación genética resultantes son en general interpretados a la luz de información sobre comportamiento, caracteres morfométricos, caracteres de historia de vida, relaciones filogenéticas con especies cercanas, paleontología, geología, historia geográfica, etc. El objetivo final de las aproximaciones filogeográficas es inferir las fuerzas históricas y contemporáneas responsables de la actual estructura genética de las poblaciones o de especies cercanamente emparentadas (Avice 2009)

La mayoría de las especies muestran al menos cierto grado de diferenciación genética en relación a su distribución geográfica (Avice 2000). Dichas diferencias pueden atribuirse tanto a procesos actuales como históricos que hayan limitado el flujo génico o a diferentes regímenes de selección natural. A nivel multiespecífico las aproximaciones filogeográficas son útiles para detectar aquellos procesos que han tenido un efecto generalizado sobre los ecosistemas o comunidades bióticas de la región. Muchas especies con distribución y características ecológicas parecidas tienden a mostrar historias demográficas y estructuras poblacionales semejantes sugiriendo que las fuerza biogeográficas históricas han concordantemente moldeado la estructura genética de biotas regionales particulares (Bermingham & Moritz 1998; Lessa et al. 2003; Avice 2009).

Los cambios climáticos ocurridos durante el Cuaternario constituyen uno de los principales procesos naturales a los cuales se les atribuye haber tenido un efecto importante sobre la actual arquitectura genética de las poblaciones, en particular en zonas de alta latitud. Estos eventos climáticos pueden ser vinculados a cambios demográficos en el pasado ya que si las variaciones en el tamaño poblacional son grandes, estas dejan improntas genéticas en las poblaciones que, en algunos casos, pueden ser datadas si se dispone de una estimación de la tasa de mutación. La visión clásica propone que durante los periodos fríos se habría producido una retracción hacia menores latitudes de la biota en general donde habrían permanecido diferentes refugios o poblaciones aisladas (favoreciendo la divergencia genética en condiciones alopátricas) a partir de las cuales se habría producido la recolonización hacia latitudes mayores durante los periodos cálidos. El efecto de los ciclos glaciales sobre los patrones filogeográficos han sido bien documentados para la flora y fauna terrestre de agua dulce en el hemisferio norte. Estudios recientes muestran que muchos de los patrones filogeográficos de diferentes especies terrestres y de agua dulce reflejan las consecuencias de una recolonización posterior al último máximo glacial hace aproximadamente 20.000 años (Hewitt 2004).

La Patagonia es una de las áreas del continente americano menos estudiada a nivel filogeográfico, sin embargo en los últimos años se acumuló cierta cantidad de información sobre varios organismos, principalmente terrestres y de agua dulce (revisado en Sérsic et al. 2011). Aunque algunos de estos organismos muestran patrones de expansión que se corresponderían con el final de la última glaciación, muchos otros habrían experimentado expansiones demográficas más antiguas atravesando con relativa estabilidad demográfica la última glaciación (Ruzzante et al. 2008; Pardiñas et al. 2011). Asimismo, diferentes procesos y direcciones de expansión de rango sugieren patrones filogeográficos más complejos que el patrón norte-sur que se propone tradicionalmente (Sérsic et al. 2011).

Estudios recientes muestran que las fluctuaciones climáticas durante el cuaternario también tuvieron un impacto importante sobre las especies marinas, principalmente las costeras, aunque este fenómeno fue registrado principalmente en el hemisferio norte (Maggs et al. 2008; Liu et al. 2011; Wilson & Eigenmann 2011). En la zona más austral de Sudamérica, correspondiente a

la región patagónica, los estudios filogeográficos sobre organismos marinos costeros son muy escasos y están, generalmente, restringidos a uno de los márgenes costeros de la Patagonia, el Atlántico o el Pacífico. Estos estudios fueron realizados en mamíferos marinos (Túnez et al. 2007; Pimper et al. 2010; Feijoo et al. 2011), lapas (de Aranzamendi et al. 2011; González Wevar et al. 2011), gasterópodos (Cárdenas et al. 2009; Sánchez et al. 2011), cefalópodos (Ibáñez et al. 2011) y macroalgas (Fraser et al. 2010; Macaya & Zuccarello 2010). Sin embargo, hasta el momento, según el conocimiento del autor, no se cuenta con estudios filogeográficos en peces marinos de las costas patagónicas (además del presente trabajo).

Una característica común a muchas especies marinas es el bajo nivel de diferenciación genética entre poblaciones. Este hecho, generalmente atribuido a la ausencia de barreras físicas al flujo génico y a la gran capacidad dispersiva de organismos marinos, ya sea en una fase larval o adulta, ha llevado a la concepción de que las poblaciones de organismos marinos son demográficamente abiertas y típicamente panmícticas a lo largo de grandes áreas del océano (Ward et al. 1994; Waples 1998; Avise 2000). Sin embargo, trabajos recientes, utilizando marcadores moleculares con mayor poder de resolución (generalmente microsatélites), cuestionan esta concepción ya que encuentran en peces marinos unidades genéticas a diferentes escalas geográficas (Hauser & Carvalho 2008; Knutsen et al. 2011).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DEL RÓBALO

### *Distribución y hábitat*

El róbalo, *E. maclovinus* (Cuvier & Valenciennes 1830), es uno de los peces marinos más conocidos y característicos de las costas de la región patagónica. Esta especie, endémica de las aguas templadas y subantárticas del sur de Sudamérica, tiene una distribución latitudinal muy extensa en el Océano Pacífico desde Valparaíso, Chile (33°S) (Pequeño 1989), hasta el extremo sur del archipiélago fueguino (~56°S), y en el Océano Atlántico hasta el Golfo San Matías, Río Negro, Argentina (40°S) (Cousseau & Perrotta 2000) incluyendo también el archipiélago de las Islas Malvinas (Figura 2.1). Si bien ésta constituye el área principal de distribución geográfica de la especie, existen reportes ocasionales de capturas en Mar del Plata, Buenos Aires (comunicación personal con pescadores de la zona) e incluso aun más al norte en aguas Uruguayas (Lopez 1963 citado en Licandeo et al. 2006).

Se trata de una especie euritérmica que debido a su amplia distribución soporta un gran espectro de temperaturas que rondan los 20°C, al norte de su distribución, hasta un mínimo de 4°C en aguas del Canal Beagle. Batimétricamente es considerado un pez estrictamente costero que pasaría la mayor parte de su vida en aguas de profundidades menores a los 50 m, aunque ocasionalmente se lo ha capturado en profundidades de hasta 250 m (Gosztanyi 1980; Brickle et al. 2005b). La presencia de adultos y juveniles es también muy común en estuarios y en la boca de los ríos por lo que es considerado un pez eurihalino.

### *Taxonomía*

*E. maclovinus* es el único representante de la familia Eleginopidae, perteneciente al suborden [Notothenioidei](#) (comúnmente llamados Nototénidos) del orden Perciformes (Teleostei: Acanthomorpha). Los Nototénidos son considerados un grupo monofilético (Near & Cheng 2008) compuesto por 131 especies, 44 géneros y 8 familias (J. T. Eastman 2010, lista de especies de nototénidos: <http://www.oucom.ohiou.edu/dbms-eastman/Articles/Noto->

[valid\\_spp\\_list.pdf](#)). Todos los nototénidos carecen de vejiga natatoria y son en general de hábitos bentónicos, aunque presentan una gran diversidad ecológica y morfológica (Eastman 1993). Del total de especies, 104 se distribuyen exclusivamente en aguas antárticas mientras que las restantes 27 en aguas templadas y subantárticas. La familia del róbalo, Eleginopidae, junto con las familias, Pseudaphritidae y Bovichtidae son los tres linajes de más temprana divergencia dentro de los nototénidos y contienen 13 especies, todas ellas con distribución extra antártica (excepto una especie de Bovichtidae). Las restantes 5 familias, conocidas como “el clado antártico”, contienen 123 especies, la gran mayoría de ellas con distribución exclusivamente antártica (Figura 1.1). El clado antártico constituye uno de los ejemplos más claros de radiación adaptativa en vertebrados que resultó en la dominancia de los nototénidos en la diversidad (76.6%), abundancia (91.6%) y biomasa (91.2%) de peces de la plataforma continental Antártica (Eastman 2005). El gran éxito de los nototénidos en la Antártida es generalmente atribuido a la presencia de glicoproteínas anticongelantes (AFGPs: Antifreeze glycoproteins) en casi todos los nototénidos antárticos, presumiblemente presentes también en el ancestro común al clado antártico, y que habría permitido la colonización de las aguas con temperaturas bajo cero, y posterior radiación en ausencia de otros grupos competidores (Chen et al. 1997; Matschiner et al. 2011). En la actualidad se postula también que otros factores históricos podrían haber tenido igual importancia en el éxito de los nototénidos en la Antártida (Near et al. en prensa).

El róbalo es considerado de gran interés para comprender la diversificación de los nototénidos en la Antártida ya que, como grupo hermano del clado antártico, representa el “punto de partida” de la radiación de los nototénidos antárticos, es decir, podría presentar muchas características del estado ancestral a la radiación (Eastman & Lannoo 2008).

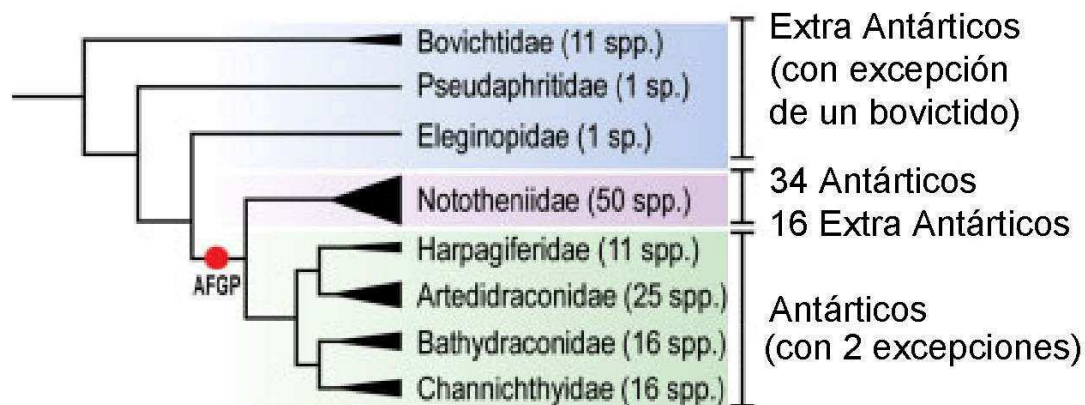


Figura 1.1. Relaciones filogenéticas entre las distintas familias de nototénidos inferidas a partir de la secuencia completa del gen mitocondrial 16S rRNA (Near 2004). Modificado de Eastman y Lannoo 2008. AFGP: proteínas anticongelantes.

### Descripción general

*E. maclovinus* es un nototénido relativamente grande (alcanza un tamaño de 80 a 90 cm de talla máxima). Su cuerpo es fusiforme, robusto y ligeramente comprimido, cubierto con grandes escamas levemente ctenoideas (pseudocicloideas). La cabeza y los ojos son relativamente pequeños, con hocico corto y romo. La boca es terminal, pequeña y protráctil bordeada por labios finos. Posee dos aletas dorsales que se encuentran próximas entre sí y la aleta caudal es truncada. Presenta una sola línea lateral, característica que lo distingue del resto de los nototénidos de la región. El color es oliva oscuro en el dorso aclarándose hacia los costados y blanco en el vientre (Gosztonyi 1980; Cousseau & Perrotta 2000; Bovcon & Cochia 2007).



**Foto 1.1. Ejemplar adulto de *E. maclovinus* de unos 30 cm de largo total capturado en las cercanías de la localidad de Río Gallegos, Santa Cruz.**

### *Edad y crecimiento*

El róbalo es una especie de crecimiento rápido, especialmente en los primeros años de vida, durante los cuales puede aumentar su tamaño a razón de 110 mm al año. Los ejemplares más longevos encontrados llegan a 11 años de edad con una talla máxima de alrededor de 90 cm de longitud total. Sin embargo, existen varios trabajos que analizan la relación entre edad y crecimiento en distintos puntos de la distribución del róbalo y que ponen de manifiesto claras diferencias en las curvas de crecimiento y en las tallas y edades máximas (Tabla 1.1 y Figura 1.3).

### *Reproducción*

*E. maclovinus* es un pez hermafrodita secuencial protándrico, es decir que durante su ciclo de vida primero madura sexualmente como macho y en determinado momento de su desarrollo experimenta una reversión sexual, en la cual las gónadas se reestructuran de testículos a ovarios transformándose en hembra. Este fenómeno, inicialmente descrito en la población del Canal Beagle (Calvo et al. 1992), fue registrado en distintas zonas a lo largo de su distribución, incluyendo Islas Malvinas (Brickle et al. 2005b), Río Valdivia (Licandeo et al. 2006) y Golfo San Matías (Gastaldi et al. 2009). En estos estudios la talla y edad a la que se estimó la reversión sexual, definidas como el punto en el cual el 50% de la población son hembras, variaron según la zona de estudio entre 35 y 53 cm de largo total, y entre los 2 y 6 años de edad.

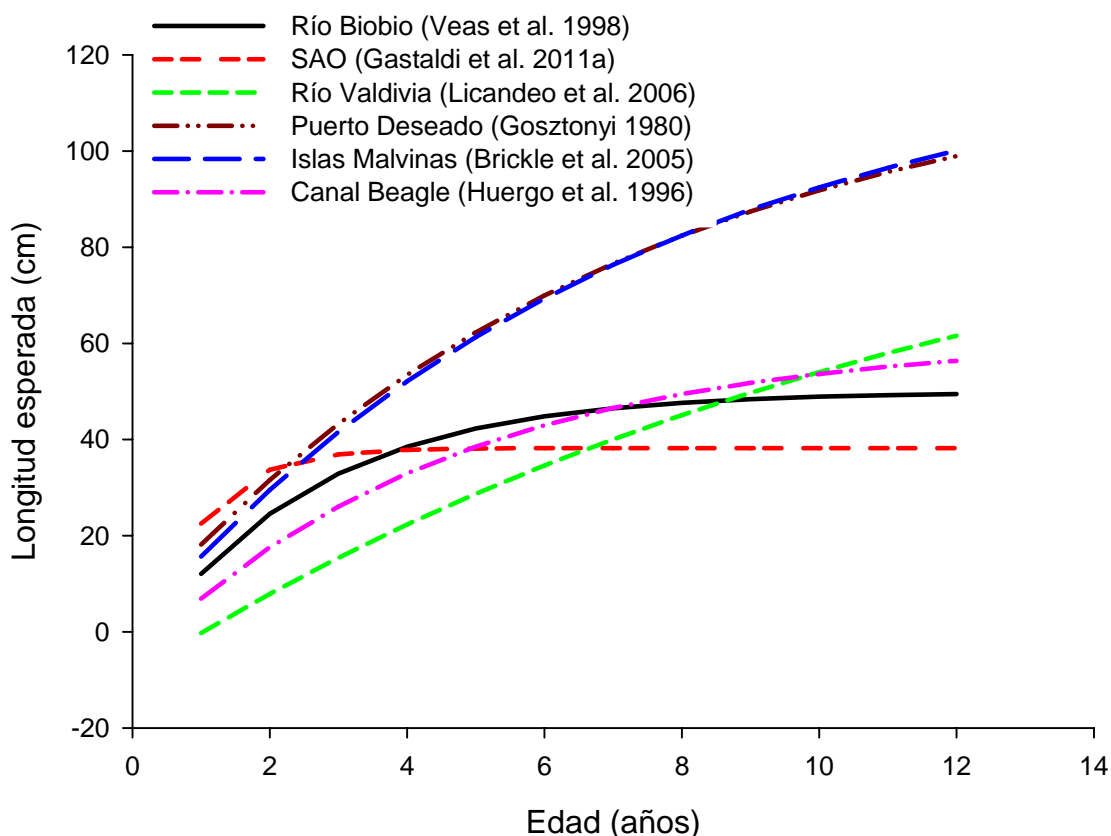


El ciclo reproductivo anual también varió según el área de estudio, siendo la época de desove estimada para otoño/invierno en el Golfo San Matías (Gastaldi et al. 2009), invierno/primavera en Puerto Deseado (Gosztonyi 1980) y primavera en Islas Malvinas (Brickle et al. 2005b). En este último sitio se sugiere la existencia de un pico menor de desove en mayo.

El róbalo estaría caracterizado por una alta fecundidad y pequeños huevos pelágicos y, mientras que las aguas costeras serían utilizadas principalmente para alimentación, el desove podría ocurrir en aguas más profundas (30-100 metros de profundidad) (Gosztonyi 1980; Brickle et al. 2005b). Sin embargo, Panoso et al. 1996 (citado en Licandeo et al. 2006) reportan que el róbalo desova en zonas estuariales en Chile central.

Lugar	Latitud	$L_{\infty}$ inf	K	$T_0$	n	Lmax	Amax	$L_{50}$	$A_{50}$
Río Biobio (1)	38°S	49.93	0.4	-0.31	126	60	6	<b>38</b>	<b>4</b>
SAO(2)	40°S	38.2	1.252	-0.29	471	53	5	34.9	2
Río Valdivia (3)	40°S	105.4	0.08	-1.03	261	79	10	35.7	4.5
Pto. Deseado(4)	47°S	121	0.14	0.16	191	78	8	----	----
Is. Malvinas(5)	51°S	124.4	0.136	-0.01	1403	90	11	53	<b>4.2</b>
Canal Beagle(6)	54°S	61.36	0.217	-0.45	682	70	8	43	<b>6</b>

Tabla 1.1. Se muestran los principales parámetros de crecimiento de la ecuación de von Bertalanffy y de reversión sexual:  $L_{\infty}$  = largo asintótico promedio, K = constante de crecimiento,  $T_0$  = edad a largo 0, n = número de individuos analizados, Lmax = largo máximo registrado, Amax = edad máxima registrada,  $L_{50}$  y  $A_{50}$  = largo y edad en el que el 50% de los individuos son hembras. Los valores en rojo fueron estimados en el presente trabajo a partir de datos de la bibliografía. 1: (Veas 1998), 2: (Gastaldi et al. 2009), 3: (Licandeo et al. 2006), 4: (Gosztonyi 1980), 5: (Brickle et al. 2005a), 6: (Calvo et al. 1992; Huergo et al.).



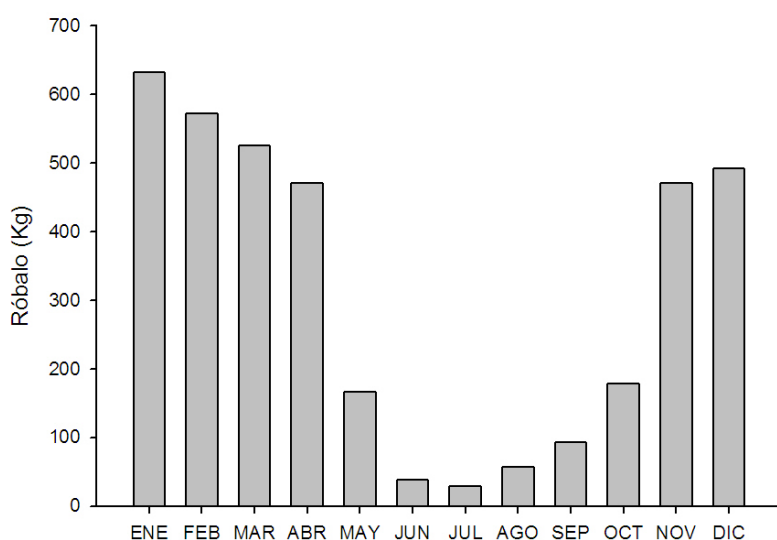
**Figura 1.3. Curvas de crecimiento en distinto puntos de la distribución del róbalo estimadas a partir de los anillos anuales de los otolitos. Abreviaciones: San Antonio Oeste (SAO).**

#### *Variación geográfica de los caracteres de historia de vida*

Algunos autores postulan que las diferencias en las tallas y edades máximas así como las de reversión sexual serían consecuencia de un efecto ambiental, sobre el cual podrían estar también actuando factores de origen antrópico, como la actividad pesquera (Gastaldi et al. 2011; Licandeo et al. 2006). En este sentido argumentan que las especies hermafroditas secuenciales serían más susceptibles que las dioicas a la sobre pesca o la pesca selectiva por tallas, por lo que un cambio de sexo a una menor talla (o edad) podría ser una estrategia reproductiva exitosa en las zonas donde la actividad pesquera es más intensa.

La época del año en que se producen las mayores capturas de róbalo en la costa también varía geográficamente. Mientras que en el Golfo San Matías la

temporada de mayor pesca comienza en mayo y continúa hasta fin del invierno (Gastaldi et al. 2009), en el sur de la Patagonia, en las provincias de Santa Cruz (Gonsztonyi 1980) y Tierra del Fuego (Figura 1.4) las máximas capturas se registran entre los meses de noviembre y abril con un marcado descenso en la época invernal. Aunque estos datos no están corregidos por el esfuerzo pesquero, la experiencia acumulada en el equipo de trabajo del laboratorio de Ecofisiología del CADIC en muestreo de róbalo en distintos momentos del año avala este resultado (datos no publicados).



**Figura 1.4. Promedio de captura en cada mes entre los años 2005 y 2009. Datos obtenidos del parte de pesca artesanal de la provincia de Tierra del Fuego.**

### *Alimentación*

La dieta del róbalo se estudió en varios puntos de su distribución. Estos trabajos coinciden en caracterizar a esta especie como un predador de amplio espectro que se alimenta de gran variedad de algas e invertebrados del bentos (principalmente crustáceos y poliquetos) (Isla & San Román 1995; Pavés et al. 2005; Licandeo et al. 2006; Martin & Bastida 2008; Gastaldi & González 2009). Asimismo, algunos de estos trabajos concuerdan en que existiría un cambio ontogenético en la alimentación de esta especie, pasando de una dieta más carnívora en los estadios juveniles a una dieta más omnívora en el estadio adulto (Licandeo et al. 2006; Gastaldi & González 2009).

*Valor como recurso*

El róbalo es uno de los pocos peces costeros sometidos a explotación en la región patagónica. Si bien no constituye un porcentaje importante de los desembarques totales de peces a nivel nacional, a nivel regional es el principal pez sustentador de la pesca artesanal (seguido por el pejerrey).

Año	Róbalo(Kg)	Total (Kg)	% Total
2009	6179	8266	74,8
2008	5435	7373	73,7
2007	2404	2982	80,6
2006	3173	4186	75,8
2005	1424	2426	58,7
Promedio	-----	-----	72,72

**Tabla 1.5. Captura anual de róbalo. Datos obtenidos del parte de pesca artesanal de la provincia de Tierra del Fuego.**

El róbalo es además una especie de importancia deportiva y social que fomenta el turismo en la región. Las ciudades de Río Grande (Tierra del Fuego) y Puerto Santa Cruz (Santa Cruz) celebran en diciembre y febrero respectivamente la Fiesta Provincial del Róbalo, un evento deportivo, artístico, turístico y cultural, que incluye muestras artesanales, recitales, la elección de la reina de la festividad y el concurso de pesca “12 horas del róbalo” que convoca cada año más aficionados de la pesca de la región y del país. La Fiesta del Róbalo concita el interés de la comunidad, donde se promueve el amor por lo autóctono y regional, difundiendo el arte y las costumbres tradicionales (datos tomados de la página del gobierno de la Provincia de Santa Cruz: <http://santacruzpatagonia.gob.ar>).

### 1.3 HISTORIA GEOLÓGICA Y CLIMA DE LA REGIÓN MARINA PATAGÓNICA

La paleogeografía y paleoclimatología de la Patagonia proveen el marco necesario para comprender los actuales patrones de biodiversidad de la región. La Patagonia, región más austral de Sudamérica, es la única masa de tierra continental en el mundo (excepto la Antártida) que se extiende más al sur de los 40°S. El clima en Patagonia sufrió variaciones significativas durante el Cenozoico, particularmente desde el Mioceno. Las glaciaciones fueron frecuentes en esta región durante el Plioceno y el Pleistoceno. Los episodios de glaciación fueron suficientemente grandes como para permitir la formación de una placa de hielo continua entre 36° y 56°S, con una extensión de casi 2500 km, que cubrió completamente los andes patagónicos y se extendió más allá de los pies de las montañas hacia el este (y hasta la actual plataforma submarina al sur de Río Gallegos) y hasta el nivel del mar en el lado pacífico (Figura 1.5). La “Gran Glaciación Patagónica” (GGP) que representa el máximo de expansión del hielo en la Patagonia extra andina se desarrolló en algún momento entre 1.1 y 1 millón de años (Rabassa 2008). Luego de la GGP existe evidencia de al menos 4 episodios principales de glaciación: Post-GGP 1, 2, 3 y la última glaciación (UG) (siguiendo la nomenclatura de Coronato et al. 2004). Post-GGP 1 probablemente ocurrió antes del límite entre el Pleistoceno Medio y el Pleistoceno Temprano ( > 710Ka antes del presente). Post-GGP 2 alcanzó su mayor avance glacial hace ~ 260 ka (Hein et al. 2009) y post-GGP 3 hace ~ 145 ka (Kaplan et al. 2005) durante el Pleistoceno Medio. La última glaciación, desarrollada durante el Pleistoceno tardío, alcanzó su máximo (UMG) hace aproximadamente 25 Ka y terminó hace 15 Ka (Rabassa 2008).

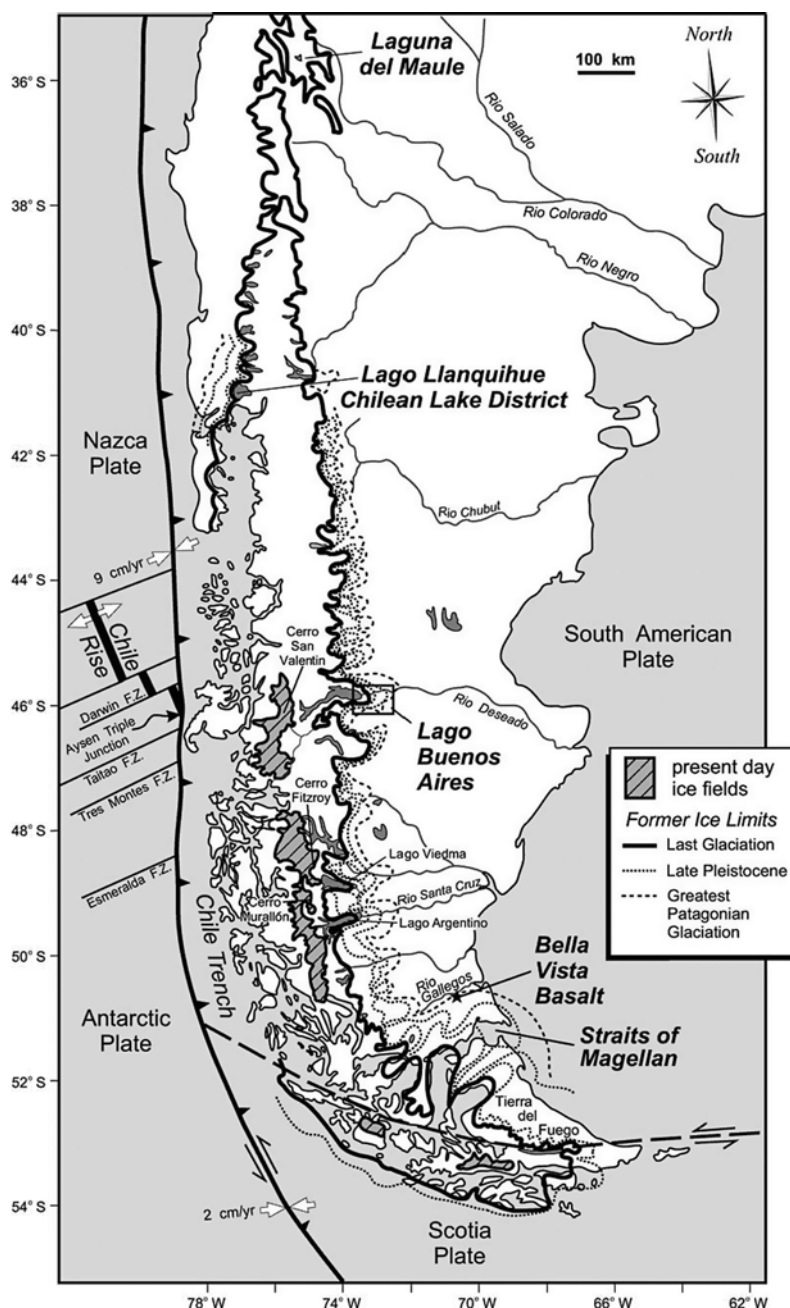
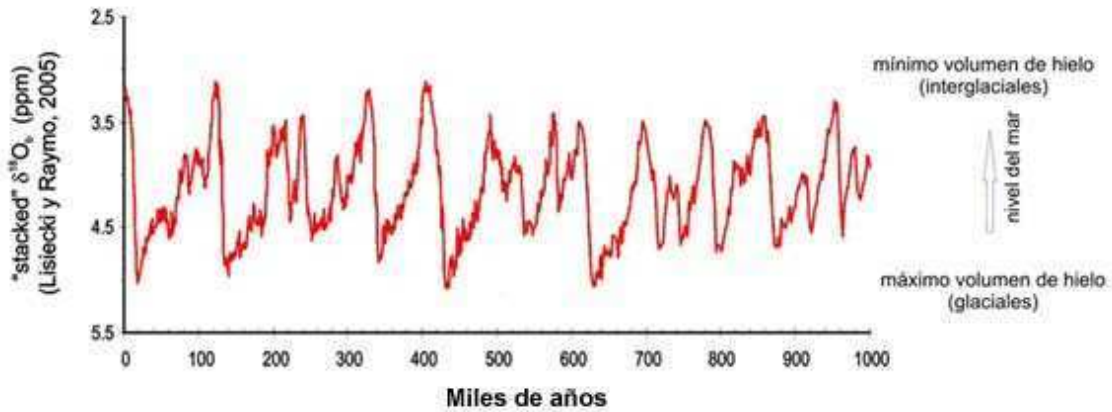


Figura 1.5. Mapa de la Patagonia con la posición y distribución de las placas de hielo durante el Pleistoceno. Del lado chileno el hielo alcanzó las aguas del Océano Pacífico al sur de los 44°S (sur de la isla Chiloé). Del lado argentino al sur de Río Gallegos el hielo se extendió sobre la actual plataforma submarina durante la Gran Glaciación Patagónica y glaciaciones del Pleistoceno Medio. Tomado de Rabassa et al. (2008).



**Figura 1.6. Registro climático mediante la señal isotópica  $\delta^{18}\text{O}$  de sedimentos marinos. Los eventos glaciales (altos valores de  $\delta^{18}\text{O}$ ) e interglaciales (bajos valores de  $\delta^{18}\text{O}$ ) (modificado de Lisiecki & Raymo 2005).**

Los periodos de glaciación (Figura 1.6) fueron acompañados por importantes descensos del nivel del mar, entre -120 y -140 m respecto del nivel actual, dejando expuestas grandes extensiones de la plataforma continental argentina (Rabassa 2008). Debido a que las variaciones en el nivel del mar probablemente hayan sido muy similares en cada ciclo glacial-interglacial durante el último millón de años, el modelo paleogeográfico que se presenta en la figura 1.7 con la posición de la línea de costa para la última glaciación, podría ser aplicado para cualquiera de las glaciaciones previas (Ponce et al. 2011) y por lo tanto utilizado para discutir distribuciones paleobiogeográficas en Patagonia durante la mayor parte del Pleistoceno.

Las condiciones oceanográficas actuales se muestran en la figura 1.8.

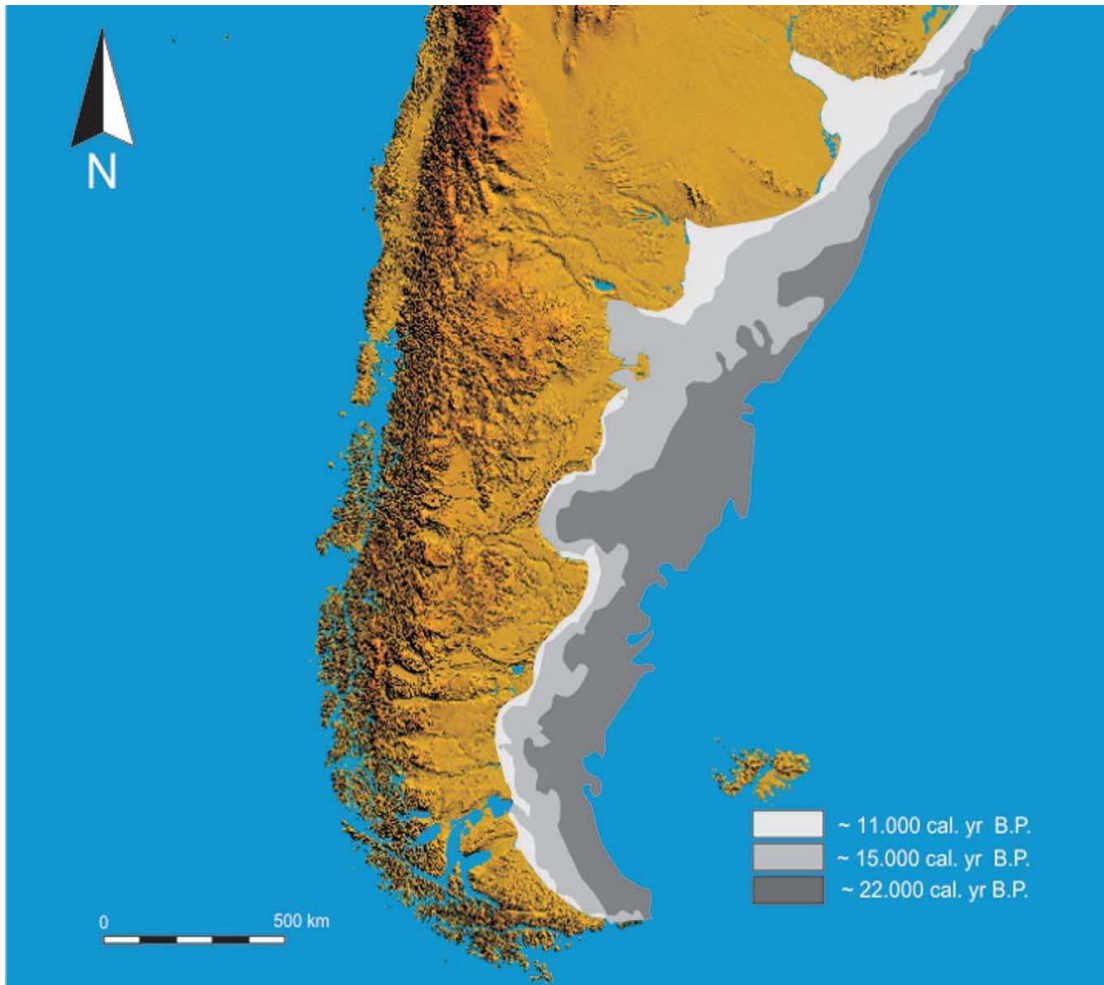


Figure 1.7. Posición de la línea de costa en momentos de aparente estabilidad del nivel del mar. Tomado de Ponce et al. (2011).



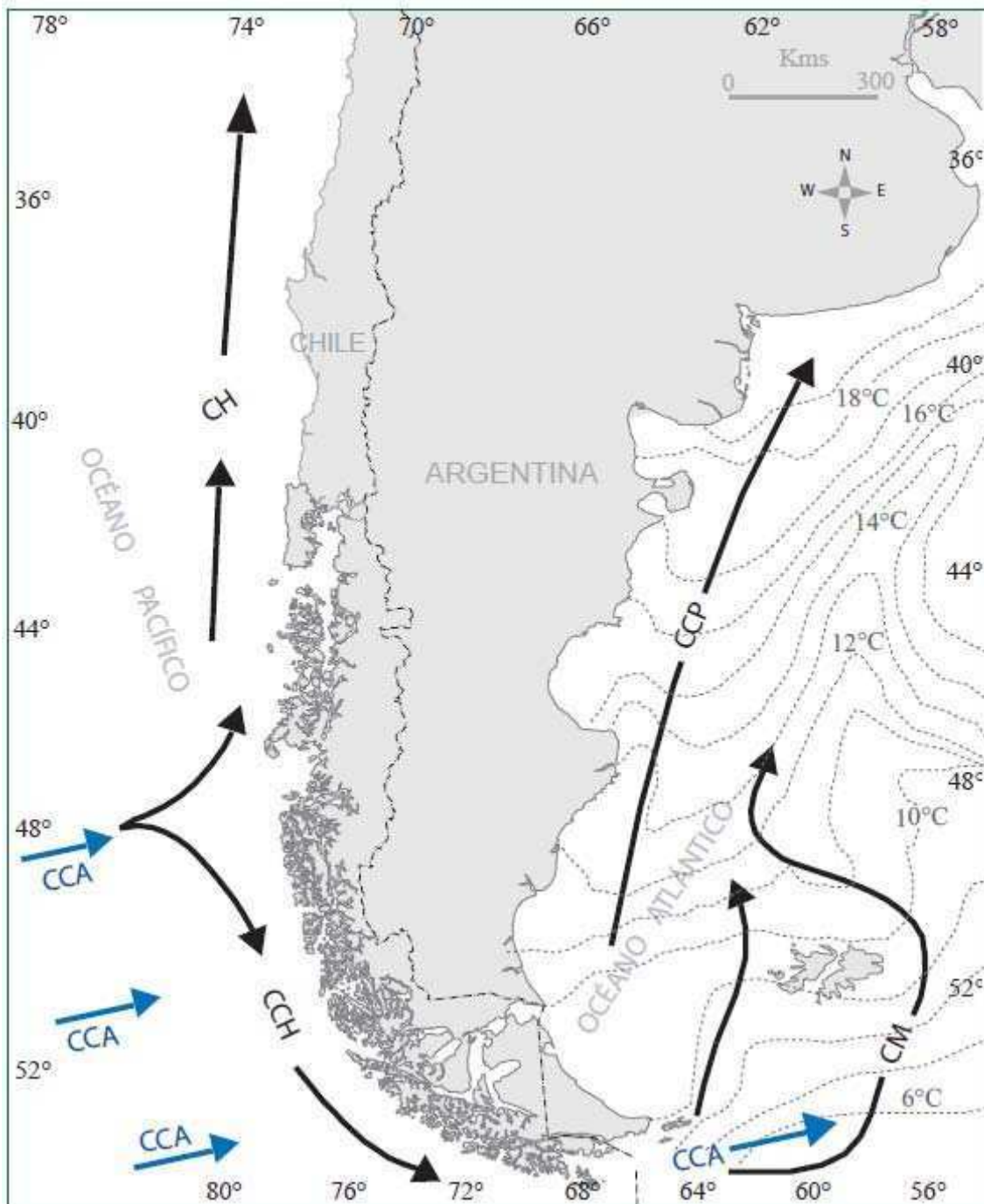


Figura 1.8. Condiciones Oceanográficas actuales. Temperatura del agua en verano y principales corrientes marinas en Patagonia: Corriente Circumpolar Antártica (CCA), Corriente de Humboldt (CH), Corriente del Cabo de Hornos (CCH), Corriente de Malvinas (CM), Corriente Costera Patagónica (CCP).

## 1.4 IMPORTANCIA DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

El róbalo (*Eleginops maclovinus*) es un pez marino costero de gran importancia ecológica y socioeconómica en la región patagónica. A pesar de esto no existían, previos a este trabajo, esfuerzos por caracterizar genéticamente las poblaciones de esta especie a lo largo de su distribución geográfica. Este tipo de estudios aportan información sobre la estructura y dinámica de las poblaciones que resulta fundamental para el desarrollo de estrategias de conservación y manejo.

La distribución del róbalo a lo largo de un amplio gradiente latitudinal, tanto en la costa Pacífica como Atlántica de la Patagonia, en una zona que fue intensamente afectada por los ciclos glaciares durante el cuaternario, ofrece además una oportunidad para estudiar los fenómenos de diferenciación poblacional en respuesta a la variación ambiental. Los dos márgenes costeros de la Patagonia, el Atlántico y el Pacífico, aunque con muchas características diferentes, son prácticamente paralelos en dirección norte-sur y en este sentido constituyen dos “réplicas” de un escenario simple para estudiar el efecto de las glaciaciones sobre los organismos marinos costeros. Esta ventaja geográfica de la Patagonia fue poco aprovechada ya que no existen trabajos que analicen la variación genética en una misma especie a lo largo de ambas costas.

En este contexto se plantearon los siguientes objetivos:

### Objetivos generales:

Evaluar cómo han respondido las poblaciones de peces a la variación ambiental asociada a un extenso gradiente latitudinal, tanto en términos de su estructura genético-poblacional como en cuanto a la variación fenotípica. A largo plazo, contribuir al conocimiento de los fenómenos de diferenciación (y en última instancia especiación) en respuesta a la variación ambiental. Finalmente se pretende aportar información de base necesaria para el manejo y la conservación de una de las especies de mayor importancia ecológica y socio-económica de la región.

Principales objetivos específicos:

- 1) Determinar la variabilidad genética y su estructuración geográfica en *E. maclovinus* a lo largo de todo el rango latitudinal de la especie en la costa Atlántica y Pacífica mediante:
  - a) El análisis de secuencias de ADN mitocondrial.
  - b) El análisis de *loci* de microsatélites.
- 2) Evaluar la variación fenotípica en distintos puntos de la distribución geográfica de *E. maclovinus* mediante el estudio de la forma general del cuerpo utilizando técnicas de morfometría geométrica.
- 3) Integrar los resultados para realizar inferencias sobre la historia demográfica de la especie y su relación con los ciclos climáticos del Cuaternario.

## CAPÍTULO 2

### Marcadores moleculares mitocondriales

## 2.1 Introducción

Los marcadores moleculares mitocondriales son generalmente utilizados como una primera aproximación al estudio de la estructura poblacional y filogeografía de las especies, ya que presentan algunas ventajas respecto de los marcadores nucleares. En primer lugar, existen en copias múltiples dentro de cada célula eucariota lo que facilita su extracción y posterior amplificación por PCR. En segundo lugar poseen, típicamente, tasas de mutación varias veces mayores que las de los genes nucleares por lo que son muy informativos, en particular para el estudio de linajes genéticos que han divergido recientemente. En tercer lugar se heredan de manera haploide, sin recombinación (aunque hay excepciones), generalmente por vía materna, lo que permite generar filogenias intraespecíficas (filogenia de genes) que pueden ser interpretadas como el linaje materno del pedigree de un organismo.

Originalmente el estudio del ADN mitocondrial en el presente trabajo se había planteado a partir de secuencias de la región de control. Se intentó amplificar esta zona utilizando una batería de diferentes *primers*, ya sean generales para peces como específicos diseñados a partir de secuencias disponibles de róbalo. Se probaron muchas condiciones de PCR diferentes variando la temperatura y las concentraciones de los reactivos pero sin éxito, por lo que finalmente se decidió seguir adelante utilizando las secuencias de Cyt b (como se detalla más abajo). Investigadores italianos encontraron la misma dificultad con la región de control de róbalo, por lo que secuenciaron el genoma mitocondrial completo excepto esa región (Papetti et al. 2007). Finalmente, en un trabajo posterior (Zhuang & Cheng 2010) se logró secuenciar la región de control. En la misma se encontró una región repetitiva de 288 pb de longitud (tacatata x 36; N°acceso GB GU214211.1). Esta podría ser la razón por la cual no se tuvo éxito al intentar amplificar la región de control.

## 2.2 Materiales y métodos

### *Obtención de muestras*

Se colectaron ejemplares de róbalo en 9 localidades distribuidas a lo largo de la costa argentina y chilena, abarcando casi todo el gradiente latitudinal en que se distribuye la especie (Figura 2.1). En los sitios de muestreo San Antonio Oeste, Puerto Madryn, San Julián, Rada Tilly y Canal Beagle la pesca se realizó con redes de arrastre costero (Foto 2.1) obteniéndose mayormente ejemplares juveniles. En Punta María se utilizaron redes de enmalle agalleras caladas en la zona intermareal, mientras que en las 3 localidades chilenas (Concepción, Puerto Montt y Puerto Aysén) la pesca se realizó con redes de enmalle agalleras caladas desde pequeñas embarcaciones.



**Foto 2.1. Pesca en el Canal Beagle con redes de arrastre costero.**

Tanto en Punta María como en las localidades chilenas se obtuvieron individuos de mayores tallas que en general eran adultos. En el laboratorio se obtuvieron las medidas de Largo total (LT), Largo estándar (LS) y Peso total (PT) de los ejemplares. A cada individuo se le tomó una muestra de aproximadamente 1 gr de músculo rápido (*fast twitch* o blanco) tomado de uno de sus flancos. Los tejidos se colocaron en tubos plásticos de 2 ml con alcohol 99% y se conservaron en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar la extracción de ADN. El instrumental de disección y los tubos plásticos utilizados fueron esterilizados previamente a la obtención de cada muestra para evitar

contaminación cruzada entre las mismas o con otras fuentes ambientales de contaminación.

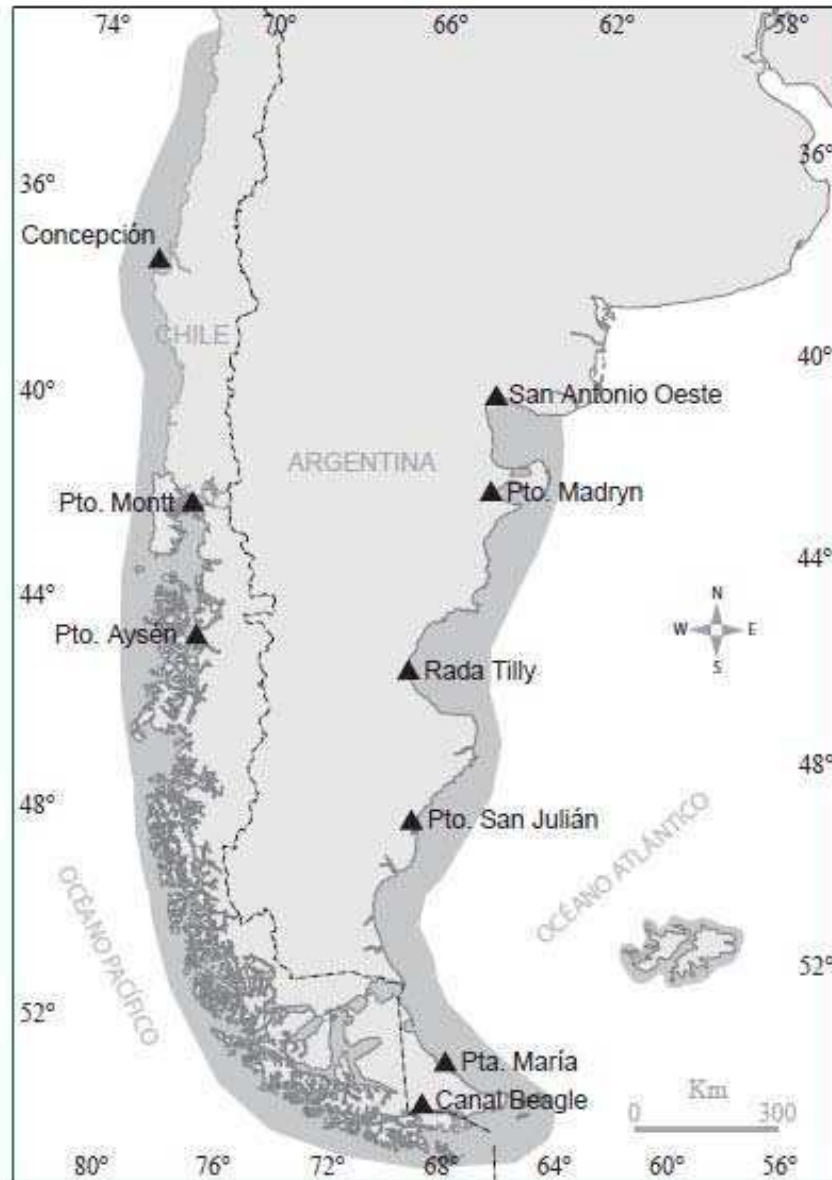
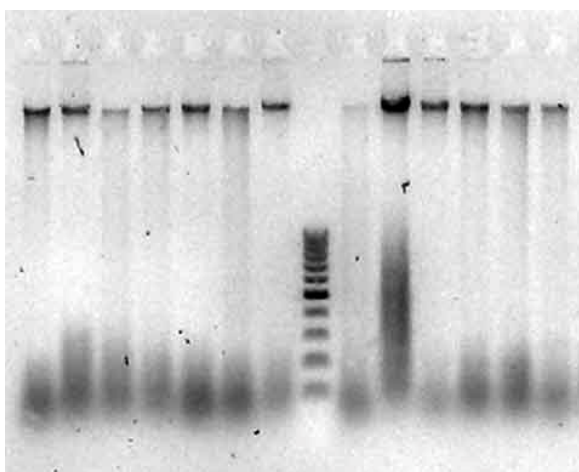


Figura 2. 1. Mapa del sur de Sudamérica donde se indican los puntos de muestreo de ejemplares de *E. maclovinus* a lo largo de todo el rango latitudinal de distribución de la especie: San Antonio Oeste (Lat 40° 43'S, Long 64° 57'O), Puerto Madryn (Lat 42° 46'S, Long 65° 00'O) Rada Tilly (Lat 45° 56'S, Long 67° 32'O), Puerto San Julián (Lat 49° 18'S, Long 67° 43'O), Punta María (Lat 53° 57'S, Long 67° 27'O), Canal Beagle (Lat 54° 50'S, Long 68° 11'O) , Puerto Aysén (Lat 45° 19'S, 72° 50'O), Puerto Montt (Lat 41° 28'S, Long 72° 54'O) y Concepción (Lat 36° 50'S. Long 73° 03'O).

*Extracción de ADN*

El ADN total de cada muestra se obtuvo realizando una digestión con proteinasa K seguida de extracción con cloruro de sodio y precipitación con isopropanol. El protocolo utilizado (modificado de Miller SA et al. 1988) se detalla en el ANEXO. Las extracciones fueron chequeadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (foto 2.2).



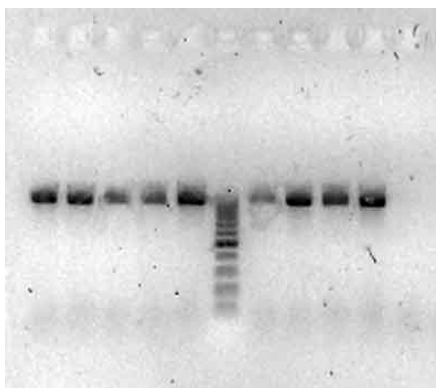
**Foto 2.2. Electroforesis en gel de agarosa 1%, revelada con Bromuro de etidio. En cada calle se sembraron 5ul de ADN extraído de róbalo más 1ul de buffer de siembra. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 100 y 1000 pares de bases.**

*Amplificación por PCR y secuenciación*

Se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) un fragmento de 926 pb de la región 3' del gen mitocondrial citocromo b (citb) en un total de 261 individuos de *E. maclovinus* (entre 24 y 38 de cada una de las 9 localidades muestreadas; tabla 2.1). Se utilizó como *primer forward* el MVZ05 5' – CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTT - 3' tomado de Smith and Patton (1991) y como *primer reverse* el R1negra 5' - CCAGTACTCCTCCAAGTTTGTCGGGG - 3' diseñado a partir de secuencias de citocromo b de nototénidos disponibles en Gen Bank. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 30 ul conteniendo los siguientes componentes: 15 µl del ADN extraído en una dilución 2/25 (~ 4 µg/ml) como molde, 1 unidad de ADN Taq polimerasa (Promega), buffer Taq polimerasa 1X, dNTPs (0.2 mM cada uno), primers (0.3 mM cada uno) y MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM). Las reacciones de PCR se realizaron en un termo ciclador modelo 2720 de Applied Biosystems con un programa que consistió en una desnaturalización inicial de



3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de asociación a 50°C y 1 min de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (foto 2.3) y enviados para su secuenciación con ambos *primers* a Macrogen S.A. (Korea).



**Foto 2.3.** Electrofoeresis en gel de agarosa 1%, revelada con bromuro de etidio. En cada calle se sembraron 5 ul de producto de PCR de la amplificación del gen citocromo b róbalo más 1ul de buffer de carga. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 100 y 1000 pares de bases.

#### *Edición de secuencias*

Los electroferogramas que resultaron de las secuenciaciones fueron visualizados y analizados con el programa “BioEdit sequence alignment editor” (Hall 1999). Las secuencias *forward* y *reverse* fueron alineadas para confirmar los resultados y resolver ambigüedades. Luego de eliminar las secuencias de los extremos con baja calidad de secuenciación (que incluían los *primers*) se obtuvieron secuencias de 833 pb que fueron utilizadas para los análisis subsiguientes.

#### *Análisis de datos*

Los índices de diversidad molecular de los haplotipos de CitB [número de haplotipos, sitios polimórficos, diversidad haplotípica (DiHa), diversidad nucleotídica (NuDi) y número promedio de diferencias pareadas ( $\pi$ )] y los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA),  $F_{ST}$  pareados considerando como distancia entre haplotipos el número de diferencias pareadas (*pairwise*), Test de Mantel y las pruebas de neutralidad  $D$  de Tajima y  $F_S$  de Fu fueron calculados usando el programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2006).

La red de haplotipos (minimum spanning network) se generó usando el método Media Joining (Bandelt et al. 1999) implementado en el programa Network 4.6 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). La distribución de diferencias pareadas observada y la esperada bajo un modelo de crecimiento poblacional exponencial se calcularon usando el programa DNAsp V5.1 (Librado & Rozas 2009). Se obtuvieron tasas de fijación especie-específicas para 5 especies de nototénidos usando un reloj molecular relajado con el programa Beast v1.6.0. Los análisis se llevaron a cabo bajo el modelo mutacional HKI + I + G seleccionado, usando el programa JModeltest (Posada 2008), como el modelo más apropiado de evolución molecular. Se utilizaron 8 secuencias de citb: 4 secuencias representativas de *E. maclovinus*, 1 secuencia de cada uno de 3 nototénidos antárticos con glicoproteínas anticongelantes (GPAC) *Dissostichus eleginoides*, *Notothenia coriiceps* y *Chionodraco rastropinosus*, y una secuencia del nototénido de divergencia temprana *Cottoperca gobio* como grupo externo (dado que *E. maclovinus* es considerado el taxón hermano de todos los nototénidos antárticos, Near et al. 2008). La calibración se realizó colocando al ancestro común más reciente de los nototénidos antárticos (portadores de GPAC) hace  $24 \pm 0.5$  millones de años (Near 2004; Janko et al. 2007). La estimación de los parámetros se basó en la distribución de la probabilidad posterior construida por muestreo de 10 millones de generaciones cada 1000 pasos, luego de descartar 1 millón de generaciones iniciales.

Los tamaños poblacionales históricos de *E. maclovinus* se estimaron usando el método coalescente "Bayesian Skyline Plot" (Drummond et al. 2005) implementado en el programa Beast v1.6.0. La corrida consistió en 100 millones de generaciones muestreadas cada 1000 generaciones bajo el modelo mutacional HKY + G. Las muestras antes de la zona de convergencia se descartaron. También se utilizó el programa Arlequin v3.11 para estimar parámetros bajo el modelo de expansión espacial (Schneider & Excoffier 1999; Excoffier 2004).

## 2.3 Resultados

### *Variación entre haplotipos*

Se analizaron 261 secuencias de 833 pb de longitud. En el alineamiento se identificaron un total de 58 haplotipos definidos por 65 sitios variables, incluyendo 28 *singletons* (mutaciones encontradas en una sola secuencia) y 37 sitios parsimoniosamente informativos (números de acceso a GenBank: JN010371 - JN010428; tabla 2.1 y anexo). De los 65 sitios variables 8 fueron cambios no sinónimos, de los cuales 6 fueron *singletons* y los otros dos fueron observados en 2 y 3 individuos respectivamente. La diversidad haplotípica y nucleotídica global fueron 0.90 y 0.0039, respectivamente, variando localmente la primera entre 0.82 y 0.96 y entre 0.0026 y 0.0054 la segunda. Se observó un alto número de haplotipos únicos (32), la mayoría de ellos definidos por *singletons* (28).

Población	n	S	N°Sin	k	$\pi$	HaDi (DE)	NuDi (DE)
San Antonio Oeste	25	16	3	10	3.94	0.91 (0.03)	0.0047 (0.0027)
Pto. Madryn	27	23	1	16	4.53	0.96 (0.02)	0.0054 (0.0031)
Rada Tilly	25	15	10	12	2.15	0.89 (0.04)	0.0026 (0.0017)
Pto. San Julián	24	20	15	9	2.90	0.86 (0.04)	0.0035 (0.0021)
Pta. María	38	20	7	11	2.99	0.87 (0.03)	0.0036 (0.0021)
Canal Beagle	36	23	14	16	3.15	0.88 (0.04)	0.0038 (0.0022)
Puerto Aysén	31	21	10	16	3.53	0.91 (0.03)	0.0042 (0.0025)
Puerto Montt	28	23	17	14	3.25	0.87 (0.06)	0.0039 (0.0023)
Concepción	27	15	9	13	2.64	0.90 (0.04)	0.0032 (0.0019)
Todas las poblaciones.	261	65	28	58	3.28	0.90 (0.01)	0.0039 (0.0022)

**Tabla 2.1. Variación genética en cada sitio: tamaño de muestras (n), número de sitios polimórficos (S), número de singletons (N°Sin), número de haplotipos (K), número promedio de diferencias pareadas ( $\pi$ ), diversidad haplotípica (HaDi), diversidad nucleotídica (NuDi), Desvío Estandar (DE).**

*Variación genética geográfica*

No se observaron diferencias fijas entre las poblaciones. Los haplotipos más frecuentes se encontraron en varias poblaciones a lo largo del rango geográfico muestreado (Anexo). La varianza entre poblaciones fue baja (1.62%) pero significativa ( $p=0.019$ , AMOVA). Los valores de  $F_{ST}$  pareados variaron entre  $-0.019$  y  $0.085$  (ver tabla en el ANEXO), indicando que la diferenciación entre poblaciones fue baja o moderada dependiendo de la comparación particular (Hartl & Clark 2007). El test de Mantel (Figura 2.2) no mostró una correlación significativa entre las distancias geográficas y los valores de  $F_{ST}$ , por lo que no se encontró un patrón de aislamiento por distancia ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.096$ ). El AMOVA jerárquico agrupando por un lado las localidades ubicadas en el Océano Pacífico y por el otro las ubicadas en el Océano Atlántico (aunque ubicando al Canal Beagle dentro del grupo Pacífico) resultó en una varianza entre grupos significativa ( $V_{entre} = 2,37\%$ ;  $p = 0.007$ ). Sin embargo el análisis de *cluster*, utilizando como medida de distancia entre localidades los  $F_{ST}$  pareados, no fue capaz de distinguir estos grupos (Figura 2.3).

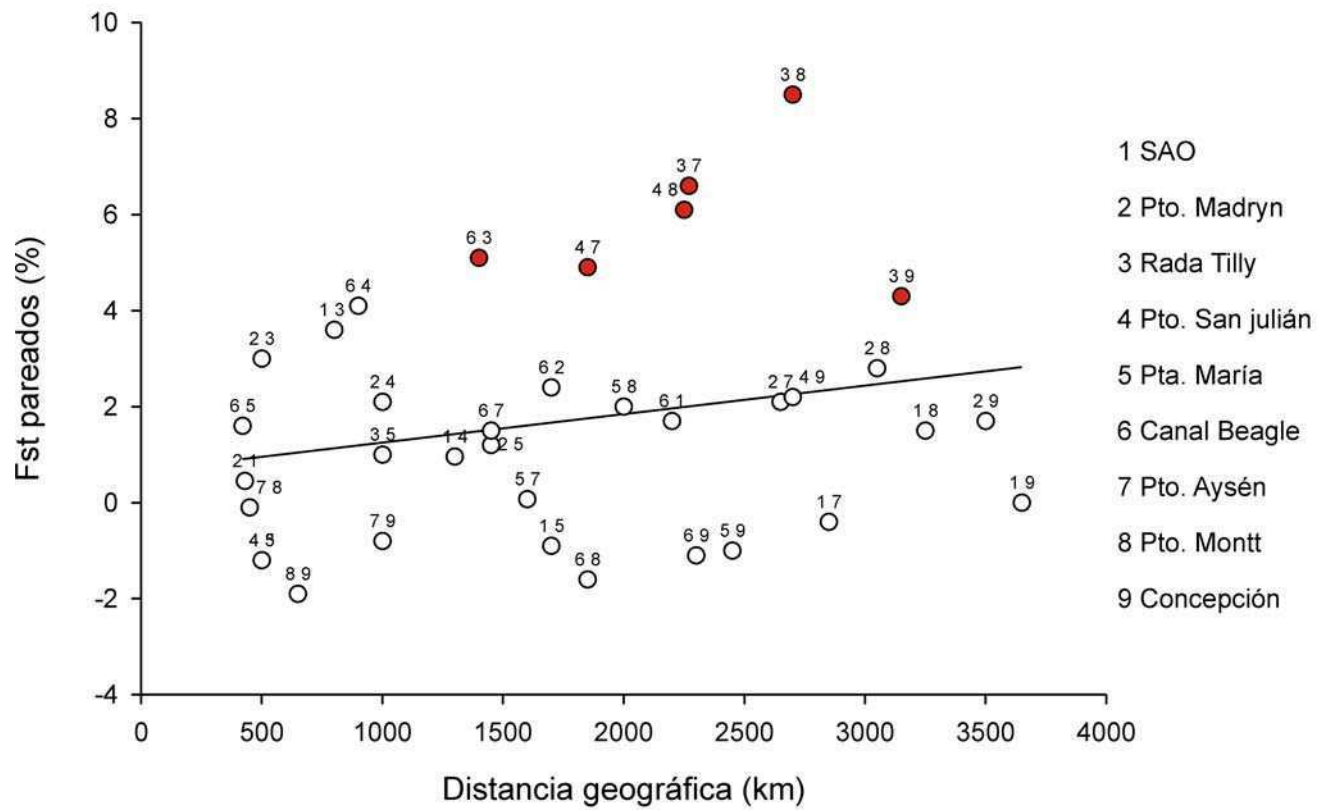
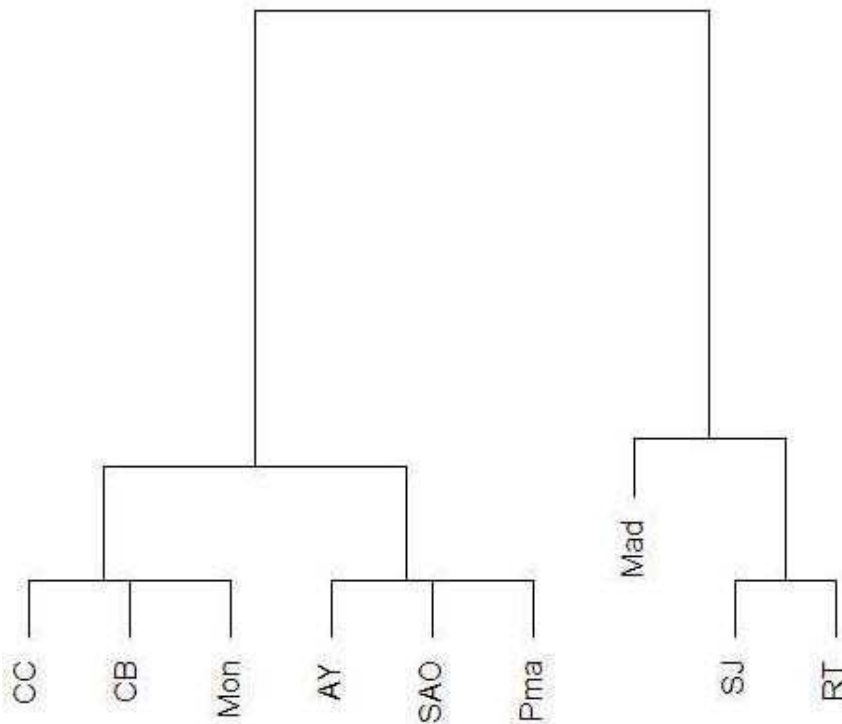


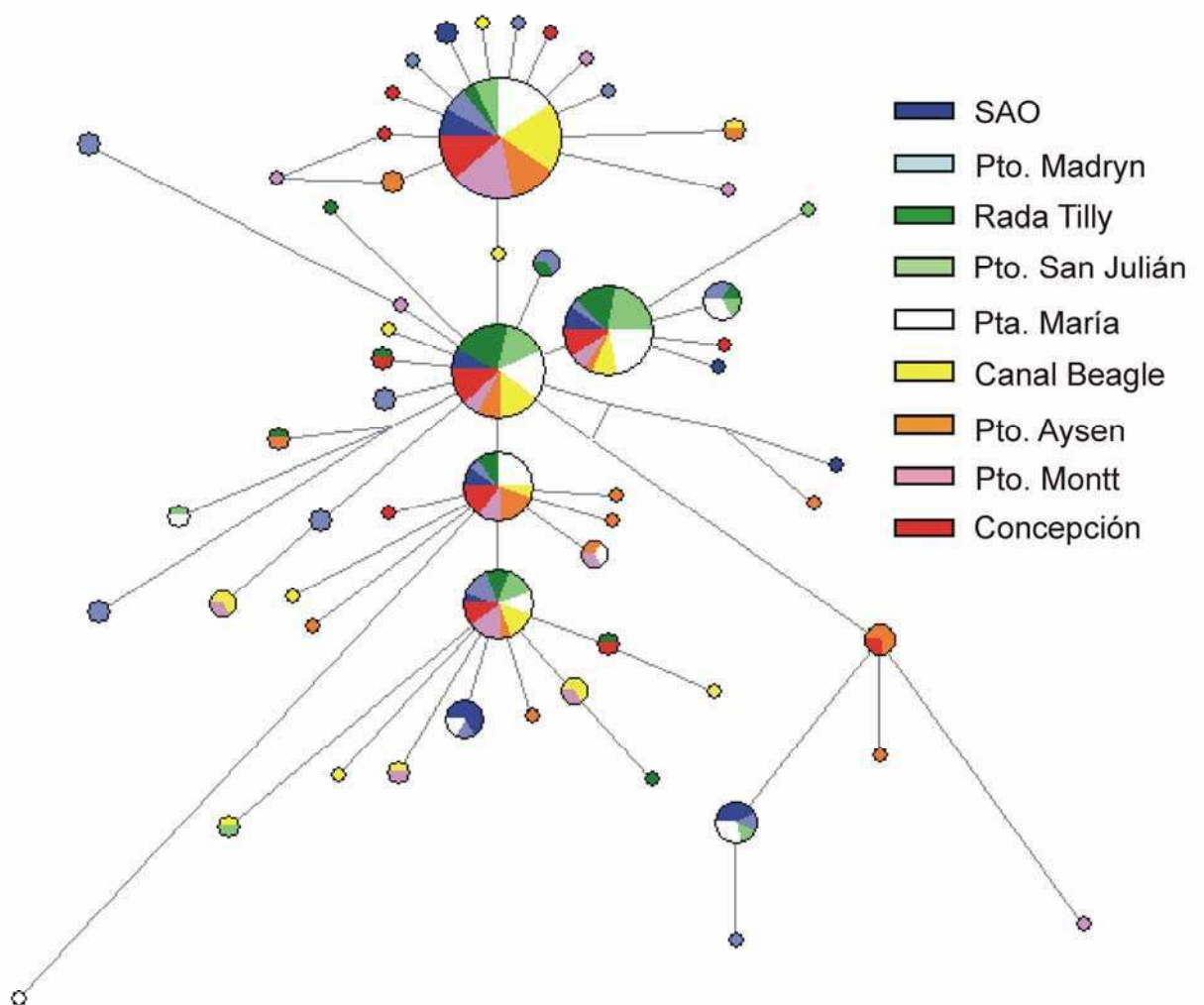
Figura 2.2 Representación gráfica de la correlación entre Distancia Geográfica y  $F_{ST}$  pareados ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.096$ ). Los círculos rojos indican las comparaciones de  $F_{ST}$  significativamente distintas de cero ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2.3.** Cladograma construido con la función *hclust* del paquete *stats* del programa *R* utilizando como distancia entre localidades los valores de  $F_{ST}$  pareados. Concepción (CC), Canal Beagle (CB), Puerto Montt (Mon), Puerto Aysén (AY), San Antonio Oeste (SAO), Punta María (Pma), Puerto Madryn (Mad), Puerto San Julián (SJ), Rada Tilly (RT).

#### *Relación filogenética entre haplotipos*

La red filogénica de haplotipos (*minimum spanning network*) se muestra en la figura 2.4. Los haplotipos presentes en relativamente alta frecuencia se encontraron en casi todas las poblaciones reflejando la ausencia de una estructura filogeográfica marcada. Los 5 haplotipos más frecuentes se encuentran centralmente ubicados en la red, mientras que el resto de los haplotipos se encuentran en frecuencias muy bajas y están separados de los más frecuentes en la mayoría de los casos por uno o pocos pasos mutacionales. Por lo tanto puede considerarse que el patrón observado tiene una forma aproximadamente estrellada lo que probablemente refleje la impronta de una expansión poblacional (Slatkin & Hudson 1991). Esta posibilidad se analiza formalmente más abajo.



**Figura 2.4** Red filogenética de haplotipos de citocromo b de *E. maclovinus*. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y la longitud de las ramas es proporcional al número de eventos mutacionales. Los colores indican las localidades.

#### *Pruebas de neutralidad y distribución de diferencias pareadas*

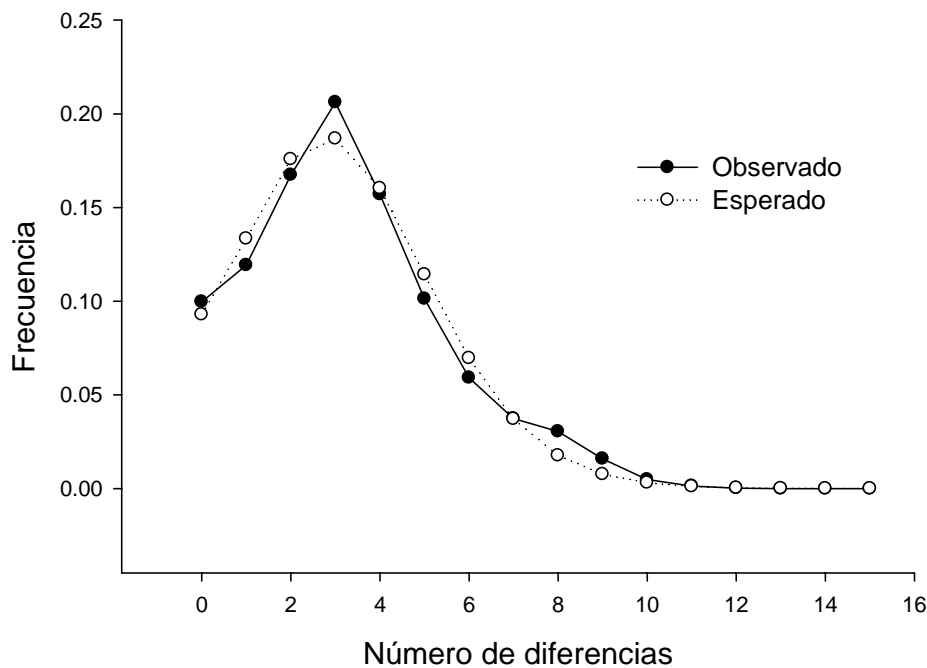
Ambos test de neutralidad,  $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu, mostraron, consistentemente, valores negativos en todas las poblaciones. La  $D$  de Tajima fue significativa en Rada Tilly, San Julián, Canal Beagle y Puerto Montt, mientras que la  $F_s$  de Fu fue significativa en Puerto Madryn, Rada Tilly, Canal Beagle, Puerto Aysén, Puerto Montt y Concepción (Tabla 2.2). Los valores globales para ambos estadísticos fueron negativos y significativos ( $D = -1.99$ ,  $p$

$< 0.01$ ;  $F_s = -25.93$ ,  $p < 0.001$ ). Los valores negativos de los test de neutralidad indican un exceso de mutaciones en baja frecuencia en relación a lo esperado en el equilibrio mutación-deriva y sugerirían una expansión poblacional reciente (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Un análisis global mostró una distribución unimodal de diferencias pareadas, lo que sugiere que los eventos de coalescencia habrían ocurrido en una ventana de tiempo angosta, hecho que sería consistente con un evento demográfico de expansión poblacional (Slatkin & Hudson 1991). El test de bondad de ajuste realizado en Arlequin v3.11 no encontró desviación significativa de lo esperado bajo el modelo de "expansión espacial" (Sum of Squared deviation = 0.0007 y  $p = 0.94$ ; Slatkin 1991; Figura 2.5).

Population	Tajima's D		Fu's $F_s$	
	D	P	$F_s$	P
San Antonio Oeste	-0.25	0.42	-0.96	0.35
Pto. Madryn	-0.87	0.19	-5.79	0.01
Rada Tilly	-1.61	0.04	-5.94	0.00
Pto. San Julián	-1.67	0.02	-1.35	0.26
Pta. María	-1.24	0.11	-1.64	0.25
Canal Beagle	-1.46	0.06	-6.46	0.00
Pto. Aysén	-1.15	0.12	-6.59	0.01
Pto. Montt	-1.61	0.04	-5.29	0.01
Concepción	-1.10	0.13	-5.56	0.01
All populations	-1.99	0.001	-25.93	0.00

**Tabla 2.2. Valores de las pruebas de neutralidad D de Tajima y  $F_s$  de Fu en las 9 localidades muestreadas.**





**Figura 2.5. Distribución observada y esperada (bajo un modelo de crecimiento exponencial) de las diferencias pareadas entre las secuencias obtenidas de individuos de *E. maclovinus* provenientes de las costas pacífica y atlántica.**

#### *Estimación de la tasa mutacional y tamaño poblacional*

Si se dispone de una tasa mutacional es posible datar el evento de expansión poblacional. La estimación de la tasa de fijación (que se asume equivalente a la tasa mutacional) obtenida para *E. maclovinus* fue de 0.0054 fijaciones por sitio por millón de años (95% HPD 0.0024-0.0087 Ma) (Fig 2.6). Utilizando esta tasa como información de entrada se realizó el “Bayesian Skyline Plot” (Fig 2.7). De la figura se desprende que la expansión pudo haber comenzado aproximadamente hace unos 125.000 años. Teniendo en cuenta los límites de 95% HPD del gráfico se podría establecer un intervalo de confianza gruesamente estimado de entre 100.000 y 175.000 años para el comienzo de la expansión. El tiempo de coalescencia de todos los haplotipos se calculó en 0.92 Ma, 95% HPD 0.25-1.92 Ma. La estimación del momento de la expansión basada en el modelo de expansión espacial sugiere una antigüedad mayor: 0.283 Mya (95%CI: 0.147-0.523Mya).

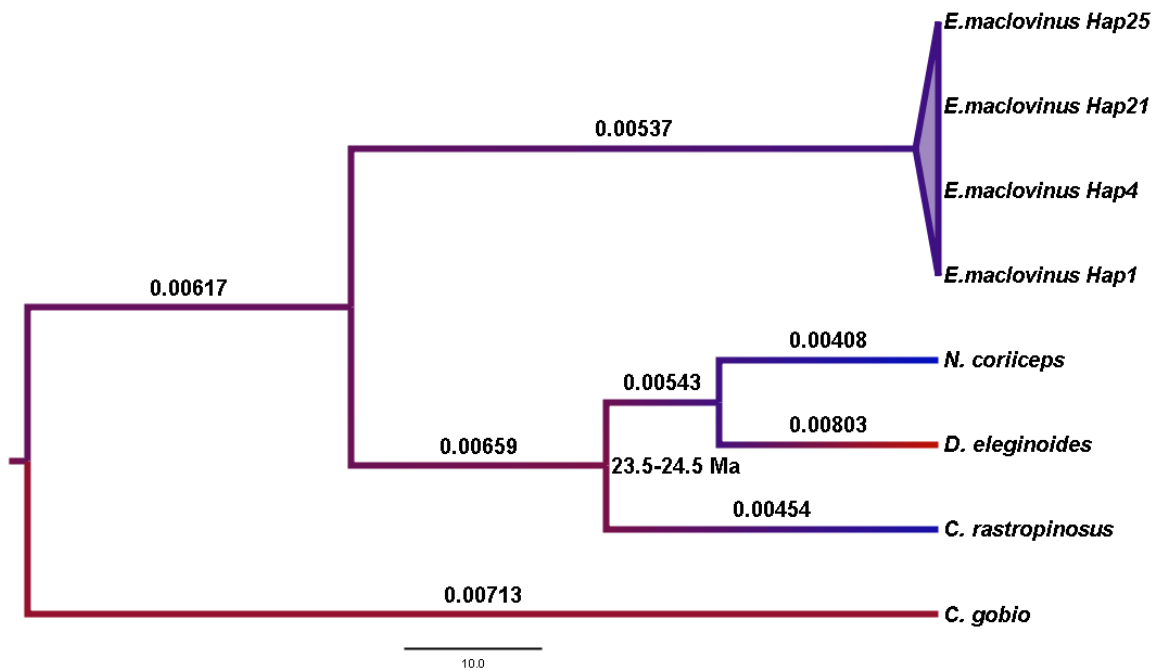


Figure 2.6 Calibración del reloj molecular utilizando 4 haplotipos representativos de *E. maclovinus*, 3 secuencias de nototénidos antárticos (*N. coriiceps*, *D. eleginoides* y *C. rastrospinosus*) y una secuencia del nototénidos de temprana divergencia *C. gobio*. La calibración se realizó colocando al ancestro común más reciente de los nototénidos antárticos hace  $24 \pm 0.5$  millones de años (Near 2004; Janko et al. 2007). Sobre las barras se indica el valor medio de la tasa de fijación estimada para cada segmento. El gradiente de colores se corresponde con el valor estimado de la tasa mutacional.

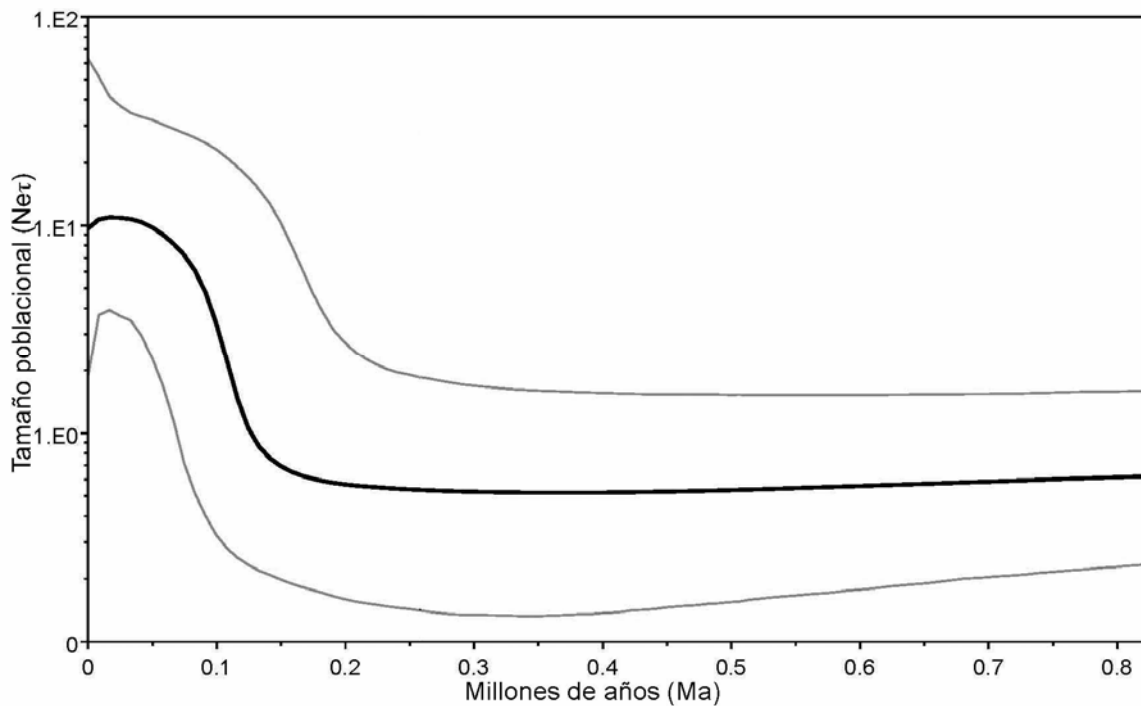


Figura 2.7. Estimación del tamaño poblacional histórico usando el método “*Bayesian Skyline Plot*” con los haplotipos de citocromo b de *E. maclovinus*. El eje X está en unidades de millones de años antes del presente y el eje Y representa el producto del tamaño poblacional efectivo y el tiempo generacional en escala logarítmica. La línea negra es la estimación de la mediana y el área entre las líneas grises representa la región del 95% HPD.

## 2.4 Discusión

A pesar de que no existen estimaciones directas de la capacidad dispersiva del róbalo es esperable que la misma sea alta. La dispersión podría ocurrir por desplazamiento de los adultos, dado que el róbalo puede alcanzar tamaños de aproximadamente  $\sim 80-90$  cm como tamaño máximo (Gosztanyi 1974; Licandeo et al. 2006) y es un nadador activo como puede observarse en acuarios (observaciones personales) y como lo sugiere su alta tasa metabólica que es comparable con la de otro teleósteos subantárticos con alta movilidad (Vanella & Calvo 2005). La dispersión a través de huevos o estadios larvales tempranos también podría ser importante: como lo propone Brickle et al (2005b) el róbalo estaría caracterizado por una alta fecundidad y pequeños

huevos pelágicos, y, mientras que las aguas costeras serían utilizadas principalmente para alimentación, el desove podría ocurrir en aguas más profundas (30-100 metros de profundidad). Si esto es así, los pequeños huevos pelágicos y los estadios larvales tempranos podrían estar sujetos a las corrientes marinas lo que facilitaría la dispersión a grandes distancias. De hecho, en muchos nototénidos antárticos con estadios pelágicos extendidos la dispersión de larvas a través de corrientes marinas fue sugerida como una de las principales razones por la cual comúnmente no se encuentran diferencias significativas en estudios de genética de poblaciones de estas especies con distribuciones de miles de kilómetros de extensión (Matschiner et al. 2009 y citas incluidas).

Otro carácter de historia de vida, que ha sido propuesto como un factor que potencialmente podría tener algún efecto sobre la estructura genética de las poblaciones es el cambio secuencial de sexos (hermafroditismo protándrico en el caso del róbalo). Chopelet et al (2009) puso a prueba la hipótesis de que las especies que cambian de sexo están más estructuradas genéticamente que las gonocoristas, lo cual se esperaría como resultado de una natural proporción asimétrica de sexos que implicaría una reducción en el tamaño efectivo de las poblaciones y por lo tanto un aumento de la deriva génica. Sin embargo, en el mencionado trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre modos de reproducción.

Los resultados en el presente trabajo son consistentes con los encontrados en otros nototénidos o peces marinos para lo cuales se esperan altos niveles de flujo génico. Esto fue revelado principalmente por la baja varianza genética entre poblaciones (1.62%) detectada por el AMOVA así como por el alto número de secuencias compartidas (como se observa en la red de haplotipos), reflejando un patrón general de baja estructuración geográfica. A pesar de esto fue posible observar para algunas comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  una heterogeneidad genética moderada y significativa. Los sistemas espaciales de una dimensión (como puede ser considerada la población de róbalo debido a sus hábitos costeros) tienen una varianza reducida en sus atributos genéticos geográficos en comparación con sistemas de 2 dimensiones, lo que aumenta las posibilidades de que se desarrolle un patrón de aislamiento por distancia (Slatkin & Barton 1989). Sin embargo, como

se deduce de la falta de correlación entre  $F_{ST}$  pareados y distancia geográfica, la heterogeneidad genética observada no se encuentra distribuida formando un patrón de aislamiento por distancia. Este resultado podría atribuirse a un evento relativamente reciente de expansión poblacional acompañado por altos niveles de flujo génico.

Aunque el índice  $F_{ST}$  es una excelente medida de la diferenciación geográfica entre poblaciones, las inferencias sobre los niveles de migración basados en  $F_{ST}$  conllevan una cantidad de supuestos (Whitlock & McCauley 1999) que muy probablemente no cumplen las poblaciones estudiadas en este trabajo. Las estimaciones de flujo génico mediante  $F_{ST}$  se basan en predicciones de equilibrio derivadas de la teoría neutral aplicada a modelos ideales de estructura poblacional (Slatkin & Barton 1989; Avise 2004a). Los resultados (principalmente los valores negativos de las pruebas de neutralidad, la distribución unimodal de las diferencias pareadas, la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia y el crecimiento poblacional indicado por el *Bayesian Skyline Plot*) sugieren que las poblaciones de *E. maclovinus* estarían lejos del equilibrio deriva-mutación y deriva-migración y que podrían haber invadido recientemente una parte importante del área que ocupan. Por lo tanto la baja estructuración global observada podría ser consecuencia no solo de los actuales niveles de flujo génico sino también de la conectividad histórica entre poblaciones. De esta manera inferencias sobre los niveles de migración basados en  $F_{ST}$  podrían estar sobreestimados (un ejemplo que ilustra esta situación puede hallarse en Mora et al. 2007). Sin embargo, es importante destacar que, con el análisis de un solo locus, no sería posible descartar apartamiento de la neutralidad como explicación alternativa o adicional al patrón observado de variación genética.

La calibración del reloj molecular que se realizó en este trabajo, siguiendo Near (2004) y Janko (2007), es consistente con los resultados obtenidos en un trabajo reciente de Matschiner et al. (2011) donde se utilizaron 6 puntos de referencia para estimar tiempos de divergencia de nototénidos. El tiempo de divergencia entre *E. maclovinus* y el clado antártico fue estimado en 42.3 millones de años en el presente trabajo, mientras que en Matschiner et al. (2011) este evento fue estimado en 42.9 millones de años. Este importante acontecimiento en la historia filogenética de los nototénidos coincidiría con el

comienzo de la apertura del Pasaje de Drake estimado hace aproximadamente 41 Ma, lo cual habría permitido la formación de la Corriente Circunpolar Antártica y la subsecuente aislación térmica de la Antártida (Scher & Martin 2006). De todos modos las estimaciones de tiempo basadas en relojes moleculares deben ser consideradas como aproximaciones muy amplias.

La estimación del momento de la expansión espacial resultó en un valor más antiguo que el calculado mediante el Bayesian Skyline Plot. Sin embargo los intervalos de confianza de ambas estimaciones se superponen y ambas sugieren que la expansión podría haber ocurrido durante el pleistoceno medio, claramente antes del último máximo glacial pero después del evento de glaciación post-Gran Glaciación Patagónica 1 (según la notación de Coronato et al. 2004) de una antigüedad no menor a 710 Ka. Estos resultados son similares a los encontrados en especies de moluscos costeros patagónicos utilizando marcadores mitocondriales y estimaciones de la tasa de mutación: Cárdenas et al. (2009) en un estudio sobre la costa del Pacífico en el gastrópodo *Concholepas concholepas* encontró evidencias de expansión poblacional y estimó el comienzo de la misma hace 427.000 años (IC del 95%: 207-606) utilizando el modelo "Sudden population expansion"; Aranzamendi et al. (2011) en un estudio sobre la costa atlántica en la lapa *Nacella magellanica* también encontró evidencia de expansión poblacional y estimó el comienzo hace 110.000 años basándose en el *Bayesian Skyline Plot*.

Generalmente se propone que las especies afectadas durante las glaciaciones se habrían desplazado hacia el norte en busca de hábitats más propicios (Ruzzante et al. 2008; Lessa et al. 2010). Considerando este escenario *E. maclovinus* podría haber mantenido al menos dos refugios durante las glaciaciones, uno del lado del Océano Pacífico y otro del lado del Océano Atlántico. Sin embargo, los principales patrones de variación genética encontrados en el segmento de ADN mitocondrial estudiado sugerirían que la expansión detectada se habría originado desde un único refugio debido, principalmente a: 1) La red de haplotipos no está fuertemente estructurada en dos o más clados; 2) La distribución de diferencias pareadas es claramente unimodal, mientras que al menos dos o más modas se hubieran esperado en caso de que hubiera existido más de un refugio; 3) los valores de las pruebas de neutralidad, tanto la  $D$  de Tajima como la  $F_S$  de Fu toman valores más

negativos y significativos al considerar todos los datos juntos mientras que una genealogía estructura habría llevado estos estadísticos hacia valores más positivos. Por otro lado, aunque el AMOVA jerárquico que divide a las poblaciones del Atlántico de las del Pacífico resultó significativo para la varianza entre grupos, es importante destacar que el análisis de *cluster* falló en distinguir dichos grupos. Incluso, el  $F_{ST}$  entre la población más al norte en el Pacífico (Concepción) y la población más al norte en el Atlántico (San Antonio Oeste) es cero.

Las dos poblaciones ubicadas más al norte en el Atlántico (San Antonio Oeste y Pto. Madryn) se diferencian del resto de las localidades en algunos aspectos. Estas localidades exhiben mayor diversidad nucleotídica (Tabla 2.1) y valores menos negativos para las pruebas de neutralidad (excepto por  $F_S$  de Fu en Puerto Madryn) (Tabla 2.2). Esto podría ser evidencia de que existió un único refugio del lado Atlántico o que al menos estas poblaciones podrían haber permanecido más estables históricamente. Este escenario de mayor estabilidad relativa en el NE de la distribución es compatible con el hecho de que la costa pacífica fue más afectada durante las fases glaciales debido a que los glaciares alcanzaban el nivel del mar al menos hasta la latitud de la Isla de Chiloé (Clapperton 1993). Asimismo, debido a que el aumento de la profundidad es más abrupto en el Pacífico, y la plataforma continental es menor que en el Atlántico, el descenso del nivel del mar durante los periodos fríos, habría dejado un área menor (o más angosta) con aguas de baja profundidad como las que habitualmente ocupa el róbalo.

## CAPÍTULO 3

Marcadores moleculares nucleares: microsatélites



### 3.1 Introducción

Los microsatélites son secuencias de ADN conformadas por motivos cortos, de una longitud de entre 1 y 6 pares de bases (pb), que se repiten consecutivamente una cantidad determinada de veces. Este tipo de secuencias están presentes en los genomas de la mayoría de las especies animales y vegetales. Pueden ser altamente polimórficos, variando en general en el número de veces en que se repite el motivo. Debido a su gran variación constituyen unos de los marcadores moleculares más utilizados para estudios de estructura poblacional. Aunque su función en el genoma no está clara, en general se asume que son marcadores neutrales desde el punto de vista de la selección natural, sin embargo su variación a nivel poblacional puede estar ligada (por proximidad física en el genoma) a un *locus* no neutral (Goldstein & Schlötterer 1999; Avise 2004a). Existe evidencia, además, de que algunos microsatélites podrían tener influencia sobre la organización de la cromatina, la regulación del metabolismo del ADN (ejemplo, replicación, recombinación, etc) o la regulación de la actividad génica, por lo que al menos en este tipo de microsatélites la variación en el tamaño del alelo podría no ser neutral (Li et al. 2002; Li et al. 2004).

El genotipado de cada *locus* de microsatélite consiste en realizar una amplificación por PCR, utilizando *primers* diseñados a partir de las secuencias flanqueantes a las secuencias repetitivas, y una posterior determinación del tamaño del producto de PCR por electroforesis.

Comúnmente los *primers* específicamente diseñados para amplificar un *locus* de microsatélite en una determinada especie pueden también funcionar en especies cercanamente emparentadas. Por este motivo se probaron en *E. maclovinus* 27 pares de *primers* para microsatélites descritos en otros nototénidos, pero sin éxito, por lo que finalmente se decidió desarrollar *primers* específicos para *E. maclovinus*. Esto fue posible gracias al curso “Microsatélites para estudios genéticos de eucariotas: un curso teórico y práctico” dictado en la Universidad de Campinas (UNICAMP), Brasil, en el mes de febrero de 2009 por la Profesora Anete Pereyra De Souza, donde se generó una biblioteca genómica enriquecida en microsatélites (Ceballos et al. 2011).

### 3.2 Materiales y métodos

#### *Construcción de una biblioteca enriquecida en microsatélites*

Se extrajo ADN genómico de tejido muscular de un individuo colectado en el Canal Beagle mediante digestión con proteinasa K seguida de extracción con cloruro de sodio y precipitación con isopropanol siguiendo el protocolo (modificado de Miller SA et al. 1988) que se detalló en la sección 2.2. A partir del ADN extraído se construyó una librería genómica enriquecida en microsatélites de acuerdo al método descrito en Billotte et al. (1999). En resumen el procedimiento consistió en los siguientes pasos:

Se digirió el ADN genómico con la enzima de restricción RsaI y posteriormente los fragmentos resultantes fueron ligados a adaptadores Rsa21 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3' y Rsa25 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'. La librería fue enriquecida en secuencias con repeticiones de dinucleótidos usando los oligos biotinilados (CT)<sub>8</sub> y (GT)<sub>8</sub> como sondas que fueron adheridas a partículas paramagnéticas (Streptavidin MagneSphere, Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se amplificaron por PCR los fragmentos enriquecidos en microsatélites usando los *primers* complementarios a los adaptadores y se ligaron al vector pGEM-T (Promega). Los fragmentos fueron clonados transformando bacterias *Escherichia coli*, cepa XL-1 Blue con los vectores. Las células transformadas se cultivaron en placas de agar conteniendo ampicilina (100 µg/mL), galactosidasa (50 µg/mL) y 30 µl of isopropil *b*-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (20 mg/mL). Se seleccionaron 96 colonias blancas (aquellas que contenían el vector con inserto) y se conservaron a -80°C. Los plásmidos de estas colonias se purificaron por miniprep y se secuenciaron los insertos con los *primers* SP6 y T7. Los electroferogramas que resultaron de la secuenciación fueron visualizados y analizados con el programa "BioEdit sequence alignment editor" (Hall 1999). Las secuencias *forward* y *reverse* fueron alineadas para chequear los resultados y resolver ambigüedades. Luego de excluir las secuencias que no contenían microsatélites o con microsatélites demasiado cerca del final de la secuencia como para permitir el diseño de *primers*, quedaron 23 *loci* candidatos. Usando el programa CID (Freitas et al.

2008) se identificaron las secuencias repetitivas simples (SSRs) y se diseñaron *primers* específicos para cada *locus*. Luego de optimizar las condiciones de PCR se pudieron obtener productos satisfactorios en 10 de los 23 *loci*. Los niveles de polimorfismo en estos 10 *loci* se evaluaron en 48 individuos capturados en la localidad de San Antonio Oeste, Río Negro. Un *primer* de cada par se marcó con los fluorocromos HEX o 6-FAM. Las PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ L conteniendo los siguientes componentes: 10  $\mu$ L de AND templado (4  $\mu$ g/mL), 1 unidad de ADN Taq polimerasa (Promega), 1x buffer Taq polimerasa, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 mM de cada *primer* y  $MgCl_2$  2.5 mM. Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems) usando el siguiente ciclo: 95°C por 3 min, seguido de 37 ciclos de 94°C por 30 s, la temperatura de asociación específica del primer ( $T_a$ ) por 30 s, y 72°C por 30 s, y un paso de extensión final de 5 min a 72°C. Los genotipos se determinaron utilizando el servicio de Genescan de MacroGen Korea y se visualizaron con el programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). El programa Arlequin v3.11 (Excoffier *et al.* 2006) se utilizó para calcular la heterocigosis observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$  respectivamente) y para realizar los tests de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada *locus* y de desequilibrio de ligamiento entre *loci*. El programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) se utilizó para detectar errores de genotipado debidos a tartamudeo, no amplificación de alelos grandes y/o presencia de alelos nulos.

#### *Caracterización de los loci de microsatélites*

Solo el *locus* EmA4 mostró desviación significativa del EHW ( $P < 0.005$ ). No se encontró evidencia de errores de genotipado causados por tartamudeo, no amplificación de alelos grandes o presencia de alelos nulos en ningún *locus* excepto en EmA4, donde se encontró evidencia de posibles alelos nulos. Las frecuencias genotípicas y alélicas del *locus* EmA4 se corrigieron según el método Brookfield2 implementado en MICROCHECKER para la estimación de alelos nulos. Luego de esta corrección no se observó desviación significativa del EHW (Tabla 3.1). Ningún par de *loci* mostró valores significativos de

desequilibrio de ligamiento luego de realizar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Locus	No. de acceso GenBank	Secuencia del primer (5'-3')	Motivo de repetición	NoA	Rango de tamaño (bp)	T <sub>a</sub> °C	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	Valor de p (EHW)
EmA4	JF740679	F: ATCAACTTCGCTTTGATGTC R: ACTTAACCTTGTGGCATTG	(TG)25	33	230-334	55	0.943	0.851	0.09
EmA5	JF740680	F: AGGAGCTGAGATTGIGTGT R: TAGTTGACTGCAGCGTTTTA	(TG)22	22	102-202	55	0.908	0.936	0.83
EmC4	JF740681	F: GTTCAAAGATTCCTGCAGAC R: TGGTGTTAGCAGATGACTGA	(AC)20	20	120-190	53	0.879	0.872	0.46
EmC11	JF740682	F: AGGTGTTGTTTCAGCTCTGT R: CTACTGCGCTGTAAAGGTC	(TG)19	17	124-166	54	0.916	0.894	0.47
EmE7	JF740683	F: TGAAAACCTAACAGGTCCCA R: TCTCGAATGTAAAGTGCAGC	(GT)15	17	188-236	54	0.874	0.851	0.09
EmE9	JF740684	F: GCGTGCATCATTACACATA R: CATGATGAGGCGCTTTTTA	(AC)26	28	137-263	55	0.935	0.875	0.11
EmF6	JF740685	F: GAATCAGCATGGAGGAGTTA R: TCGCCGTCGTAAACTCTAT	(GT)7atgc(GT)6	8	94-108	55	0.695	0.688	0.55
EmG6	JF740686	F: CTGGTCAAAGCTGTGTGTA R: TACAGGATGCTCTTTGTGAA	(GT)14	10	135-191	54	0.793	0.787	0.86
EmH9	JF740687	F: GCTTACATCCTCAGCAGTTT R: CAAGGAGTCAGCTTTTGTCT	(GT)17atc(TG)26	41	166-300	55	0.968	0.938	0.73
EmH10	JF740688	F: CCTTTAAAGCTGCACATTCT R: AAACACGGACAAATTACACC	(CA)9cg(CA)9	12	141-173	47	0.880	0.917	0.76

**Tabla 3.1** Caracterización de 10 *loci* polimórficos de microsatélites de *E. maclovinus*. NoA = número de alelos; T<sub>a</sub> = temperatura de asociación; H<sub>e</sub> = heterocigosis esperada; H<sub>o</sub> = heterocigosis observada. La muestra corresponde a 48 ejemplares capturados en San Antonio Oeste.

Luego de poner a punto la amplificación de los microsatélites y su caracterización con los individuos de San Antonio Oeste, se procedió a realizar la amplificación y posterior genotipado en 48 individuos de cada una de las siguientes localidades: Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Pto. Aysén (AY) y Concepción (CC) (Figura 2.1).

### Análisis de datos

El programa Arlequin v3.11 (Excoffier *et al.* 2006) se utilizó para calcular el número de alelos, la heterocigosis observada y esperada (H<sub>o</sub> y H<sub>e</sub> respectivamente), los test de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y de desequilibrio de ligamiento, el AMOVA, los índices F<sub>ST</sub> pareados y el Test de Mantel. El programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) se utilizó para detectar errores de genotipado debido a tartamudeo, no amplificación de alelos grandes y/o presencia de alelos nulos. La frecuencia de

alelos nulos se calculó por máxima verosimilitud utilizando el programa ML-Null (Kalinowski & Taper 2006). El intervalo de confianza del 95% de la heterocigosis esperada para cada población se calculó utilizando el paquete PopGenKit de R.

La estructuración poblacional se exploró mediante el método bayesiano presentado en Pritchard et al. (2000) e implementado en el software Structure 2.3.3. Este método consiste en asumir la existencia de un número  $K$  de *clusters* (o poblaciones) cada una caracterizada por un determinado conjunto de frecuencias alélicas en cada *locus*. Los individuos son luego asignados probabilísticamente a un *cluster* o a una mezcla de *clusters* si sus genotipos indican una ancestralidad mixta. Los análisis se llevaron a cabo para valores de  $k$  entre 1 y 5 utilizando un modelo con el siguiente conjunto de parámetros:

- 1) Ancestralidad mixta (*Admixture model*). Asume que cada individuo pudo haber heredado una fracción de su genoma de ancestros pertenecientes a cada uno de los  $k$  *clusters*.
- 2) Información de muestreo (*LOCPRIOR model*) (Hubisz et al. 2009). Utiliza como información *a priori* los lugares de procedencia de las muestras para asistir la detección de estructura cuando la señal de diferenciación es muy débil.
- 3) Frecuencias alélicas correlacionadas (*Correlated allele frequencies model*). Asume que las frecuencias alélicas en los distintos *clusters* derivan de una misma población ancestral. Los autores del programa sugieren este modelo para poblaciones con baja diferenciación.
- 4) Modelo con alelos recesivos (Falush et al. 2007). Asume la existencia de alelos recesivos (o nulos) en los *loci* indicados por el usuario.

Se realizaron 6 corridas independientes para cada  $K$ . Análisis preliminares mostraron que un descarte inicial (*burn-in*) de 50.000 iteraciones son suficientes para alcanzar la zona de convergencia, luego de las cuales se realizaron 100.000 iteraciones adicionales para obtener las estimaciones finales.

La distancia genética  $D_A$  (Nei et al. 1983) entre poblaciones se calculó utilizando el programa POPTREE2 (Takezaki et al. 2009).

El patrón de cambio en el tamaño poblacional histórico se evaluó mediante el cálculo del parámetro de crecimiento exponencial “ $g$ ” utilizando el

método bayesiano implementado en el programa Lamarc v2.1.6 (Kuhner 2006). El análisis para cada localidad consistió en una cadena de la cual se muestrearon 30.000 árboles en intervalos de 40 generaciones luego de descartar 4.000 árboles iniciales. Se asumió un modelo mutacional mixto Stepwise/K-allele permitiendo optimizar la importancia relativa de cada modelo.

### 3.3 Resultados

#### *Variación genética en los loci*

El *locus* EmE9 mostró una intensidad muy baja o nula en los electroferogramas, probablemente debido a la degradación de alguno de los *primers*, motivo por el cual se decidió descartar este *locus*. Los restantes 9 *loci* se renombraron con números del 1 al 9. Se genotiparon exitosamente 47 individuos en Puerto Aysén y 48 en cada una de las 4 localidades restantes totalizando 239 individuos. El número de alelos detectados fue en general elevado variando según el *locus* entre 8 (*locus* 6) y 62 (*locus* 8) (Tabla 3.2). En 4 *loci* (5, 7, 8 y 9) se detectaron diferencias de tamaño de alelos que no son múltiplo de 2 (Anexo) evidenciando falta de ajuste al modelo de "Stepwise".

La heterocigosis observada (promediada entre localidades) varió según el *locus* entre 0.571 y 0.933 mientras que la esperada bajo el EHW varió entre 0.746 y 0.963 (tabla 3.3). El apartamiento del EHW, evaluado en cada población para cada *locus*, fue significativo sólo en 6 de los 45 casos (9 *loci* x 5 poblaciones) (Tabla 3.4). Los desvíos más importantes se observaron para el *locus* 6 que mostró consistentemente una deficiencia de heterocigotas en 4 de las 5 localidades estudiadas (tabla 3.3 y figura 3.1).

El análisis realizado con el programa Microchecker no encontró evidencia de errores de genotipado por tartamudeo o no amplificación de alelos grandes, pero detectó la posible presencia de alelos nulos en aquellos *loci* que mostraron un apartamiento significativo del EHW. La frecuencia de alelos nulos estimada fue relativamente alta (entre 0.11 y 0.21) para el *locus* 6 en 4 localidades (Tabla 3.5). Por este motivo todos los análisis subsiguientes se realizaron por duplicado, incluyendo y excluyendo el *locus* 6. Sin embargo, no

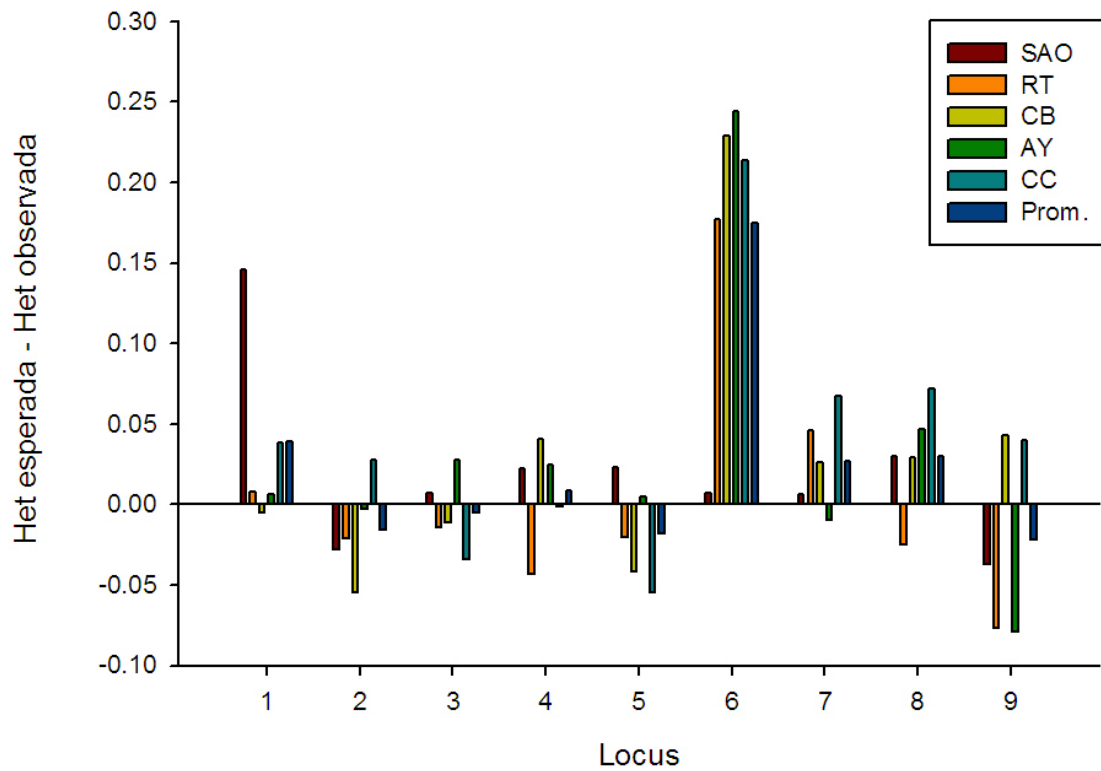
se encontraron diferencias apreciables por lo que se muestra la salida de los análisis que incluyen al *locus* 6.

**Tabla 3.2. Número de alelos detectados en cada *locus* y población. Para cada población se indica entre paréntesis el número de individuos genotipados. Los *locus* caracterizados en la tabla 3.1 (con excepción del *locus* EmE9) fueron renombrados con números del 1 al 9. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Pto. Aysén (AY), Concepción (CC).**

Locus	Número de alelos					
	SAO(48)	RT(48)	CB(48)	AY(47)	CC(48)	Global (239)
1 (EmA4)	33	41	39	39	45	58
2 (EMA5)	22	24	19	22	25	40
3 (EmC4)	20	20	20	23	25	34
4 (EmC11)	17	15	17	17	19	23
5 (EmE7)	17	19	22	17	25	31
6 (EmF6)	8	8	8	6	8	8
7 (EmG6)	10	13	12	13	21	27
8 (EmH9)	41	41	35	32	37	62
9 (EmH10)	12	11	11	10	13	15
Total	180	192	183	179	218	298
Específicos	17	9	7	10	20	

**Tabla 3.3 Heterocigosis observada (Obs.) y esperada (Esp.) en cada *locus* y población, así como los correspondientes promedios (Prom.). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Pto. Aysén (AY), Concepción (CC).**

Locus	Heterocigosis											
	SAO		RT		CB		AY		CC		Prom.	
	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Obs.	Esp.
1	0.787	0.933	0.936	0.944	0.979	0.974	0.957	0.963	0.938	0.976	0.919	0.958
2	0.936	0.908	0.958	0.937	0.936	0.881	0.894	0.891	0.875	0.903	0.92	0.904
3	0.872	0.879	0.938	0.924	0.956	0.945	0.913	0.941	0.979	0.945	0.932	0.927
4	0.894	0.916	0.917	0.874	0.875	0.916	0.851	0.876	0.896	0.895	0.887	0.895
5	0.851	0.874	0.896	0.876	0.958	0.916	0.915	0.92	0.979	0.924	0.92	0.902
6	0.688	0.695	0.596	0.773	0.565	0.794	0.425	0.669	0.583	0.797	0.571	0.746
7	0.787	0.793	0.771	0.817	0.813	0.839	0.851	0.841	0.804	0.871	0.805	0.832
8	0.938	0.968	1	0.975	0.938	0.967	0.894	0.941	0.894	0.966	0.933	0.963
9	0.917	0.88	0.938	0.861	0.813	0.856	0.963	0.884	0.854	0.894	0.897	0.875
Prom.	0.852	0.872	0.883	0.887	0.87	0.899	0.851	0.881	0.867	0.908	0.865	0.857



**Figura 3.1** Diferencia entre la heterocigosis esperada y observada para cada locus y población. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Pto. Aysén (AY), Concepción (CC).



Tabla 3.4 Valores de  $p$  obtenidos mediante el test de permutaciones para evaluar desvios significativos del EHW. Los valores menores a 0.05 se muestran en rojo. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).

Locus	EHW				
	SAO	RT	CB	AY	CC
1	0.0035	0.4904	0.5624	0.365	0.1143
2	0.6717	0.7009	0.557	0.6739	0.5137
3	0.5633	0.7195	0.6888	0.2096	0.7378
4	0.39	0.8591	0.4019	0.3305	0.6405
5	0.4989	0.5973	0.9076	0.3934	0.833
6	0.3807	0.007	0.0001	0.0001	0.0000
7	0.5124	0.403	0.1133	0.5729	0.1635
8	0.1507	0.7064	0.0699	0.2584	0.036
9	0.2682	0.9662	0.2806	0.5715	0.2086

Tabla 3.5 Estimación de la frecuencia de alelos nulos en los loci donde se encontró evidencia de la presencia de los mismos. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).

Locus	Frecuencias de alelos nulos				
	SAO	RT	CB	AY	CC
1	0.07	0	0	0	0.006
6	0	0.118	0.164	0.208	0.113
8	0.002	0	0.011	0	0.026

### *Desequilibrio de ligamiento*

El desequilibrio de ligamiento se evaluó para cada combinación posible de *loci* tomados de a dos en cada sitio de muestreo lo que significó un total de 180 pruebas estadísticas. Diez de estas resultaron en un  $p$  menor a 0,05. Sin embargo ninguna fue significativa luego de realizar correcciones por comparaciones múltiples (Tabla 3.6). De todas maneras el par constituido por los *loci* 3 y 9 resultó significativo (previo a la corrección por comparaciones múltiples) en tres localidades como se observa en la tabla. Este resultado es

poco probable por azar y podría sugerir que estos *loci* se encuentran ligados. Debido a que algunos de los análisis subsiguientes son sensibles al desequilibrio de ligamiento (por ejemplo el realizado con el software Structure) se decidió correr los análisis en tres condiciones distintas: sin el *locus* 3, sin el *locus* 9 y con ambos *locus*. Los resultados fueron similares en los tres casos por lo que se asume que de existir algún grado de ligamiento entre los *loci* 3 y 9, esto no estaría afectando sensiblemente los resultados. Por este motivo los análisis siguientes incluyen a ambos *loci*.

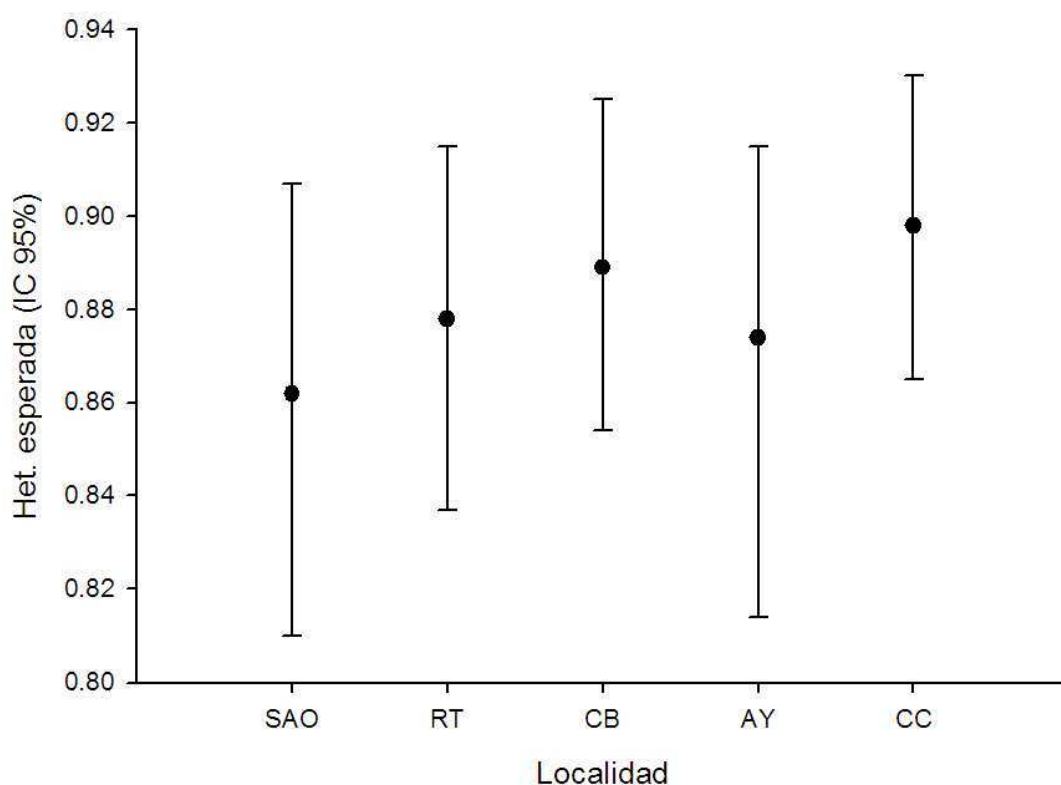
**Tabla 3.6.** Se indican los valores de *p* en los casos que resultaron significativos para la prueba de desequilibrio de ligamiento realizada con el programa Arlequin 3.11. Asimismo se indican los valores de *p* corregidos por comparaciones múltiples según 5 métodos diferentes implementados en el programa SGoF+(Carvajal-Rodriguez A & de Uña-Alvarez 2011): método SGoF (BMC Bioinformatics: Carvajal-Rodriguez et al 2009); método B-H (Benjamini and Hochberg Journal of the Royal Statistical Society. Series B:1995); método SGoF+(Carvajal-Rodriguez & de Uña-Alvarez 2010); método SFisher (MCP: Perez-Diz et al 2010); método Bonferroni secuencial (BS) (Holm 1979). En la primera columna entre paréntesis el par de *loci* involucrados. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Puerto Aysén (AY).

Prueba	Valor - <i>p</i>	SGoF	B-H	SGoF+	SFisher	BS
RT (1,6)	0.00228	0.737027	0.4104	1	0.482142	0.4104
RT (3,9)	0.00931	1	0.8136	1	0.632421	1
AY (3,9)	0.01356	1	0.8136	1	0.73299	1
RT (6,7)	0.02673	1	0.81972	1	0.811038	1
AY (4,8)	0.03416	1	0.81972	1	0.862684	1
SAO(3,9)	0.03703	1	0.81972	1	0.90095	1
SAO(3,6)	0.03752	1	0.81972	1	0.930313	1
SAO(4,5)	0.03832	1	0.81972	1	0.952675	1
RT(7,8)	0.04198	1	0.81972	1	0.968986	1
SAO(1,7)	0.04554	1	0.81972	1	0.980129	1

#### *Variación genética en las localidades*

La heterocigosis observada en las localidades (promediando los *loci*) varió entre 0.851 y 0.883 mientras que la esperada varió entre 0.872 y 0.908 siendo las diferencias entre localidades no significativas (figura 3.2). El número

de alelos totales alcanzó el mayor valor en CC (218), la localidad ubicada más al norte del lado Pacífico (tabla 3.1). Por otro lado, el número de alelos específicos mostró una correlación negativa y significativa con la latitud (prueba no paramétrica  $r_s$  de Spearman,  $p = 0.017$ ), encontrándose los mayores valores en las dos localidades ubicadas más al norte: 20 en CC y 17 en SAO, mientras que en CB, la localidad ubicada más al sur, solo se detectaron 7 alelos específicos (Tabla 3.1).



**Figura 3.2** Heterocigosis esperada en cada población y su respectivos intervalos de confianza (IC) del 95%, estimados por bootstrap. Los intervalos de confianza se solapan mostrando que las diferencias no son significativas. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).

### *Estructura geográfica*

El  $F_{ST}$  global estimado entre poblaciones fue de 0.0135 con un intervalo de confianza del 95% estimado por *bootstrap* entre 0.009 y 0.0179. Los valores de  $F_{ST}$  evaluados en cada *locus* por separado variaron entre 0.0035 y 0.02812

siendo significativos en 8 de los 9 *loci* (tabla 3.6). Los valores de  $F_{ST}$  pareados entre poblaciones variaron entre 0.001 y 0.021 siendo significativos en 9 de las 10 comparaciones posibles (Anexo). Para evaluar la existencia de un patrón de aislamiento por distancia se realizó un test de Mantel, el cual resultó no significativo, pero mostró una tendencia positiva, con un  $p = 0.11$  y coeficiente de correlación = 0.41 (figura 3.7).

Las relaciones filogenéticas entre poblaciones estimadas por el método de Neighbor Joining o UPGMA a partir de distancias genéticas basadas en las frecuencias alélicas agrupan a SAO y RT en un clado y a CC, AY y CB en otro (Figura 3.8).

**Tabla 3.6** Diferenciación genética global entre poblaciones ( $F_{st}$ ) para cada *locus* y su significancia.

Locus	$F_{st}$	Valor de $P$
1	0.01196	0.00000
2	0.02812	0.00000
3	0.01165	0.00000
4	0.01697	0.00000
5	0.01258	0.00000
6	0.02247	0.00293
7	0.0035	0.16129
8	0.00796	0.00000
9	0.00659	0.02444
Todos los loci	0.01347	0.00000

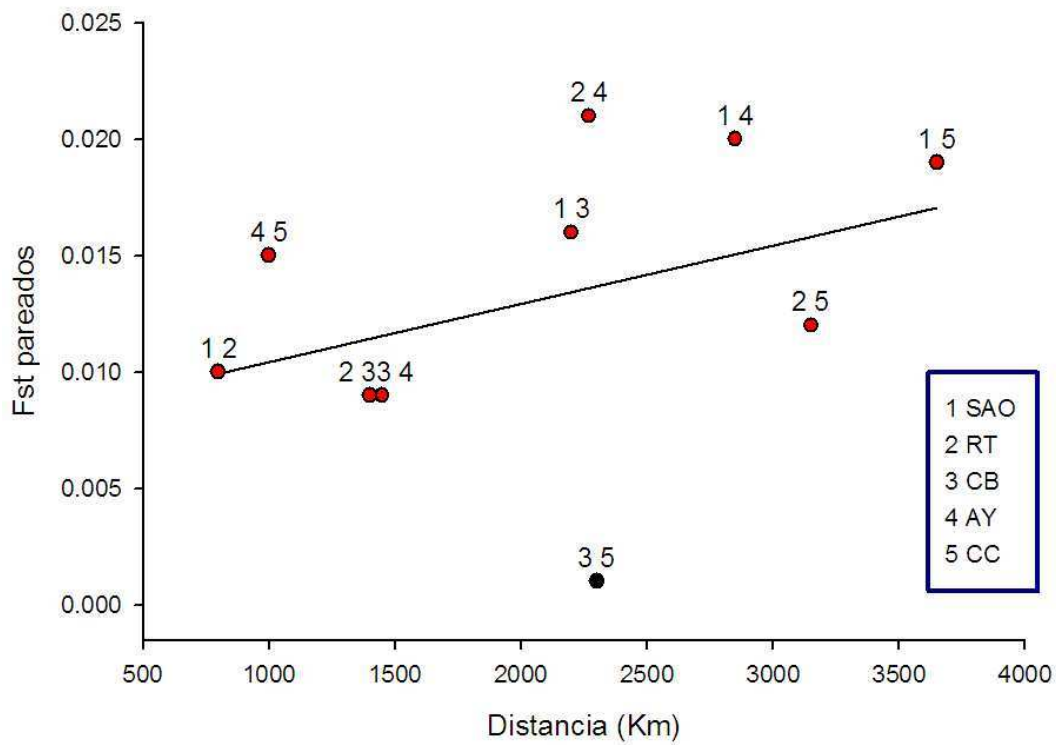
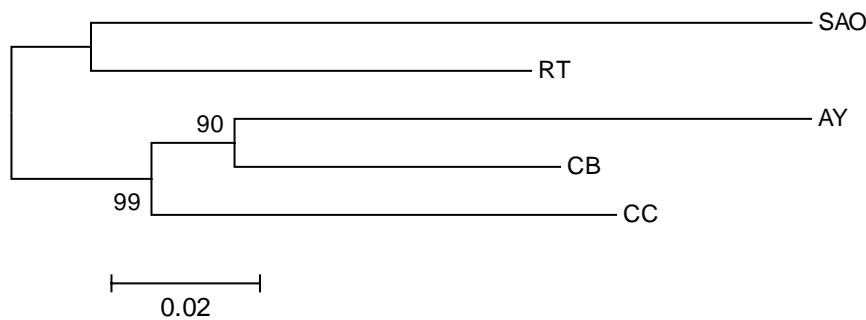
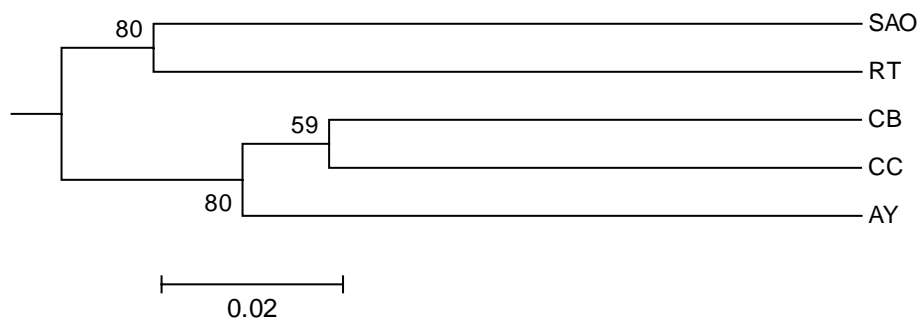


Figura 3.7 Representación gráfica de la correlación entre Distancia geográfica y  $F_{ST}$  pareados ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.1$ ). Los círculos rojos indican las comparaciones de  $F_{ST}$  significativamente distintas de cero ( $p < 0.05$ ). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).

A)



B)



**Figura 3.8. Relaciones genéticas entre las poblaciones inferidas mediante el método de Neighbour Joining (A) o UPGMA (B) a partir de la distancia genética  $D_A$  (Nei et al. 1983). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).**

El análisis bayesiano usando *Structure* permitió detectar estructura geográfica sólo bajo el modelo que incorpora información *a priori* sobre los sitios de muestreo (Hubisz et al. 2009). Para cada valor de K entre 1 y 5 se realizaron 6 corridas independientes verificándose que las salidas arrojaron resultados consistentes entre sí (Fig 3.9 y 3.10). El *Logn* de la probabilidad *a posteriori* de los datos sugeriría que las mejores soluciones podrían corresponderse con  $k = 2$  o  $k = 3$  (figura 3.11).

Asumiendo  $K = 2$ , la ancestralidad inferida para los individuos de CC, AY y CB se corresponde casi totalmente con el *cluster 1* (rojo); SAO muestra una mayor proporción de ancestralidad correspondiente al *cluster 2* (verde), mientras que en RT se observa un patrón intermedio.

Con  $k = 3$  resulta posible discriminar entre las 5 localidades de muestreo ya que cada una posee una proporción de asignación a cada uno de los 3 *clusters* que la caracteriza y lo mismo ocurre para  $k = 4$  y  $K = 5$ .

En la figura 3.10 se observa que los individuos de las localidades de CC, AY y CB se ubican sobre la arista derecha del triángulo reflejando que la ancestralidad inferida tendría componentes del cluster 1 y 2, pero no del cluster 3. Asimismo los individuos de las localidades de SAO y RT se ubican sobre la arista izquierda reflejando que la ancestralidad inferida tendría componentes del cluster 1 y 3, pero no del 2. Este patrón que separa SAO y RT por un lado (arista izquierda) y CC, AY y CB por el otro podría estar reflejando la misma diferenciación que se observa con  $k = 2$ .

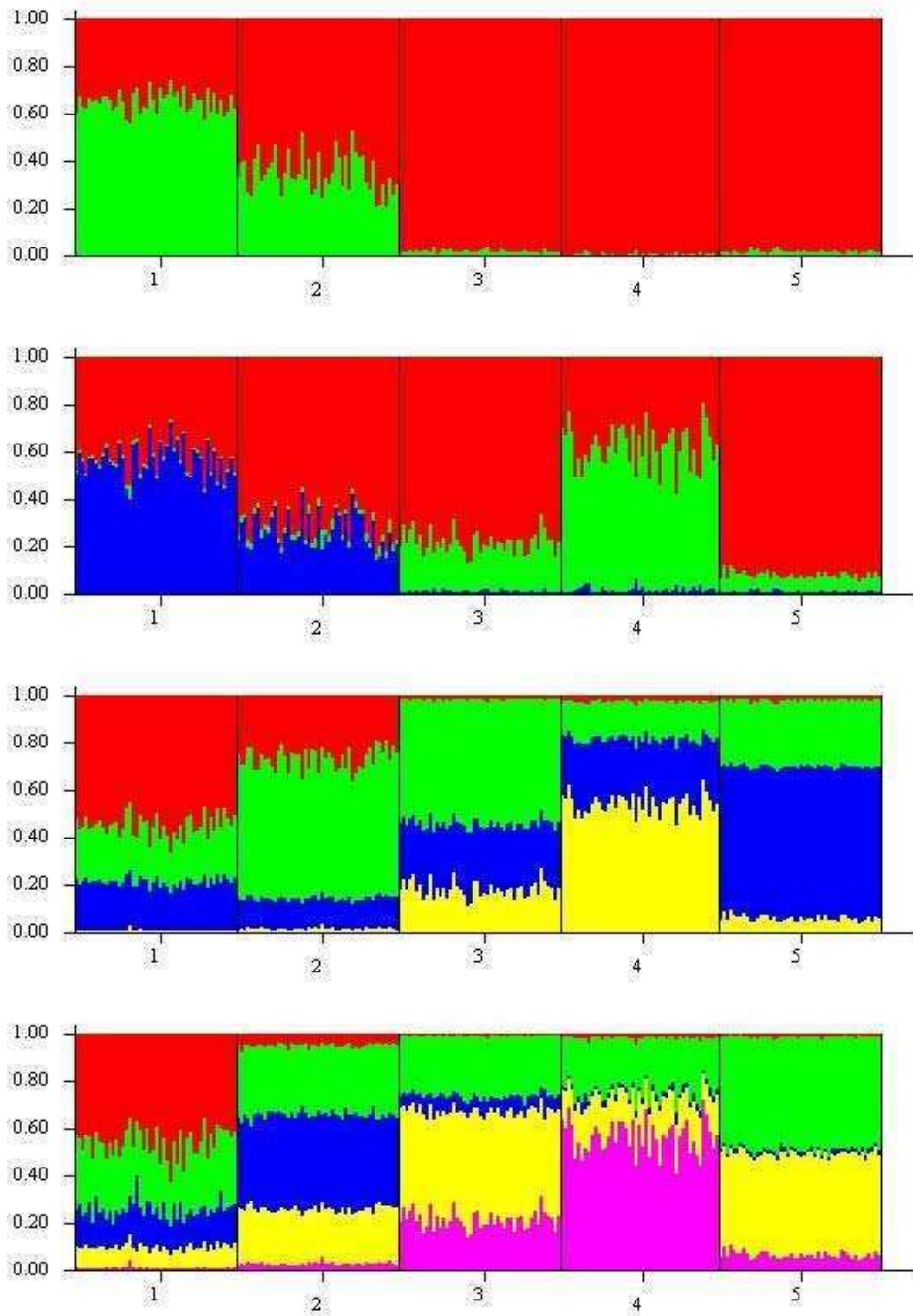


Figura 3.9. Cada barra vertical representa un individuo. El color se corresponde con la proporción de asignación de cada individuo en cada *cluster* para valores de K entre 2 y 5. Los individuos están ordenados por localidad de muestreo: 1 = San Antonio Oeste, 2 = Rada Tilly, 3 = Canal Beagle, 4 = Puerto Aysén, 5 = Concepción.



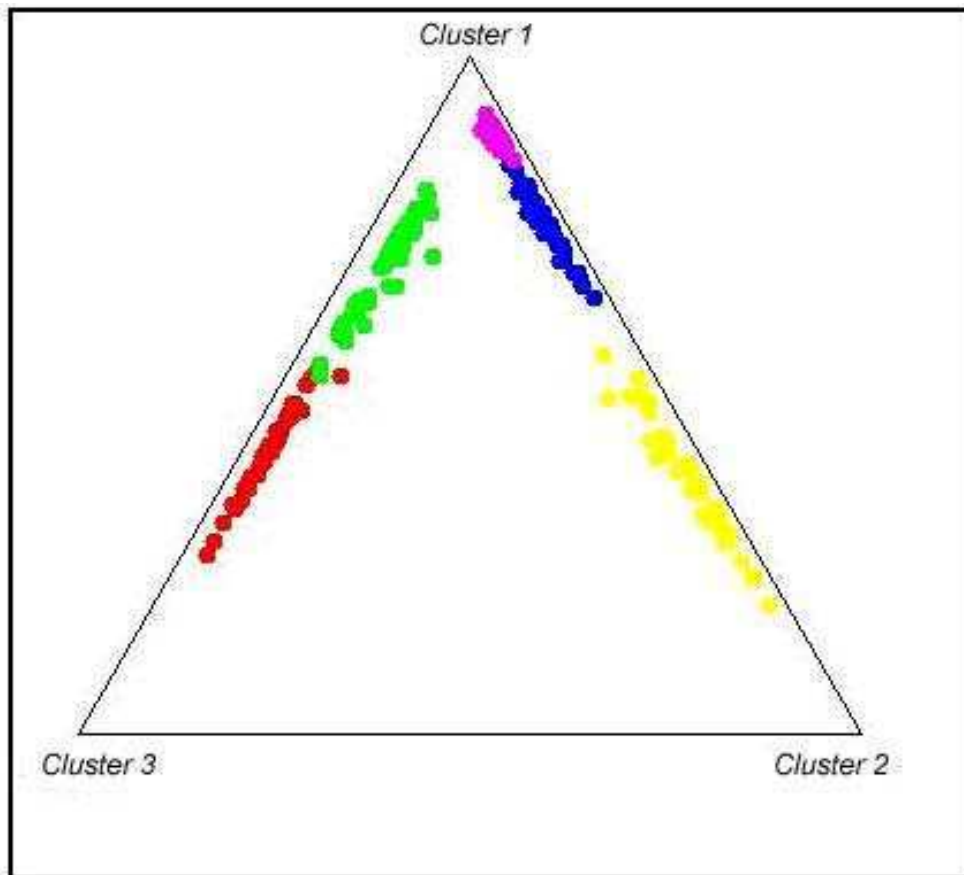
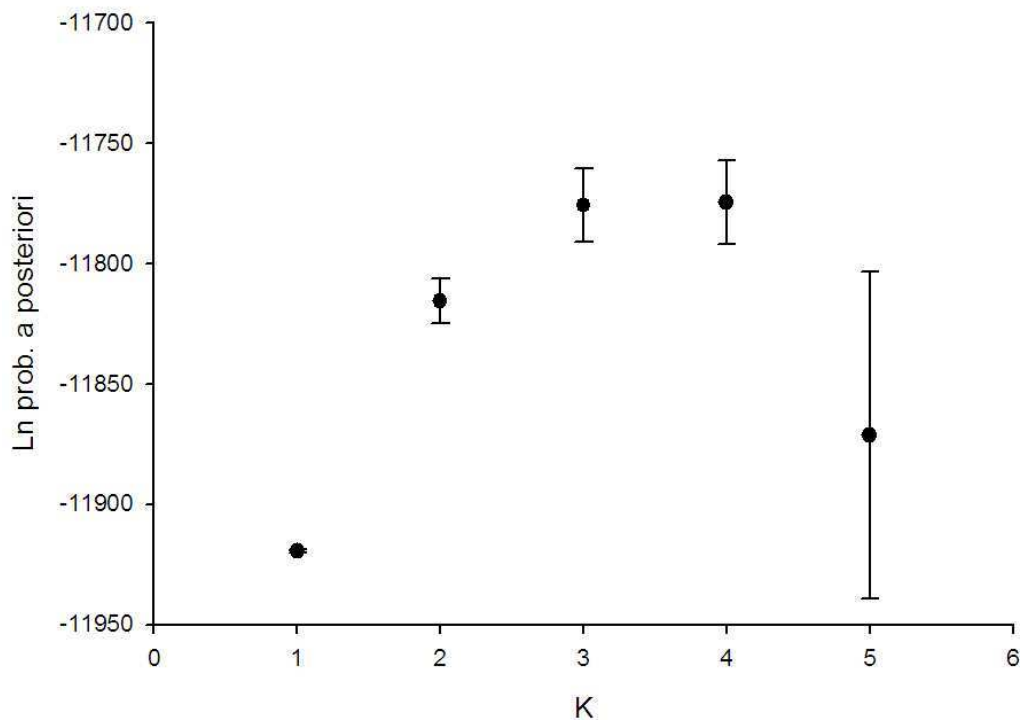


Figura 3.10. Otra forma de representar la salida de Structure para  $K = 3$ . Cada punto representa un individuo cuya ubicación en el esquema está determinada por la proporción de asignación a cada *cluster*. Los colores indican la localidad de origen del individuo: rojo = San Antonio Oeste, verde = Rada Tilly, azul = Canal Beagle, amarillo = Puerto Aysén, fucsia = Concepción.



**Figura 3.11** Inferencia del valor de K que mejor representa la estructura de los datos. Se muestra el promedio y desvío estándar del Ln de la probabilidad *a posteriori* de los datos de 6 corridas independientes para cada k.

Tanto el análisis de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones como el análisis de *clusters* realizado con Structure sugerirían la existencia de dos grupos: uno atlántico conformado por las localidades de SAO y RT y otro principalmente pacífico conformado por CC, AY y CB. Considerando esto se realizó un AMOVA jerárquico que reveló una diferenciación entre grupos baja pero significativa (Tabla 3.7).

**Table 3.7** Resultado de AMOVA jerárquico considerando un grupo conformado por San Antonio Oeste (SAO) y Rada Tilly (RT) y otro conformado por Concepción (CC), Puerto Aysén (AY) y Canal Beagle (CB).

Fuente de variación	Componentes de varianza	Valor de P
<b>Entre grupos</b> Grupo1: SAO-RT Grupo2: CC-AY-CB	0.00707	0.00391
<b>Dentro de grupos</b>	0.00927	0.00000

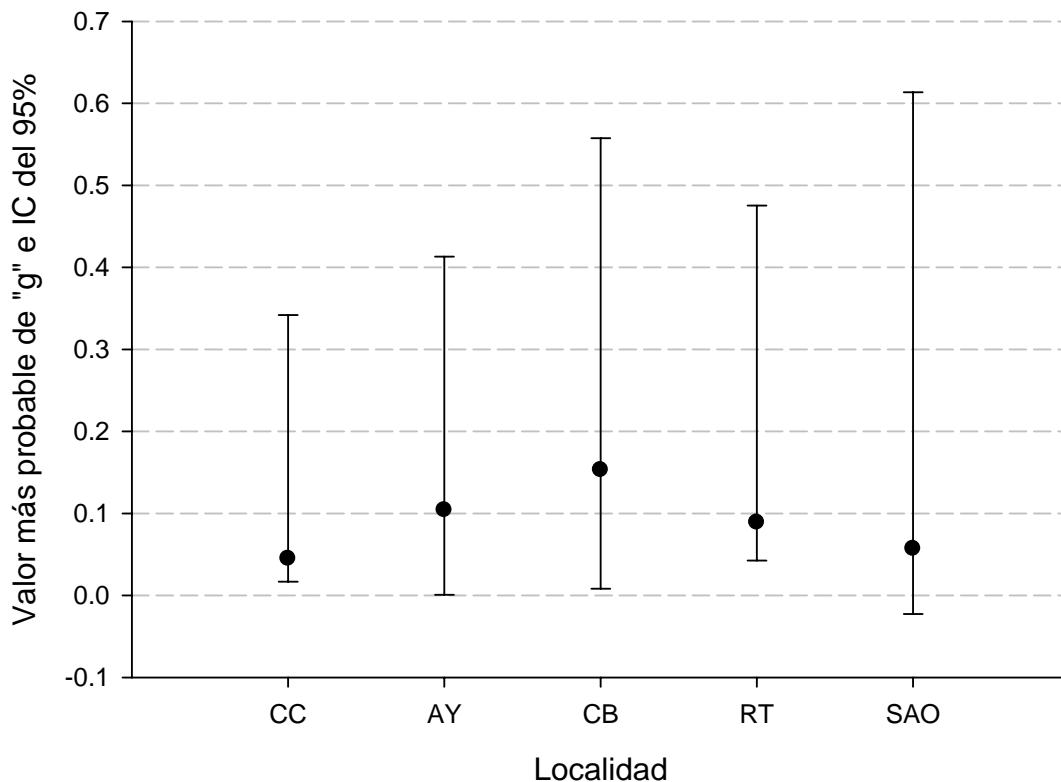
*Cambios demográficos históricos*

Para evaluar la existencia de cambios demográficos en el pasado se estimó el parámetro de crecimiento exponencial “g” utilizando el programa Lamarc. La ecuación utilizada para modelar el crecimiento poblacional en Lamarc es:

$$\Theta_t = \Theta_0 \exp - (g * t * \mu)$$

En esta ecuación  $\Theta_t$  es igual a  $4N\mu$  en un tiempo t en el pasado medido en número de generaciones y  $\Theta_0$  es  $4N\mu$  en el momento en que los organismos fueron muestreados. Valores positivos de “g” indican que las poblaciones posiblemente experimentaron crecimiento poblacional mientras que valores negativos son compatibles con un decrecimiento.

El valor estimado del parámetro “g” resultó positivo en todas las localidades y los correspondientes intervalos de confianza del 95% no incluyeron al cero excepto en SAO. Los valores de “g” no difieren significativamente entre localidades dado que sus IC se superponen (Figura 3.12).



**Figura 3.12** Parámetro “g” de crecimiento exponencial y su intervalo de confianza (IC) del 95% estimado en Lamarc v2.1.6 (Kuhner 2006) utilizando 9 loci de microsatélites en las 5 localidades estudiadas: Concepción (CC); Puerto Aysén (AY); Canal Beagle (CB); Rada Tilly (RT); San Antonio Oeste (SAO).

La interpretación final del valor de “g” depende de la tasa de mutación que se asuma. Si  $\mu$  es muy chica entonces es probable que el crecimiento poblacional no sea visible. Por el contrario valores altos de  $\mu$  podrían implicar un ritmo superior de crecimiento poblacional para los mismos valores de “g” y  $\Theta_0$ .

No se dispone de estimaciones de la tasa de mutación para los *loci* de microsatélites empleados en este trabajo, sin embargo, tasas de mutación razonables para microsatélites de di-nucleótidos de entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  mutaciones por *locus* por generación (Lai & Sun 2003; Avise 2004b), implicarían un ritmo apreciable de crecimiento poblacional para los valores de “g” y  $\Theta_0$  obtenidos en las localidades estudiadas (Figura 3.14)

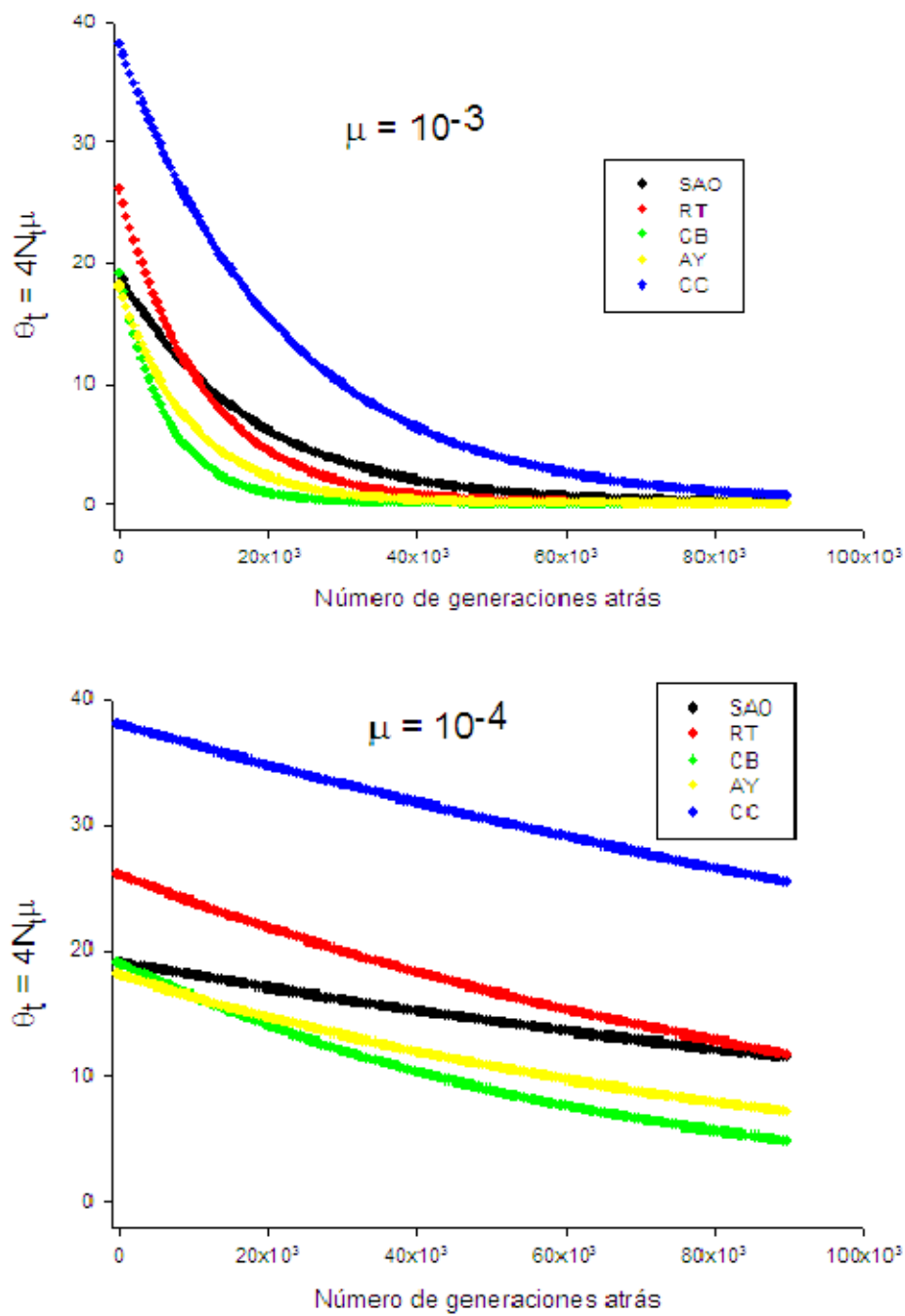


Figura 3.14. Los gráficos representan el ritmo de crecimiento poblacional en las últimas 100.000 generaciones según los valores de “g” y  $\Theta_0$  estimados para cada localidad asumiendo dos tasas de mutación. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Rada Tilly (RT), Canal Beagle (CB), Puerto Aysén (AY), Concepción (CC).

### 3.4 Discusión

Tres *loci* mostraron apartamiento significativo del equilibrio de Hardy-Weinberg como consecuencia, en todos los casos, de una deficiencia de heterocigotas que, según los análisis realizados, sugerirían la presencia de alelos nulos. Si se hubiera aplicado el ajuste de Bonferroni para pruebas múltiples algunos de estos apartamientos del equilibrio habrían resultado no significativos. Sin embargo, a diferencia de los *loci* 1 y 8 para los que se verificó deficiencia de heterocigotas en solo una localidad, el *locus* 6 mostró consistentemente el mismo patrón en 4 de las 5 localidades estudiadas lo que permitiría descartar que esta observación sea simplemente producto del azar. A pesar de esto, el hecho de que los análisis realizados con la presencia o ausencia del *locus* 6 no hayan arrojado diferencias sustanciales pone de manifiesto que el apartamiento del EHW consistentemente detectado en este *locus* en varias localidades no estaría afectando apreciablemente los principales patrones observados en los datos. Asimismo, dado que la deficiencia significativa de heterocigotas se detectó en solo 6 de las 45 pruebas realizadas (9 *loci* x 5 localidades) sería posible considerar que en cada población los apareamientos se producen al azar (panmixia).

La variabilidad genética evaluada mediante la heterocigosis esperada no varió significativamente entre las localidades. Sin embargo se observó un claro patrón latitudinal en el número de alelos específicos de cada localidad, encontrándose los valores más altos en las localidades ubicadas a menor latitud, tanto sobre la costa atlántica como sobre la costa pacífica. Este resultado podría indicar que las localidades ubicadas más al norte serían más antiguas y probablemente la fuente a partir de la cual se colonizaron las zonas ubicadas más al sur (Bowcock et al. 1994 realizan una interpretación equivalente sobre la distribución de alelos específicos para *loci* de microsatélites en humanos). Esto sugiere que en algún momento en el pasado podrían haber permanecido dos poblaciones de *E. maclovinus* separadas, una sobre su actual distribución noreste y la otra sobre el noroeste. Este posible escenario sería compatible con el patrón de estructura geográfica revelado por los datos. El análisis de las distancias genéticas entre las poblaciones mediante el algoritmo de NJ y el de UPGMA concuerdan en agrupar por una lado las

localidades ubicadas en la Patagonia atlántica media y norte (SAO y RT: grupo atlántico) y por el otro a las localidades del Pacífico y la del Canal Beagle (CC, AY y CB: grupo pacífico). Este patrón también es distinguible en el análisis bayesiano realizado con Structure. Para  $K=2$  se observa que el cluster verde es un componente exclusivo de SAO y Rada Tilly. Esta última localidad muestra un patrón intermedio entre SAO y el grupo formado por CC, AY y CB lo cual tiene sentido geográfico y por lo tanto sugiere que la estructuración detectada es genuina, además de ser compatible con la tendencia, aunque no significativa, de un aumento de la diferenciación con la distancia geográfica (figura 3.7). El análisis con  $K = 3$  resulta compatible con lo observado para  $k = 2$  ya que también distingue los grupos antes mencionados: por un lado el cluster azul (el 3 en el esquema triangular) está presente exclusivamente en SAO y RT y por el otro, el cluster verde (el 2 en el esquema triangular) esta presente casi exclusivamente en CC, AY y CB. Sin embargo, a diferencia del análisis realizado con  $k = 2$ , es posible también diferenciar las localidades dentro del grupo “pacífico” debido a la asignación asimétrica de cada cluster, reflejando, probablemente, la naturaleza jerárquica en la que la varianza genética se encuentra estructurada. En línea con estos resultados el AMOVA realizado mostró diferencias significativas tanto entre grupos como dentro de grupos.

Llamativamente el  $F_{ST}$  entre Canal Beagle y Concepción resultó muy bajo apartándose de la tendencia general observada en la figura 3.7. La similitud entre estas dos localidades es también evidente en el análisis realizado con Structure. Una posibilidad es que esta similitud esté relacionada con eventos de dispersión de larga distancia.

Los valores del parámetro “g” de crecimiento poblacional resultaron positivos y significativamente distintos de cero en 4 de 5 localidades. Este análisis no pretende asumir que los tamaños históricos poblacionales se ajusten a un modelo de crecimiento exponencial, como tampoco intenta calcular un ritmo preciso de expansión demográfica. Sin embargo los valores positivos y significativos de “g” son compatibles con un posible escenario de crecimiento poblacional histórico y en este sentido los resultados coinciden con los obtenidos mediante ADN mitocondrial.

## CAPÍTULO 4

### MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA



### 4.1 Introducción

El estudio de la variación fenotípica a nivel geográfico contribuye a comprender los procesos ecológicos y evolutivos que influyen sobre la biodiversidad y por lo tanto aporta al conocimiento de base necesario para el manejo y conservación de las especies. Las diferencias morfológicas entre individuos pueden deberse a una variedad de procesos biológicos como, por ejemplo, cambios ontogenéticos inducidos por el ambiente (plasticidad fenotípica), adaptación a condiciones ambientales locales o divergencia evolutiva (West-Eberhard 2003; Pigliucci & Preston 2004).

La morfometría geométrica (Bookstein 1997) es una de las herramientas más poderosas para estudiar la variación de estructuras anatómicas complejas. En esta aproximación la forma de una determinada estructura se representa mediante la posición relativa de distintos puntos anatómicos llamados *landmarks* los cuales se consideran homólogos entre todos los individuos del estudio. Las relaciones espaciales propias de cada configuración de *landmarks* permiten, en general, una descripción de la forma más precisa que la morfometría tradicional de medidas lineales (Rohlf 2000). Otra ventaja de la morfometría geométrica es que permite, además, una visualización e interpretación sencilla de las diferencias en la forma (Zelditch et al. 2004). El objetivo del presente capítulo es analizar, mediante técnicas de morfometría geométrica, la forma general del cuerpo en individuos de *E. maclovinus* provenientes de distintos puntos de su distribución geográfica.

### 4.2 Materiales y Métodos

Se utilizaron un total de 140 individuos provenientes de 4 localidades: 52 de San Antonio Oeste (SAO), 15 de Pto. Madryn (Madryn), 35 de Pto. San Julián (SJ) y 38 de Canal Beagle (CB) (ver Figura 2.1). Para el estudio se seleccionaron individuos juveniles de alrededor de 10 cm de largo total para independizarse de efectos del tamaño en la forma. Los ejemplares fueron fotografiados con una cámara digital marca Nikon modelo coolpix 4600, utilizando un estativo para mantener la cámara a 30 cm de los individuos. Utilizando un nivelador de burbuja se constató que la cámara de fotos y el

ejemplar estuvieran en planos paralelos. La puesta a punto de las fotografías fue realizada siguiendo las recomendaciones propuestas por Zelditch et al. (2004).

Se marcaron 19 *landmarks* (que se asumen homólogos) sobre el flanco izquierdo de cada pez (Figura 4.1).

- 1- Extremo anterior del labio superior.
- 2- Poro anterior del sistema lateral sensitivo cefálico
- 3- Narina.
- 4- Extremo anterior del ojo.
- 5- Extremo posterior del ojo.
- 6- Centro del ojo.
- 7- Comisura occipital del sistema lateral sensitivo cefálico.
- 8- Inserción anterior de la primera aleta dorsal.
- 9- Inserción posterior de la primera aleta dorsal.
- 10- Inserción anterior de la segunda aleta dorsal.
- 11- Inserción posterior de la segunda aleta dorsal.
- 12- Inserción superior de la aleta caudal.
- 13- Inserción inferior de la aleta caudal.
- 14- Punto medio de la inserción de la aleta caudal.
- 15- Inserción posterior de la aleta anal.
- 16- Inserción posterior de la aleta ventral.
- 17- Inserción anterior de la aleta ventral.
- 18- Inserción superior de la aleta pectoral
- 19- Inserción inferior de la aleta pectoral.

El programa TpsDig (Rohlf 2005) se utilizó para colocar los *landmarks* en cada foto y determinar sus coordenadas en los ejes “x” e “y”. Las configuraciones de *landmarks* obtenidas se superpusieron con el método de Procrustes Generalizado (Rohlf 1999), implementado en el programa MorphoJ (Klingenberg 2011) con el propósito de trasladar, rotar y escalar las imágenes de manera de minimizar las distancias. Se realizó un CVA (*Canonical variate analysis*) para encontrar las características morfológicas que mejor discriminan entre los grupos estudiados. Se obtuvieron las grillas de deformación para

destacar las zonas principales de variación en forma. Se realizaron un total de 1000 permutaciones de individuos entre grupos como test no paramétrico de la significancia de la distancia Procrustes y de Mahalanobis entre pares de grupos. Finalmente se realizaron pruebas de clasificación correcta/incorrecta mediante validación cruzada entre pares de localidades utilizando el programa MorphoJ (Klingenberg 2011) y pruebas globales utilizando el programa PAST v2.13 (Hammer et al. 2001).

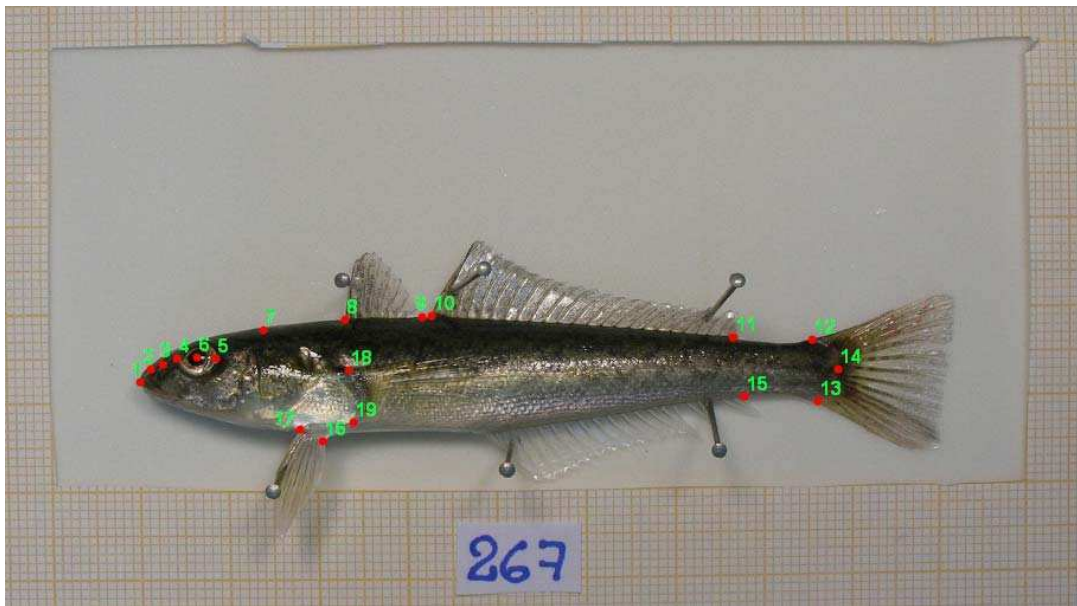


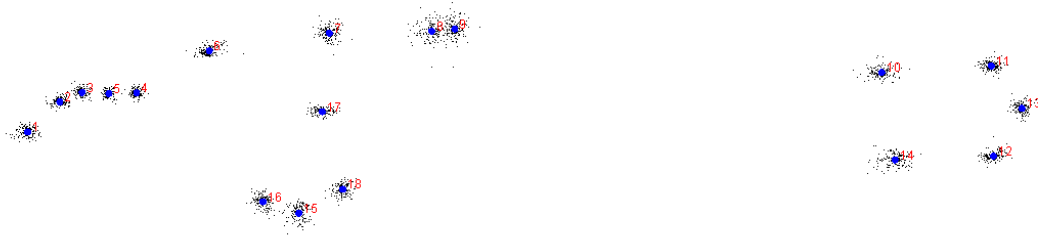
Figura 4.1. Ejemplo de las fotos tomadas a los ejemplares de *E. maclovinus* para el estudio de morfometría geométrica. Los puntos rojos corresponden a los *landmarks*.

### 4.3 Resultados

Inicialmente se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) mediante el cual no fue posible distinguir entre localidades. Por ese motivo se procedió a realizar un análisis canónico el cual mostró una buena discriminación entre localidades. En conjunto los 3 ejes discriminantes distinguen a todas las localidades entre sí. La variación entre grupos explicada por el eje canónico 1 fue más del doble que la explicada por el eje canónico 2 o el eje canónico 3. Específicamente el EC1 explicó el 54,7 % de la varianza entre grupos, el EC2 el 24,7% y el EC3 el 22,6%. En el eje EC1 se distingue

principalmente la localidad de Canal Beagle de las otras 3 (Figura 4.3). Como puede inferirse de la grilla de deformación correspondiente al EC1 estas diferencias morfológicas podrían atribuirse principalmente a un cuerpo más comprimido dorso-ventralmente en la zona de la aleta pectoral (indicado por el desplazamiento relativo de los *landmarks* 16, 17 y 19) y a una posición más posterior del extremo posterior de la aleta anal (indicada por el desplazamiento del *landmark* 15) (Figura 4.6). Los otros dos ejes canónicos, aunque explican un menor porcentaje de varianza entre grupos, contribuyen en combinación con el eje 1 a diferenciar todas las localidades entre si.

Las distancias pareadas de Mahalanobis y de Procrustes entre poblaciones fueron en todos los casos significativas (Tabla 4.1,  $p < 0.0001$ ). La *validación cruzada* realizada para evaluar la fiabilidad de la discriminación entre grupos mediante comparaciones pareadas, correctamente asignó a los individuos a sus grupos en general en más del 80 % de los casos (Tabla 4.2). Las excepciones involucran a Pto. Madryn, la localidad con menor número de ejemplares (Tabla 4.2 y 4.3).



**Figura 4.2. Superposición de procrustes de los *landmarks*. Los puntos azules de mayor tamaño ubicados en el centro de cada nube corresponden a la configuración de consenso.**

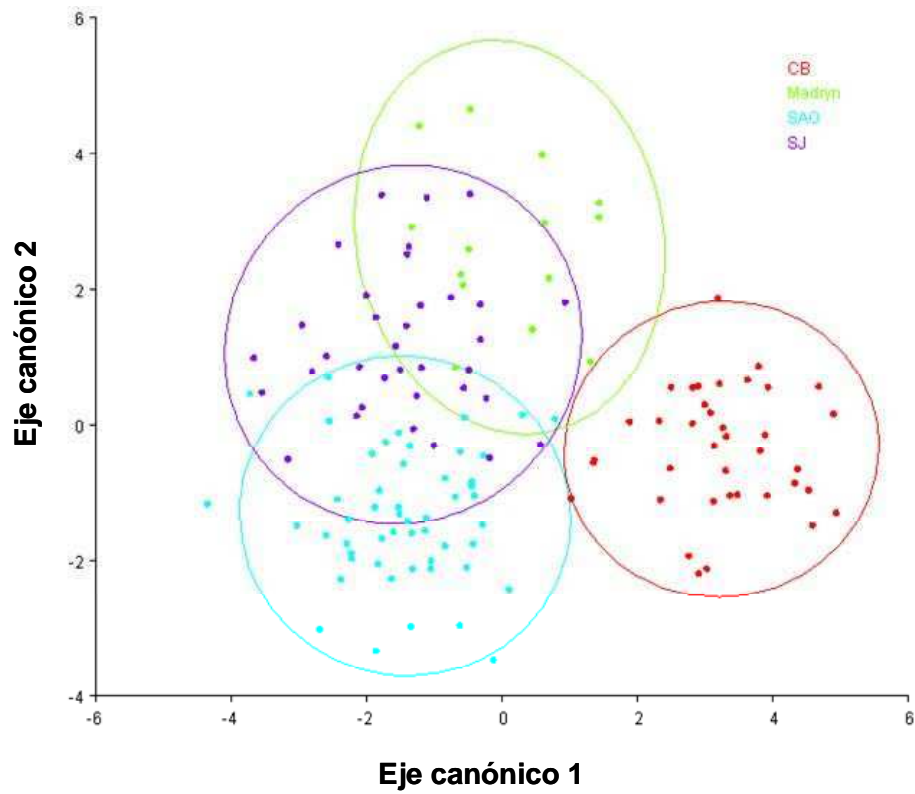


Figura 4.3 Eje canónico 1 vs. eje canónico 2. Los colores se corresponden con las 4 localidades estudiadas. Las elipses representan el área del 95% de confianza para cada localidad. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).

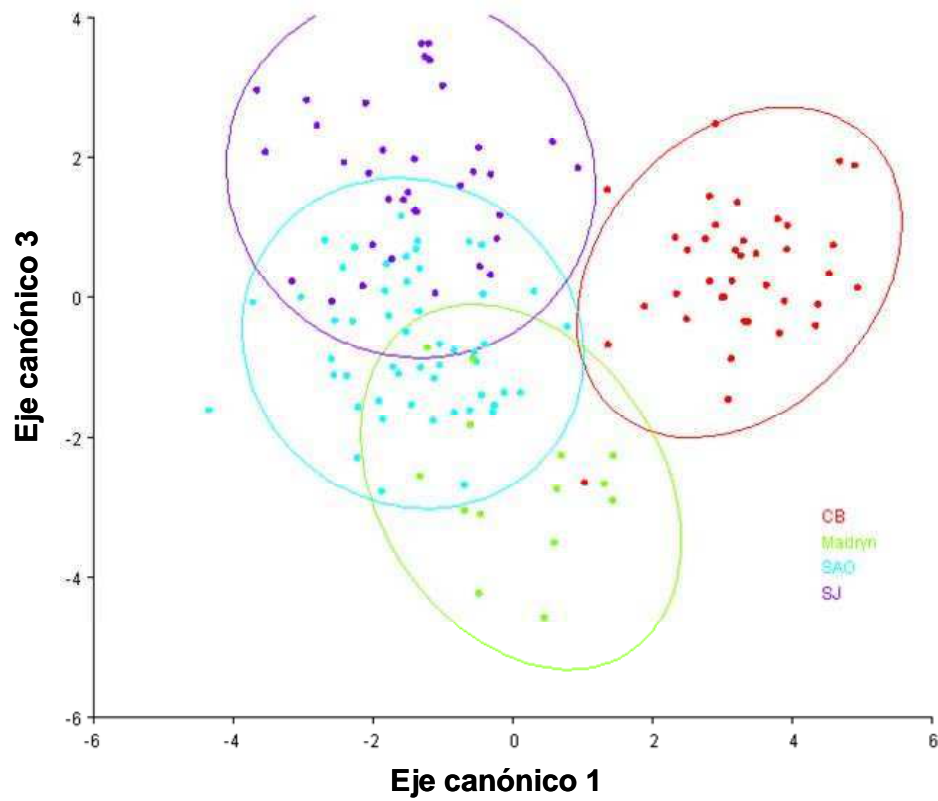


Figura 4.4 Eje canónico 3 vs. eje canónico 1. Los colores se corresponden con las 4 localidades estudiadas. Las elipses representan el área del 95% de confianza para cada localidad. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).

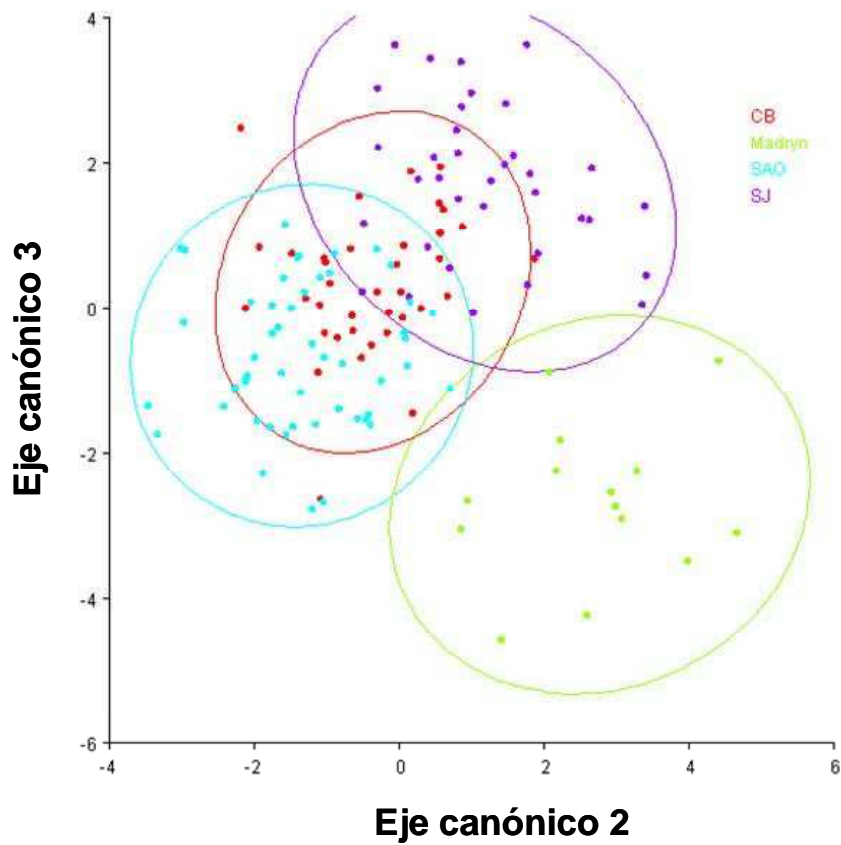
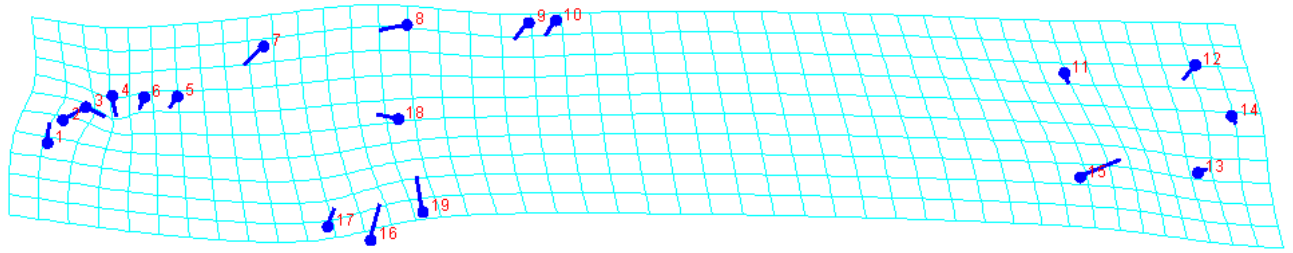
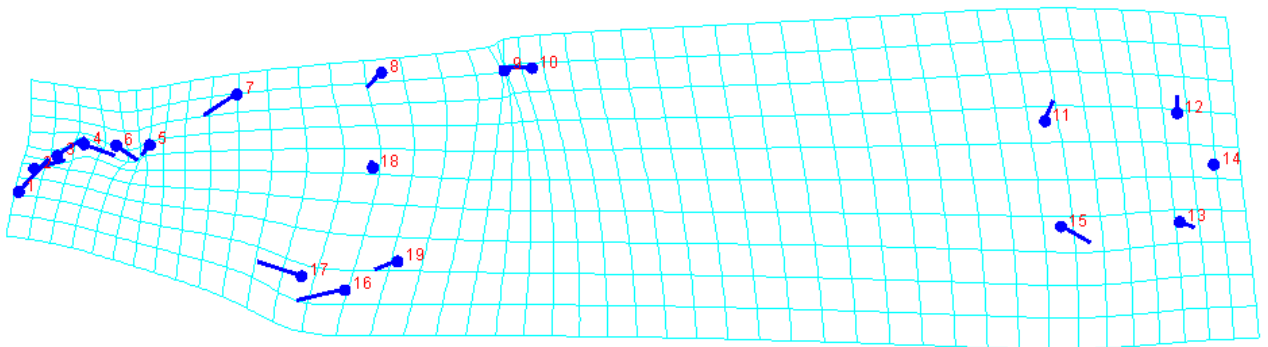


Figura 4.5 Eje canónico 3 vs. eje canónico 2. Los colores se corresponden con las 4 localidades estudiadas. Las elipses representan el área del 95% de confianza para cada localidad. Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).



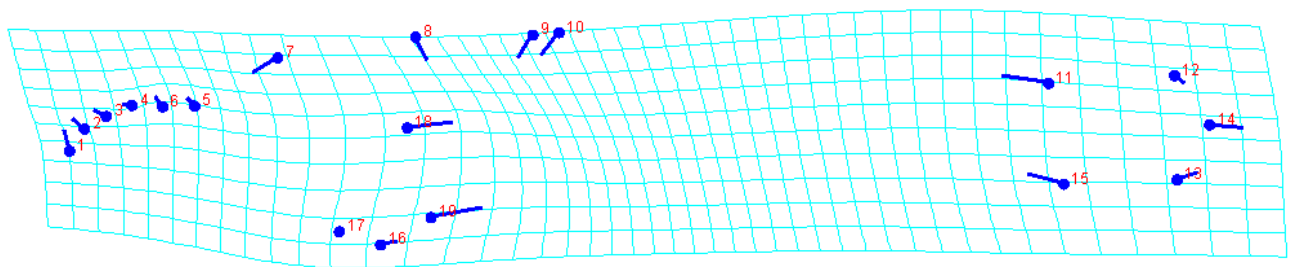
CV1

Figura 4.6 Grilla de deformación. Cambio de forma asociado con valores positivos del eje canónico 1.



CV2

Figura 4.7 Grilla de deformación. Cambio de forma asociado con valores positivos de eje canónico 2.



CV3

Figura 4.8 Grilla de deformación. Cambio de forma asociado con valores positivos de eje canónico 3.



**Tabla 4.1. Distancias de Mahalanobis en la matriz triangular inferior y distancias de Procrustes en la matriz triangular superior. Las distancias son en todos los casos significativas ( $p < 0.0001$ ). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).**

	SAO	Madryn	SJ	CB
SAO	-	0.0174	0.0107	0.0138
Madryn	4.85	-	0.0172	0.0159
SJ	3.47	4.97	-	0.0128
CB	4.88	5.38	5.13	-

**Tabla 4.2. Pruebas de validación cruzadas donde se indica la cantidad de individuos que fueron correctamente asignados a su grupo de origen para todas las comparaciones pareadas posibles (a-f). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).**

a) SAO- Madryn

Grupo de origen	Grupo asignado		Total	% de validación
	SAO	Madryn		
SAO	46	6	52	88
Madryn	5	10	15	67

b) SAO-SJ

Grupo de origen	Grupo asignado		Total	% de validación
	SAO	SJ		
SAO	44	8	52	85
SJ	6	29	35	83

c) SAO-CB

Grupo de origen	Grupo asignado		Total	% de validación
	SAO	CB		
SAO	50	2	52	96
CB	2	36	38	95

d) Madryn-SJ

Grupo de origen	Grupo asignado		Total	% de validación
	Madryn	SJ		
Madryn	9	6	15	60
SJ	6	29	35	83

e) Madryn - CB

Grupo de origen	Grupo asignado		Total	% de validación
	Madryn	CB		
Madryn	13	2	15	86
CB	2	36	38	95

f) SJ-CB

Grupo verdadero	Grupo asignado		Total	% de validación
	SJ	CB		
SJ	32	3	35	91
CB	3	35	38	92

**Tabla 4.3** Tabla de asignación global realizada con el método *Jackknifing* de validación cruzada implementado en PAST v 2.13 (Hammer et al. 2001). Abreviaturas: San Antonio Oeste (SAO), Puerto Madryn (Madryn), Puerto San Julián (SJ), Canal Beagle (CB).

	SAO	Madryn	SJ	CB	Total	%Val.
SAO	40	2	6	4	52	77
Madryn	2	9	3	2	16	56
SJ	7	4	21	3	35	60
CB	5	1	1	32	39	82

#### 4.4 Discusión

Los caracteres morfométricos, al igual que los fenotípicos en general, tienen la complicación de estar influenciados tanto por factores ambientales como genéticos, y la importancia relativa de ambas fuentes de variación es difícil de determinar. Una manera directa de abordar esta problemática sería mediante experimentos de crianza común (*common garden*), donde las variables ambientales se controlan de modo de poder distinguir los componentes ambientales y genéticos de la variación fenotípica (Conover et al. 2006). Este tipo de experiencias son, en general, muy difíciles de llevar a cabo en organismos no modelos debido a la imposibilidad de cría en cautiverio de algunas especies o a ciclos de vida largos. Otro tipo de aproximación directa involucraría una búsqueda a nivel genómico de *loci* asociados con algún rasgo fenotípico determinado. Sin embargo, es posible hacer algunas aproximaciones indirectas para obtener indicios de que tipo de factores estarían influyendo más sobre la diferenciación fenotípica, como evaluar correlaciones entre distancias genéticas, distancias ambientales y distancias morfológicas (Jorgensen et al. 2008; Ruzzante et al. 2011).

Existen dos tipos principales de variación genética que se utilizan frecuentemente en estudios evolutivos, especialmente en aquellos relacionados con la biología de la conservación. Una es la variación molecular que se asume neutral desde el punto de vista de la selección natural porque no afecta el fenotipo, y por lo tanto se supone que no influiría sobre el *fitness*. La otra

sería la variación genética entre individuos que afecta el fenotipo, y que por lo tanto potencialmente podría afectar el *fitness*. En este caso la selección natural podría favorecer la divergencia adaptativa o bien limitarla en el caso de que la selección sea estabilizadora. La geografía de la variación genética de genes neutrales y no neutrales proveen información muy diferente sobre la ecología y la evolución de las especies (Shaw & Mullen 2011).

En la presente tesis se utilizaron marcadores moleculares que se asumen neutrales para los que además no habría ninguna razón para creer que tuvieran algún efecto sobre la forma del cuerpo. Sin embargo, caracteres independientes pueden estar correlacionados debido a una historia evolutiva en común (D'Anatro & Lessa 2006; Leinonen et al. 2006). Al igual que los análisis multilocus realizados en esta tesis, el análisis de morfometría geométrica mostró ser suficientemente preciso como para distinguir entre todas las localidades estudiadas, pudiendo, además, asignar correctamente a los individuos a sus respectivas poblaciones en más de un 80 % en promedio. El eje canónico 1, que explica más del 50% de la varianza entre grupos es el que permite distinguir más claramente al Canal Beagle de las otras 3 localidades estudiadas. Por otro lado el análisis con microsatélites realizado en el capítulo 3 sugiere una mayor afinidad genética del Canal Beagle con las localidades ubicadas sobre la costa Pacífica que sobre la Atlántica. Por este motivo sería interesante realizar un estudio de morfometría en localidades sobre la costa Pacífica. De esta manera sería posible evaluar si la localidad del Canal Beagle posee mayor afinidad morfológica (por ejemplo en los caracteres asociados a la variación en el eje canónico 1 de este estudio) con localidades en el Pacífico o en el Atlántico. En este sentido, una mayor afinidad morfológica del Canal Beagle con el Pacífico que con el Atlántico, en conjunto con la mayor afinidad genética detectada en el análisis de microsatélites, podría estar indicando una historia evolutiva común. Lamentablemente, por cuestiones de logística, no fue posible incluir en este trabajo localidades del lado pacífico.

El estudio de morfometría geométrica se realizó en individuos juveniles de aproximadamente 10 cm debido a que es el tamaño de pez más fácil de capturar. Si en los individuos adultos las diferencias morfológicas entre localidades se mantienen, estas deberían ser mayores en términos absolutos de distancia, por lo que el análisis podría ser más robusto.

Futuros estudios deberían extenderse a individuos de mayor tamaño, incorporar un mayor número de localidades, tanto para el análisis morfométrico como para el análisis multilocus y tratar de establecer posibles patrones de correlación entre caracteres morfológicos, genéticos, ambientales y geográficos.

**CAPÍTULO 5. Discusión general**

En el presente trabajo se logró caracterizar los principales patrones de variación genética en la especie *E. maclovinus* a lo largo de casi toda su distribución utilizando como marcadores genéticos secuencias mitocondriales del gen del citocromo b y *loci* nucleares de microsatélites.

Los análisis con ambos tipos de marcadores moleculares mostraron similitudes en algunos aspectos y diferencias en otros. Ambos tipos de marcadores detectaron importantes niveles de polimorfismo, pero con débil estructuración geográfica reflejada en los bajos porcentajes de variación entre localidades. Este resultado es común en especies marinas y es generalmente interpretado como la consecuencia de la influencia (en combinación o no) de 3 factores principales: expansiones recientes del rango de distribución, altos niveles de flujo génico y tamaños poblacionales grandes (Hauser & Carvalho 2008). Las expansiones recientes de rango contribuirían a un bajo nivel de diferenciación porque implicarían conectividad histórica entre poblaciones; el flujo génico sería una fuerza homogeneizadora importante en el ambiente marino debido a la ausencia de barreras físicas para la migración, y los tamaños poblacionales grandes implicarían una menor contribución de la deriva génica en la diferenciación poblacional. En *E. maclovinus* ambos tipos de marcadores muestran patrones de variación compatibles con una posible expansión poblacional. Además, a pesar de que no existen estimaciones directas de la capacidad dispersiva del róbalo es esperable que la misma sea alta, dadas las características de la especie: la migración sería posible mediante el desplazamiento de los adultos, ya que son activos nadadores, o mediante la dispersión de los huevos y larvas pelágicas. Finalmente la abundancia de *E. maclovinus* a lo largo de toda su distribución permite suponer tamaños poblacionales grandes. Por lo tanto *E. maclovinus* no sería la excepción a la regla en organismos marinos y los bajos niveles de variación entre localidades estimados con ambos tipos de marcadores moleculares podrían ser la consecuencia de la combinación de los 3 factores anteriormente mencionados.

Por otro lado, la principal diferencia entre ambos tipos de marcadores sería que el análisis con ADN mitocondrial parece reflejar una expansión desde

un único refugio ubicado probablemente al NE de su actual distribución (Océano Atlántico a la latitud de la Provincia de Río Negro), mientras que el análisis de microsatélites indicaría dos refugios (o al menos dos zonas de mayor estabilidad demográfica) ubicados en el NE y NO de la actual distribución de la especie (Océano Atlántico a la latitud de la Provincia de Río Negro, y Pacífico Sur a la latitud de Concepción). Los principales resultados obtenidos a partir de las secuencias mitocondriales, que indicarían un único refugio son: la distribución unimodal de las diferencias pareadas y los valores negativos de las pruebas de neutralidad globales. En el caso de los microsatélites la principal evidencia que sugiere dos refugios es el ordenamiento latitudinal en el número de alelos específicos, tanto en el Atlántico como en el Pacífico. Además, aunque en ambos casos los  $F_{ST}$  entre grupos (Atlántico y Pacífico) resultaron significativos y de valores comparables (lo que atenúa la diferencia entre ambos tipos de marcadores), en el caso de los microsatélites la distinción entre ambos grupos fue consistentemente detectada por el análisis realizado con el programa Structure y por el fenograma construido a partir de las distancias genéticas  $D_A$  de Nei entre localidades. En cambio, en el caso del ADNmt el análisis de *cluster* no logró distinguir dichos grupos, incluso el  $F_{ST}$  pareado entre la población más al norte en el Pacífico, (Concepción) y la población más al norte en el Atlántico, (SAO) es cero.

Es posible imaginar al menos dos escenarios históricos que expliquen la aparente discordancia entre los resultados mitocondriales y los de microsatélites:

- Escenario 1) La población de *E. maclovinus* experimentó cambios demográficos en el pasado, siendo la distribución actual el resultado de la colonización desde 2 refugios, uno en el NE y otro en el NO de su actual distribución, como sugieren los análisis realizados con microsatélites. La expansión aparente desde un único refugio que refleja el patrón mitocondrial, podría ser consecuencia de la expansión de una variante ancestral en toda la distribución, luego de un contacto secundario entre las poblaciones originalmente separadas. Dicha expansión debiera estar mediada por la selección natural.

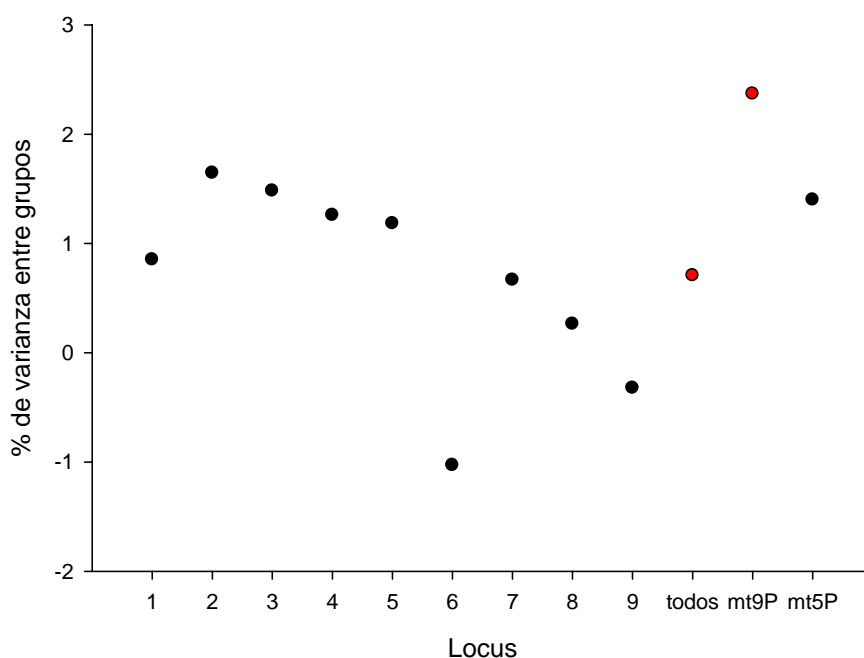
- Escenario 2) La población de *E. maclovinus* experimentó una expansión poblacional desde un único refugio, probablemente durante el Pleistoceno Medio, como sugiere el ADN mitocondrial. Subsecuentes fluctuaciones demográficas (una situación esperable dado los cambios climáticos; ver figura 1.6), probablemente menos severas, serían las responsables del patrón observado con *loci* de microsatélites. Específicamente, la historia posterior habría facilitado la persistencia de variación microsatelital en las regiones más estables de la distribución, es decir en las áreas a menor latitud, tanto en el Pacífico como en el Atlántico.

Al considerar el escenario 2 surge la pregunta de por qué las fluctuaciones demográficas más recientes podrían no haber dejado una impronta clara en el segmento de ADN mitocondrial estudiado. Los sistemas diploides tienen un tamaño efectivo aproximadamente 4 veces mayor que los haploides de herencia uniparental (como el caso del ADN mitocondrial), razón por la cual los tiempos esperados de coalescencia también son 4 veces mayores (Wakeley 2009). Por este motivo podría esperarse que una genealogía mitocondrial sea capaz de captar eventos demográficos, por ejemplo de vicarianza, mas recientes que una genealogía nuclear. Otra manera de apreciar este fenómeno es la deriva genética, la cual se espera tenga una influencia mayor sobre marcadores mitocondriales debido a su menor tamaño efectivo. Esta podría ser la razón por la cual el  $F_{ST}$  dividiendo en grupos Atlántico y Pacífico fue un poco mayor en el análisis mitocondrial. También hay que considerar que dicho valor de  $F_{ST}$  se calculó en base a 9 localidades para el ADN mitocondrial, mientras que para el análisis de microsatélites solo se utilizaron 5 localidades. Si el  $F_{ST}$  entre regiones se calcula utilizando las mismas 5 localidades que para los microsatélites, entonces, el valor cae dentro del rango en que varían los valores de  $F_{ST}$  calculados para cada *locus* por separado (Figura 5.1). Por otro lado, la ventaja de los análisis nucleares es que pueden involucrar muchos *loci* independientes, y por lo tanto potencialmente pueden tener mayor poder de resolución para determinar la estructura geográfica débil, ya que se sumarían muchas pequeñas señales. Un ejemplo extremo de esto se ilustra en el artículo de Novembre et al. (2008) donde, en base al análisis de centenares de miles de SNP nucleares, se resuelve en humanos una estructura geográfica imposible de detectar con ADN



mitocondrial. Esta podría ser la razón por la cual la agrupación de las localidades en dos grupos (uno Atlántico y otro Pacífico) fue más consistente en el análisis de microsatélites que en el análisis mitocondrial. Además de la estructura, la variación geográfica en la diversidad genética luego de una expansión de rango es mejor evaluada por varios *loci* que por uno solo debido a la estocasticidad del proceso genético poblacional (Austerlitz et al. 1997). Por lo tanto las últimas fluctuaciones demográficas de *E. maclovinus* planteadas en el escenario 2 pueden no verse reflejadas en el ADN mitocondrial simplemente porque se trata de un único *locus*.

De todas maneras diferentes autores mantienen distintos puntos de vista sobre cómo interpretar las diferencias entre análisis multilocus nucleares y análisis de ADN de organelas (ejemplo Zink & Barrowclough 2008; Barrowclough & Zink 2009; Edwards & Bensch 2009).



**Figura 5.1.** Se muestran los  $F_{ST}$  entre regiones (Atlántico y Pacífico) para cada locus de microsatélites (1 a 9), para todos los loci de microsatélites (todos), para el ADNmt considerando las 9 poblaciones analizadas (mt9P) y para el ADNmt considerando solo las mismas 5 poblaciones que se utilizaron para el estudio de microsatélites (mt5P). Los puntos rojos indican valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Pocos estudios genéticos en organismos marinos bentónicos comprenden grandes extensiones en las costas del extremo sur de Sudamérica. Los mismos están generalmente restringidos a solo una de las

costas (Pacífica o Atlántica) y utilizan, en la mayoría de los casos, solo marcadores mitocondriales. Dos de estos estudios presentan resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo: fueron realizados en el gastrópodo *Concholepas concholepas* sobre la costa pacífica (Cárdenas et al. 2009) y en la lapa *Nacella magellánica* en la costa atlántica (de Aranzamendi et al. 2011). Ambas especies mostraron bajos valores de  $F_{ST}$  entre localidades y ausencia de un patrón de aislamiento por distancia. En ambos casos el resultado fue interpretado por los autores como la consecuencia de altos valores de flujo génico acoplados con un escenario de expansión poblacional reciente. En ambas especies el momento estimado de la expansión fue previo al último máximo glacial siendo 400.000 años para *C. concholepas* y 110.000 para *N. magellanica*. Aunque en este último caso los autores consideraron que las tasas mutacionales a nivel poblacional pueden ser 10 veces mayores que las tasas de sustitución estimadas a nivel de especie (siguiendo a Ho et al. 2005; Ho et al. 2007), y que por lo tanto la expansión poblacional podría haber ocurrido luego del último máximo glacial. Otras especies muestran en cambio evidencias más claras de colonización posterior al último máximo glacial en el extremo sur de Patagonia. El gastrópodo *Acanthia monodon*, que posee limitada capacidad dispersiva, tiene, sobre el margen Pacífico, una estructura regional cuyas distancias genéticas están correlacionadas con la distancia geográfica (Sánchez et al. 2011). En el extremo sur solo se detectó un haplotipo mitocondrial, lo que fue interpretado por los autores como una colonización posterior al último máximo glacial luego de que el hielo se retirara de la zona intermareal. Un patrón similar se encontró en la misma zona en el alga *Durvillaea antarctica*, la cual estaría caracterizada por la capacidad de colonizar rápidamente hábitats vacantes, pero de limitado flujo génico entre poblaciones ya establecidas (Fraser et al. 2009; Fraser et al. 2010).

Este es el primer trabajo que evalúa la estructura y los patrones de variación genética en una misma especie marina a lo largo de la costa Atlántica y Pacífica del extremo sur de Sudamérica. La geografía y la historia climática de la región sugieren que durante los periodos fríos del cuaternario, al menos algunas especies marinas costeras del extremo sur de Sudamérica podrían haber experimentado una retracción demográfica hacia el norte quedando eventualmente al menos dos poblaciones aisladas, una sobre el margen

Atlántico y la otra sobre el Pacífico. En estas circunstancias, el extremo sur de Patagonia cubierta por glaciares que desembocaban en el mar podría haber constituido una barrera geográfica al flujo génico para muchos organismos marinos costeros permitiendo la diferenciación en condiciones alopátricas. Este es el primer trabajo que aporta evidencia a favor de este escenario como lo sugieren, por lo menos, los resultados del análisis realizado con microsatélites en *E. maclovinus*. De todas maneras en esta especie no se habría alcanzado una fuerte diferenciación, posiblemente debido a un tamaño efectivo grande. Otras especies, tal vez con poblaciones de menor tamaño efectivo, podrían haber alcanzado una diferenciación más marcada o incluso especiación incipiente. Futuros estudios de este tipo en otras especies con distribución similar a la de *E. maclovinus* serán importantes para evaluar la importancia de los ciclos glaciares durante el cuaternario como motores generadores de biodiversidad en las costas marinas de la Patagonia.

## Referencias

- Austerlitz F, Jung-Muller B, Godelle B & Gouyon PH (1997) Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theoretical Population Biology* 51 (2):148-164
- Avise J (2004a) *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edn. Sinauer Associates, Massachusetts
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ Pr,
- Avise JC (2004b) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* (J Biogeogr) 36:3-15
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1):37
- Barrowclough GF & Zink RM (2009) Funds enough, and time: mtDNA, nuDNA and the discovery of divergence. *Molecular Ecology* 18 (14):2934-2936
- Bermingham E & Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7 (4):367-369
- Billotte NL, Risterucci PJR & Baurens AM (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277-288
- Bookstein FL (1997) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge Univ Pr,
- Bovcon ND & Cochia PD (2007) *Guía para el reconocimiento de peces capturados por buques pesqueros monitoreados con observadores a bordo*. Gobierno de la Provincia del Chubut, Secretaría de Pesca
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR & Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368 (6470):455-457
- Brickle P, Arkhipkin AI & Shcherbich ZN (2005a) Age and growth in a temperate euryhaline nototheniid, *Eleginops maclovinus* from the Falkland Islands. *J Mar Biol Ass UK* 85:1217-1221
- Brickle P, Laptikhovskiy V & Arkhipkin A (2005b) Reproductive strategy of a primitive temperate nototheniid *Eleginops maclovinus*. *Journal of Fish Biology* 66 (4):1044-1059
- Calvo J, Morriconi E, Rae GA & San Roman NA (1992) Evidence of protandry in a subantarctic nototheniid, "*Eleginops maclovinus* (Cuv.&Val., 1830) from the Beagle Channel, Argentina. *Journal of Fish Biology* 40:157-164
- Cárdenas L, Castilla JC & Viard F (2009) A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *Journal of Biogeography* 36 (5):969-981
- Carvajal-Rodríguez A & de Uña-Alvarez J (2011) Assessing Significance in High-Throughput Experiments by Sequential Goodness of Fit and q-Value Estimation. *PLoS ONE* 6 (9):e24700
- Ceballos SG, Victorio MF, Lyra ML & Fernández DA (2011) Isolation and characterization of ten microsatellite loci from the Patagonian nototheniid fish *Eleginops maclovinus*. *Conservation Genetics Resources* 3:689–691. doi:10.1007/s12686-011-9434-3

- Chen L, DeVries AL & Cheng CH (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (8):3811-3816
- Chopelet J, Waples RS & Mariani S (2009) Sex change and the genetic structure of marine fish populations. *Fish and Fisheries* 10 (3):329-343
- Clapperton CM (1993) Quaternary geology and geomorphology of South America, vol 779. Elsevier Amsterdam etc.,
- Conover DO, Clarke LM, Munch SB & Wagner GN (2006) Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of fish biology* 69:21-47
- Coronato A, Martínez O, Rabassa J, Ehlers J & Gibbard P (2004) Quaternary Glaciations, Extent and Chronology. *Quaternary Glaciations, Extent and Chronology* 3
- Cousseau MB & Perrotta R (2000) *Peces Marinos de Argentina (Mar del Plata: INIDEP)*.
- Coyne JA & Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates Sunderland, MA,
- Cuvier G & Valenciennes A (1830) *Histoire naturelle des poissons*, vol 1. F.-G. Levrault,
- D'Anatro A & Lessa EP (2006) Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae) *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde* 71 (5):288-298
- de Aranzamendi MC, Bastida R & Gardenal CN (2011) Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast. *Marine Biology* 158:2405–2418
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B & Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5):1185
- Eastman J (1993) *Antarctic Fish Biology: evolution in an unique environment*. Academic Press,
- Eastman J (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biology* 28:93-107
- Eastman JT & Lannoo MJ (2008) Brain and sense organ anatomy and histology of the Falkland Islands mullet, *Eleginops maclovinus* (Eleginopidae), the sister group of the Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei). *Journal of morphology* 269 (1):84-103
- Edwards S & Bensch S (2009) Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology* 18 (14):2930-2933
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite island model. *Molecular Ecology* 13 (4):853-864
- Excoffier L, Laval G & Schneider S (2006) Arlequin ver 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7 (4):574-578
- Feijoo M, Lessa EP, Loizaga de Castro R & Crespo EA (2011) Mitochondrial and microsatellite assessment of population structure of South American sea

- lion (*Otaria flavescens*) in the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology*:1-11
- Fraser C,Thiel M,Spencer H & Waters J (2010) Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC evolutionary biology* 10 (1):203
- Fraser CI,Nikula R,Spencer HG & Waters JM (2009) Kelp genes reveal effects of subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9):3249
- Freitas PD,Martins DS & Galetti Jr PM (2008) CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources* 8 (1):107-108
- Gastaldi M & González R (2009) Estrategia alimentaria y dieta del róbalo *Eleginops maclovinus* (Pisces: Eleginopidae) en el extremo norte de su distribución atlántica (Río Negro, Argentina). *IBMP Almirante Storni VIII*:7
- Gastaldi M,Maggioni M,Ocampo Reinaldo M & González R (2009) Caracterización biológica y poblacional del róbalo *Eleginops maclovinus* (Pisces, Eleginopidae) en la Bahía de San Antonio Oeste y zona de influencia. *IBMP Almirante Storni VIII*:18
- Goldstein DB & Schlötterer C (1999) *Microsatellites: evolution and applications* Oxford: Oxford University Press,
- González Wevar CA,Nakano T,Cañete JI & Poulin E (2011) Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella* limpets in the Magellanic Province. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05065.x
- Gosztanyi A (1980) *Biología del róbalo (Eleginops maclovinus Cuv. & Val., 1830)*. Universidad Nacional de La Plata, La Plata
- Gosztanyi AE (1974) Edad y crecimiento del róbalo *Eleginops maclovinus* (Osteichthyes, Nototheniidae) en aguas de la ría Deseado y sus adyacencias. *Physis* 33 (86):1-8
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hammer O,Harper DAT & Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 1 (4):9
- Hartl DL & Clark AG (2007) *Principles of Population Genetics*.
- Hauser L & Carvalho GR (2008) Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9 (4):333-362
- Hein AS,Hulton NRJ,Dunai TJ,Schnabel C,Kaplan MR,Naylor M & Xu S (2009) Middle Pleistocene glaciation in Patagonia dated by cosmogenic-nuclide measurements on outwash gravels. *Earth and Planetary Science Letters* 286 (1-2):184-197
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 359 (1442):183
- Ho SYW,Phillips MJ,Cooper A & Drummond AJ (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 22 (7):1561-1568

- Ho SYW, Shapiro B, Phillips MJ, Cooper A & Drummond AJ (2007) Evidence for time dependency of molecular rate estimates. *Systematic Biology* 56 (3):515-522
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M & Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9 (5):1322-1332
- Ibáñez CM, Cubillos LA, Tafur R, Argüelles J, Yamashiro C & Poulin E (2011) Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. *Mar Ecol Prog Ser* 431:163-171
- Isla MS & San Román N (1995) Alimentación de *Eleginops maclovinus* (Pisces, Nototheniidae) en el Canal Beagle, Argentina. *Natur Patag, Cs Biol* 3:107-127
- Janko K, Lecointre G, DeVries A, Couloux A, Cruaud C & Marshall C (2007) Did glacial advances during the Pleistocene influence differently the demographic histories of benthic and pelagic Antarctic shelf fishes? – Inferences from intraspecific mitochondrial and nuclear DNA sequence diversity. *BMC evolutionary biology* 7 (1):220
- Jorgensen HBH, Pertoldi C, Hansen MM, Ruzzante DE & Loeschcke V (2008) Genetic and environmental correlates of morphological variation in a marine fish: the case of Baltic Sea herring (*Clupea harengus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65 (3):389-400
- Kalinowski ST & Taper ML (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics* 7 (6):991-995
- Kaplan MR, Douglass DC, Ackert RP & Caffee MW (2005) Cosmogenic nuclide chronology of pre-last glaciation maximum moraines at Lago Buenos Aires, 46 S. Argentina. *Quaternary Research* 63:301-315
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*
- Knutsen H, Olsen EM, Jorde PE, Espeland SH, André C & Stenseth NC (2011) Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes 'biologically meaningful'? A case study of coastal Atlantic cod. *Molecular Ecology*
- Kuhner MK (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22 (6):768
- Lai Y & Sun F (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20 (12):2123-2131
- Leinonen T, Cano JM, Makinen H & Merila J (2006) Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology* 19 (6):1803-1812
- Lessa EP, Cook JA & Patton JL (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:10331-10334
- Lessa EP, D'Elía G & Pardiñas UFJ (2010) Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19 (15):3031-3037

- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A & Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11 (12):2453-2465
- Li YC, Korol AB, Fahima T & Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21 (6):991-1007
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11):1451
- Licandeo RR, Barrientos CA & González MA (2006) Age, growth rates, sex change and feeding habits of notothenioid fish *Eleginops maclovinus* from the central-southern Chilean coast. *Environmental Biology of Fishes* 77:51–61
- Lisiecki LE & Raymo ME (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}O$  records. *Paleoceanography* 20
- Liu JINX, Tatarenkov A, Beacham TD, Gorbachev V, Wildes S & Avise JC (2011) Effects of Pleistocene climatic fluctuations on the phylogeographic and demographic histories of Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Molecular Ecology* 20 3879–3893
- Macaya EC & Zuccarello GC (2010) Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 420:103-112
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, Henzler C, Jolly MT, Kelly J, Olsen J, Perez KE, Stam W & Väinölä R (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* 89 (sp11):108-122
- Martin JP & Bastida R (2008) Contribution of benthic communities to the diet of the Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) at Ría Deseado (Santa Cruz, Argentina). *Lat Am J Aquat Res* 36 (1):1-13
- Matschiner M, Hanel R & Salzburger W (2009) Gene flow by larval dispersal in the Antarctic notothenioid fish *Gobionotothen gibberifrons*. *Molecular Ecology* 18 (12):2574-2587
- Matschiner M, Hanel R & Salzburger W (2011) On the Origin and Trigger of the Notothenioid Adaptive Radiation. *PLoS ONE* 6 (4):e18911
- Miller SA, Dikes DD & Polesky HF (1988) A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:215
- Mora MS, Lessa EP, Cutrera ANAP, Kittlein MJ & Vassallo AI (2007) Phylogeographical structure in the subterranean tuco tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat specific histories. *Molecular Ecology* 16 (16):3453-3465
- Near TJ (2004) Estimating divergence times of notothenioid fishes using a fossil-calibrated molecular clock. *Antarctic Science* 16 (1):37-44
- Near TJ & Cheng CHC (2008) Phylogenetics of notothenioid fishes (Teleostei: Acanthomorpha): inferences from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 47 (2):832-840
- Nei M, Tajima F & Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19 (2):153-170
- Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, Indap A, King KS, Bergmann S & Nelson MR (2008) Genes mirror geography within Europe. *Nature* 456 (7218):98-101



- Papetti C, Liò P, Rüber L, Patarnello T & Zardoya R (2007) Antarctic Fish Mitochondrial Genomes Lack ND6 Gene. *Journal of Molecular Evolution* 65 (5):519-528
- Pardiñas UFJ, Teta P, D'Elía G & Lessa EP (2011) The evolutionary history of sigmodontine rodents in Patagonia and Tierra del Fuego. *Biological Journal of the Linnean Society* 103 (2):495-513
- Pavés H, Pequeño G, Bertrán C & Vargas L (2005) Limnetic feeding in *Eleginops maclovinus* (Valenciennes, 1830) in the Valdivia river, Chile. *Interciencia* 30 (3):120-125
- Pequeño G (1989) The geographical distribution and taxonomic arrangement of South American Nototheniid fishes (Osteichthyes, Nototheniidae). *Bol Soc Biol Concepción* 60:183-200
- Pigliucci M & Preston KA (2004) Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. Oxford University Press, USA,
- Pimper LE, Baker CS, Goodall RNP, Olavarría C & Remis MI (2010) Mitochondrial DNA variation and population structure of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in their southernmost distribution. *Conservation Genetics*:1-12
- Ponce JF, Rabassa J, Coronato A & Borromei ANA (2011) Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. *Biological Journal of the Linnean Society* 103 (2):363-379
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2):945-959
- Rabassa J (2008) Late cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Science* 11:151-204
- Ramos-Onsins SE & Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19 (12):2092
- Ridley M (2004) *Evolution*. 3rd ed. edn. Blackwell Publishing, Oxford
- Rohlf FJ (1999) Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* 16 (2):197-223
- Rohlf FJ (2000) On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 11 (1)
- Rohlf FJ (2005) tpsDig, digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit E, Zemplak TS & Adams EDM (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17 (9):2234-2244
- Ruzzante DE, Walde SJ, Macchi PJ, Alonso M & Barriga JP (2011) Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society* 103 (2):514-529
- Sánchez R, Sepúlveda RD, Brante A & Cárdenas L (2011) Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Mar Ecol Prog Ser* 434:121-131
- Scher HD & Martin EE (2006) Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science* 312 (5772):428
- Schneider S & Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary

- among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152 (3):1079
- Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Sites Jr J & Morando M (2011) Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103 (2):475-494
- Shaw KL & Mullen SP (2011) Genes versus phenotypes in the study of speciation. *Genetica*:1-13
- Slatkin M & Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43 (7):1349-1368
- Slatkin M & Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129 (2):555-562
- Smith MF & Patton JL (1991) Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution* 8 (1):85
- Takezaki N, Nei M & Tamura K (2009) POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular Biology and Evolution* 27 (4):747
- Túnez JI, Centrón D, Cappozzo HL & Cassini MH (2007) Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 72 (4):193-203
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM & Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3):535-538
- Vanella F & Calvo J (2005) Influence of temperature, habitat and body mass on routine metabolic rates of sub-antarctic teleosts. *Scientia Marina* 69 (2):317-323.
- Veas ER (1998) Tasa de crecimiento en relación al cambio de sexo en el róbalo *Eleginops maclovinus* (Valenciennes, 1830) (Pisces: Eleginopsidae) en la zona de la desembocadura del río Bio-Bio, Chile. *Universidad de Concepción*
- Wakeley J (2009) *Coalescent theory: an introduction*. Roberts & Co. Publishers, Waples RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89 (5):438
- Ward RD, Woodwark M & Skibinski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of fish biology* 44 (2):213-232
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution Animal Species*. Oxford Univ. Press, New York,
- Whitlock MC & McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} 1/(4Nm + 1)$ . *Heredity* 82 (2):117-125
- Wilson AB & Eigenmann V (2011) The impact of Pleistocene glaciation across the range of a widespread European coastal species. *Molecular Ecology* 19 (20):4535-4553
- Zelditch M, Swiderski D, Sheets DH & Fink W (2004) *Geometric morphometrics for biologists*. Academic Press,

- Zhuang X & Cheng CHC (2010) ND6 gene lost and found: evolution of mitochondrial gene rearrangement in Antarctic notothenioids. *Molecular Biology and Evolution* 27 (6):1391-1403
- Zink RM & Barrowclough GF (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17 (9):2107-2121

## **ANEXO**

### Protocolo de extracción de ADN:

#### *Soluciones necesarias*

- Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % de SDS y 50 mM de NaCl),
- Proteinasa K (10 mg/ml),
- NaCl (5 M), TE 1X pH 8 (autoclavado),
- Isopropanol absoluto a -20 °C
- RNasa A (10 mg/ml).

#### *Procedimiento*

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 ml.
2. Enjuagar brevemente con agua destilada.
3. Agregar 500 ul de buffer de lisis y 10 ul de proteinasa K.
4. Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 horas o hasta toda la noche.
5. Una hora antes de finalizar, agregar 5 ul de RNasa A.
6. Centrifugar al máximo (por ej., 15.000 rpm) por 15 min.
7. Pipetear 500 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiese).
8. Agregar 300 ul de NaCl, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 min.
9. Pipetear 500-600 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a -20°C o el doble de volumen de etanol absoluto a -20°C. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.
10. Colocar a -20°C por dos horas o toda la noche.

11. Centrifugar al máximo por 15 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
12. Lavar breve y cuidadosamente con unos 750 ul de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.
13. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C (aproximadamente dos horas) o en campana de vacío media hora.
14. Resuspender en 100 ul 1xTE. Agitar, y opcionalmente incubar a 55°C (o menos) por 2 horas.
15. Guardar a -20°C.

## ANEXO

**Matriz de  $F_{ST}$  pareados (considerando como distancia entre haplotipos el número de diferencias) en base a las secuencias parciales de 833pb del gen mitocondrial citocromo b. Los valores en rojo son significativamente distintos de cero.**

	Beagle	Madryn	SAO	SJ	Tilly	PMaría	Aysen	Montt	
Madryn	0.024	0							
SAO	0.017	0.005	0						
SJ	0.041	0.021	0.01	0					
Tilly	0.051	0.03	0.036	-0.012	0				
Pmaría	0.016	0.012	-0.009	-0.012	0.01	0			
Aysen	0.015	0.021	-0.004	0.049	0.066	0.007	0		
Montt	-0.016	0.028	0.015	0.061	0.085	0.02	-0.001	0	
Concepción	-0.011	0.017	0	0.022	0.043	-0.01	-0.008	-0.019	

**Valores de  $F_{ST}$  pareados obtenidos a partir de 9 loci de microsatellites. Los valores en rojo son significativamente distintos de cero.**

POB		Micro Fst
SAO	RT	0.01
SAO	CB	0.016
SAO	AY	0.02
SAO	CC	0.019
RT	CB	0.009
RT	AY	0.021
RT	CC	0.012
CB	AY	0.009
CB	CC	0.001
AY	CC	0.015

## ANEXO

Sitios polimórficos en las secuencias parciales de citocromo b del ADN mitochondrial de *Eleginops maclovinus* (N=261; largo de las secuencias = 833 pb). Se indican el número de haplotipos, la distribución de cada haplotipo por localidad y el número total de individuos por haplotipo (T). Entre paréntesis se informa el tamaño de la muestra. Las abreviaciones de las localidades son: SAO: San Antonio Oeste; Mad: Puerto Madryn; RT: Rada Tilly; SJ: San Julián; PM: Punta María; CB: Canal Beagle; Ay: Puerto Aysén; Mon: Puerto Montt; Con: Concepción.

NHap	Polymorphic sites	SAO (25)	Mad (27)	RT (25)	SJ (24)	PM (38)	CB (36)	Ay (31)	Mbn (28)	Con (27)	T (261)
H1	CGCTACACTCGGCAAACCGACGATTGCAAAAATTCCGTACCAAATTAGACCGCCAATCCAGGATGA	3		7	5	6	5	3	2	4	35
H2	.....G.....	3	1	5	7	7	3	1	2	3	32
H3	.....C.....C.....C..						1		1		2
H4	..T.....C.....	5	4	2	4	10	11	8	10	7	61
H5	.....C.....C.....C..						2		1		3
H6	.....C.....	2	1	2		5	1	4	2	3	20
H7	.....C.....G...T.....C..						1				1
H8	.....C...GG.....						2		1		3
H9	.....C.....C..		3	2	4	2	3	1	3	2	20
H10	...C.....C.....G.....						1				1
H11	..T...T.....T.....C.....						1	1			2
H12	..AT.....C.....						1				1
H13	.....A..G.....C.....C..						1				1
H14	.....A.....						1				1
H15	.....T..C.....T...C..G				1		1				2
H16	..T.....						1				1





H49	..T.....A...CC.....			1	1
H50	..T.....G.....C.....			1	1
H51	.....T.....C.....	1			1
H52	.....A.....G.....TA.....G...	1			1
H53	.....T.....C.....T.....	1			1
H54	.....C.....C.....C.....C.....	1			1
H55	.....C.....C.....G.....	1			1
H56	..T.....C.....G.....	2			2
H57	.....G.....C.....	1			1
H58	.....C.....G.....G.....CT...G.....A.....		1		1

## ANEXO

### MICROSATÉLITES: Frecuencias alélicas por población y por locus

Locus	Poblaciones					Locus	Poblaciones				
	SAO	Cam	Tilly	CC	AY		SAO	Cam	Tilly	CC	AY
224			1.06	1.04		104	1.06		2.08		
230	1.06		3.19	4.17	4.26	106	1.06				1.06
232	1.06		1.06			108		2.13	9.38	6.25	3.19
234	1.06	2.08		1.04	3.19	116		1.06	3.13		1.06
236	19.15	7.29	4.26	5.21	4.26	118	17.02	27.66	9.38	25.00	5.32
238	3.19	5.21	3.19	2.08	1.06	120	1.06	3.19		1.04	1.06
240	4.26	2.08	2.13	4.17	13.83	124	1.06				
242		3.13	2.13	1.04	2.13	126	5.32	12.77	7.29	13.54	17.02
244		2.08	1.06	4.17	1.06	128	10.64	8.51	13.54	2.08	14.89
246		1.04	2.13	3.13	1.06	130	5.32	5.32	7.29	4.17	5.32
248		3.13	1.06	2.08	2.13	132	1.06	11.70	1.04	7.29	21.28
250		1.04	1.06			134	6.38	7.45	7.29	5.21	8.51
252		1.04	4.26		1.06	136	3.19		3.13	3.13	
254	7.45	6.25	4.26	4.17	5.32	138	11.70	2.13	4.17	2.08	2.13
256	2.13	1.04	1.06	2.08	1.06	140		2.13			1.06
258	3.19	4.17		1.04		142				1.04	
260	12.77	4.17	21.28	6.25	2.13	144					1.06
262	3.19	3.13	4.26	1.04	1.06	146			1.04		1.06
264		5.21	2.13	4.17	8.51	148			1.04	1.04	1.06
266	3.19	2.08	1.06	3.13		150		1.06		1.04	1.06
268		2.08	1.06	2.08	2.13	152	2.13		2.08	5.21	
270	1.06	2.08		4.17	1.06	154			1.04	2.08	
272	1.06			1.04	1.06	156			5.21	1.04	2.13
274					1.06	158	1.06	2.13	1.04	6.25	1.06
276		3.13			1.06	160		1.06	2.08	2.08	1.06
278	1.06	1.04		1.04	1.06	162				2.08	
280		1.04	1.06		3.19	164				1.04	
282	2.13	2.08	2.13	1.04	1.06	166					1.06
284		2.08	2.13	1.04	2.13	168		2.13		2.08	7.45
286	1.06			1.04		170				1.04	1.06
288	2.13		3.19	1.04	2.13	172			1.04	1.04	
290		2.08	4.26	2.08	1.06	174	17.02	1.06	10.42	1.04	
292	1.06	1.04	3.19	1.04	1.06	176	2.13	2.13	3.13	2.08	
294	7.45		1.06	2.08	3.19	178	1.06	2.13	2.08		
296	1.06	6.25		1.04	1.06	182	1.06	4.26			
298	2.13		2.13	3.13	2.13	188	7.45				
300		4.17	2.13	5.21		190	1.06				
302	3.19	1.04	1.06	1.04	2.13	194	1.06		1.04		
304		1.04		1.04	1.06	196			1.04		
306	1.06	2.08	1.06	1.04	2.13	202	1.06				
308	2.13	3.13	3.19	7.29	3.19						
310		3.13	1.06	2.08	2.13						
312	1.06	1.04	1.06	1.04							
314	1.06	2.08	1.06	1.04	3.19						

316			1.06	2.08	3.19
318	1.06	2.08	2.13	1.04	
320	2.13	1.04	1.06	1.04	
322	3.19			1.04	
324	1.06			1.04	4.26
326		1.04	1.06	1.04	
330	1.06				
332			1.06		
334	1.06				
336			1.06		
340			1.06		
348					2.13
350				1.04	
366		1.04			

<b>Locus</b>		<b>Poblaciones</b>				<b>Locus</b>		<b>Poblaciones</b>			
C4	SAO	Cam	Tilly	CC	AY	C11	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
114		2.22	4.17	3.13	3.26	124	6.38	9.38	7.29	9.38	9.57
116		1.11	1.04	3.13	4.35	126	2.13	7.29	3.13	3.13	8.51
118		6.67	2.08	9.38	2.17	128	4.26		2.08		
120	1.06					130	1.06			1.04	1.06
122	2.13	8.89	4.17	4.17	3.26	132		1.04		3.13	1.06
124	5.32	8.89	1.04	5.21	9.78	134		1.04			
126	4.26	5.56	8.33	1.04	1.09	136		3.13	3.13	3.13	2.13
128	30.85	10.00	18.75	10.42	10.87	138	2.13			1.04	
130	5.32	3.33	7.29	1.04	5.43	140	6.38	9.38	4.17	6.25	11.70
132		3.33	4.17	3.13	3.26	142	6.38	8.33	1.04	5.21	9.57
134	8.51	4.44	9.38	5.21	2.17	144	9.57	16.67	29.17	11.46	5.32
136	7.45	5.56		4.17	5.43	146	8.51	4.17	10.42	2.08	3.19
138	4.26	5.56	7.29	8.33	8.70	148	7.45	6.25	7.29	8.33	4.26
140	6.38	7.78	4.17	5.21	9.78	150	13.83	14.58	9.38	26.04	28.72
142	6.38	4.44	9.38	8.33	2.17	152	10.64	6.25	5.21	4.17	3.19
144	4.26	10.00	3.13	11.46	8.70	154	15.96	4.17	8.33	4.17	5.32
146	2.13	2.22	7.29	4.17	9.78	156	2.13	4.17	7.29	5.21	2.13
148	1.06	2.22			2.17	158	1.06	1.04	1.04	2.08	2.13
150	3.19	4.44	2.08	1.04	2.17	160		2.08	1.04	2.08	1.06
152	1.06	2.22		2.08		162	1.06				
154	3.19				1.09	164		1.04			1.06
156	1.06			1.04		166	1.06			1.04	
158				1.04		172				1.04	
160			1.04	1.04							
162				2.08							
176			1.04		1.09						
184	1.06										
186			3.13								
188			1.04	2.08	1.09						
190	1.06										
192					1.09						
194		1.11			1.09						
196				1.04							

202

1.04

Locus E7	Poblaciones				
	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
188	7.45	8.33	1.04	6.38	3.19
192		1.04	1.04		
194				1.06	1.06
196	1.06			1.06	
198	2.13	1.04	2.08	4.26	
200	21.28	21.88	25.00	21.28	17.02
202	2.13	8.33	5.21	4.26	7.45
204	20.21	4.17	2.08	8.51	8.51
206	6.38	3.13	8.33	2.13	8.51
208	18.09	4.17	20.83	7.45	5.32
210	2.13	7.29	6.25	8.51	11.70
212	2.13	1.04	6.25	3.19	
213			1.04	1.06	
214	4.26	2.08	4.17	2.13	
216	2.13	4.17	7.29	3.19	6.38
217	1.06			1.06	
218		2.08		3.19	1.06
219				1.06	
220	4.26	10.42	2.08	7.45	7.45
221	2.13	7.29	3.13	2.13	8.51
222		1.04	1.04	1.06	5.32
223			1.04	1.06	
224		2.08			
225	2.13			4.26	1.06
226		2.08			
227			1.04	1.06	
229		1.04			1.06
231		1.04			
232		4.17	1.04	1.06	5.32
234					1.06
236	1.06	2.08		2.13	

Locus F6	Poblaciones				
	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
94	9.38	9.78	4.26	8.33	15.00
96	6.25	4.35	13.83	10.42	10.00
98	4.17	2.17	1.06	1.04	
100	17.71	26.09	24.47	31.25	11.25
102	51.04	33.70	37.23	26.04	53.75
104	6.25	10.87	10.64	15.63	5.00
106	1.04	8.70	6.38	5.21	5.00
108	4.17	4.35	2.13	2.08	

Locus G6	Poblaciones				
	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
135	1.06				
158				1.09	
159	3.19	7.29	6.25		4.26
163	1.06			2.17	
165	32.98	21.88	29.17	27.17	21.28
166				1.09	
167	22.34	23.96	22.92	16.30	23.40
168				1.09	
169	19.15	18.75	20.83	9.78	21.28
170			2.08	1.09	
171	12.77	6.25	5.21	5.43	4.26
172				1.09	

Locus H9	Poblaciones				
	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
166	2.08	1.04		2.13	
168	1.04	1.04	2.08	1.06	
171	6.25	6.25	7.29	2.13	6.38
173				1.06	2.13
176	1.04	2.08	1.04	1.06	1.06
182		3.13	3.13	4.26	17.02
188	1.04		2.08	2.13	1.06
192	3.13	2.08	3.13		3.19
202	1.04	2.08	1.04	5.32	2.13
204		4.17	2.08	3.19	1.06
206		1.04			
208	1.04		2.08		

173	4.26	13.54	4.17	14.13	12.77	210	1.04		1.04	
175					1.06	212			2.08	1.06
177				1.09	1.06	216	1.04		1.04	
178				1.09		220	1.04			
179			1.04			222				1.06
180				2.17		224			2.08	
181		1.04		1.09	3.19	226	6.25		2.08	
183					1.06	228			2.08	
185		3.13	1.04	2.17		230	1.04		2.08	1.06
187			3.13	2.17	2.13	232	7.29		3.13	3.19
189	1.06	1.04	1.04	3.26	3.19	234			1.04	
191	2.13	1.04		3.26		236		2.08		1.06
193		1.04	2.08	2.17		238		1.04	1.04	1.06
195		1.04	1.04		1.06	240	1.04	1.04	1.04	1.06
220				1.09		242	1.04			2.13
						243				2.13
						244		2.08	1.04	1.06
						245	1.04		1.04	
						246	1.04	1.04		1.06
						248	2.08	1.04	1.04	1.06
						250	4.17	10.42	5.21	10.64
						252	3.13	6.25	3.13	4.26
						254	1.04	4.17	3.13	2.13
						255	1.04	1.04	3.13	
						256	7.29	5.21	4.17	5.32
						257		1.04		1.06
						258	2.08	4.17	8.33	3.19
						260	7.29	2.08	3.13	2.13
						261				1.06
						262	3.13	3.13	4.17	2.13
						263				1.06
						264	1.04	3.13	1.04	4.26
						266	2.08	4.17		3.19
						267	2.08			4.26
						268	4.17	4.17	3.13	3.19
						270	1.04	3.13	3.13	9.57
						272	2.08	4.17	3.13	2.13
						274	3.13	4.17	2.08	2.13
						275	1.04			
						276	2.08		2.08	2.13
						278		3.13		2.13
						280	7.29		2.08	4.26
						282	1.04	1.04	1.04	
						284		1.04	1.04	
						288	1.04			3.19
						292		1.04		
						294	1.04			
						298		2.08		1.06
						300	1.04		1.04	
						310				1.06

Locus	Poblaciones					
	H10	SAO	Cam	Tilly	CC	AY
141	7.29	23.96	18.75	8.33	14.81	
143		3.13	4.17	11.46	1.85	
145	11.46	12.50	16.67	15.63	9.26	
147	18.75	11.46	8.33	8.33	18.52	
148	1.04	4.17	4.17	3.13		
149	4.17	3.13	2.08	4.17	5.56	
151	21.88	19.79	22.92	16.67	14.81	
153	10.42	14.58	12.50	14.58	14.81	
155	6.25	4.17	7.29	10.42	12.96	
157	8.33	2.08	2.08	2.08	5.56	
159	1.04	1.04		3.13	1.85	
161				1.04		
171	4.17					
173	5.21		1.04			
183				1.04		