



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Filogenia molecular, biogeografía y procesos de diversificación de peces neotropicales, familia Loricariidae [Siluriformes]

Cardoso, Yamila P.

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Lizarralde, Marta

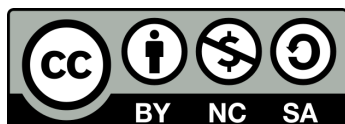
Co-dirección: Posadas, Paula

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2014

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140421001330>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

TESIS DOCTORAL

**Filogenia molecular, biogeografía y procesos de
diversificación de peces neotropicales, familia Loricariidae
(Siluriformes)**

Yamila P. Cardoso

La Plata, Octubre 2013

Trabajo dirigido por:

- **Dra. Marta Lizarralde.** Laboratorio de Ecología Molecular, Centro Regional de Estudios Genómicos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina.
- **Dra. Paula Posadas.** Laboratorio de Sistemática y Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, Argentina.

Resumen

El propósito de este trabajo es investigar los procesos que originaron y mantienen la gran diversidad de peces continentales neotropicales. Para abordar esta temática se ha elegido estudiar a cuatro géneros de la familia Loricariidae de la cuenca del Plata. En este territorio se encuentra la mayor variedad de ambientes acuáticos y la mayor cantidad de especies de peces de Argentina, presentando un gran número de endemismos. Sin embargo, los procesos evolutivos causales de esta gran riqueza biológica son aún poco conocidos y son escasas las hipótesis que actualmente dan cuenta de ella. Con el objetivo de comprender el origen de la diversificación de especies dentro de la cuenca del Plata, se han realizado una serie de estudios filogenéticos de numerosos individuos de cuatro géneros de la familia Loricariidae, *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*. Las filogenias moleculares basadas en marcadores mitocondriales y nucleares, y sobre datos concatenados, han sido establecidas para cada grupo. Se utilizaron los árboles filogenéticos obtenidos para realizar la calibración molecular y la reconstrucción de las áreas ancestrales de cada género. A partir de estos datos y de la distribución actual de las especies, se evaluó una hipótesis que propone como causa de la diversificación una incursión marina en la cuenca del Plata ocurrida hace 15-5 Ma.

El género *Hypostomus* ha resultado ser muy diverso dentro de la cuenca del Plata, comprendiendo al menos 17 linajes diferentes, que consideramos de nivel específico. La filogenia de este género es la más robusta de este trabajo dado que fue reconstruida a partir de cinco marcadores moleculares diferentes, abarcando aproximadamente 5000 pb. Según los árboles filogenéticos, el

género *Hypostomus* es un grupo monofilético que se divide en cuatro clados. El clado D1 compuesto por las especies del grupo morfológico *H. cochliodon*, el clado D2 formado por el grupo *H. plecostomus* y los clados D3 y D4 compuestos por el grupo *H. regani*.

De los géneros en estudio, *Loricariichthys* ha sido el que presentó la menor diversidad en la cuenca del Plata, representado tan sólo por cuatro especies. Los resultados de las filogenias para este grupo varían de acuerdo al marcador utilizado. No obstante, este género resulta ser un grupo natural en el cual la especie *L. platymetopon* se encuentra en la base del árbol, mientras que el resto de las especies del sistema del Plata conforman un clado junto a especies de los ríos costeros del sur de Brasil.

Basados en los resultados del gen mitocondrial COI, se ha encontrado que al menos 14 linajes específicos de *Rineloricaria* habitan en el sur de Sudamérica, diez de los cuales están presentes en la cuenca del Plata. Los resultados filogenéticos obtenidos muestran en la base del árbol del género a la especie *R. lanceolata* y luego un clado más diversificado con el resto de las especies de la cuenca del Plata junto a especies y linajes del sistema del río São Francisco y los ríos costeros del sur.

La diversidad del género *Ancistrus* ha resultado ser inesperadamente muy alta para la cuenca del Plata. Este género, representado para dicha cuenca por 12 linajes específicos, conforma un grupo monofilético que puede dividirse en dos clados según nuestros resultados filogenéticos basados en COI. Uno de ellos conformado por las especies *A. dubius*; *A. temminckii* y *A. triradiatus* y el otro clado con especies endémicas del sur de Sudamérica.

La interpretación de los resultados moleculares, el análisis del patrón de distribución de las especies, la calibración de los eventos de especiación y la reconstrucción de áreas ancestrales de los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* de la cuenca del Plata permiten concluir que la ingesión marina ocurrida hace 15-5 Ma ha jugado un rol muy importante en la formación de la diversidad de especies de Loricáridos de esta región. Este proceso, al que se ha denominado especiación intracuenca, ha generado grupos de especies endémicas dentro de la cuenca del Plata. Sin embargo, la historia biogeográfica de estos cuatro grupos ha sido bastante compleja y se ha observado que otros procesos evolutivos también han aportado a la formación de la riqueza específica de dicha cuenca. Argumentamos que los cambios hidrogeológicos durante el Mioceno promovieron rutas de dispersión y eventos de vicariancia entre la cuenca del Plata y otros sistemas,

generando de este modo especiaciones alopátricas. Este proceso, al que se ha denominado especiación intercuenca, ha dado lugar a la presencia de grupos de especies cuyas distribuciones son actualmente disyuntas.

Se aplicó el Análisis de Parsimonia de Brooks, una metodología biogeográfica cladística de árboles, a los árboles obtenidos para los cuatro géneros en estudio. Este análisis reveló un patrón de distribución similar para los cuatro grupos, en el cual las áreas de la cuenca del Plata conforman un grupo monofilético. Asimismo, la aplicación de métodos biogeográficos basados en eventos (análisis de dispersión-vicariancia) ha permitido establecer cuales fueron los eventos de dispersión y vicariancia más frecuentes. Así, las dispersiones más abundantes resultaron ser: del río Uruguay a Río de la Plata, del los ríos costeros del sur al río Uruguay, del Medio-Bajo Paraná al Alto Paraná y del Medio-Bajo Paraná al río Paraguay. En tanto que el evento de vicariancia más frecuente tuvo lugar debido a la separación de la cuenca del Plata del resto de las cuencas del continente.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis concuerdan perfectamente con la historia hidrogeológica documentada para la cuenca del Plata, reforzando la identificación de los mayores patrones de especiación de la cuenca. La biogeografía histórica de los géneros estudiados sostiene y apoya la hipótesis de que los diferentes cambios hidrogeológicos y las variaciones en el nivel del mar han influenciado fuertemente los eventos cladogenéticos observados en las filogenias de los cuatro géneros estudiados.

Este trabajo presenta la primera contribución al conocimiento filogenético de la familia Loricariidae para la cuenca del Plata en Argentina y a los procesos de diversificación que han moldeado la elevada diversidad de especies dentro de ella. De este modo, este estudio aporta nuevas perspectivas para la comprensión de la evolución de los organismos dulceacuícolas presentes en áreas de distribución similares.

Summary

The purpose of this work is to investigate the processes that originated and maintain the great diversity of neotropical freshwater fishes. To address this issue we have chosen to study four genera of the family Loricariidae in the del Plata basin. This area has the largest variety of aquatic environments and hosts most species of freshwater fishes of Argentina showing a large number of endemic species. However, the evolutionary processes that have driven this biological wealth are still poorly understood and the hypotheses that currently explain it are scarce. In order to understand the the origin of the diversity of species within the del Plata basin, we performed a series of phylogenetic studies of four genera of the family Loricariidae: *Hypostomus*; *Loricariichthys*; *Rineloricaria* y *Ancistrus*. The molecular phylogenies based on mitochondrial and nuclear markers, and concatenated data have been established for each group. From the obtained phylogenetic trees, we performed the molecular calibration and reconstruction of ancestral areas for each genus. From these data and from the current distribution of species, we assessed a hypothesis that proposes a marine incursion in the del Plata Basin 15-5 Ma ago, as the main cause of diversification.

The genus *Hypostomus* resulted to be very diverse within the del Plata basin, comprising at least 17 different lineages, that we consider to be of specific level. The phylogeny of this genus is the most robust of this work since it was rebuilt from five different molecular markers, covering approximately 5000 bp. According to our phylogenetic trees, *Hypostomus* is a monophyletic group that can be divided into four clades. Clade D1 comprises species of morphological group *H. cochliodon*, clade D2 contains the group *H. plecostomus*, and clades D3 and D4 clades comprise the group *H.*

regani.

Among the studied genera, *Loricariichthys* has been the one that exhibited the lowest diversity in the del Plata basin, represented only by four species. The results of the phylogenies for this group vary according to the employed molecular marker. Nevertheless, this genus turns out to be a natural group in which the species *L. platymetopon* is located at the base of the tree, whereas the rest of the species from the del Plata system form a single clade together with species from coastal rivers in southern Brazil.

Based on the results of the mitochondrial COI gene, we found that at least 14 specific lineages of *Rineloricaria* inhabit southern South America, ten of which are present in the del Plata basin. The obtained filogenetic results show that *R. lanceolata* is the basal species of the genus. In addition, we obtain a more diverse clade containing the other species from the del Plata basin, the São Francisco River and the coastal rivers in southern Brazil.

The diversity of the genus *Ancistrus* turned out to be unexpectedly high in the del Plata Basin. This genus, represented by 12 specific lineages in this basin, forms a monophyletic group. According to our results based on phylogenetic tree of COI, *Ancistrus* can be divided into two clades. One with *A. dubius*, *A. temminckii* and *A. triradiatus* and the other clade with species endemic to southern South America.

The interpretation of the molecular results, the analysis of the distribution pattern of the species, the calibration of the speciation events and the reconstruction of ancestral areas of *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria*, and *Ancistrus* in the del Plata basin, allow us to conclude that the marine ingressión 15-5 Ma ago has played a major role in shaping the species diversity of loricariids in the region. This process, that we have called speciation intra-basin, has generated endemic species groups within the del Plata basin. Still, the biogeographic history of these four groups has been complex and we have observed that other evolutionary processes have also contributed to the formation of the species richness in the basin. We argue that, hydrogeological changes occurred during the Miocene promoted dispersal routes and vicariance events between the del Platael Plata basin and other systems, thus generating allopatric speciation. This process, which we have called inter-basin speciation, has lead to the presence of groups of species whose distributions are currently disjunct.

We applied a Brooks Parsimony Analysis, a cladistic biogeographic methodology of trees, to

the trees obtained for the four studied genera. This analysis revealed a similar distribution pattern for the four groups, in which areas of the del Plata basin form a monophyletic group. Furthermore, the application of event-based biogeographic methods (dispersion-vicariance analysis) allowed us to establish which were the most frequent dispersal and vicariance events. Therefore, the most common dispersions resulted: from Uruguay River to Río de la Plata, from the southern coastal rivers of Brazil to Uruguay River, from Middle-Lower Paraná River to Upper Paraná, from Middle-Lower Paraná to Paraguay River. In turns, the most common vicariance event took place due to the separation of the del Plata basin from the rest of the basins of the continent.

The results obtained along this thesis are in perfect agreement with the documented hydrogeological history for the del Plata Basin, reinforcing thereby the identification of the major patterns of speciation. Historical biogeography of the studied genera supports the hypothesis that hydrogeological changes and fluctuations in the sea level strongly influenced cladogenetic events observed in phylogenies of the four genera.

We present the first contribution to the knowledge of phylogenetic data of the Loricariidae Family in the del Plata Basin in Argentina, and of the diversification processes that shaped the high diversity of species within it. This study thus provides new insights to the understanding of the evolution of freshwater organisms with similar distribution ranges.

Agradecimientos

Principalmente quisiera agradecer al Dr. J. I. Montoya-Burgos de la Universidad de Ginebra por la dirección, el financiamiento y la discusión que ha aportado para este proyecto de tesis. Sin su participación este trabajo no habría podido realizarse. Le agradezco también a Juan por haberme dado nuevamente la posibilidad de trabajar con los temas que más me gustan y por compartir su entusiasmo, sus energías y sus ideas conmigo. Indudablemente le agradezco por confiar en mí y por acompañarme en estos pasos de aprendizaje.

Quisiera agradecer a la Dra. Marta Lizarralde por haberme aceptado en su laboratorio para formar parte de su equipo de trabajo, por los momentos buenos y los no tanto que siempre dejan sus enseñanzas y aportan al crecimiento académico y personal.

Agradezco mucho a la Dra. Paula Posadas por haber aceptado la codirección de esta tesis, por estar siempre disponible para ayudarme en los análisis y discusión de los resultados biogeográficos y siempre disponible para escucharme y aconsejarme cuando lo necesitaba.

Al CONICET por haberme otorgado las becas tipo I y II que me permitieron realizar mi doctorado. A los fondos Ibol Argentina-CONICET, Ministerio de Ecología, RNR y Turismo de Misiones y Araucaria XXI - Bosque Atlántico, G. and A. Claraz, Fonds Augustin Lombard y al Estado de Ginebra por los subsidios recibidos.

A la gente del Centro Regional de Estudios Genómicos, por haberme dado el espacio físico para poder llevar adelante mi tesis. Especialmente a mis compañeros de laboratorio, Sebastián, Magalí, Diego, Mariana y Cecilia.

Me gustaría agradecer fuertemente a Florencia Brancolini y a Ariel Paracampo por la ayuda incondicional que me han brindado a lo largo de estos años. Por haberme recibido con cariño y entusiasmo. Por el esfuerzo de muestreo que han hecho por mí. Gracias por su disposición a discutir, a trabajar, a viajar, a muestrear... hasta llenarse de barro... Pero sobre todo gracias por escucharme y entusiasmarse conmigo con todo tipo de delirios que se me ocurren para estudiar e investigar juntos.

Mucha gente me ha ayudado en la recolección de material, gracias a ellos este trabajo pudo ser lo que es. Muchas gracias especialmente a: Lucila Protogino, Eva Rueda, Pablo Scarabotti, Adriana Almirón, Jorge Casciotta, Tomás Maiztegui, Facundo Vargas, Ignacio García, Amalia Miquelarena y Hugo López. Quisiera agradecer también a Sergio Bogan por estar siempre dispuesto a ayudarme y por facilitarme el ingreso de la mayor parte del material colectado en estos años en el museo de la Fundación de Historia Natural Félix de Azara.

Le agradezco muy especialmente a Lucila Protogino, que con su paciencia de oro me ha ayudado en todos los momentos. Lu ha contado innumerables dientes, placas y medido peces a mi lado; ha llevado y traído tachos pesadísimos; ha ido diez mil veces al correo; sacado fotos; ha ido a muestrear y me ha enseñado día a día el arte de la morfología en la ictiología.

Malgré la distance, Ilham Bahechar a été toujours prête à m'aider. Elle a "fait magie" avec ses capacités dans le Lab. pour que je puisse joliment arriver à mes objectifs. A Ilham, je dois toutes mes connaissances et gestion du travail de laboratoire. Merci beaucoup Ilham.

Muchísimas gracias al Dr. Raphael Covain del Museo de Historia Natural de Ginebra por su ayuda (*via face* en ocasiones) en los análisis de *Loricariichthys* y *Rineloricaria*, y por haberme cedido gentilmente material y varias secuencias que él mismo ha amplificado, por la gran ayuda que ha sido el material de su excelente trabajo de tesis. Así mismo quisiera agradecer a la Dra. Sonia Ficher-Muller por el material administrado de *Ancistrus* y por su interés y buena disposición.

Cécile Jacot-des-Combes fue de gran ayuda para la elaboración de esta tesis. Gracias a ella muchas de las secuencias de *Hypostomus* provenientes del Amazonas y del Escudo de la Guyanas han podido ser incorporadas a los análisis.

Quisiera agradecer al Dr. L. Lucena de la PUCRS por el material y los tejidos del sur de Brasil, de suma importancia para completar mis análisis.

Por supuesto que este trabajo no lo hubiera podido realizar sin la ayuda que me brindó día a día mi familia. Mis padres, mis hermanas, mis suegros y mi abuela han aportado mucho de ellos

para que yo pudiera trabajar: llevando, trayendo, acunando, preparando mamaderas y chocolatadas, jugando, haciendo dibujitos y llenando de besos y abrazos a las niñas.

Mucha gente que me rodea, sin darse cuenta, ha contribuido mucho para la realización de esta tesis brindándome su cariño, compañía y haciendo que mis días se conviertan en lo que siempre he querido. Mi mamá, mi papá, Vane, Sabri, Tati, Lean, Manu, Leu, Carlos, Alicia, Mili, Fede, Matías, Andrés son siempre un gran sostén. Lumila, ha sido desde mis comienzos una gran compañera, compartiendo desde muy cerca cada uno de mis pasos. Lean, Mariel, Nico, Paula, Eva, Diego, Paula B., Leo, “la gente de nuestros diferentes coros” me han brindado siempre hermosos momentos.

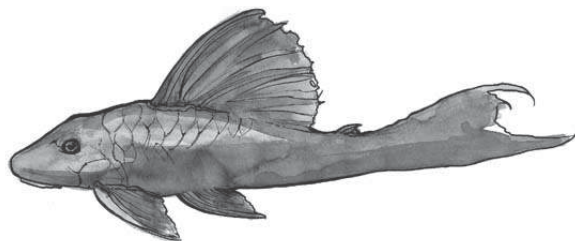
Quisiera agradecer muy especialmente a Griselda por su, siempre afectuosa, disposición a ayudarme.

Muchas gracias Aníbal, por el soporte técnico, indispensable, sobre Illustrator, Latex, Macintosh, Adobe, DOS...en fin, computadoras...Gracias por la ayuda en la edición estética y literaria del manuscrito y por las ocasionales, pero fructuosas, discusiones sobre eventos geológicos y biogeográficos. Gracias por estar siempre dispuesto a escucharme y aconsejarme cuando me faltan energías. Gracias por apoyarme y alentarme en los nuevos proyectos que me voy inventando. Gracias por acompañarme en mi trabajo y en mi vida.

Muchas gracias Julia y Clara por la fuerza, la alegría, las sonrisas, las miradas y el amor que me brindan día a día. A ellas dedico este trabajo que se ha llevado tiempo y energías que les pertenecían.

*None but those who have experienced them can
conceive of the enticements of science.*

Mary Shelley, *Frankenstein*.



Índice general

Resumen	3
Summary	9
Agradecimientos	11
1. Introducción general	21
1.1. Diversificación neotropical	22
1.2. Historia hidrogeológica de la cuenca del Plata y su implicancia en la biodiversidad	26
1.3. La familia Loricariidae	33
1.4. Herramientas moleculares aplicadas al estudio de la diversidad y la biogeografía . .	35
2. Materiales y métodos	37
2.1. Muestreos y material examinado	37
2.2. Técnicas moleculares	38
2.2.1. Extracción de ADN	38
2.2.2. Marcadores moleculares	38
2.2.3. Amplificación por PCR	39
2.2.4. Electroforesis	40
2.2.5. Secuenciado	40

2.3.	Análisis filogenéticos	40
2.3.1.	Modelos de evolución	41
2.3.2.	Métodos para inferir filogenias	43
2.4.	Tiempos de divergencia y análisis biogeográficos	46
2.4.1.	Filogenias y rangos de distribución	46
2.4.2.	Calibración del reloj molecular	47
2.4.3.	Reconstrucción de áreas ancestrales	49
2.4.4.	Análisis de biogeografía comparada	51
2.5.	Medidas Morfológicas	52
3.	El género <i>Hypostomus</i>	57
3.1.	Introducción	57
3.2.	Resultados	59
3.2.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Hypostomus</i> en la cuenca del Plata	59
3.2.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Hypostomus</i>	65
3.2.3.	Calibración del reloj molecular	102
3.2.4.	Reconstrucción de áreas ancestrales	103
3.3.	Discusión	107
3.3.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Hypostomus</i> en la cuenca del Plata	107
3.3.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Hypostomus</i>	108
3.3.3.	Procesos de diversificación en la cuenca del Plata	113
3.4.	Consideraciones finales	119
4.	El género <i>Loricariichthys</i>	121
4.1.	Introducción	121
4.2.	Resultados	122
4.2.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Loricariichthys</i> en la cuenca del Plata	122
4.2.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Loricariichthys</i>	127

4.2.3.	Calibración del reloj molecular	137
4.2.4.	Reconstrucción de áreas ancestrales	137
4.3.	Discusión	141
4.3.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Loricariichthys</i> en la cuenca del Plata	141
4.3.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Loricariichthys</i>	142
4.3.3.	Procesos de diversificación en la cuenca del Plata	143
4.4.	Consideraciones finales	146
5.	El género <i>Rineloricaria</i>	147
5.1.	Introducción	147
5.2.	Resultados	150
5.2.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Rineloricaria</i> en la cuenca del Plata	150
5.2.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Rineloricaria</i>	151
5.2.3.	Calibración del reloj molecular	162
5.2.4.	Reconstrucción de áreas ancestrales	163
5.3.	Discusión	168
5.3.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Rineloricaria</i> en la cuenca del Plata	168
5.3.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Rineloricaria</i>	169
5.3.3.	Procesos de diversificación en la cuenca del Plata	170
5.4.	Consideraciones finales	174
6.	El género <i>Ancistrus</i>	177
6.1.	Introducción	177
6.2.	Resultados	179
6.2.1.	Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Ancistrus</i> en la cuenca del Plata	179
6.2.2.	Análisis filogenéticos del género <i>Ancistrus</i>	183
6.2.3.	Calibración del reloj molecular	189

6.2.4. Reconstrucción de áreas ancestrales	191
6.3. Discusión	195
6.3.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de <i>Ancistrus</i> en la cuenca del Plata	195
6.3.2. Análisis filogenéticos del género <i>Ancistrus</i>	197
6.3.3. Procesos de diversificación en la cuenca del Plata	198
6.4. Consideraciones finales	202
7. Biogeografía comparada de Loricariidos en la cuenca del Plata	205
7.1. Introducción	205
7.2. Resultados	207
7.2.1. Análisis de Parsimonia de Brooks (BPA)	207
7.2.2. Análisis de dispersión-vicariancia	208
7.3. Discusión	210
7.4. Consideraciones finales	217
8. Conclusiones general	219
A. Lista del material utilizado	223
B. Protocolos de laboratorio	241
B.1. Extracción de ADN con sales	241
B.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	242
B.3. Electroforesis	244
C. Matriz de datos para la obtención del cladograma general de áreas a partir del análisis de parsimonia de Brooks (BPA)	245
D. Archivo de datos para DIVA 1.1	247
E. Trabajos Publicados	249

CAPÍTULO 1

Introducción general

Cómo y cuándo surgió la vida y su extraordinaria diversidad es la pregunta más importante de la biología desde su inicio como ciencia. Lejos de llegar a una respuesta precisa, los biólogos evolutivos se esfuerzan por conocer la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman. El estudio realizado en el marco de esta tesis doctoral pretende ser un aporte a esta gran incógnita biológica. Sin embargo, debido a la magnitud del esfuerzo que requiere un estudio de esta índole, se ha decidido escoger para este trabajo un modelo de estudio representativo de la actual diversidad de nuestro planeta. De esta manera, se ha seleccionado a la región Neotropical y a un grupo de los peces de agua dulce para investigar los procesos evolutivos que originaron y mantienen la gran riqueza de especies de peces continentales. Por lo tanto, el trabajo presentado aquí es solo una contribución al conocimiento de los procesos evolutivos que podrían explicar una parte de la actual diversidad.

Con este propósito en vista, los objetivos específicos de esta tesis son los siguientes: (i) Identificar genéticamente los límites de diferentes taxones (géneros y especies) dentro de cuatro géneros de Loricariidos de la cuenca del Plata. (ii) Establecer la biogeografía de estos grupos. (iii) Conocer la filogenia molecular de los cuatro géneros seleccionados. (iv) Investigar las causas de la diversificación, estableciendo el rol de las diversas fuerzas evolutivas que dieron origen a la diversidad de especies en cada grupo. Principalmente se evaluará una hipótesis que propone como causa de la

diversificación una incursión marina en la cuenca del Plata hace 15-5 Ma.

La presentación de esta tesis ha sido estructurada en capítulos específicos para una mejor organización de los datos y diagramación de los resultados obtenidos. En este primer capítulo de introducción se presentarán los antecedentes de la temática, aportando información sobre la diversidad de peces en el Neotrópico, sobre la historia hidrogeográfica de la cuenca del Plata, sobre las características de la familia Loricariidae y sobre las ventajas del uso de herramientas moleculares en estudios biogeográficos. Luego se presenta un segundo capítulo con todos los materiales, métodos y técnicas implementadas a lo largo de este trabajo. En los capítulos tres, cuatro, cinco y seis se abordan y discuten los resultados obtenidos para los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* respectivamente. En cada uno de estos capítulos se estimará la diversidad, la distribución geográfica y las relaciones filogenéticas de las especies de cada género. Además, se presentarán y discutirán los análisis realizados para evaluar las causas de la diversificación de los géneros en estudio en la cuenca del Plata. En el capítulo siete, se presentarán los análisis sobre biogeografía comparada basados en los cuatro géneros analizados. Finalmente, se describen las conclusiones finales del conjunto de la tesis. En cinco apéndices apartados se muestran la lista del material utilizado, los protocolos de laboratorio, los archivos de corridas para dos análisis y tres trabajos publicados que contienen gran parte de los resultados morfológicos obtenidos. Estos trabajos han implicado importantes contribuciones taxonómicas para el género *Hypostomus*, sin embargo, debido a la estructuración de la tesis, estos resultados no han sido incorporados en el cuerpo principal del trabajo pero son una contribución de extrema importancia a la hora de evaluar la diversidad de las especies en la cuenca del Plata.

1.1. Diversificación neotropical

La región Neotropical básicamente comprende los trópicos americanos, desde el norte de México hasta el centro de la Argentina (Morrone, 2001). En esta región se encuentra la mayor diversidad de organismos del mundo. En particular, la región Neotropical alberga alrededor de 8000 especies de peces de agua dulce (Reis *et al.*, 2003), las cuales representan entre el 20 y el 25 % de la diversidad de vertebrados del planeta (Lundberg *et al.*, 1998; Schaefer, 1998). Dentro de ella, áreas como las cuencas de los ríos Orinoco, Amazonas y la cuenca del Plata contienen una enorme riqueza

de especies. Esto hace de la región Neotropical una de las más importantes del mundo para comprender los procesos que han generado tal biodiversidad y que los peces de agua dulce que en ella habitan sean un buen modelo para estos estudios. No obstante, las fuerzas evolutivas subyacentes a esta gran diversidad biológica son aún poco conocidas, y son escasas las hipótesis que actualmente dan cuenta de ella. Lejos de llegar a un consenso, el aumento de estudios en biogeografía y filogeografía de peces de agua dulce neotropicales demuestra que las hipótesis propuestas no son excluyentes entre sí y que varios mecanismos intrincados pueden haber jugado un rol importante en la formación de dicha biodiversidad.

El Neotrópico tiene la mayor proporción de su territorio en forma de llanura (<200 m sobre el nivel del mar) en comparación a otros subcontinentes tropicales. Esta topología hace a esta región muy susceptible a: *i*) los cambios en los cursos de los ríos y captura de tributarios de una cuenca a otra debido a pequeñas modificaciones en el relieve; *ii*) las variaciones del nivel del mar; *iii*) la fragmentación - reconexión de cuencas durante los cambios climáticos de períodos secos y húmedos. Los eventos del tipo *i*, dependen exclusivamente de los cambios geomorfológicos (como por ejemplo actividad volcánica, movimiento de placas tectónicas). En cambio, los eventos *ii* e *iii* están, ambos, dirigidos por los cambios climáticos, generando de este modo una relación entre ellos. Para el Neotrópico, se conoce que los períodos secos son concomitantes a los períodos de bajo nivel del mar.

El estudio de la biogeografía y dispersión de peces de agua dulce se vuelve sumamente interesante dado que estos organismos están intrínsecamente ligados a los canales de agua y a sus conexiones temporales, las cuales a su vez, se relacionan con los cambios geomorfológicos y climáticos de la región. Sin embargo no han sido muy frecuentes los estudios biogeográficos basados en organismos adaptados a vivir en aguas dulces, dejando esta área de la biogeografía poco explorada hasta el momento (Posadas *et al.*, 2013). Inferir los patrones de diversificación de las especies es uno de los tópicos más interesantes en la biología evolutiva porque es esta temática la que puede proveer la clave del conocimiento de los procesos que han promovido la actual biodiversidad. Esto es especialmente válido para el Neotrópico, dada la extrema complejidad geológica, el alto nivel de diversidad y el endemismo de esta región.

En los trabajos de Hubert & Renno (2006) y Hubert *et al.* (2007) se han listado las principales hipótesis reconocidas que intentan explicar la inmensa diversidad neotropical de peces, algunas de

ellas son:

- La hipótesis de los gradientes sugiere que la especiación sería causada por los intensos gradientes ambientales (Bleeker, 1977).
- La hipótesis de los refugios propone que las fluctuaciones climáticas a lo largo del Pleistoceno han permitido la desconexión y re-conexión de diversos hábitats en función de las variaciones ligadas a los cambios climáticos de este período (Haffer, 1982, 1969, 1997).
- La hipótesis de los ríos-refugios sugiere que los refugios del Pleistoceno fueron consolidados al interior de los ríos, dado que en estos ambientes las fluctuaciones climáticas han provocado cambios que han afectado fuertemente a la biota acuática (Ayres & Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1997).
- La hipótesis de los ríos supone una fragmentación del biótomo terrestre luego del establecimiento definitivo de la cuenca del Amazonas a fines del Terciario (Patton *et al.*, 1994; Hall & Harvey, 2002). También estima que los ríos de gran envergadura pueden actuar como barreras para la dispersión de las especies, incluso para organismos acuáticos que presentan hábitos ecológicos y/o morfología particulares.
- La hipótesis de los museos estipula que la gran diversidad de especies estrictamente de agua dulce, se ha originado a partir de una fragmentación alopátrica durante los períodos de alto nivel del mar, antes de dispersarse a su actual área de distribución (Fjeldså, 1994).
- La hipótesis de disturbio-vicariancia propone que los hábitats ecológicamente poco aptos para la vida son la resultante de un enfriamiento climático (Colinvaux *et al.*, 1996).
- La hipótesis paleogeográfica supone que la formación de los paleo-arcos elevados durante el levantamiento de los Andes, han causado fragmentación de las áreas y especiación por vicarianza (Patton & Silva, 1998).
- La hipótesis hidrogeológica plantea que las fuerzas que han provocado la diversificación fueron los eventos vicariantes de cambios en los cursos de agua ocurridos durante la compleja historia geomorfológica y climática del Neotrópico (Montoya-Burgos, 2003).

Recientemente, junto al Dr. Montoya Burgos, hemos presentado una nueva hipótesis llamada fluctuaciones del nivel del mar (Cardoso & Montoya-Burgos, 2009) donde se propone que las modificaciones del clima (por ejemplo, los períodos glaciares e interglaciares) estarían fuertemente ligadas a las fluctuaciones del nivel del mar y que estas fluctuaciones tendrían un impacto muy importante en la dispersión de los organismos de agua dulce. En Cardoso & Montoya-Burgos (2009), hemos verificado que los períodos de bajo nivel del mar favorecen las interconexiones entre las desembocaduras de ríos adyacentes, permitiendo así la dispersión de los peces que habitan esas zonas. Durante los períodos de alto nivel del mar, las desembocaduras de los ríos vecinos quedan nuevamente desconectadas, impidiendo la dispersión de los organismos adaptados a vivir en agua dulce. Si los períodos de alto nivel del mar son prolongados, producen aislamiento en las poblaciones generando divergencia. Si el aislamiento es suficientemente extenso en el tiempo, la divergencia resulta en especiación, dando como resultado la presencia de especies hermanas en ríos adyacentes.

En la actualidad, por fuera del alcance de esta tesis doctoral, también estamos evaluando una nueva hipótesis que podría contribuir a explicar la gran diversidad de peces observada en la cuenca del Plata. Estudiando una gran variedad de grupos de peces, verificaremos la hipótesis llamada fragmentación de cuencas (Cardoso *et al.*, 2013b). Esta hipótesis propone que las variaciones en el régimen de lluvias permitirían la fragmentación de las cuencas, fragmentando también a las poblaciones que habitan en ellas. En nuestro país, hay numerosas cuencas fragmentadas que hoy en día no alcanzan el sistema principal de la cuenca del Plata, el ejemplo más importante lo representa el sistema de Mar Chiquita en la provincia de Córdoba, Santiago del Estero y Tucumán. Evaluando la estructuración las poblaciones de peces y el nivel de endemismo de estos dos sistemas, intentaremos estimar el impacto que ha generado la fragmentación de cuencas a lo largo de la historia hidrogeológica de la cuenca del Plata.

Para este trabajo de doctorado, se ha desarrollado un modelo para evaluar el impacto de las ingresiones marinas sobre la diversidad de peces de agua dulce en la cuenca del Plata. Evidencias geológicas sugieren que la diversificación de especies en las cuencas de los ríos Paraguay y Paraná podría haber surgido a partir de una incursión marina durante el Mioceno (15-5 Ma) (Hernández *et al.*, 2005). Como postula la hipótesis de los museos, este prolongado ingreso marino podría haber provocado el aislamiento de los afluentes de estas cuencas, generando procesos de especiación alopátrica simultáneos en los diferentes organismos estrictamente dulceacuícolas que en ella habita-

ban. Un objetivo puntual de este trabajo es datar mediante la calibración de marcadores moleculares la diversificación de diferentes grupos de peces de agua dulce de la cuenca del Plata. Mediante este datado se evaluará la hipótesis según la cual el ingreso marino durante el Mioceno ha sido la causa principal de la diversificación en esta región.

En todas las hipótesis mencionadas anteriormente se postula que los múltiples eventos de cambios climáticos, hidromorfológicos y variaciones del nivel del mar pudieron haber provocado a través de la especiación alopátrica la gran diversidad biológica, controlando la dispersión de las especies. Por lo tanto, para entender cómo surgió la actual riqueza de peces neotropicales, es necesario considerar la compleja historia hidrogeomorfológica del continente sudamericano, pero también se requiere del conocimiento de los organismos en estudio. Datos sobre la filogenia, morfología, ecología, distribución en tiempo y en espacio del grupo taxonómico utilizado, son fundamentales para poder evaluar y formular las hipótesis generales sobre la diversificación de dicho grupo (Quérouil, 2003).

1.2. Historia hidrogeológica de la cuenca del Plata y su implicancia en la biodiversidad

La cuenca del Plata, con una superficie de 3.200.000 km², es la segunda cuenca hidrográfica más grande del mundo. Abarca importantes territorios pertenecientes a Argentina, Bolivia, Brasil, Uruguay y la totalidad del Paraguay (ver Fig. 1.1). Se compone de cuatro grandes sub-cuencas, las de los ríos: Uruguay, Paraná, Paraguay, y la propia cuenca del Río de la Plata. El conjunto comprende las cuencas de los tributarios andinos de éstos, como el río Bermejo, el río Pilcomayo, y el Salado del norte. En tan enorme extensión se pueden encontrar distintos ambientes acuáticos naturales, que van desde los típicos de agua dulce hasta aquellos en que ésta se mezcla con agua de mar, formando un ecosistema de estuario, en la desembocadura del Río de la Plata.

Desde el punto de vista biogeográfico, Arratia *et al.* (1983) definieron a la cuenca del Plata como la provincia Páramo-platense, y López *et al.* (2008) la llamaron la zona de Grandes Ríos. Estos autores afirman que es en este territorio donde se encuentra la mayor variedad de ambientes acuáticos y la mayor cantidad de especies, presentando un gran número de endemismos.

Con el objetivo de comprender los procesos que han moldeado la diversidad de peces en el



Figura 1.1: Territorio abarcado por la cuenca del Plata. En detalle puede verse sus principales afluentes. Figura tomada de <http://es.wikipedia.org/wiki-CuencadelPlata>.

sistema del Plata, es necesario considerar la compleja historia hidrogeológica de esta cuenca y de sus principales ríos (ver un resumen en la Tabla 1.1).

Según la reconstrucción de los paleocauces de América del Sur realizada por Lundberg (1998), durante el comienzo del Cenozoico, el paleocauce del sistema Amazonas-Orinoco fue un gran cuerpo de agua que corría en dirección norte hacia el Mar Caribe, mientras que el sistema de la cuenca del Plata tenía sus cabeceras en Chile y Argentina y drenaba también hacia el norte por captura del proto Amazonas-Orinoco. La división entre estas dos grandes cuencas tuvo lugar con la deformación Orocline boliviana y el comienzo del levantamiento del Arco Michicola durante el Orógeno Incaico (aproximadamente hace 30 Ma) y continuó con el levantamiento del muro de Chapare (28-20 Ma). De este modo el Arco Michicola generó una división entre el proto Amazonas-Orinoco y el Alto Paraguay en el margen oeste del continente Sudamericano. Este evento hidrogeográfico subdividió y mezcló la fauna acuática preexistente dentro de ese gran cuerpo de agua, generando eventos vicariantes y geodispersión de las poblaciones y especies. Estos procesos deben haber jugado un papel muy importante dentro de la compleja historia de especiación que ha tenido lugar dentro y entre las cuencas del Amazonas, Orinoco y del Plata (Montoya-Burgos, 2003).

Posteriormente, los límites entre el paleocauce del Amazonas-Orinoco y del Plata sufrieron un último e importante desplazamiento. Kennan *et al.* (1997) proponen que hace 10 Ma en la región de la Cordillera Oriental en los Andes, la división entre el sistema del norte (Amazonas) y del sur (del Plata) estaba a dos grados de latitud más al sur que la actual división entre cuencas (véase una representación de la zona en la Fig. 1.2). Estos autores sostienen que hace 3,5 Ma con el levantamiento de los picos montañosos del norte de la ciudad de Sucre (Bolivia), la cabecera del río Pilcomayo (sistema sur) capturó los afluentes del Alto Río Grande (sistema norte) y desde entonces, en la región cercana de Bertanzos (Bolivia) y Sucre se encuentran ríos que drenan hacia el sur del continente formando parte de la cuenca del Plata. Este evento de captura de cabeceras del Amazonas por parte del Pilcomayo debe haber implicado también captura de los organismos que habitaban esa región, generando dispersión desde el Amazonas hacia el Pilcomayo. Este hecho concuerda perfectamente con la distribución observada de numerosas especies de peces que se encuentran en la cuenca del río Paraguay (siendo el Pilcomayo un afluente de ésta) cuyas especies hermanas y clados más relacionados son amazónicos. Una lista exhaustiva de especies y grupos de especies que ejemplifican este tipo de distribución puede verse en el capítulo 11 de Albert & Reis (2011).

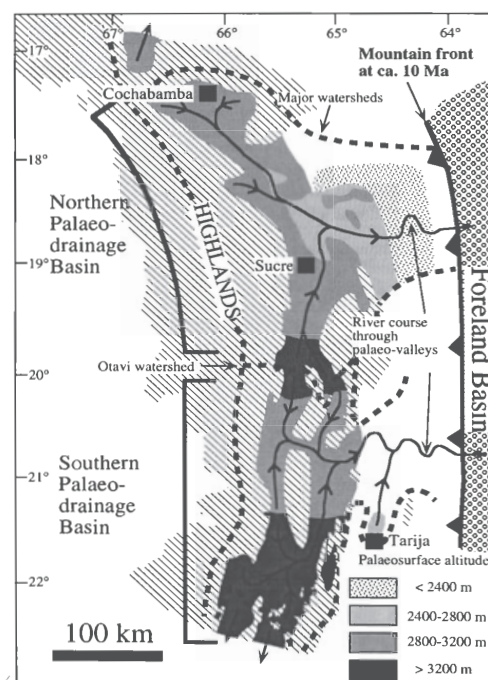


Figura 1.2: Diagrama de las cabeceras de los sistemas Amazonas y del Plata hace 10 Ma, mostrando el paleo límite entre las cuencas. Figura tomada de Kennan *et al.* (1997). El límite actual entre ambas cuencas se encuentra al norte de la ciudad de Sucre, Bolivia.

Desde el lado este del continente, se sabe que el río Paraná ha sobrellevado numerosas modificaciones en su curso durante los tiempos geológicos. Sin embargo, los dos especialistas en los paleocauces de la región mesopotámica, M. Iriondio y E. Popolizio, no acuerdan sobre las posiciones tomadas por el río ni sobre los períodos donde se han producido los cambios.

Según Popolizio (1999), es probable que inicialmente la cuenca del Alto Paraná drenara hacia el norte, pero el levantamiento del Escudo Brasileño con posterioridad a los derrames basálticos del Mesozoico, invirtiera la tendencia al descenso y la incorporara como intracratónica. Durante el Neógeno se desarrolló una gigantesca superficie de pediplanación que se extendía desde el este, en el macizo brasileño, con dirección hacia el este y sudoeste. Durante el Mioceno, el Paraná desembocó en el mar Paranense que había ingresado desde el Río de la Plata y parte de la Mesopotamia. Posteriormente, a medida que el mar se retiraba, se fue formando un enorme conoide aluvial, cuyos sedimentos no están bien determinados.

Hoy en día, la cronología del nacimiento del actual Paraná no tiene consenso. Algunos autores sostienen que el río se instaló en su curso actual hace 2,5 Ma (Castellanos, 1959; Iriondo & Drago, 1972; Iriondo, 1993; Iriondo *et al.*, 2007). Los datos geológicos sugieren, sin embargo, fechas más

cercanas a 7 Ma (Popolizio, 1972, 1980, 1987, 1999). Según Popolizio (1999), el Paraná corría inicialmente a través de los ríos Garupá y Tunas en la provincia de Misiones, desembocando en el río Uruguay (véase la línea de trazos I en la Fig. 1.3). El elevamiento del este de la provincia de Corrientes (Plioceno inferior) ha dado lugar a la depresión del Iberá, ésto modificó la situación hidrográfica y el río Paraná se deslizó hacia los saltos de Apipé entrando a la zona deprimida. Durante el Chapadmalense el Paraná fue rotando hacia el oeste y ocupó los valles de los ríos Aguapey y Miriñay para finalmente desembocar en el Uruguay (véase las líneas de trazos II y IV en la Fig. 1.3). Para Castellanos, este último río giraba hacia el este y se dirigía hacia la laguna de los Patos (actualmente esta laguna forma parte de los ríos costeros del sur de Brasil). A pesar de que varios autores se han referido a estos antiguos valles (Beurlen, 1970; Bonetto, 1994), que se dirigían hacia dicha laguna, Popolizio pensaba que es más probable que el río Uruguay ya existiera y se fuera ensanchando a medida que el Paraná desembocaba en él, cada vez más hacia el sur. Iriondo se refiere a esta conexión, del Paraná con el Uruguay a través del Miriñay, asignándole una edad entre los 780.000 y 130.000 años. Con posterioridad, el Paraná logró vencer el resalto estructural, giró hacia el oeste e ingresó a la Depresión Iberana formando varios cauces más o menos paralelos, continuando por la del Sarandí - Barrancas y desembocando al sur del límite entre Corrientes y Entre Ríos, en el río Paraguay. Finalmente tomó su posición actual confluyendo sus aguas con el río Paraguay, más al norte, entre el límite de la provincia de Chaco y Corrientes. Por lo tanto, el río Paraná corre actualmente con características de un río doble ya que presenta un canal correspondiente a las aguas del Paraguay y otro al de las suyas, al sur de la confluencia.

En la actualidad, a pesar de la cercanía de algunos de sus afluentes, los ríos Paraná y Uruguay están conectados exclusivamente a través del Río de la Plata. Sin embargo, Iriondo & Krohling (2008) aseguran que cuando la laguna Iberá y el río Gualeguay (cuenca del Paraná) superan cierta cota pueden desbordar hacia el río Miriñay y Gualeguaychú respectivamente (cuenca del Uruguay). La separación de los ríos Paraná y Uruguay debe haber implicado también la división de la biota que en ellos habitaba, conllevando procesos de especiación a través de eventos vicariantes.

Sobre el margen este del sur de Sudamérica en el territorio brasileño, se encuentran numerosos ríos costeros que no pertenecen a la cuenca del Plata pero que han tenido una compleja relación con dicha cuenca. Ribeiro (2006) describe eventos de capturas de cabeceras de los ríos costeros del sur como un complejo asociado al sistemas de fallas. Estos eventos de capturas son aun más susceptible



Figura 1.3: Las diferentes posiciones del río Paraná a lo largo de su compleja evolución. Figura tomada de Popolizio (1999).

por causas de erosión. A su vez, Albert & Reis (2011) reportaron varios eventos de capturas de cabeceras ocurridas entre los 28-15 Ma entre estos ríos y el Paraná. Estos eventos podrían explicar mediante procesos de geodispersión como fue que se estableció la mayor parte de la distribución de los peces que habitan en los ríos costeros del sur de Brasil (Roxo *et al.*, 2012).

Por otra parte, durante la segunda mitad del Mioceno, hace 15-5 Ma atrás, al menos dos intrusiones marinas ocurrieron en la cuenca del Plata a través de distintos corredores paleogeográficos (Hernández *et al.*, 2005). El primer evento de máxima inundación ocurrió hace 15-13 Ma y fue el resultado de una elevación de más de 150 m del nivel del mar (Haq *et al.*, 1987). La Fig. 1.4.A muestra la extensión ocupada por esta ingresión marina, la cual inundó la mayor parte de la cuenca del río Paraná, llegando hasta el arco Michicola. Este arco, elevado durante el Cretácico, parece haber actuado como barrera para esta ingresión. El segundo máximo de inundación de la ingresión duró aproximadamente entre 10 a 5 Ma (Hernández *et al.*, 2005). La Fig. 1.4.B muestra el área cubierta por esta segunda ingresión, nótese que para la mayor parte del territorio no hay datos disponibles. Durante este segundo evento de inundación marina Paranense, el mar Caribe o Amazónico también ingreso desde el norte del continente. Hernández *et al.* (2005) surgieron que ambas ingre-

siones marinas no estuvieron en contacto y proponen que los 22°S fue el punto más al sur de la ingresión del norte y que los 26°S fue el punto más norte de la ingresión Paranense. Entre estos los 22°S y 26°S no hay indicios de depósitos marinos.

Tal como sugiere la hipótesis de los museos (Fjeldså, 1994) es muy probable que la diversidad de los organismos estrictamente dulceacuícolas haya sido seriamente modificada debido a estas ingresiones marinas en la cuenca del Plata. Un objetivo puntual de esta tesis será entonces evaluar el impacto de estas ingresiones sobre la diversidad de especies de cuatro géneros de la familia Loricariidae.

Fjeldså (1994) propuso que la evolución de los ecosistemas tropicales puede haber estado dirigida por un proceso dinámico de diferenciación localizada en las zonas altas del continente durante las ingresiones marinas, seguido de una acumulación en las zonas bajas durante los períodos de niveles bajos del mar. Siguiendo esta hipótesis, las zonas bajas del continente tropical actúan como museos donde gran número de especies se acumulan. Esta hipótesis identifica a las ingresiones marinas como el mayor evento vicariante que promueve divergencia. Según esta hipótesis, dos predicciones pueden ser esperadas para los peces estrictamente de agua dulce : (i) alto nivel de endemismo en las áreas emergidas durante el Mioceno y (ii) alto número de especies en las zonas bajas acompañado con un bajo nivel de endemismo.

Hubert & Renno (2006) encuentran en la región Neotropical once áreas de endemismo y para explicar la diversidad dentro de cada una de ellas proponen a las ingresiones marinas como la fuerza más importante de diversificación. Una de las áreas de endemismo que estos autores definen está compuesta por la cuenca de los ríos Paraná y Paraguay. Dentro de esta área debe haber existido uno o varios refugios donde las especies se resguardaron durante las ingresiones marinas. Lundberg *et al.* (1998) basados en evidencias geológicas, argumentan que la diversidad dentro de la cuenca Paraná-Paraguay procede del Mioceno, sin embargo, el tiempo de diversificación de las especies dentro de estas cuencas es aún incierto.

Por otro lado, dentro de la cuenca del Plata, López & Miquelarena (2005) comentan que el endemismo a nivel específico de Argentina se distribuye principalmente en la Provincia Parano-Platense, en el eje que une al río Paraná y el Río de la Plata y sus áreas de influencia. Estos autores agregan que el mayor número de estas especies han sido descritas para cursos interiores del territorio misionero. Posteriormente, López *et al.* (2008), estudian las regiones biogeográficas de Argentina

Tabla 1.1: Resumen de los cambios documentados en la hidrogeología de la cuenca del Plata.

Evento hidrogeológico	Fecha	Referencia
1. División entre el proto Amazonas-Orinoco y la cuenca del Plata	30-20 Ma	Lundberg (1998)
2. Captura de cabeceras entre el Paraná y los ríos costeros del sur	28-15 Ma	Albert & Reis (2011)
3. Primer máximo de ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata	15-13 Ma	Hernández <i>et al.</i> (2005)
4. Segundo máximo de ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata	10-5 Ma	Hernández <i>et al.</i> (2005)
5. Separación de los ríos Paraná y Uruguay	7-2,5 Ma	Numerosas citas, ver texto
6. Captura de cabeceras del Río Grande por parte del Pilcomayo	3,5+/- 0,2 Ma	Kennan <i>et al.</i> (1997)

a partir de los datos de los peces de agua dulce. En este trabajo los autores definen la región de los Grandes Ríos al conjunto de todos los componentes de la cuenca del Plata, siendo las únicas excepciones los ríos Carcarañá y Salado del norte (provincia de Santiago del Estero) que, junto a los ríos del sistema endorreico de Mar Chiquita, pertenecen a lo que denominan *región pampeana*.

1.3. La familia Loricariidae

A fin de responder a las preguntas sobre la diversificación de las especies y la biogeografía de los peces de agua dulce en la cuenca del Plata, elegimos estudiar cuatro géneros (*Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*) de la familia Loricariidae, una de las familias más diversificadas de peces continentales tanto en número de especies como en adaptaciones ecológicas. Los Loricariidos son exclusivamente neotropicales y cuentan con más de 800 especies válidas, esto los convierte en la familia más grande dentro de los Siluriformes (Ferraris, 2007). Nuevas especies son descritas regularmente cada año, reflejando de esta manera la gran biodiversidad de la región Neotropical.

Los miembros de la familia Loricariidae tienen el cuerpo cubierto por placas óseas y una boca que ha sido modificada en forma de ventosa (véase algunas especies en la Fig. 1.5). Llevan las aletas y el cuerpo parcial o totalmente cubiertos por espinas llamadas odontodes. Estos odontodes pueden estar muy desarrollados en los machos de algunas especies generando de este modo un gran dimorfismo sexual. Generalmente están desprovistos de aletas adiposas o poseen solo una, representada mediante un proceso óseo y una membrana. Sus hábitos alimenticios están basados sobre detritos,

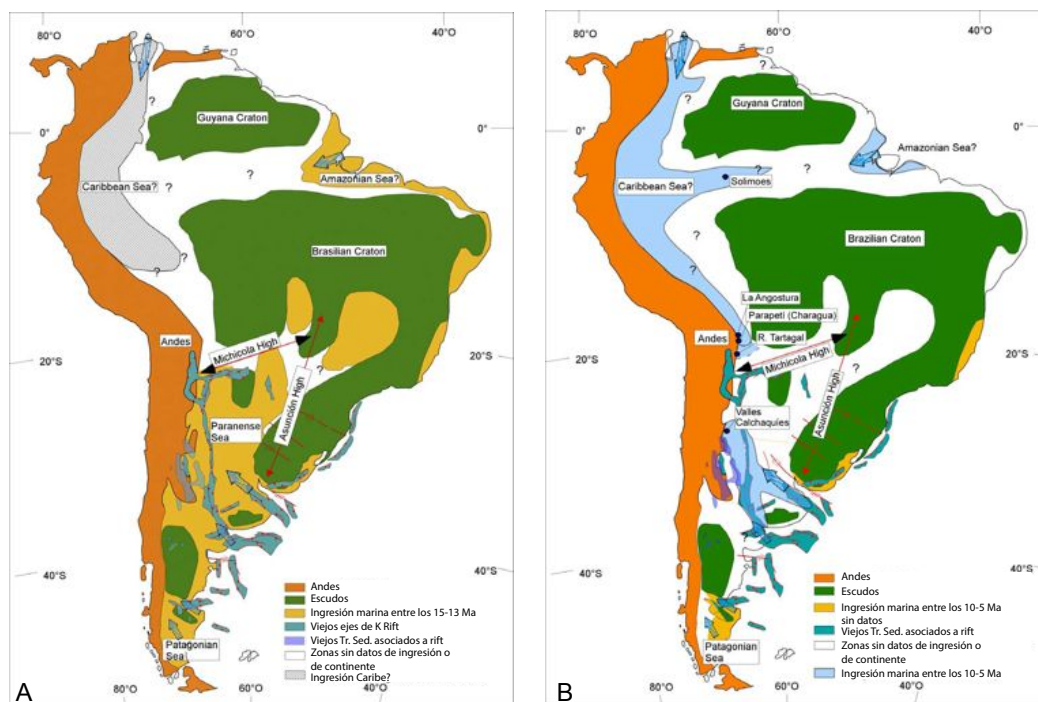


Figura 1.4: Territorio abarcado por las ingresiones marinas durante el Mioceno. A: hace 13-15 Ma. B: 10-5 Ma. Figura modificada de Hernández *et al.* (2005)

algas, moluscos y larvas de diferentes invertebrados. Los Loricariidos son principalmente peces de fondo que viven en arroyos y ríos de corriente rápida con fondo rocoso o en ambientes lénticos de fondo fangoso.

Hoy en día, la familia Loricariidae esta dividida en siete subfamilias: Lithogeninae (con un género y tres especies), Loricariinae (con 30 géneros y alrededor de 220 especies), Hypoptopominae (con 13 géneros y aproximadamente 100 especies), Neoplecostominae (con 5 géneros y 39 especies), Otothyriinae (con 10 géneros), Delturinae (con 2 géneros y 7 especies) e Hypostominae (con más de 40 géneros y 400 especies) (Chiachio *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2011).

Dos de los géneros estudiados en esta tesis (*Hypostomus* y *Ancistrus*) pertenecen a la subfamilia Hypostominae. Esta subfamilia esta dividida a su vez en cinco tribus: Hypostomini, Corymbophanini, Pterygoplichthini, Rhinelepini y Ancistrini (Armbruster, 2004). Siguiendo a Armbruster (2004) Hypostominae es diagnosticada por una única característica: el lóbulo inferior de la placa hipural es tan largo como el lóbulo superior. Sin embargo, otras características también son consideradas como sinapomorfías para los *Hypostomus*: un largo proceso accesorio en el primer ceratobranquial, una pequeña placa anal, un espinelet en forma de "V" y un puente postero-ventral en el basipterigio.



Figura 1.5: Algunos representantes de la familia Loricariidae. Varias de estas fotos fueron tomadas por F. Brancolini.

Los otros dos géneros estudiados en este trabajo (*Loricariichthys* y *Rineloricaria*) son miembros de la subfamilia Loricariinae. Esta subfamilia está dividida en dos tribus: Harttiini y Loricariini. Según Covain *et al.* (2008), los miembros de esta subfamilia se reúnen por presentar un pedúnculo caudal largo y comprimido y por no tener aleta adiposa. Además, exhiben una gran variación en la forma del cuerpo, la morfología de los labios y la dentición.

En este trabajo doctoral, estos cuatro géneros han sido estudiados a partir de herramientas moleculares con el objetivo de conocer su diversidad, filogenia y biogeografía histórica.

1.4. Herramientas moleculares aplicadas al estudio de la diversidad y la biogeografía

Los análisis basados en marcadores moleculares, mitocondriales y nucleares, son frecuentemente muy usados para responder cuestiones taxonómicas. El hecho que el ADN mitocondrial (mtADN) no sufre recombinación y que, al menos en animales, evoluciona más rápido que el ADN nuclear, hace que el mtADN sea una herramienta extremadamente importante en los estudios de genética de poblaciones, filogenias moleculares y sistemática (Pages & Holmes, 1998). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que los árboles basados en mtADN son frecuentemente incongruentes con los árboles basados en datos morfológicos, citológicos o en marcadores nucleares. Esto se debe a la introgresión del mtADN *via* eventos de hibridación y resulta de la combinación de herencia materna a diferentes tasas de evolución (véase una discusión en Arnold *et al.*, 1999). Por esta razón, generalmente se recomienda incluir uno o más marcadores nucleares para investigar la historia evo-

lutiva de complejos de especies recientemente divergentes (Kawakami *et al.*, 2007). La elección del marcador debe estar en concordancia con el nivel del problema taxonómico a resolver porque cada marcador molecular evoluciona a diferente tasa de evolución. En este estudio, la diversidad y las relaciones filogenéticas de los cuatro géneros estudiados fueron analizados usando la región control (D-loop) y la citocromo C oxidasa subunidad I (COI), dos marcadores mitocondriales, pero también se han utilizado varios marcadores nucleares tales como CDC27, RAG11, HODZ3 y F-reticulon-4, dependiendo del género en estudio.

En los últimos tiempos, estos análisis moleculares, además de ser utilizados en sistemática y para resolver la filogenia de los taxones, han sido ampliamente utilizados para abordar estudios biogeográficos, sobre todo en los temas relacionados a la biogeografía histórica. Esta rama de la biología, se enfoca en las relaciones que existen entre la distribución de la vida y el tiempo, buscando cómo se fueron sucediendo las distribuciones de las especies hasta su estado actual. La biogeografía, evalúa de este modo los procesos de especiación, dispersión, extinción de los linajes y los clados. Los datos moleculares de las especies han revolucionado los estudios biogeográficos, permitiendo integrar datos filogenéticos, tiempo y espacio. La disciplina que más ha crecido recientemente dentro de la biogeografía ha sido la filogeografía (Posadas *et al.*, 2013), la cual estudia la distribución geográfica de la diversidad genética dentro de una especie o un complejo de especies. Sin embargo, frecuentemente se utilizan las filogenias moleculares para resolver cuestiones biogeográficas, tal es el caso de este estudio. Una de las ventajas de los datos moleculares para este tipo de trabajos, es la posibilidad de estimar las edades de divergencia entre los clados (mediante relojes moleculares). Las fechas absolutas de divergencia entre linajes permite a los investigadores inferir los efectos de los cambios climáticos y geológicos del pasado en el patrón de especiación y en la dispersión de los organismos (Riddle *et al.*, 2008). Cuando un investigador observa que los tiempos estimados de divergencia de un cierto clado correlaciona con un evento geológico o climático conocido, el investigador está tentado de postular causalidad. No obstante, correlación no implica causa. Las correlaciones entre edades de divergencia y condiciones geológicas deben ser interpretadas como hipótesis tentativas, que deben ser sujetas a futuras evaluaciones con material y datos adicionales.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

2.1. Muestreos y material examinado

La mayor parte del material utilizado en esta tesis fue colectado mediante numerosos viajes de campaña. Algunos de estos viajes han sido financiados por el subsidio IBOL-CONICET y por el Dr. Montoya-Burgos de la Universidad de Ginebra. Otras muestras, fueron obtenidas gracias a la colaboración y el intercambio de material con otras instituciones e investigadores tanto nacionales como extranjeros.

Los especímenes obtenidos durante las campañas, se rotularon e identificaron individualmente. Una pequeña cantidad de tejido (aleta o músculo) fue preservada en etanol 96%. Los ejemplares testigos fueron rotulados, fijados en formalina y posteriormente preservados en alcohol. Luego han sido depositados en las colecciones del Museo de Ciencias Naturales de La Plata (MLP) o en el Instituto de Limnología R. Ringuelet (ILPLA) o en el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (MACN) o en la Fundación Felix de Azara. A partir de las muestras y tejidos colectados se realizaron los estudios moleculares que se detallan a continuación. Los ejemplares *voucher* depositados en las colecciones fueron utilizados para la determinación de las especies, así como también para la descripción de nuevos taxones.

Una lista exhaustiva de todo el material utilizado se encuentra en el apéndice A. Allí se pueden

ver los datos de la localización geográfica, determinación, colección donde esta depositada cada muestra y el número de acceso al *Genbank* si hay secuencias publicadas del ejemplar.

2.2. Técnicas moleculares

2.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los tejidos preservados en alcohol se realizó mediante el protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997) (protocolo completo puede verse en el apéndice B.1). Esta técnica produce una extracción rápida del ADN total (mitocondrial y nuclear) a partir de un tejido de menos 25 mg. La calidad y la cantidad de ADN extraído se verificó mediante electroforesis (ver más adelante), luego el extracto se conservó a -20°C para futuros análisis genéticos.

2.2.2. Marcadores moleculares

Para este estudio se utilizaron diversos marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares. Uno de los marcadores más utilizados en los últimos tiempos es la Región Control o D-loop porque es el marcador que presenta la mayor variabilidad del genoma mitocondrial. Para los loricaridos, el D-loop está caracterizado por la presencia de repeticiones mini-satélites en la región 5' y por micro-satélites en la región 3' (Montoya-Burgos *et al.*, 2002). Estas repeticiones causan importantes problemas técnicos en la amplificación por PCR y en la secuenciación (ver más adelante). Es por ello que en este trabajo solo la región central del D-loop, de aproximadamente 600 bp, fue amplificada y secuenciada para el género *Hypostomus*. Este marcador además de ser parte de los análisis filogenéticos de este género fue utilizado para evaluar la diversidad de especies.

Otro marcador mitocondrial utilizado en este trabajo de tesis fue la Citocromo c oxidasa subunidad I o COI. Este marcador es utilizado por el *DNABarcoding* para la identificación de las especies. La COI presenta menor variabilidad intraespecífica que el D-loop, pero permite obtener una buena determinación de la mayoría de las especies de vertebrados gracias a su alta variación interespecífica. Este gen se amplificó y secuenció para los cuatro géneros en estudio. Hoy en día hay a disposición miles de secuencias de COI para una gran variedad de grupos taxonómicos de todo el mundo. Es por ello que fue posible utilizar muchas secuencias depositadas en el *Genbank* o en la plataforma del *Barcoding* para el estudio de los cuatro géneros de interés.

El primer marcador nuclear utilizado para nuestros análisis filogenéticos fue el F-reticulon-4 o FRTN4. Este gen codifica una proteína receptora de membrana presente en las células del sistema nervioso, regulando de este modo el crecimiento, la regeneración y la plasticidad del axón (Yang & Strittmatter, 2007; Klinger *et al.*, 2004). El FRTN4 fue amplificado para los géneros *Ancistrus* (1200bp), *Loricariichthys* (2500bp) y *Rineloricaria* (2500bp). Para los *Hypostomus* se amplificó el FRTN4, pero con las primeras secuencias obtenidas, se observó que este gen presentaba grandes deleciones e inserciones asociadas a mutaciones puntuales, las cuales no reflejaban la historia evolutiva del género. Es por ello que para el género *Hypostomus* se decidió utilizar otros marcadores nucleares que se detallan a continuación.

El gen CDC27 codifica una proteína que actúa en la anafase del ciclo de división celular. Esta proteína está compuesta por ocho subunidades y es altamente conservada en células eucariotas. En este trabajo para el género *Hypostomus* se ha amplificado una fracción de 1128 bp correspondientes a un intrón de este gen.

El gen RAG1 es parte de los genes activadores de recombinación, conocidos por sus siglas en inglés de *recombination activating gene* (RAG1). Estos genes codifican enzimas que llevan a cabo un importante papel en la reordenación y recombinación de los genes de la inmunoglobulina y el receptor de linfocitos T durante el proceso de recombinación. Aquí se ha amplificado para el género *Hypostomus* la primera fracción de este gen, obteniendo aproximadamente 1340 bp.

Finalmente, el gen *Hodz3* (homólogo *od3* para *Hypostomus*) codifica una proteína transmembrana que se expresa en las neuronas. Una fracción de 1060 bp del gen *Hodz3* fue utilizada para el género *Hypostomus*.

2.2.3. Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es un método para amplificar segmentos de ADN específicos (ver el protocolo completo en el apéndice B.2). En este trabajo, se ha utilizado la PCR para amplificar los marcadores moleculares descritos más arriba. El método de PCR requiere un ambiente químico específico para que Taq-DNAPolimerasa (extraída de *Thermus aquaticus*) copie una región del ADN: dos *primers* específicos (directo y reverso), dNTP y una solución buffer. La replicación es exponencial dado que la PCR opera en ciclos amplificando en cada ciclo el ADN previamente replicado. Cada ciclo involucra tres etapas: desnaturalización (a 94°C), unión de los

primers (a 50°C - 59°C) y elongación (a 72°C). Las PCRs fueron realizadas en un volumen total de 25 μ l. Los *primers* utilizados para cada marcador y para cada género en estudio están detallados en el apéndice B.2.

Los *primers* utilizados para el marcador CDC27 fueron diseñados exclusivamente a lo largo de este estudio. Para cada uno de ellos se debió elegir un fragmento de 18-25 bp en una región conservada del marcador con una composición de bases de 50 % G + C. Se ha intentado siempre que los *primers* terminen con dos o tres bases G y/o C para incrementar la eficiencia de la amplificación.

2.2.4. Electroforesis

Los geles de agarosa fueron usados mediante electroforesis para analizar los resultados de la extracción de ADN y los productos de PCR. La electroforesis consiste en sembrar 2-5 μ l de producto y 4 μ l de un marcador molecular (por ejemplo *100 bp DNA ladder invitrogen*) en un gel de agarosa al 1,5 % (el protocolo completo se puede ver en el apéndice B.3). Luego se genera una corriente eléctrica a fin de que las moléculas cargadas migren. La velocidad de migración depende del tamaño de cada molécula. Esta técnica se utiliza para conocer la cantidad, la calidad y el tamaño molecular del producto que se está analizando.

2.2.5. Secuenciado

La totalidad de los productos amplificados por PCR fueron secuenciados en Macrogen Inc. Corea del Sur. Esta compañía purifica y realiza la reacción de secuenciado a partir de 10 μ l del producto PCR. Además del producto PCR es necesario enviarle los *primers* específicos correspondientes a cada marcador molecular. En todos los casos, se secuenciaron ambas cadenas del ADN (*forward* y *reverse*). Cuando el marcador superaba las 1000 bp, se realizó además una tercera reacción de secuenciado a partir de un *primer* interno del fragmento. Los datos de secuenciado y los cromatogramas son enviados por *e-mail* y guardados en formato FASTA y ABI respectivamente.

2.3. Análisis filogenéticos

Para cada marcador y para cada género, las secuencias obtenidas fueron manualmente alineadas usando BioEdit version 7.0.1 (Hall, 1999). Este programa permite una buena visualización de los

cromatogramas y la obtención de secuencias consenso. El alineamiento es una etapa crucial para los análisis filogenéticos porque es el paso donde se define la homología de los sitios. El objetivo es asegurar que cada sitio elegido sea homólogo, es decir, que fue adquirido desde un ancestro común y que contiene información filogenética relevante.

A cada conjunto de datos además de las secuencias correspondientes al grupo en estudio, se le agregaron varias secuencias de otros géneros que fueron utilizadas como *outgroup* para el enraizamiento de los árboles filogenéticos.

2.3.1. Modelos de evolución

Un simple conteo del número de las diferencias entre dos secuencias de ADN puede llevar a cabo una subestimación de las distancias genéticas entre dichas secuencias. Es por ello que en los últimos años, se han desarrollado varios modelos para interpretar estas diferencias y convertirlas en medidas que reflejen la verdadera distancia evolutiva entre secuencias. Usando estos modelos es posible estimar el número de eventos mutacionales no vistos o detectados en un simple conteo. Muchos de estos modelos fueron propuestos diferenciándose entre sí por el tipo de supuestos acerca de la naturaleza de los procesos evolutivos involucrados. Algunos de los principales modelos son los siguientes:

- El modelo Jukes-Cantor (JC) es el más simple. Asume que las cuatro bases tienen igual frecuencia y que todas las sustituciones son igualmente probables. El modelo contiene un solo parámetro, α , que es la probabilidad de sustitución por unidad de tiempo, la cual es constante.
- El modelo Kimura (K-2P). Contiene dos parámetros. Asume que las cuatro bases tienen igual frecuencia, pero las transiciones α no son igualmente probables que las transversiones β .
- El modelo Felsenstein (F81). Contiene cinco parámetros. Asume una variación en la composición de bases, es decir, que cada nucleótido tiene diferente frecuencia ($\pi(A) \neq \pi(C) \neq \pi(G) \neq \pi(T)$). Sin embargo, las transiciones y las transversiones son igualmente probables ($\alpha = \beta$).
- El modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85). Tiene seis parámetros. Asume que las transiciones y las transversiones ocurren a tasas diferentes ($\alpha \neq \beta$) y que las bases tienen diferentes

frecuencias ($\pi(A) \neq \pi(C) \neq \pi(G) \neq \pi(T)$).

- El modelo *General Time Reversible* (GTR). Tiene diez parámetros. Asume que cada nucleótido tiene diferente frecuencia y que cada tipo de las seis posibles sustituciones tiene una probabilidad específica.

El programa MrAIC.pl (Nylander, 2004) fue empleado para seleccionar el modelo que mejor se ajustaba a cada set de datos. MrAIC.pl es un *Perl script* usado para computar el *Akaike Information Criterion* (AIC), el *corrected Akaike Information Criterion* (AICc), el *Bayesian Information Criterion* (BIC) y el *Akaike weights*. Por defecto este programa verifica 24 modelos diferentes usando PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) y les asigna distintos valores de verosimilitud. Además existen dos factores adicionales que son estimados por el programa, uno de ellos es proporción de sitios invariantes (I) y el otro la distribución Gamma (G). Esta última es usada para corregir las variaciones de sustituciones entre los diferentes sitios. MrAIC.pl también sugiere si uno o ambos factores deben tenerse en cuenta a la hora de procesar los datos. El programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004) también fue utilizado para buscar el mejor modelo de cada conjunto de datos. En el caso de datos compuestos por múltiples marcadores moleculares, Treefinder proporciona para cada partición el modelo que mejor se ajusta a cada fracción del alineamiento.

El modelo K-2P, es el modelo frecuentemente utilizado para calcular las distancias genéticas interespecíficas, especialmente cuando se analizan los límites taxonómicos de las especies basados en el marcador mitocondrial COI, tal como propone el consorcio *Barcoding*. En este trabajo, para el género *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* se ha calculado las distancias genéticas entre los diferentes linajes o especies basándose en el marcador COI. Para ello se ha utilizado el programa Dnadist del paquete Phylip 3.69 (Felsenstein, 1989) y se ha asumido el modelo de evolución K-2P. Según la literatura, cuando se encuentra 3% o más de divergencia entre dos especies del mismo género de peces se las considera como diferentes especies o linajes (Ward, 2009). Para llevar a cabo la matriz de distancias genéticas entre diferentes especies del mismo género se ha utilizado el segmento del gen mitocondrial COI (650 bp) empleado en el consorcio internacional del *Barcoding*. Visitando la página web www.boldsystems.org pueden verse las diferentes maneras de calcular la diversidad de un grupo de organismos a partir de los datos brindados por el marcador COI.

2.3.2. Métodos para inferir filogenias

Los métodos comúnmente utilizados para inferir filogenias incluyen la parsimonia, la máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana. También existen métodos basados en distancia para la construcción de árboles, donde se asume un método aglomerativo basado en el principio de mínima evolución entre dos secuencias. Estos métodos dependen de modelos matemáticos que describen la evolución de los caracteres de las especies y son usualmente empleados para filogenias moleculares basadas tanto en ácidos nucleicos como en amino ácidos. En este trabajo, luego de definir el modelo de evolución, se utilizaron tres métodos diferentes para la reconstrucción de la historia evolutiva de los géneros en estudio: máxima verosimilitud (MV), inferencia bayesiana (IB), así como también Máxima Parsimonia (MP).

Máxima verosimilitud (MV)

El método de MV busca el árbol más probable a partir de un conjunto de datos basados en diferentes hipótesis evolutivas y de un dado modelo de evolución. Solo la hipótesis con máxima verosimilitud es tomada. Este método es fiable y es poco sensible al artefacto de atracción de ramas largas (Felsenstein, 1985). Desafortunadamente, el método MV es muy lento dado que requiere un gran poder de cálculo computacional. En este trabajo, dos análisis MV fueron hechos: un primer árbol se generó en el programa PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) de manera local. PHYML construye filogenias a partir de datos de ADN y proteínas. El análisis puede ser llevado a cabo asumiendo diferentes modelos de evolución (algunos de ellos fueron mencionados en 2.3.1). El segundo análisis de MV realizado fue efectuado en el programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004). Este programa infiere grandes árboles por MV bajo una variedad de modelos de evolución. Acepta tanto datos de ADN como de amino ácidos y toma en cuenta las tasas de heterogeneidad. Todos los parámetros son estimados de los datos. Con este programa se realizó un análisis filogenético con valores de *bootstrap*. Este es el método más utilizado para evaluar la confianza de las relaciones inferidas dentro de los árboles filogenéticos. La robustez de los resultados fue estimada a partir de *bootstrap* no paramétricos siguiendo la metodología de Felsenstein (1985). En este análisis los soporte de *bootstrap* para cada una de las ramas del árbol fue obtenida usando 1000 réplicas. Este último análisis con soporte de ramas fue corrido en el sitio web del Bioportal (ver más adelante) dado que requiere gran poder de cálculo.

Inferencia Bayesiana (IB)

La IB esta basada en el concepto de probabilidad posterior (PP) de la distribución de un árbol. Se define como la probabilidad de que una determinada hipótesis sea correcta conociendo el modelo de evolución y un conjunto de datos observados. Esta PP de distribución de árboles no puede ser calculada analíticamente. Es por ello que se utiliza una simulación técnica llamada cadena de Monte Carlo Markov (mcmc) para tener una aproximación de la PP. La IB es un método rápido, pero tiene tendencia a sobrestimar la fiabilidad de los nodos internos de los árboles. Los análisis de IB fueron realizados en el programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) en el sitio web de Bioportal (ver más adelante). La corrida se realizó utilizando cuatro cadenas simultáneas (tres calientes y una fría) para 20.000.000 de generaciones con un espacio de muestreo cada 100 generaciones. Luego de evaluar el marcador de verosimilitud, el 25 % de las generaciones fueron descartadas. El resto de los árboles obtenidos se utilizaron para calcular el árbol consenso final.

Máxima Pasimonia (MP)

Básicamente, el concepto de Máxima Parsimonia sostiene que ante dos hipótesis evolutivas es más probable que sea cierta aquella que implique menos cambios evolutivos. La Máxima Parsimonia utilizada por la corriente cladística consiste básicamente en buscar los árboles evolutivos más cortos posibles. El análisis cladístico consiste en una búsqueda, basada en la parsimonia, para una clasificación jerárquica de las unidades terminales que han sido determinados con una serie de atributos. Como es un método estrictamente numérico no hay requerimientos de un modelo que relacione estos árboles con un proceso biológico, como reproducción o descendencia. En este trabajo se ha usado el programa TNT 1.1 (Gologoff *et al.*, 2008) para inferir las filogenias según MP. Se realizó una búsqueda tradicional usando TBR con 1000 secuencias al azar adicionadas. Con los árboles obtenidos se generó un árbol de consenso estricto y en él se calcularon las frecuencias absolutas de los valores de soporte *Jackknife* con 1000 réplicas.

Análisis a partir de múltiples genes

Frecuentemente, las relaciones entre las especies están poco resueltas cuando se reconstruye una filogenia a partir de un solo marcador molecular. Una manera muy útil de afrontar esta difi-

cultad es aumentar el conjunto de datos agrupando la información contenida de diferentes genes. Los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de múltiples genes pueden obtenerse fundamentalmente de dos formas. Una es concatenar en un super alineamiento las secuencias de cada gen, que luego es analizado para generar un único árbol que defina las relaciones de las especies. La otra es inferir la filogenia de cada gen separadamente para luego realizar un árbol consenso de todos los árboles obtenidos. Para este trabajo, se ha utilizado un super alineamiento de múltiples genes para obtener la filogenia más robusta de las especies. En todos estos análisis los datos fueron particionados indicando donde empezaba y terminaba cada gen a fin de mantener el modelo de evolución correspondiente de cada marcador, las tasas y la composición de cada carácter sobre cada conjunto de datos. Los super alineamientos fueron analizados mediante MV, IB y MP usando los programas Treefinder, Mr Bayes y TNT, respectivamente.

Para el género *Hypostomus* se concatenaron los marcadores D-loop, COI, CDC27, RAG11 y HODZ3. Mientras que para los géneros *Loricariichthys* y *Rineloricaria* solamente se unificaron los genes COI y FRTN4.

Bioportal

El sitio web de Bioportal de la Universidad de Oslo (<http://www.bioportal.uio.no>) fue inicialmente desarrollado como una plataforma de servicio *on-line* para análisis filogenéticos. Actualmente, ha ampliado sus objetivos y permite realizar también análisis de genética de poblaciones y una gran variedad de análisis de secuencias a través de múltiples programas. Este servicio, gracias a un *cluster* de computadoras muy poderoso, permite correr análisis que de manera local tardarían muchas horas o incluso días. Los resultados que genera el sitio Bioportal son descargados en formatos Zip.

Test de topologías

Muy a menudo, las diferentes metodologías para las reconstrucciones filogenéticas presentan resultados diferentes. Esto se debe a las diferencias en los algoritmos y supuestos que cada método implementa. Entonces, vale preguntarse cuáles de las topologías obtenidas es la que mejor se ajusta a los datos. Para establecer si un determinado conjunto de datos soporta significativamente más una topología que otra, existen los tests de topologías. Para realizar este test se utilizó el programa Tree-

finder (Jobb *et al.*, 2004), incorporando al análisis el alineamiento del gen en cuestión, el modelo de evolución y las topologías a evaluar. En los casos de análisis de múltiples genes, además, se indicó la partición de los datos y los modelos de evolución para cada sección.

2.4. Tiempos de divergencia y análisis biogeográficos

2.4.1. Filogenias y rangos de distribución

La biogeografía histórica comúnmente utiliza las relaciones filogenéticas o las filogenias de las especies para inferir su historia biogeográfica. Es importante considerar que los cladogramas representan sólo una hipótesis de las relaciones biológicas de un grupo y no necesariamente la verdadera historia evolutiva de los organismos. Si una primera hipótesis es contrastada con nueva evidencia, es posible que la topología previa de la filogenia pueda cambiar, en consecuencia, estos cambios pueden afectar a los análisis biogeográficos realizados a partir de ella.

Todos los análisis realizados para abordar el estudio de la biogeografía de los taxones en estudio, se basaron en la información filogenética obtenida según los análisis detallados anteriormente. Para analizar al género *Hypostomus* desde un punto de vista biogeográfico se ha utilizado la filogenia molecular basada en los cinco genes concatenados, dado que es este árbol el que presenta la mayor evidencia para este grupo de peces. Para los géneros *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*, se ha tomado solamente la información que brindan los árboles basados en COI, dado que es en estos análisis donde podemos observar la mayor cantidad de especies. Cabe aclarar que el análisis biogeográfico para estos tres últimos géneros es simplemente un avance exploratorio, los resultados obtenidos deben ser interpretados como preliminares y deberían ser verificados a partir de otros estudios (agregando, por ejemplo, mayor números de genes estudiados e incorporando más especies).

Se han tomados las áreas de distribución de cada una de las especies para los cuatros géneros de Loricariidos estudiados. Para la realización de los análisis biogeográficos cada una de estas se ha codificado con una letra. Con el objetivo de analizar con mayor énfasis la historia evolutiva dentro de la cuenca del Plata, se ha optado por separar las tres regiones diferentes del río Paraná, definiendo de este modo al Alto Paraná, Medio Paraná y Bajo Paraná. Asimismo se han tomado por separado los ríos Uruguay, Paraguay y el Río de la Plata.

Los *outgroups* para cada análisis se han considerado como distribuidos en la cuenca del Amazonas. Según numerosos estudios la diversidad de organismos de agua dulce neotropicales derivan de ancestros originarios de la cuenca del Amazonas (Renno *et al.*, 1990; Hubert & Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007).

2.4.2. Calibración del reloj molecular

El reloj molecular es una técnica para datar la divergencia de dos taxones [véase una revisión sobre el tema en Bromham & D.Penny (2003)]. Deduce el tiempo pasado a partir del número de diferencias entre dos secuencias de ADN. La técnica del reloj molecular es una herramienta importante en la sistemática molecular. El conocimiento de la tasa aproximada de evolución molecular en ciertos grupos de linajes facilita el establecimiento de fechas de eventos filogenéticos no documentados en el registro fósil, como la divergencia de taxones vivos y la formación del árbol filogenético.

En este trabajo, se ha implementado el punto de calibración utilizado en Montoya-Burgos (2003), el cual consiste en el siguiente razonamiento: la filogenia de *Hypostomus* muestra que *H. hondae*, distribuido solamente en el lago Maracaibo y en la cuenca del río Magdalena, es la especie hermana de *H. plecostomoides*, la cual habita solamente la cuenca de río Orinoco y algunas localidades del Alto Amazonas. Dado que estos patrones de distribución concuerdan con el evento de vicariancia que separó el lago Maracaibo del sistema del Amazonas y del Orinoco hace 8 Ma (Lundberg, 1998), es razonable atribuirle esta edad al evento de especiación que ha diferenciado a *H. hondae* y *H. plecostomoides*. Siguiendo esta misma lógica, se han incorporado tres secuencias del género *Ancistrus* dentro de los análisis de tiempos de divergencia. Dos de estas secuencias corresponden a la especie *A. triradiatus*. Esta especie está distribuida tanto en el lago Maracaibo como en la cuenca del Orinoco. Una de las secuencias pertenece a un ejemplar proveniente del lago Maracaibo (Anc42.6) mientras que la otra pertenece a un ejemplar colectado en la cuenca del Orinoco. A la divergencia observada dentro de los dos ejemplares de *A. triradiatus* se le ha asignado la edad de 8 Ma, como en el caso de *H. hondae* y *H. plecostomoides*. Este evento geológico ha sido usado para calibrar varias filogenias de peces neotropicales, dos ejemplos se pueden ver en Lovejoy & Araújo (2000) y en Sivasundar *et al.* (2001).

Según el trabajo de Kennan *et al.* (1997), últimos eventos de captura de cabeceras del Río Gran-

de (Amazonas) por parte del Pilcomayo (cuenca del Plata) datan de 3,5 +/- 0,2 Ma . En nuestros resultados filogenéticos hemos visto que varias especies, linajes o individuos provenientes de cada una de estas cuencas, demuestran una estrecha relación. Por ejemplo, la especie *Hypostomus formosae*, distribuida en el río Paraguay (incluyendo el río Pilcomayo), es la especie hermana de *H. plecostomus*, la cual se encuentra en la región de los ríos de las Guayanas. *Rineloricaria lanceolata*, es una especie que ha mostrado estar presente tanto en la cuenca del Amazonas como en la cuenca del Plata. Dado que estos patrones de distribución concuerdan con el evento de captura de cabeceras, les hemos asignado a estos nodos una divergencia de 3,5 +/- 0,2 Ma. En el caso de los *Hypostomus* esta edad corresponde a un evento de especiación, mientras que en *R. lanceolata* es simplemente una fecha de divergencia intraespecífica.

Los métodos de relojes moleculares relajados para estimar los tiempos de divergencia son utilizados cuando se asume que la tasa de mutación no es constante. Con el fin de verificar que nuestros datos no poseen tasas de mutación constantes, se ha utilizado los test de *log-likelihood ratio* (LRT) (Felsenstein, 1981). Este test consiste en hacer dos corridas de reconstrucciones filogenéticas basadas en máxima verosimilitud con el mismo set de datos. La primera corrida se realiza con un programa de máxima verosimilitud común. La segunda corrida se realiza con un programa que asume que todas las terminales del árbol son equidistantes, en largo de ramas, a la raíz de dicho árbol. Si las topologías de los árboles obtenidas son las mismas, entonces es legítimo comparar los valores de los logaritmos de sus verosimilitudes. Para ello hay que tomar la diferencia de los logaritmos de verosimilitud entre las dos corridas y duplicarla. A este valor hay que mirarlo en una tabla de distribución de chi-cuadrado con $n - 2$ grados de libertad, donde n es el numero de terminales incluidas en los árboles. Si el resultado es significativo, es decir se encuentra un valor de *p-value* menor a 0.05, entonces se rechaza la hipótesis de reloj molecular constante o estricto, en otras palabras, la tasa de mutación en nuestros datos es variable a lo largos de las ramas de la filogenia. Para la realización de este test se ha utilizado las aplicaciones Dnamlk y Dnaml del paquete de programas Phylip (Felsenstein, 1989).

A partir de allí, se ha utilizado un modelo estocástico dentro de una metodología bayesiana para estimar los tasas y las fechas de divergencia de cada uno de los nodos de las filogenias en estudio. Se ha utilizado el programa Beast v1.7.5, el cual estima la filogenia y los tiempos de divergencia simultáneamente, permitiendo modelos complejos de evolución y topologías inciertas

durante la optimización de las fechas (Drummond *et al.*, 2006; Drummond & Rambaut, 2007). El análisis se ha realizado respetando la partición de los datos y los modelos de evolución de cada gen. Se ha implementado la opción *log-normal relaxed clock* con un *prior* de Yule para el patrón de especiación. Dos cadenas independientes de Markov Monte Carlo (mcmc) fueron corridas para generar 20.000.000 de iteraciones de las cuales se han quemado el 25 %. El conjunto de las cadenas y la convergencia de la corrida fueron verificadas en el programa Tracer v.1.7.5. El árbol final fue reconstituido con el programa TreeAnnotator v.1.7.5.

Para el género *Hypostomus*, se infirió el tiempo de divergencia entre los linajes usando los datos de los análisis de cinco genes concatenados. Dos de los puntos de calibración estuvieron dentro del *ingroup* del género y uno en el *outgroup* dado por la de las secuencias de *Ancistrus*. Para los análisis de calibración de los géneros *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*, se han tomado solamente la información que brindan los árboles basados en COI. Para el género *Loricariichthys* los cuatro puntos de calibración se encontraron en el *outgroup* el cual fue constituido por secuencias de *Hypostomus*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*. Para el género *Rineloricaria* se utilizaron cuatro puntos de calibración uno de ellos en el *ingroup* y los tres restantes en el *outgroup* el cual estuvo conformado por secuencias de *Hypostomus* y *Ancistrus*. Para los análisis de *Ancistrus*, se obtuvieron un punto de calibración en el *ingroup* y tres en el *outgroup* el cual estuvo formado por secuencias de *Hypostomus* y *Rineloricaria*.

2.4.3. Reconstrucción de áreas ancestrales

Métodos basados en eventos

Dentro de los métodos utilizados en biogeografía histórica, los métodos basados en eventos postulan modelos de los procesos que han afectado la distribución de los seres vivos. Los diferentes tipos de procesos son identificados y se les asigna valores de costo-beneficio. Los procesos pueden ser: dispersión, extinción, duplicación y vicariancia. A partir de estos métodos, la historia de la distribución de un taxón es inferida sobre la base de la información filogenética y aplicando el criterio de máximo beneficio y mínimo costo sobre todos o solo algunos de esos procesos Crisci *et al.* (2000).

En esta tesis se han utilizado tres métodos basados en eventos:

- Análisis de dispersión-vicariancia (DIVA)

Este método, basado en el principio de parsimonia, optimiza áreas ancestrales en los nodos de las filogenias minimizando el número de dispersiones y extinciones en relación a los eventos vicariantes (Ronquist, 1997). Recientemente Nylander *et al.* (2008) propuso una modificación de DIVA, llamada Bayes-DIVA o S-DIVA (*statistical dispersal-vicariance analysis*) donde se integran las reconstrucciones biogeográficas de DIVA sobre las distribuciones posteriores de una muestra Bayesiana mcmc de topologías de árboles. Esta metodología permite una estimación de las probabilidades marginales de los rangos ancestrales de un dado nodo mientras integra las incertidumbres del resto de la topología del árbol. Nylander *et al.* (2008) ha argumentado que tener en cuenta las incertidumbres de las relaciones filogenéticas puede a veces reducir las incertidumbres en las reconstrucciones biogeográficas por sí mismas.

Por otro lado, DIVA frecuentemente da como resultado varios escenarios biogeográficos igualmente parsimoniosos, no siendo imposible la selección de una de esas posibilidades. S-DIVA, a diferencia de DIVA, permite analizar filogenia con politomías y le asigna valores de probabilidades a cada una de las áreas ancestrales de cada nodo (Nylander *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013).

En este trabajo se corrió el análisis de S-DIVA usando el programa RASP *Reconstruct Ancestral State in Phylogenies* (RASP) 2.1 (beta) (Yu *et al.*, 2013). Un primer análisis se efectuó para cada género en estudio por separado. Luego, se realizó una reconstrucción con la información de todas las filogenias y las distribuciones de las especies con el objetivo de contrastar hipótesis acerca de eventos biogeográficos generales del área de estudio (Ronquist, 1997), éste último análisis se realizó con el programa DIVA 1.1 (Ronquist, 1997).

- Dispersión-Extinción cladogénesis (DEC)

El modelo de DEC fue diseñado por Ree *et al.* (2005) y Ree & Smith (2008). Este modelo incorpora el largo de ramas estimado y la información sobre la historia de las áreas en el análisis, permitiendo dispersiones entre áreas que pueden variar a lo largo del tiempo. Este análisis fue originalmente escrito en lenguaje *python* bajo el nombre de Lagrange. El programa RASP usa el código de C++ de Lagrange dado que es más rápido que la versión *python*.

Este modelo se basa en el principio de máxima verosimilitud. En él se infieren las proba-

bilidades relativas de cada posible rango ancestral y los rangos en competencia según los diferentes escenarios. Los parámetros de máxima verosimilitud son estimados para las tasas de migración entre áreas y extinciones locales dentro de las áreas. DEC tiene la ventaja de tomar una escala temporal de un cronograma para estimar las probabilidades de cambio entre los estados ancestrales de una rama. Dada una topología, el largo de las ramas y las distribuciones actuales de los taxones, este método encuentra los valores de los parámetros biogeográficos que maximizan la probabilidad de los datos observados.

■ **Análisis Bayesiano Binario mcmc (BBM)**

Este método bayesiano para la reconstrucción de estados ancestrales fue recientemente aplicado a estudios biogeográficos (Sanmartín *et al.*, 2008). BBM modela dispersiones entre áreas como un proceso estocástico representado por una cadena de Markov, involucrando la transición entre dos o más estados discretos con diferentes probabilidades. Para correr este análisis se ha utilizado el modelo F81. Este es el modelo más general y complejo implementado en el programa RASP, con propiedades que se espera alcancen el máximo realismo para la reconstrucción de este tipo de problemas.

2.4.4. Análisis de biogeografía comparada

La comparación de patrones biogeográficos de múltiples taxones permite una mejor comprensión de la historia paleogeográfica de una región en particular (Crisci *et al.*, 2000; Morrone, 2009). Con el objetivo de identificar los patrones de diversificación y las fuerzas que han afectado a la comunidad ictiológica en la cuenca del Plata, se ha realizado un análisis biogeográfico comparado utilizando los árboles filogenéticos obtenidos para los cuatro géneros en estudio.

El análisis de Máxima Parsimonia de Brooks (BPA) (Wiley, 1987), es un método que utiliza el concepto de Máxima Parsimonia para obtener cladogramas generales de áreas. Para aplicar BPA, se construye una matriz de datos basada en los cladogramas taxonómicos y en las áreas que ocupan cada taxón. Los pasos a seguir para realizar el BPA son los siguientes:

1. Obtención del cladograma de las especies distribuidas en la zona de estudio.
2. Los nombres de las especies son remplazados por las áreas geográficas que estos ocupan, obteniendo de este modo los cladogramas de áreas.

3. Construcción de una matriz de datos de áreas por componentes.
4. Análisis de Máxima Parsimonia y obtención del o los cladograma/s general/es de áreas.

Para la realización del análisis de Máxima Parsimonia de la matriz, se ha utilizado el programa TNT 1.1 (Gologoff *et al.*, 2008). Se realizó una búsqueda tradicional usando TBR con 100 secuencias al azar adicionadas.

Un aspecto relevante y aparentemente poco explorado de los cladogramas generales de áreas es su poder predictivo. Mediante un cladograma general de áreas es posible predecir: (i) la existencia de especies fósiles, ancestros de las conocidas, con su probable distribución geográfica y datación cronológica; (ii) la existencia de barreras físicas que fragmentaron la biota ancestral distribuida en las áreas estudiadas; (iii) el número mínimo de especies terminales, que se extinguieron o aun no fueron coleccionadas; y (iv) la edad mínima de los diferentes eventos vicariantes (Morrone, 1997).

2.5. Medidas Morfológicas

Para la determinación de las especies y para la descripción de nuevas especies definidas durante este trabajo (exclusivamente para el género *Hypostomus*), se realizaron varias medidas morfológicas y conteos de los ejemplares *voucher*. Para ello se utilizó un calibre de 0.1 mm de precisión. La mayor parte de las medidas tomadas fueron las descritas por Armbruster (2003a). Estas medidas están basadas en los puntos de referencia de la figura 2.1 y definidas en la tabla 2.1. La lista de cada medida tomada se puede ver en la tabla 2.2.

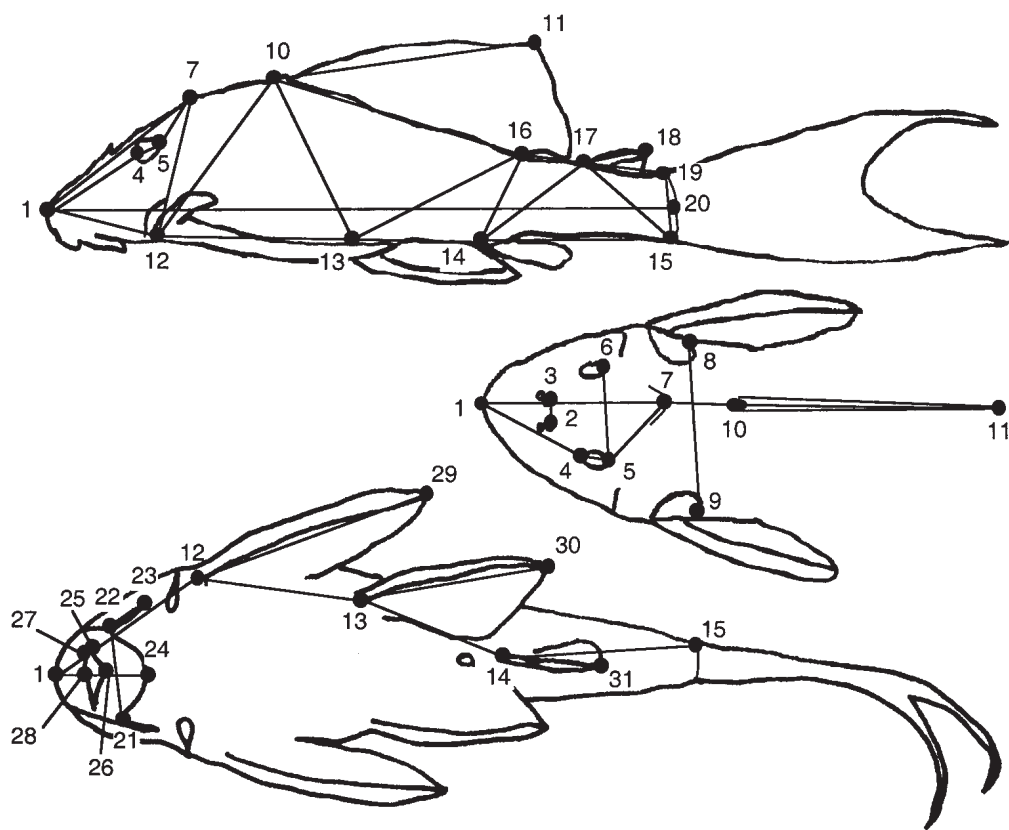


Figura 2.1: Landmarks y distancias de las medidas tomadas para la identificación de las especies. Figura tomada de Armbruster (2003a).

Tabla 2.1: Definición de los puntos de *landmarks* de la Fig. 2.1.

<i>Landmark</i>	Definición
1	Punta del hocico
2	Borde posteromedio de la narina izquierda
3	Borde posteromedio de la narina derecha
4	Borde anterior de la órbita izquierda
5	Borde posterior de la órbita izquierda
6	Borde posterior de la órbita derecha
7	Margen medio-posterior del supraoccipital
8	Margen posterior del cleitro derecho
9	Margen posterior del cleitro izquierdo
10	Margen anterior del espinelet de la aleta dorsal
11	Punta de la espina de la aleta dorsal
12	Inserción de la espina de la aleta pectoral
13	Inserción de la espina de la aleta pélvica
14	Inserción de la espina de la aleta anal
15	Margen posterior de la última placa de la serie de placas ventrales
16	Inserción del último radio de la aleta dorsal
17	Inserción de la espina de la aleta adiposa
18	Punta de la espina de la aleta adiposa
19	Margen posterior de la última placa de la serie de placas dorsales
20	Margen posterior de la última placa de la serie de placas medias
21	Angulo posterior de la barbilla derecha y el labio
22	Angulo posterior de la barbilla izquierda y el labio
23	Punta de la barbilla izquierda
24	Margen posteromedio del labio
25	Margen lateral del dentario
26	Margen medio del dentario
27	Margen lateral del premaxilar
28	Margen medio del premaxilar
29	Punta de la espina de la aleta pectoral
30	Punta de la espina de la aleta pélvica
31	Punta de la espina de la aleta anal

Tabla 2.2: Medidas representadas por dos *landmarks* (véase también la Fig. 2.1).

<i>Landmarks</i>	Medida (mm)
1-20	Largo estándar (SL)
1-10	Largo predorsal
1-7	Largo de la cabeza
7-10	Largo dorsal de la cabeza
8-9	Ancho cleítral
1-12	Cabeza-pectoral
12-13	Largo del tórax
12-29	Largo de la espina pectoral
13-14	Largo abdominal
13-30	Largo de la espina pélvica
14-15	Largo posanal
14-31	Largo de la espina anal
10-12	Distancia dorsal-pectoral
10-11	Largo de la espina dorsal
10-13	Distancia dorsal-pélvica
10-16	Largo de la aleta dorsal
16-17	Distancia aleta dorsal- origen aleta adiposa
17-18	Largo de la espina adiposa
17-19	Distancia desde el origen de la aleta adiposa al origen de la aleta caudal dorsal
15-19	Altura del pedúnculo caudal
15-17	Distancia desde el origen de la aleta adiposa al origen de la aleta caudal ventral
14-17	Distancia de la aleta adiposa a la aleta anal
14-16	Distancia dorsal anal
13-16	Distancia pélvica dorsal
5-7	Distancia entre borde posterior del ojo y borde anterior del supraoccipital
4-5	Diámetro de la órbita
1-4	Largo del hocico
2-3	Ancho internarinas
5-6	Ancho interórbitas
7-12	Altura de la cabeza
1-24	Largo de la boca
21-22	Ancho de la boca
22-23	Largo de la barbilla
25-26	Largo del dentario
27-28	Largo del premaxilar

CAPÍTULO 3

El género *Hypostomus*

Este capítulo se enfoca en estudiar al género *Hypostomus* de la cuenca del Plata. En un primer apartado se evaluará la diversidad de especies o linajes de este género y sus implicancias taxonómicas, detallándose la distribución de las diferentes especies, luego se presentarán seis análisis filogenéticos. Basándose en los resultados más robustos, se ha realizado la calibración de la filogenia, así como también la reconstrucción de las áreas ancestrales de este género.

3.1. Introducción

El género *Hypostomus* pertenece a la subfamilia Hypostominae dentro de los Loricariidos. Esta subfamilia está dividida a su vez en cinco tribus: Hypostomini, Corymbophanini, Pterygoplichthini, Rhineleporini y Ancistrini (Armbruster, 2004). La tribu Hypostomini tiene un único género, *Hypostomus*. Según Armbruster (2004), los *Hypostomus* no se caracterizan por un único carácter morfológico, sino por un complejo conjunto de características.

Los representantes de este género son peces de fondo, ampliamente distribuidos en toda Sudamérica tropical y subtropical. Ocupan una variedad de ecosistemas de agua dulce que pueden ser desde pequeños arroyos de montaña hasta grandes lagos, lagunas o ríos con grandes corrientes. *Hypostomus* constituye un género muy diverso, con aproximadamente 130 especies reconocidas



Figura 3.1: Cuatro especies diferentes del género *Hypostomus* de la cuenca del Plata. Arriba: *H. luteomaculatus* y *H. ternetzi*, fotos tomadas por F. Vargas. Abajo: *H. myersi* y *H. derby*.

(Weber, 2003). Sin embargo, la delimitación de las especies de este género resulta muchas veces laboriosa. Esto se debe a que las especies presentan una alta variabilidad morfológica intraespecífica, y muchas de las descripciones originales realizadas para el género durante el siglo pasado son muy escuetas o incompletas.

Montoya-Burgos *et al.* (2002) presentaron por primera vez la filogenia molecular de *Hypostomus* mostrando que se trataba de un género polifilético, dado que incluía al género *Cochliodon* y que algunas especies asignadas a *Hypostomus* quedaban fuera del clado principal de este género. Por lo tanto, estos autores consideraron a *Cochliodon* como sinónimo junior de *Hypostomus*. Posteriormente, otros géneros como *Cheiridodus*, *Plecostomus* y *Watawata* fueron puestos en sinonimia dentro de *Hypostomus* por Armbruster (2004). Posteriormente, algunos trabajos basados en datos moleculares fueron realizados para *Hypostomus* (Carvalho, 2006; JacotdesCombes, 2012), sin embargo estos se han enfocado en representantes del género del escudo de las Guayanas en el noreste del continente.

Numerosas especies de *Hypostomus* habitan en la cuenca del Plata (cuatro de ellas pueden verse en la Fig. 3.1). Según la recopilación bibliográfica realizada por Liotta (2005) al menos unas 25 especies estarían presentes dentro del territorio argentino. Pero si consideramos la totalidad

de esta cuenca el número de especies se eleva aproximadamente a 50 según el *Catalog of Fishes* (www.research.calacademy.org). De este modo, queda demostrado no sólo que el género *Hypostomus* es muy diverso en especies, sino también que la cuenca del Plata alberga a casi la mitad de la diversidad descrita para este grupo.

3.2. Resultados

3.2.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Hypostomus* en la cuenca del Plata

La Fig. 3.2 muestra las localidades en donde se ha logrado coleccionar tejidos y/o ejemplares del género *Hypostomus* a partir de muestreos y colaboraciones con otras instituciones e investigadores. En total se han obtenido más de 250 tejidos de este género que se encuentran depositados en el Laboratorio de Ecología Molecular del Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG), en el MACN; en el ILPLA; en el Muséum d'Histoire Naturelle de la Ville de Genève (MHNG) o en el Museu de Ciências e Tecnologia (PUCRS). En el apéndice A se observan la determinación taxonómica, la localidad de cada tejido y/o ejemplar, el acceso de *Genbank* (si hay secuencias publicadas) y la colección en la que se encuentra depositado el material *voucher* de los ejemplares utilizados en los siguientes análisis moleculares.

La diversidad dentro del género *Hypostomus* fue evaluada mediante dos técnicas diferentes. La primera de ellas fue la determinación morfológica clásica de medidas y conteos (ver más detalles en la sección 2.5) basándose en las claves de determinación publicadas hasta el momento. La mayor parte de los individuos capturados fueron determinados por especialistas sistemáticos, sin embargo, para algunos de los ejemplares no fue posible llegar a una determinación específica. Además, otros no coincidieron en la determinación morfológica con la posición en el árbol filogenético. Por ello, fue necesario implementar como herramienta de caracterización de especies o linajes al marcador mitocondrial D-loop.

Cada especie o linaje fue definida como un grupo monofilético que represente una identidad genética particular, y en lo posible, acompañada de aspectos morfológicos que puedan caracterizarlo. Según nuestros resultados moleculares basados en un árbol de D-loop (véase las Figs. 3.4, 3.5 y 3.6) se ha obtenido material de al menos 61 especies o linajes diferentes de *Hypostomus*, de



Figura 3.2: Mapa de Sudamérica mostrando los puntos de muestreo para el género *Hypostomus* A: Detalles de las localidades del norte de Sudamérica. B: Detalle de las localidades de muestreo en el sur del continente. La mayor parte de los puntos están ubicados según los datos geo-referenciados registrados durante las campañas de muestreo. Para la realización del mapa se utilizó el programa Google Earth.

las cuales 31 de ellas habitan la cuenca del Plata (véase la Tab. 3.1 y la Fig. 5.3). Este resultado fue obtenido gracias a la secuenciación de al menos un ejemplar por localidad y por morfotipo. En los análisis basados en D-loop se han incorporado todo el material a disposición para el género, contando con especies de la cuenca del Amazonas, Orinoco, de los ríos del escudo de las Guayanas, de los ríos de la costa norte y de la costa sur de Brasil. Esto permitió tener una mayor cantidad de especies para la comparación de la diversidad de la cuenca del Plata y una mejor evaluación de los límites entre las especies o linajes. Para la sección argentina de esta cuenca nuestros resultados muestran que al menos unas 17 especies están presentes en ella. Dos de estas especies fueron descritas por primera vez en el curso de esta tesis: *Hypostomus arecuta* (Cardoso *et al.*, 2012) e *Hypostomus formosae* (Cardoso *et al.*, 2013a). Estos dos trabajos publicados están basados tanto en los resultados moleculares de D-loop como en los análisis morfológicos clásicos de la descripción de especies de este género.

Cabe destacar que de las 61 especies o linajes definidas, se encontraron que 28 representan entidades independientes desde el punto de vista molecular, pero no han sido aún descritas como especies. Por lo tanto, se ha decidido llamarlas linajes hasta su formal descripción. En el territorio argentino, se ha encontrado dos linajes que corresponderían a nuevas especies a describir: *Hypostomus cf. commersoni* y *H. sp. AG09-207*. En el primer caso, estamos realizando los análisis morfológicos necesarios para presentar oportunamente la descripción correspondiente. En el segundo caso, solamente se ha logrado obtener dos ejemplares de este linaje, por consecuencia, hasta no obtener un mayor número de individuos no será posible trabajar esta potencial nueva especie.

En la Tab. 3.1 se muestra la lista de cada especie o linaje definido a partir de los resultados del análisis basado en D-loop y se detalla la distribución geográfica de cada uno de ellos. En esta tabla, además, se enfatizan las especies presentes en la cuenca del Plata y los ríos que son parte de ella. Como puede observarse, dentro de la cuenca del Plata, el río Paraná es la cuenca que presenta la mayor cantidad de especies con , al menos, 19 especies. Claro está, que este resultado hay que tomarlo con precaución, dado que este río ha sido muestreado con más énfasis durante este trabajo de tesis y además es el río que abarca mayor territorio, contemplando de este modo una diversidad de ambientes y ecosistemas mayor a la de otros ríos.

En un análisis general de la información biogeográfica de las especies, podemos afirmar que las especies con mayor distribución son: *H. aspilogaster*, la cual se encuentra en la cuenca del río

[illegible]

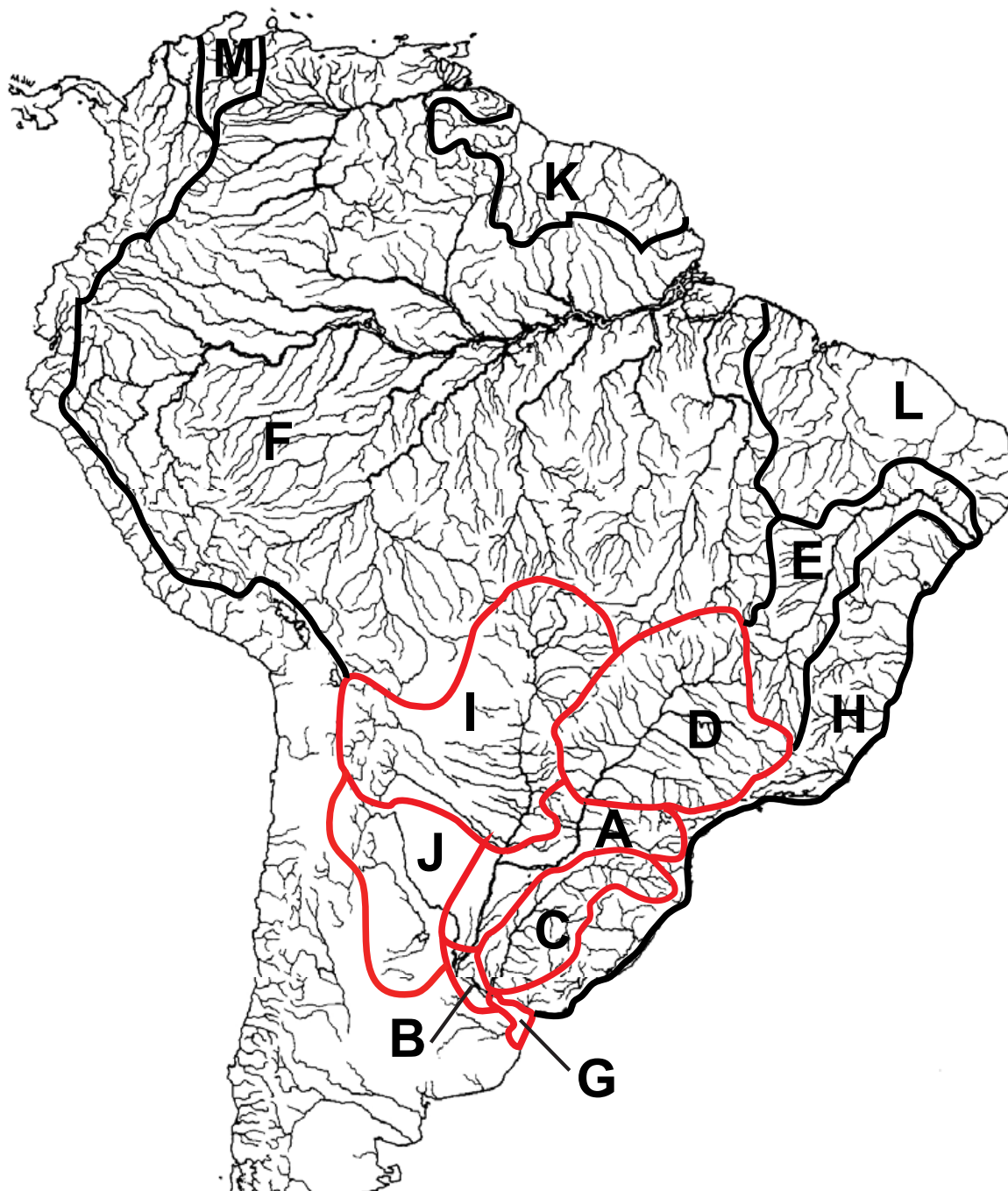


Figura 3.3: Mapa con las áreas en donde se han encontrado ejemplares del género *Hypostomus*. Estas áreas fueron las utilizadas en los análisis biogeográficos del género. Las líneas rojas muestran las áreas que corresponden a la cuenca del Plata. Cada área fue codificada con una letra: A=Paraná Medio; B=Paraná Bajo; C=Uruguay; D=Paraná Alto; E=São Francisco; F=Amazonas; G=Río de la Plata; H=ríos costeros del sur; I=Paraguay; J=ríos endorreicos, Salado del norte y Carcarañá; K=ríos del escudo de las Guayanas; L=ríos costeros del norte y M=Lago Maracaibo y río Magdalena.

3.2.2. Análisis filogenéticos del género *Hypostomus*

Análisis basado en D-loop

El alineamiento final del marcador mitocondrial D-loop para el género *Hypostomus* comprendió 185 secuencias de las cuales nueve representan el *outgroup*. Para este análisis, se han utilizado varias secuencias ya publicadas en otros trabajos y disponibles en el *Genbank* (Montoya-Burgos *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003), el resto, se amplificaron en el laboratorio, logrando obtener aproximadamente 550 bp. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es TN más la distribución gamma.

- Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

El árbol MV obtenido en el programa TreeFinder se muestra en la Fig. 3.4. Sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -4357.427$; $\alpha = 0.225$; $\pi(T) = 0.28$; $\pi(C) = 0.26$; $\pi(A) = 0.27$; $\pi(G) = 0.17$.

El primer resultado observable de este análisis, es que todas las especies de *Hypostomus* forman un clado monofilético, llamado D (véase la Fig. 3.4) sustentado por 60 %BB. Este Clado D, se divide en cuatro grupos D1; D2; D3 y D4. En este análisis de MV, el clado D4 aparece como el grupo basal dentro del gran clado D. Los clados D1; D2 y D3 junto a la especie *H. gymnorhynchus* forman el clado llamado Da. Dentro de Da el clado D2 y D3 se agrupan para formar el clado Db, estos últimos agrupamientos no están sustentados por valores mayores de 50 %BB.

El clado D1 (60 %BB) está compuesto por los representantes del grupo de especies "*Hypostomus cochliodon*", incluyendo en este análisis al linaje *H. sp.* 1134 en la base. D1 se divide en dos grupos, D1a y D1b. D1a esta compuesto por *H. sp.* PE08-441; *H. plecostomoides* y *H. hondae*. Estas dos últimas especies aparecen como especies hermanas (91 %BB). El clado D1b (98 %BB) tiene en la base al linaje *H. sp.* PE08-700, luego se separan la especie *H. fonchii*. A continuación, se separa el linaje *H. sp.* GY04-171. Finalmente, el clado D1b se divide en dos subclados. El primero esta compuesto por *H. cochliodon* y *H. sp.* GY04-333, mientras que el segundo comprende a *H. sp.* PE08-269 y dos representantes de *H. ericae*.

El clado D2 (51 %BB) esta subdividido en dos grupos monofiléticos, D2a y D2b. El primero de ellos esta formado por una tricotomía de grado tres compuesta por: (i) la especie *H. paranensis*; (ii) las especies *H. punctatus* y *H. boulengeri* y (iii) D2a1. Este último grupo D2a1 está dividido, a su vez en dos sub-grupos. El primero, compuesto por la especie *H. commersoni* y el segundo compuesto por *H. cf. commersoni*; *H. affinis*; *H. interruptus* y *H. ancistroides*. Por otro lado, el clado D2b se compone de *H. derbyi* en la base, luego se separan, formando una politomía, los representantes del linaje *H. sp.* BR1204/11/17, el linaje llamado *H. sp.* Tib 13 y el clado D2b1. Este último clado esta formado por la especie *H. watwata*, seguido el linaje *H. sp.* PE08-221 y del clado D2b2, el cual se divide en dos grupos: uno lo representa la especie *H. formosae*, y el otro grupo está compuesto por los linajes *H. sp.* PdeR36/49; *H. sp.* BR98-219; *H. sp.* BR98-177; *H. sp.* BR98-270 y por la especie *H. plecostomus*.

El clado D3 (61 %BB) se divide en dos grupos, D3a y D3b. D3a (52 %BB) incluye a la especie *H. asperatus* y a dos linajes, *H. sp.* BR906 y *H. sp.* BR1026. El otro grupo D3b contiene una tricotomía con: (i) la especie *H. microstomus*; (ii) los linajes *H. sp.* BR98-678 y *H. sp.* BR98-691 y (iii) el clado D3b1. Este clado también presenta una politomía, esta vez, de grado cuatro con: (i) el linaje *H. sp.* BR98-699; (ii) el linaje *H. sp.* BR98-716/732; (iii) un clado formado por los linajes *H. sp.* AG09-207; *H. sp.* BR98-738; *H. sp.* BR98-748 y *H. sp.* BR98-751 y (iv) un último clado formado por un lado por las especies *H. nigromaculatus* y *H. regani* y por otro lado las especies *H. luteomaculatus* y *H. myersi*.

Finalmente, el clado D4 presenta en la base al linaje *H. sp.* Tib1 junto a *H. johnii*. El resto del clado presenta una politomía con: (i) las especies *H. latirostris*, *H. luetkeni* y *H. albopunctatus*; (ii) *H. ternetzi* y *H. arecuta* y (iii) un clado llamado D4a (67 %BB) donde *H. latifrons* está en la base, luego se separa *H. uruguayensis*, el resto de las especies presentan una politomía con: (i) *H. aspilogaster* y *H. luteus*; (ii) *H. isbrueckeri* y (iii) *H. laplatae*.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol basado en D-loop reconstruido por IB para el género *Hypostomus* se observa en la Fig. 3.5. Cerca de cada una de las ramas del árbol, se indican los valores de probabilidades posteriores (PP) de cada una de ellas. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado

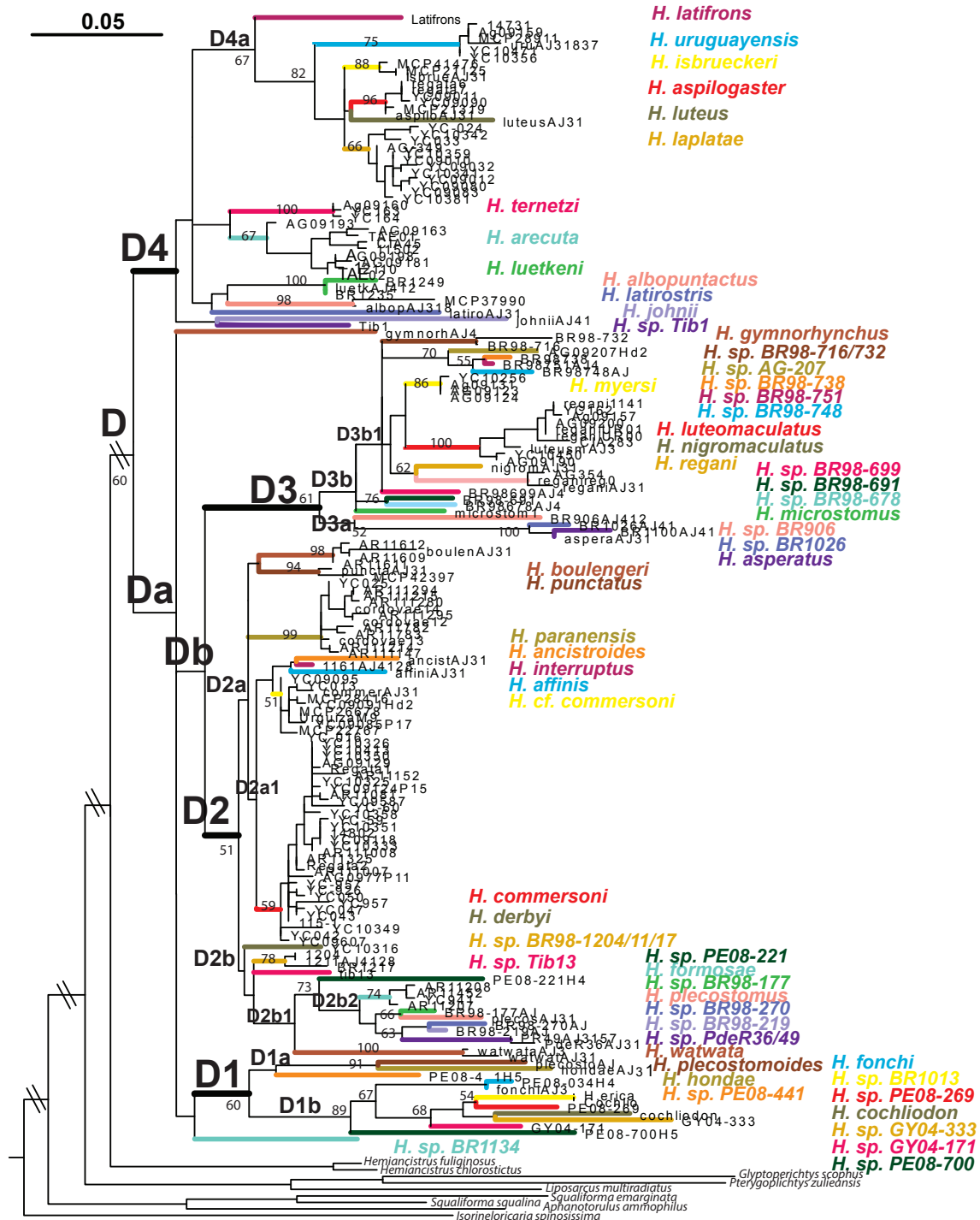


Figura 3.4: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en el marcador mitocondrial D-loop. Los valores cerca de los nodos son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

(0.95 PP). Del mismo modo que en el árbol MV, vemos que este clado también se divide en cuatro grupos. La primera diferencia entre los árboles MV y IB es la relación entre los grupos D1, D2, D3 y D4; dado que en este resultado de IB los clados D1 y D2 junto a la especie *H. gymnorhynchus* y al linaje *H. sp. BR1134* forman un grupo llamado Da (0.63 PP) que no se corresponde con el grupo Da definido por MV.

Dentro del clado D1 (1 PP) la mayor diferencia del árbol IB con el de MV esta en el subclado D1b. En el nuevo árbol se puede ver que este subclado presenta una politomía entre: (i) *H. sp. PE08-269* y dos representantes de *H. ericae*; (ii) *H. cochliodon* y (iii) *H. sp. GY04-333* con *H. sp. PE08-700*.

El clado D2 (0.93 PP) según IB se puede dividir en dos grupos, D2a (0.9 PP) y D2b (0.84 PP), estos grupos no son idénticos a los definidos anteriormente en el árbol MV, presentando las siguientes diferencias: D2a está compuesto por una gran politomía de grado ocho, en ella se encuentran especies tales como: *H. commersoni*, *H. cf. commersoni*, *H. affinis*, *H. ancistroides*, *H. puntactus*, *H. boulengeri*, *H. paranensis*, *H. derbyi*, *H. interruptus*, *H. sp. BR1204/11/17* y *H. sp. Tib 13*. Las únicas relaciones interespecíficas resueltas son las que agrupan a *H. affinis*; *H. ancistroides*; *H. puntactus*; *H. interruptus* y *H. sp. Tib 13* (0.66 PP). El subclado D2b del árbol IB se corresponde al subclado D2b1 del árbol MV. Dentro de él la única diferencia es que aquí se observa una relación estrecha entre *H. formosae* y *H. plecostomus* por un lado, *H. sp. PdeR36/49*; *H. sp. BR98-219* y *H. sp. BR98-270* por otro lado y *H. sp. BR98-177*.

El clado D3 (1 PP) se divide en dos grupos, D3a (0.95 PP) y D3b (0.53 PP), de manera idéntica al árbol MV. Aquí las diferencias se encuentran dentro del subclado D3a donde en lugar de una politomía observamos que la especie *H. microstomus* está en la base. Luego se separan los linajes *H. sp. BR98-678* y *H. sp. BR98-691* del resto del grupo llamado D3a1 (0.91 PP). En este análisis el clado D3a1 está constituido de la misma manera que en el árbol MV, salvo que aquí la politomía de grado cuatro es entre: (i) los linajes *H. sp. AG09-207*, *H. sp. BR98-738*, *H. sp. BR98-748* y *H. sp. BR98-751*; (ii) las especies *H. nigromaculatus* y *H. regani*; (iii) las especies *H. luteomaculatus* y *H. myersi* con el linaje *H. sp. BR98-699* y (iv) el linaje *H. sp. BR98-716/732*.

El clado D4 (0.9 PP) en este análisis IB presenta una politomía de grado cinco con: (i) *H. johnii* y *H. albopunctatus*; (ii) *H. luetkeni* y el linaje *H. sp.* BR1249; (iii) *H. ternetzi*; *H. arecuta* y el linaje *H. sp.* Tib1; (iv) la especie *H. latirostris* y (v) un clado llamado D4a (0.93 PP). En este análisis IB las relaciones dentro de D4a son las siguientes: *H. latirostris* está en la base, luego se separa la especie *H. uruguayensis* y aparece una nueva politomía con *H. aspilogaster*, *H. luteus*, *H. isbrueckeri* y *H. laplatae*.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.6, debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN).

El árbol basado en el marcador mitocondrial D-loop reconstruido a partir de este análisis de MP muestra, del mismo modo que los análisis MV y IB, que el género *Hypostomus* es un grupo monofilético, llamado clado D (76 JN). Del mismo modo que en los árboles anteriores, vemos que este clado también se divide en cuatro grupos. En este análisis el clado D3 aparece como basal al género, luego se destaca un clado (10 JN) que agrupa al clado D4 con los clados D1 y D2 junto a la especie *H. gymnorhynchus* y al linaje *H. sp.* BR1134.

El clado D1 (40 JN) corresponde exactamente a las mismas especies de los clados D1 definidos anteriormente. Dentro de este clado, en primer lugar, se separan las especies *H. plecostomoides* y *H. hondae* (80 JN), luego el linaje PE008-441 y finalmente vemos al clado D1b (94 JN).

El clado D2 (8 JN) según MP, se puede dividir en tres grupos: (i) el clado D2a (87 JN); (ii) un clado formado por el linaje *H. sp.* BR1134 y *H. watwata* y otro clado (iii) con *H. sp.* BR98-177, *H. sp.* BR98-270, *H. sp.* BR98-219, *H. sp.* PdeR36/49, *H. plecostomus* y *H. formosae*. Estos dos últimos clados serían los que componen al clado D2b en los análisis anteriores. Nótese aquí la relación estrecha entre *H. formosae* y *H. plecostomus* (51 JN).

El clado D3 (62 JN) se ve dividido en dos grupos también en este análisis. El clado D3a (30 JN) y el clado D3b (64 JN) se corresponde a los definidos con el mismo nombre en los análisis de MV e IB.

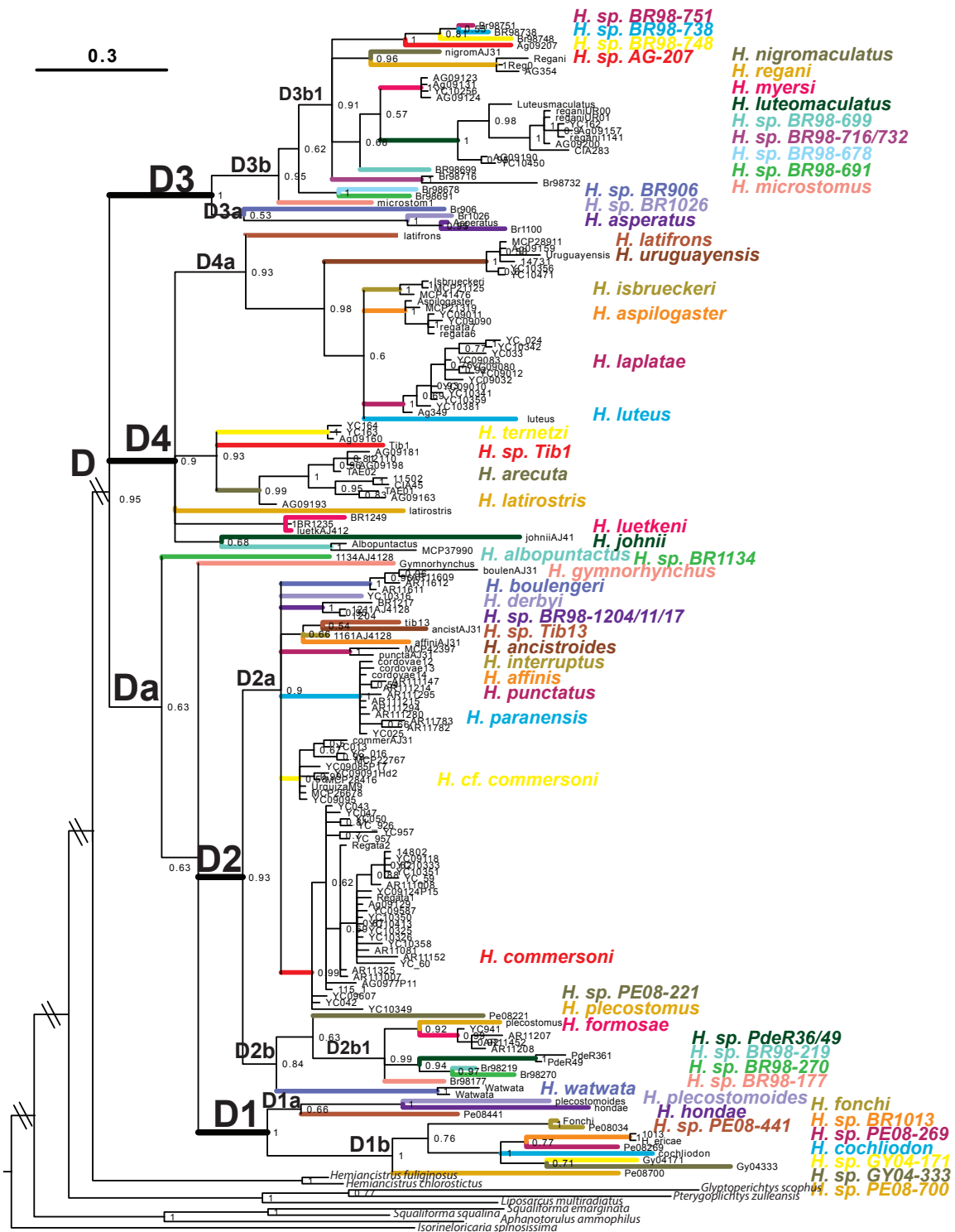


Figura 3.5: Árbol Inferencia Bayesiana para el género *Hypostomus* basado en el marcador mitocondrial D-loop. Los valores cerca de los nodos son las probabilidades posteriores.

El clado D4 (31 JN) en el árbol MP presenta una politomía de grado cinco con : (i) la especie *H. albopuntactus*; (ii) un clado con *H. latirostris*; *H. jonhii* y el linaje *H. sp. Tib 1*; (iii) la especie *H. luetkeni*; (iv) un clado que reúne *H. ternetzi* y *H. arecuta*; y por último (v) un gran clado con *H. latifrons*, *H. uruguayensis*, *H. luteus*, *H. isbrueckeri*, *H. aspilogaster* y *H. laplatae*.

Análisis basado en COI

Con el objetivo de verificar la diversidad de especies del género *Hypostomus* y sus relaciones filogenéticas, para este análisis se ha seleccionado un subgrupo de las muestras analizadas con el marcador D-loop para ser amplificadas. El alineamiento final del gen mitocondrial COI para este género comprendió 90 secuencias de las cuales cinco representan el *outgroup*. Se ha logrado obtener aproximadamente 850 bp para cada muestra. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es TN más la distribución gamma.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

El árbol MV obtenido en el programa TreeFinder se muestra en la Fig. 3.7. Por debajo de cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50% obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -4370.764$; $\alpha = 0.184$; $\pi(T) = 0,32$; $\pi(C) = 0,23$; $\pi(A) = 0,27$; $\pi(G) = 0,16$.

En este análisis, observamos que todas las especies de *Hypostomus* forman un clado monofilético, llamado D (véase la Fig. 3.4) sustentado por 85 %BB. Este Clado D, se divide en cuatro grupos D1; D2; D3 y D4, al igual que en los análisis realizados con D-loop. En este resultado basado en MV, los clados D4 y D3 se agrupan (54 %BB) por un lado, mientras que los clados D1 y D2 conforman otro sub-grupo (91 %BB). El linaje llamado *H. sp. BR1134* queda excluido de dichos agrupamientos.

El clado D1 (90 %BB) está compuesto por los representantes del grupo de especies "*Hypostomus cochliodon*". D1 se divide en dos grupos, por un lado se ve a las especies *H. plecostomoides* y *H. hondae* (90 %BB) y por otro lado el resto de las especies del clado incluyendo *H. sp. PE08-441*; *H. sp. GY04-173*; *H. sp. PE08-700*; *H. cochliodon*; *H. sp. GY04-333*; *H. fonchii*; *H. sp. PE08-269* y *H. sp. BR1013*.

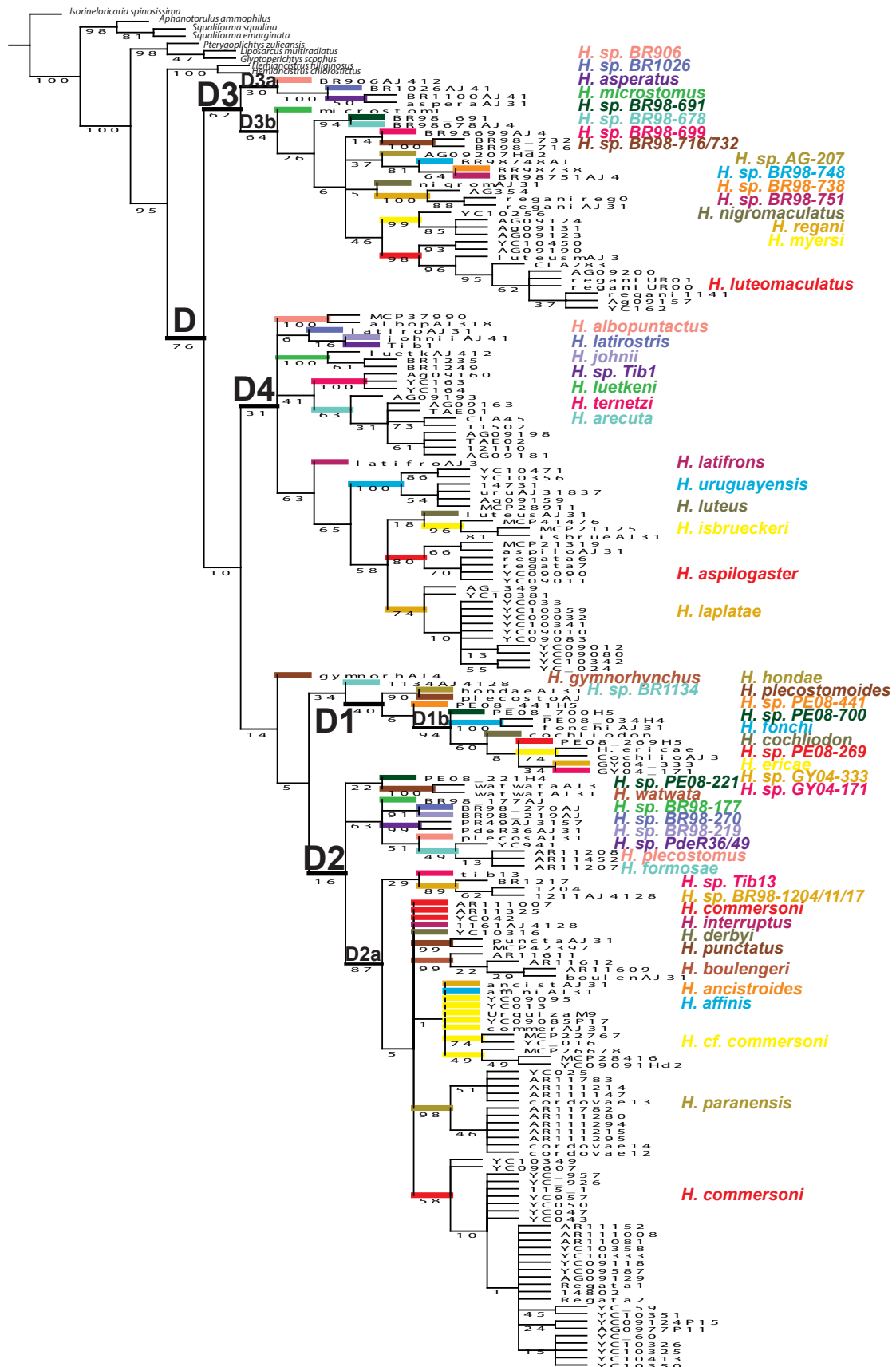


Figura 3.6: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Hypostomus* basado en el marcador mitocondrial D-loop. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

El clado D2 (62 %BB) esta subdividido en dos grupos monofiléticos, D2a y D2b. El primero de ellos, D2a (98 %BB) esta formado por una gran politomía donde no se resuelve las relaciones entre las especies, además vemos que el linaje *H. cf. commersoni* aparece como un grupo polifilético. Por otro lado, el clado D2b se compone por la especie *H. watwata* y el linaje *H. sp.* PE08-221 que se separan primero y luego los siguientes linajes: *H. sp.* BR98-219; *H. sp.* PdeR36/49; *H. sp.* BR98-177; y las especies *H. plecostomus* y *H. formosae* que se presentan como especies hermanas (84 %BB).

El clado D3 (51 %BB) se divide en dos grupos, D3a y D3b. D3a (100 %BB) incluye a la especie *H. asperatus* y al linaje *H. sp.* BR1026. El otro grupo D3b contiene una politomía de grado cuatro con: (i) el linaje *H. sp.* BR98-678; (ii) los linajes *H. sp.* AG09-207 y *H. sp.* BR98-751; (iii) la especie *H. microstomus* y (iv) un clado que contiene a las siguientes especies: *H. nigromaculatus* y *H. regani*; *H. luteomaculatus* y *H. myersi*. Estas últimas no presentan resolución de sus relaciones con más de 50 %BB.

Finalmente, el clado D4 (95 %BB) presenta en la base a la especie *H. latirostris* y luego una politomía de grado cuatro: (i) *H. albopunctatus*; (ii) un clado compuesto por *H. ternetzi* y *H. arecuta*; (iii) *H. uruguayensis* y (iv) un clado que contiene a *H. latifrons* y una politomía con *H. aspilogaster*; *H. luteus*; *H. isbrueckeri* y *H. laplatae*. Como se puede observar la especie *H. laplatae* no se presenta como un grupo monofilético sustentado por más de 50 %BB.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol reconstruido por IB para el gen mitocondrial COI se muestra en la Fig. 3.8. Cerca de cada uno de los nodos se presentan los valores de probabilidades posteriores (PP) para cada rama del árbol. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado (1 PP). Del mismo modo que en el árbol MV, vemos que este clado también se divide en cuatro grupos, donde al igual que en los resultados MV, los clados D4 y D3 se agrupan (0.62 PP) por un lado, mientras que los clados D1y D2 conforman otro sub-grupo (1 PP). Del mismo modo que en el análisis MV. El linaje llamado *H. sp.* BR1134 queda excluido de dichos agrupamientos.

El clado D1 (1 PP) está compuesto por los representantes del grupo de especies *Hypostomus cochliodon* y se presenta siguiendo los mismos agrupamientos del análisis MV con valores

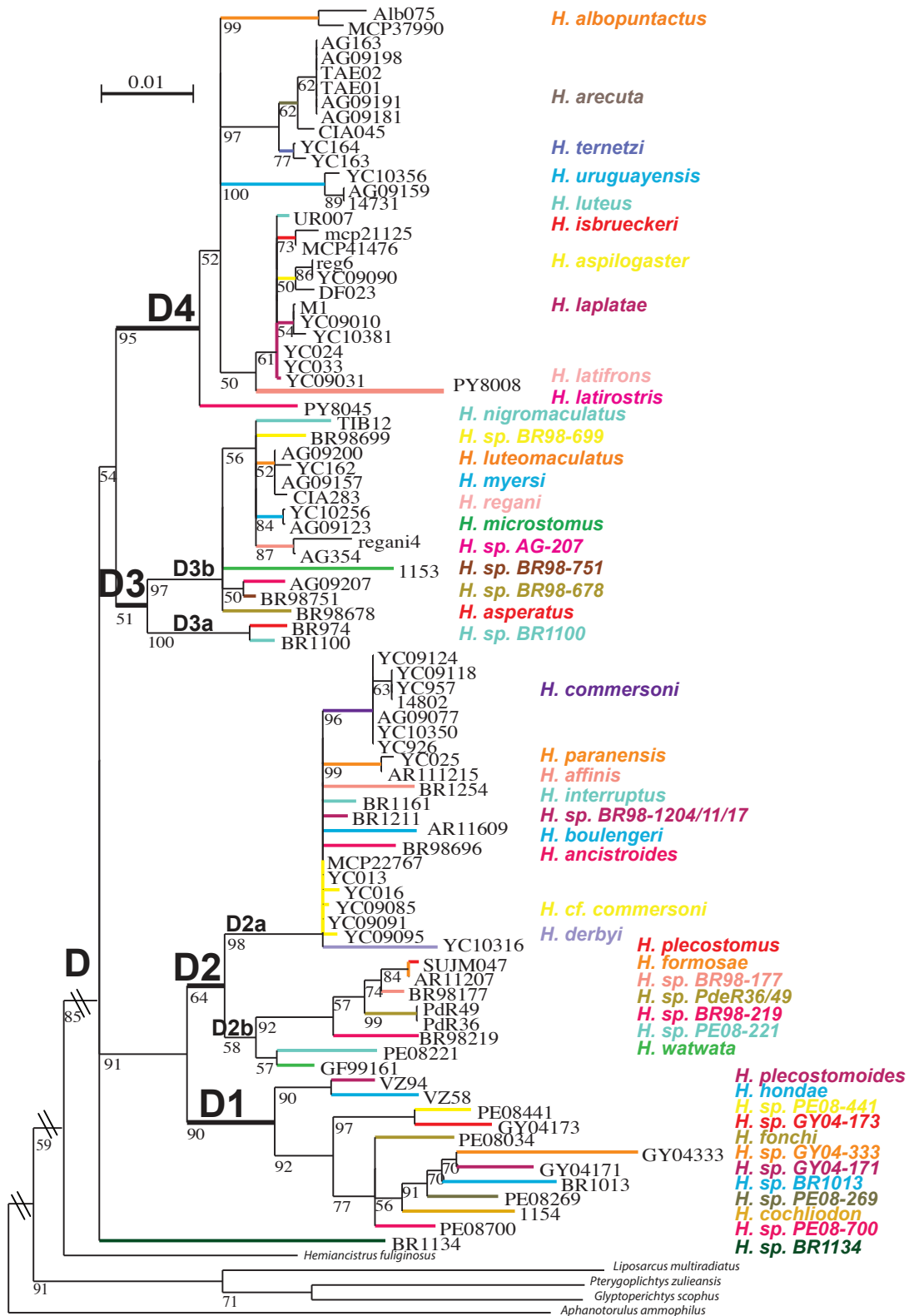


Figura 3.7: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

elevados de PP.

El clado D2 (0.75 PP) esta también subdividido en dos grupos monofiléticos, D2a y D2b. El clado D2a (1 PP) presenta una gran politomía entre las especies, pero en este resultado, contrariamente al análisis MV, el linaje *H. cf. commersoni* aparece como un grupo monofilético bien soportado (0.87 PP). El clado D2b (0.76 PP) es idéntico al presentado por MV.

El clado D3 (0.63 PP) está también subdividido en dos grupos monofiléticos, D3a y D3b. El clado D3a incluye a la especie *H. asperatus* y al linaje *H. sp.* BR1026. El otro grupo D3b (1 PP) tiene una politomía de grado tres: (i) un clado formado por los linajes *H. sp.* AG09-207 y *H. sp.* BR98-751; (ii) la especie *H. microstomus* y un clado que contiene en la base al linaje *H. sp.* BR98-678 y luego una gran politomía con las siguientes especies: *H. nigromaculatus* y *H. regani*; *H. luteomaculatus* y *H. myersi*.

El clado D4 (1 PP) en el análisis IB se presenta exactamente como en el análisis MV.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto a partir del cual se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.9 debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN). En los resultados aportados por MP vemos que nuevamente, todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado (88 JN). Del mismo modo que en el árbol MV e IB, vemos que este clado también se divide en cuatro grupos, donde al igual que en los resultados precedentes, los clados D4 y D3 se agrupan (40 JN) por un lado, mientras que los clados D1 y D2 conforman otro sub-grupo (85 JN). Del mismo modo que en el análisis MV, El linaje llamado *H. sp.* BR1134 queda excluido de dichos agrupamientos.

El clado D1 (89 JN) está representado por las mismas especies que en los análisis MV e IB. La única diferencia en este análisis basado en MP, es que la mayor parte de las relaciones entre especies y linajes no están resueltas.

En este análisis no se ha podido recuperar al clado D2 como un grupo monofilético bien soportado. Sin embargo, se ha encontrado al subclado D2a (97 JN), con una gran politomía. El subclado D2b definido anteriormente queda, aquí, dividido en tres con: (i) la especie *H.*

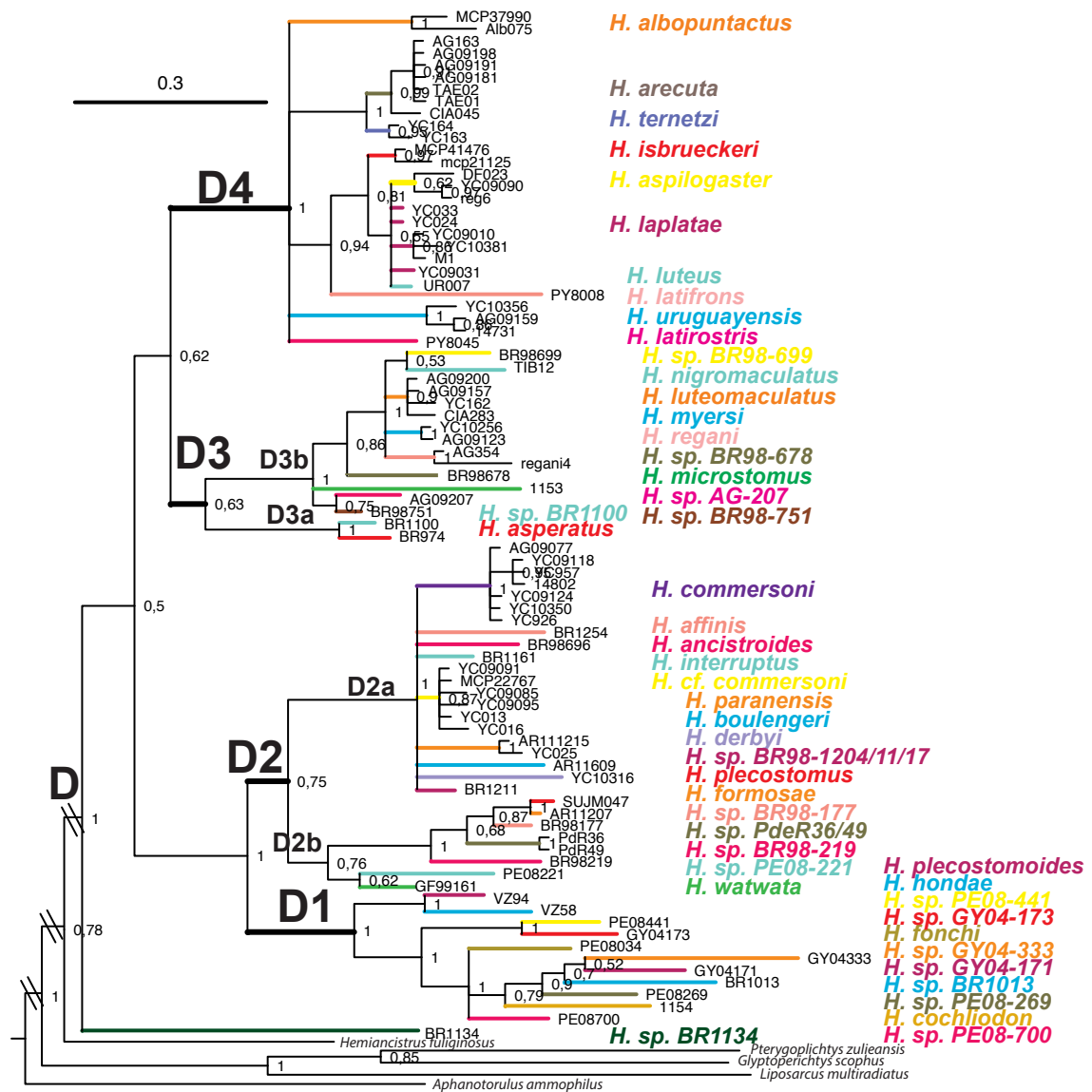


Figura 3.8: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Hypostomus* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores cerca de los nodos son las probabilidades posteriores.

watwata; (ii) el linaje *H. sp.* PE08-221 y (iii) el resto de las especies propias de este subclado. Nuevamente las especies *H. plecostomus* y *H. formosae* aparecen como especies hermanas.

El clado D3 (29 JN) en el análisis de MP se presenta exactamente como en el análisis IB, encontrando nuevamente a los subclases D3a (100 JN) y D3b (94 JN).

El clado D4 (96 JN) reconstruido por MP se observa exactamente como en el análisis MV. Aquí, nuevamente, la especie *H. laplatae* no aparece como un grupo monofilético.

Análisis basado en CDC27

El alineamiento final del gen nuclear CDC27 para el género *Hypostomus* comprendió 55 secuencias de las cuales cuatro representan el *outgroup*. Para este análisis se ha decidido seleccionar un grupos de especies y linajes definidos a partir del marcador D-loop con el objetivo de reconstruir las relaciones interespecíficas de cada clado del género. Se amplificaron en el laboratorio un total de 1070 bp del gen CDC27. Cabe destacar, que dos ejemplares (AG198 y PE08-700) utilizados fueron heterocigotas para este gen, es decir se encontraron dos alelos diferentes del mismo gen en cada individuo. Es por ello que en los árboles se verán dos secuencias diferentes para estos individuos. Por otro lado, no se ha podido amplificar correctamente a la especie *Aphanotorulus ammophilus* utilizada como *outgroup* en el resto de los análisis de *Hypostomus*, por esta razón es que la especie *Liposarcus multiradiatus* fue elegida para enraizar las árboles.

Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es TVM más la distribución gamma.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

El árbol MV obtenido en el programa TreeFinder se muestra en la Fig. 3.10. Por debajo de cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50% obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -7457,143$; $\alpha = 0,738$; $\pi(T) = 0,32$; $\pi(C) = 0,17$; $\pi(A) = 0,30$; $\pi(G) = 0,20$.

En este análisis podemos ver que el género *Hypostomus* forma un clado monofilético, sin embargo, este clado llamado D no presenta valores de BB superiores al 50%. Como puede verse en la Fig. 3.10, aquí, no se han encontrado los mismos cuatro grupos para *Hypostomus* que

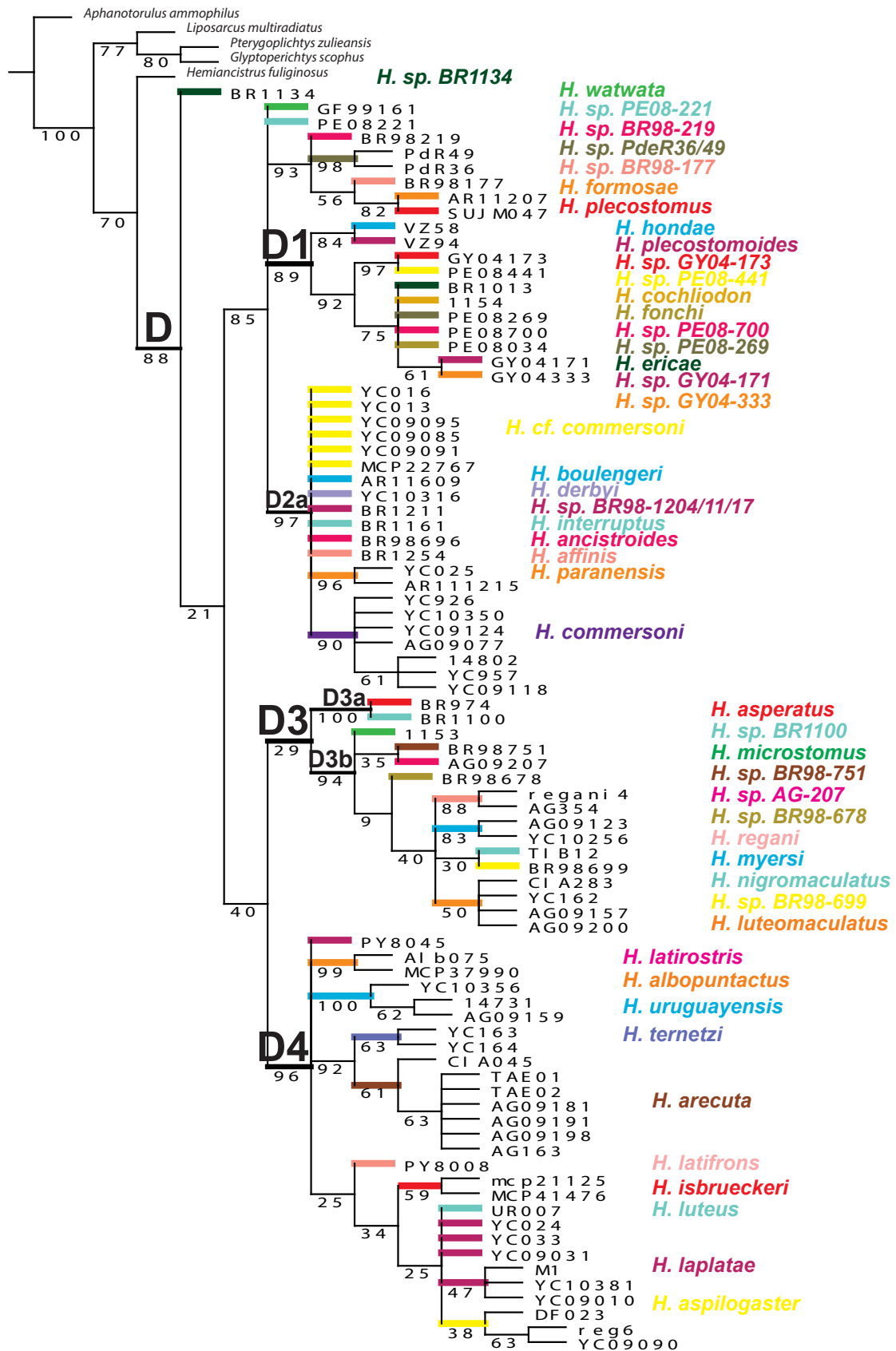


Figura 3.9: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Hypostomus* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

se han definido con los resultados basados en COI y D-loop. No obstante, podemos redefinir grupos que tienen ciertas similitudes con los grupos anteriores.

El clado D1', se corresponde con el clado D1 de los análisis precedentes, diferenciándose en que este nuevo grupo no comprende a la especie *H. ericae*. También, podemos ver que este clado no presenta valores superiores al 50% de BB, las únicas relaciones bien sustentadas de este grupo se ven en: (i) las especies *H. hondae* y *H. plecostomoides* (74%BB); (ii) en la relación de éstas con el linaje *H. sp.* GY04-333 (74%BB) y (iii) en la relación *H. fonchi* y *H. sp.* PE08-700 haplotipo 1. Por otra parte, vemos también que los dos haplotipos encontrados para el linaje *H. sp.* PE08-700 no forman un grupo monofilético y presentan varias mutaciones entre ellos.

El clado D2' tampoco este sustentado por valores de BB superiores al 50%, sin embargo aquí vemos que al igual que en los análisis anteriores este clado puede dividirse en dos grupos D2'a y D2'b. Las diferencias más notorias con los resultados precedentes es que este clado D2' no comprende a la especie *H. watwata* y además contempla a la especie *H. ericae* dentro del clado D2'b, relacionándose fuertemente (92%BB) con *H. plecostomus* y *H. ancistroides*. Cabe destacar que esta última especie aparece en los análisis anteriores siempre en el clado D2a, pero sorprendentemente aquí se la encuentra en D2'b.

El clado D3-D4 de este análisis basado en CDC27, es la conjunción de los clados D3 y D4 de los análisis realizados con D-loop y COI. Este clado presenta un buen soporte de rama con 53%BB. En la base de este grupo, vemos que la especie *H. microstomus* es la primera en diferenciarse. Luego vemos una tricotomía con: (i) la especie *H. isbrueckeri*; (ii) un grupo con *H. uruguayensis*, *H. luteus*, *H. latifrons*, *H. laplatae* y *H. aspilogaster*, todas estas especies corresponden al clado D4 de los análisis anteriores; (iii) un gran grupo que reúne al resto de las especies tanto del clado D3 como del clado D4. Dentro de este último grupo, vale mencionar que los dos haplotipos encontrados para el ejemplar AG198 de *H. arecuta*, se presentan juntos. Sin embargo, esta especie no aparece como un grupo monofilético dado que el otro representante de *H. arecuta* (AG163) se ve unida a *H. ternetzi* primero y luego al ejemplar AG198 de su misma especie.

En este análisis, vemos que el clado D2' se relaciona más con el clado D3-D4 que con el

clado D1'.

- Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol reconstruido por IB para el gen mitocondrial COI se puede observar en la Fig. 3.11. Cerca de cada uno de los nodos se presentan los valores de probabilidades posteriores (PP) para cada rama del árbol. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Hypostomus* no forman un clado monofilético, esto se debe a que en la base del árbol vemos una politomía de grado cuatro. Dos de las ramas las representan especies utilizadas como *outgroup*, una tercera rama esta compuesta por la especie *H. cochliodon* y la última por el resto de las especies del género *Hypostomus*.

En este análisis, nuevamente vemos que el género *Hypostomus* esta dividido en tres grupos. Los clados marcados como D1' y D2' de la Fig. 3.11 corresponden exactamente a los clado D1' y D2' del árbol MV basado en este mismo marcador nuclear. También, según esta reconstrucción IB la especie *H. watwata* queda excluida del clado D2'. Sin embargo, aquí vemos que al igual que en los análisis anteriores (D-loop y COI) este clado puede dividirse en dos grupos D2'a y D2'b.

El clado llamado D3-D4 está constituido por las mismas especies que en el análisis MV, presentando a la especie *H. microstomus* en la base. No obstante, aquí el resto del clado presenta una gran politomía en donde la mayor parte de las especies no resuelven sus relaciones. Notablemente, se observa que hay dos grupos en dentro de esta politomía, uno de ellos compuesto por las especies *H. uruguayensis*, *H. luteus*, *H. latifrons*, *H. laplatae* y *H. aspilogaster*, todas ellas pertenecientes al clado D4 y otro grupo con *H. asperatus*, *H. sp. BR1100*, *H. sp. BR98-699*, *H. sp. BR98-678*, *H. nigromaculatus*, *H. regani*, *H. albopunctatus*, cuyas especies pertenecen al clado D3 definido con los marcadores D-loop y COI.

Al igual que en el análisis de MV, vemos que el clado D2' se relaciona más con D3-D4 que con D1'.

- Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 60 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.12 debajo de cada una de las ramas se observan los valores de

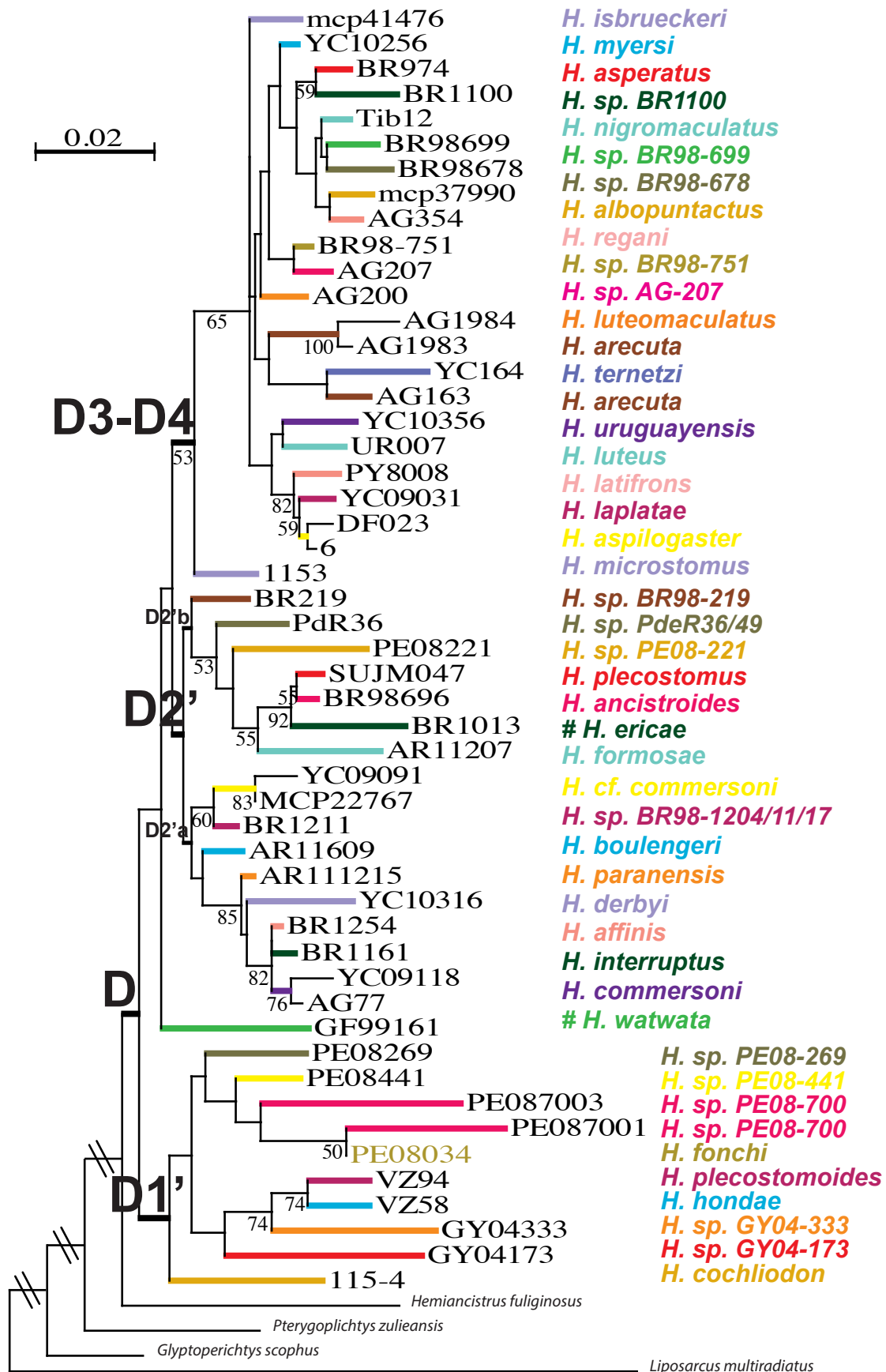


Figura 3.10: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear CDC27. Los valores por debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas. Las especies que presentan una nueva posición en el árbol están marcadas con un #.

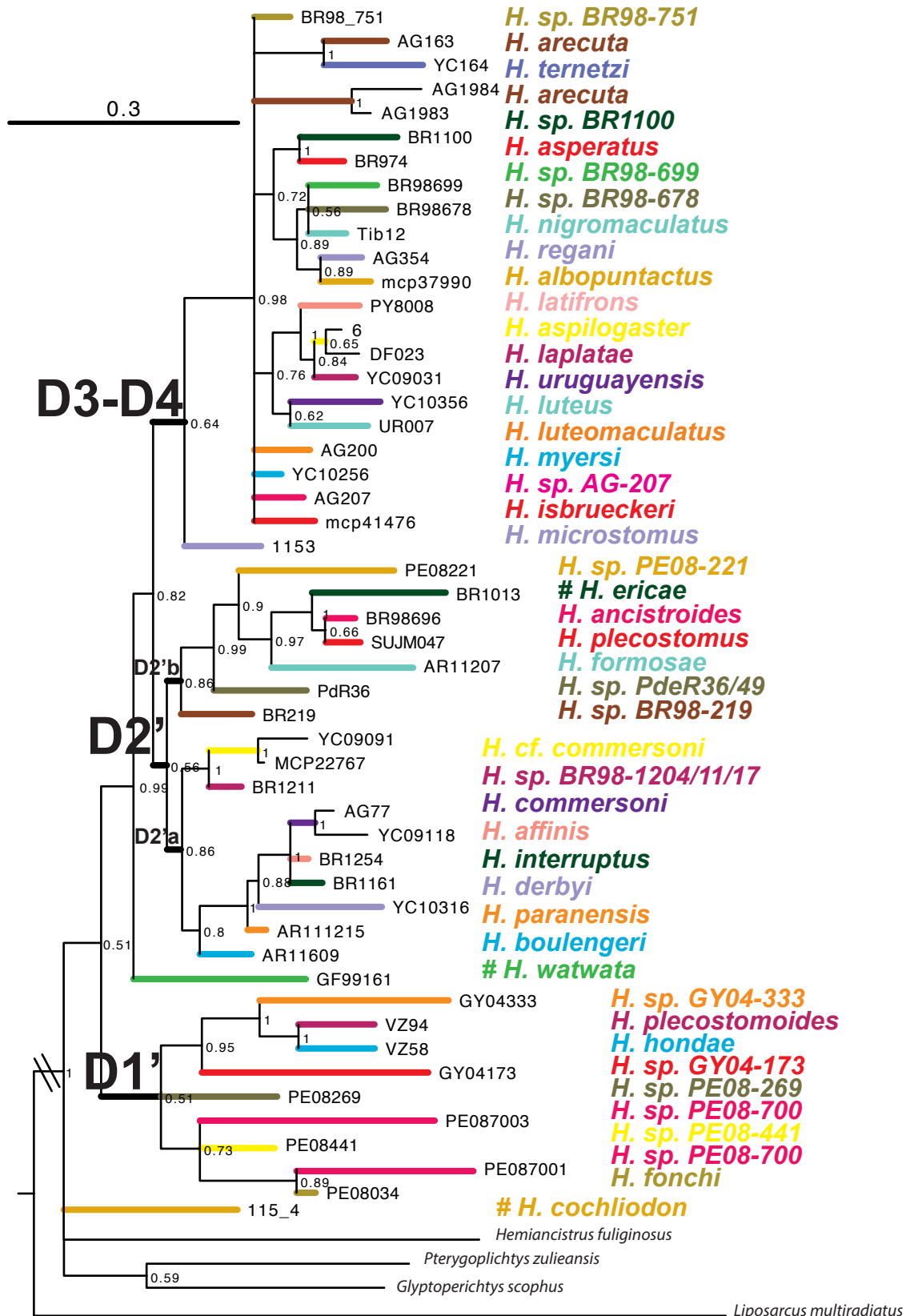


Figura 3.11: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear CDC27. Los valores cerca de cada nodo son las probabilidades posteriores. Las especies que presentan una nueva posición en el árbol están marcadas con un #.

soporte de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN). En los resultados aportados por MP vemos que nuevamente, todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado (66 JN).

El clado llamado D1' de la Fig. 3.12 (36 JN), corresponde a los clado D1' definidos a partir de MV e IB. Sin embargo, se presenta una ligera diferencia: el linaje *H. sp.* PE08-269 queda excluido de este grupo y aparece junto a la especie *H. cochliodon* en la base del árbol.

El clado D2' (66 JN) en este análisis comprende a la especie *H. watwata*, que quedaba excluida en los árboles MV e IB, no obstante, sigue siendo diferente al clado D2 definido con D-loop y COI porque, aquí, este clado incluye a la especie *H. ericae* que en los otros análisis es parte del clado D1. Como los análisis de MV e IB el clado D2' puede dividirse en dos grupos D2'a y D2'b. La única diferencia con los análisis anteriores es que el linaje *H. sp.* PE08-221 en MV e IB formaba parte de clado D2'b y aquí se lo encuentra junto a *H. watwata* en la base del clado D2'.

El clado D3-D4 (93 JN) está compuesto por las especies de los clado D3 y D4 definidos con D-loop y COI. En este árbol de P, vemos que este grupo presenta una politomía con (i) la especie *H. arecuta*, representada por los dos haplotipos del ejemplar AG198; (ii) un clado con *H. luteus*, *H. latifrons*, *H. laplatae* y *H. aspilogaster* (representantes del clado D4) y (iii) un gran clado con el resto de las especies en donde podemos ver un subclado con *H. asperatus*, *H. sp.* BR1100, *H. sp.* BR98-699, *H. sp.* BR98-678, *H. nigromaculatus* y *H. sp.* Ag-207, cuyas especies pertenecen al clado D3 en los análisis basados en los marcadores D-loop y COI. Nótese que en este resultado la especie *H. microstomus* no se encuentra en la base del clado.

Al igual que en los análisis de MV e IB, vemos que el clado D2' se relaciona más con D3-D4 que con D1'.

Análisis basado en RAG1

El alineamiento final del gen nuclear RAG1 para el género *Hypostomus* comprendió 60 secuencias de las cuales cinco representan el *outgroup*. Se seleccionaron para amplificar las mismas especies y linajes que se han utilizado en los análisis del gen nuclear CDC27. Se obtuvieron en el laboratorio un total de 1345 bp. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor

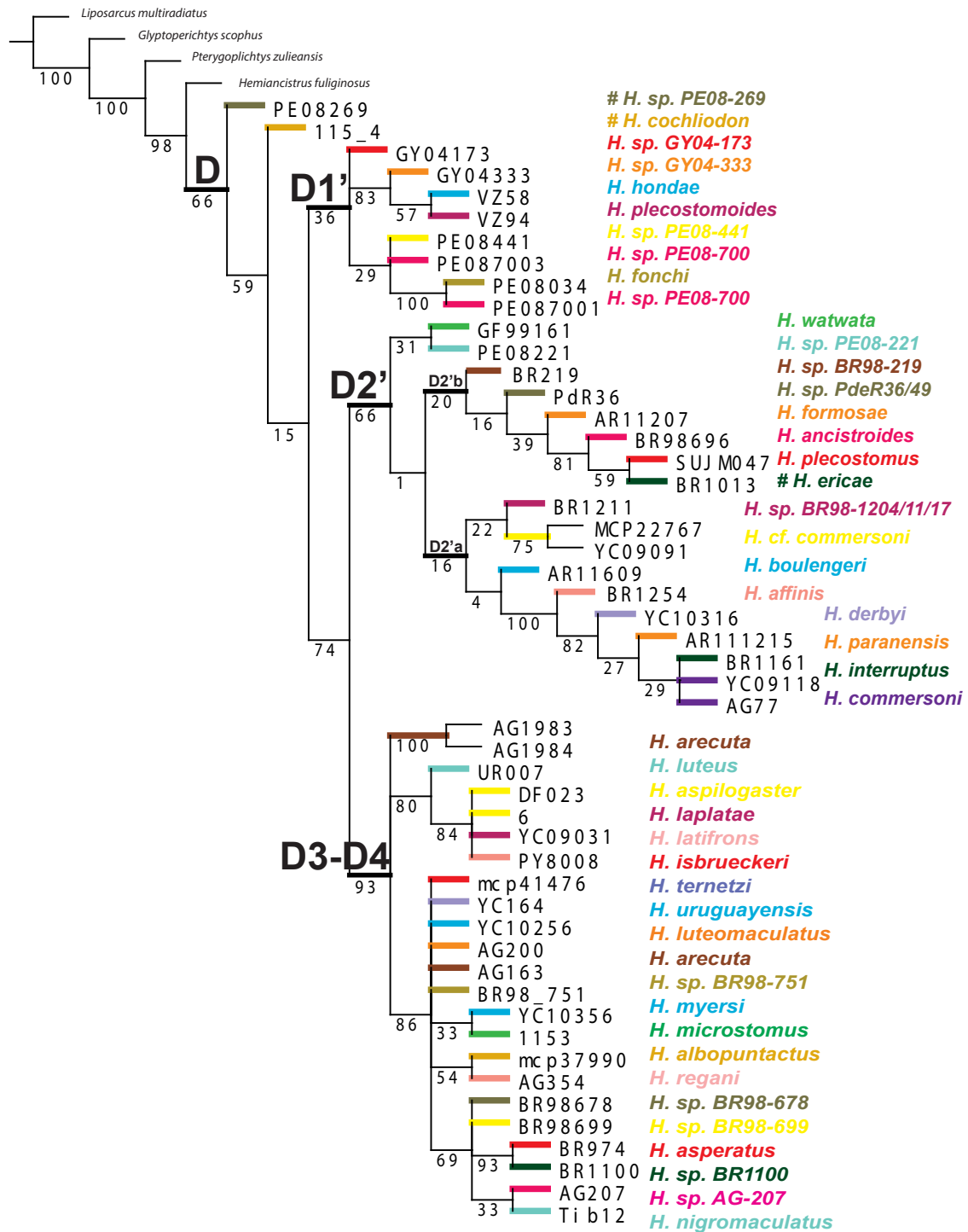


Figura 3.12: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear CDC27. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas. Las especies que presentan una nueva posición en el árbol están marcadas con un #.

se ajusta a este set de datos es TVM más la distribución gamma.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

El árbol MV obtenido en el programa TreeFinder se muestra en la Fig. 3.13. Por debajo de cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -3716,97$; $\alpha = 0,174$; $\pi(T) = 0,24$; $\pi(C) = 0,22$; $\pi(A) = 0,27$; $\pi(G) = 0,15$.

En este nuevo análisis, basado en otro marcador nuclear, observamos que el género *Hypostomus* nuevamente aparece como un grupo monofilético, llamado D (85 %BB) y que al igual que en los análisis basados en el gen CDC27 este género puede dividirse en tres grupos.

El clado D1 (58 %BB) se corresponde a los clados con el mismo nombre definidos con los marcadores mitocondriales D-loop y COI.

El clado D2, no presenta valores de soportes mayores al 50 %, pero comprende las mismas especies que los clados definidos con este mismo nombre. Además, también se puede dividir en tres grupos uno representado solamente por la especie *H. watwata* y por los grupos D2a y D2b. Nótese aquí que la especie *H. boulengeri* correspondiente al subclado D2a, en este análisis aparece dentro del clado D2b.

El clado D3-D4 (66 %BB) está compuesto por las mismas especie que el clado con el mismo nombre definido anteriormente con el marcador nuclear CDC27. Este clado presenta una gran politomía, sin embargo, vemos un subgrupo compuesto por *H. asperatus*, *H. sp.* BR1100, *H. sp.* BR98-699 y *H. nigromaculatus*, cuyas especies pertenecen al clado D3. Según estos resultados varias especies no presentan monofilia recíproca, tales son los casos de *H. myersi*, *H. luteomaculatus*, *H. arecuta* y de *H. albopunctatus*.

En este análisis se observa una politomía entre los clados D1, D2 y D3-D4.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol basado en RAG1 reconstruido por IB para el género *Hypostomus* se puede observar en la Fig. 3.14. Debajo de cada una de las ramas del árbol, se ven los valores de probabilidades posteriores (PP) de cada una de ellas. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado

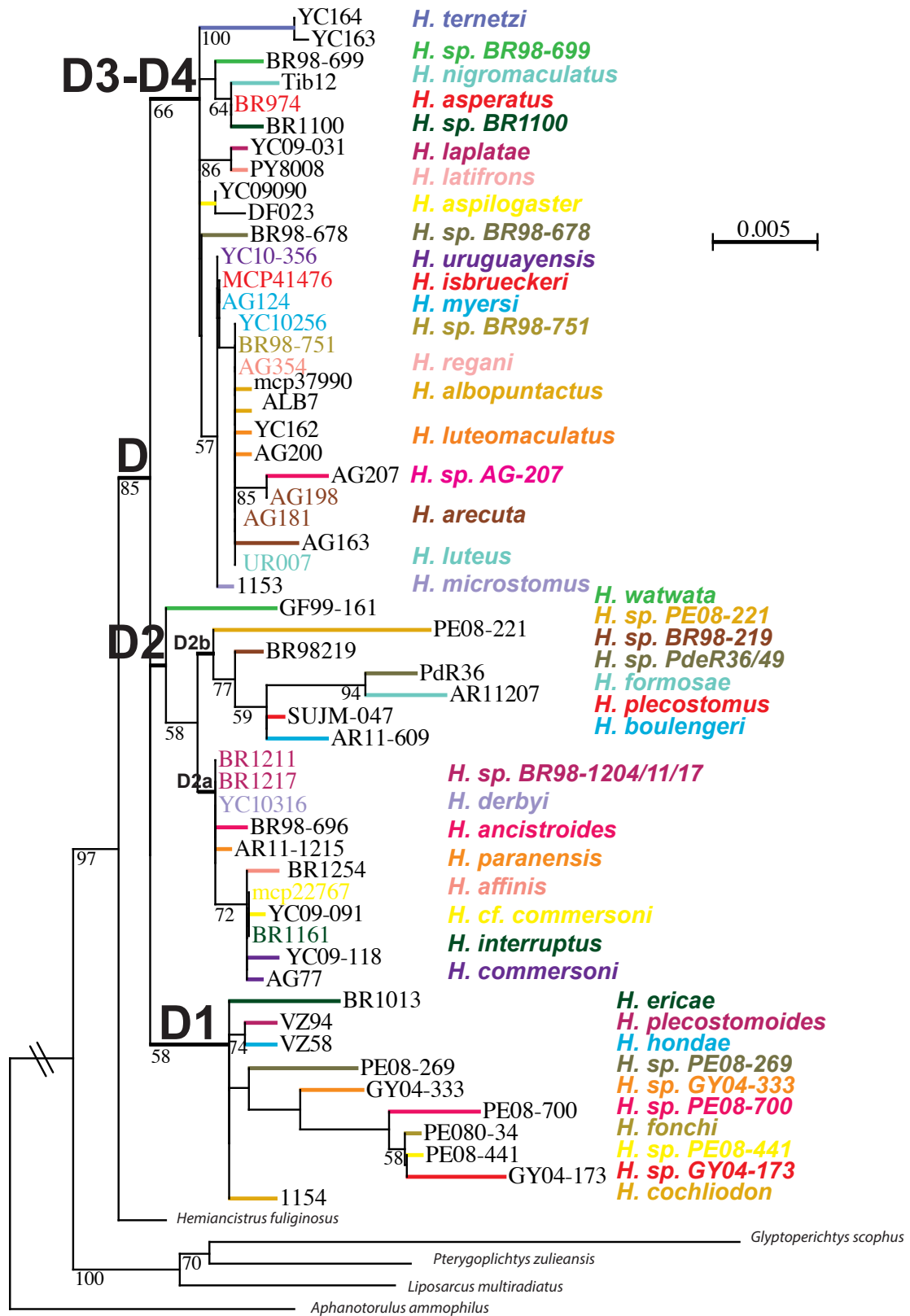


Figura 3.13: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear RAG1. Los valores por debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

(1 PP). Del mismo modo que en el árbol MV, vemos que este clado también se divide en tres grupos, pero estos grupos no se corresponden exactamente a los definidos en el árbol MV de este mismo marcador nuclear.

El clado definido como D1'' (1 PP) se corresponde a los clados D1 y D1', salvo que este nuevo clado comprende al linaje *H. sp.* PE08-221, ejemplar que se ha encontrado en todos los análisis anteriores dentro de los clados D2 y D2'. Es interesante notar las largas ramas que ha generado el análisis con la incorporación de este nuevo linaje al clado.

El clado D2'' (0,95 PP) difiere de clado D2 definido en los análisis anteriores, solamente por la ausencia del linaje *H. sp.* PE08-221. Sin embargo, al igual que los clados llamados D2 y D2', el clado D2'' puede subdividirse, en este caso, en tres grupos, el primero de ellos compuesto por la especie *H. watwata* que aparece en la base del clado, luego los grupos D2''a y D2''b. En este nuevo análisis, encontramos, otra vez, que la especie *H. boulengeri* correspondiente al subclado D2''a, aparece dentro del clado D2''b.

El clado D3-D4 (1 PP) está compuesto por las mismas especies que el clado con el mismo nombre definido anteriormente con el marcador nuclear CDC27 y con RAG1 a partir de los análisis de MV. Al igual que en el análisis de MV, este clado presenta una gran politomía, sin embargo, vemos al subgrupo compuesto por *H. asperatus*, *H. sp.* BR1100, *H. sp.* BR98-699 y *H. nigromaculatus*, cuyas especies pertenecen al clado D3. Según estos resultados varias especies no presentan monofilia recíproca, tales son los casos de *H. myersi*, *H. luteomaculatus*, *H. arecuta* y de *H. albopunctatus*.

Al igual que en los análisis de MV, vemos una politomía entre los clados D1'', D2'' y D3-D4.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 15 árboles igualmente parsimoniosos a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.15, debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN). En los resultados aportados por MP vemos que nuevamente, todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado (83 JN), que puede dividirse en tres grupos.

El clado D1'' (79 JN) es idéntico al clado D1'' definido a partir de IB con este mismo marca-

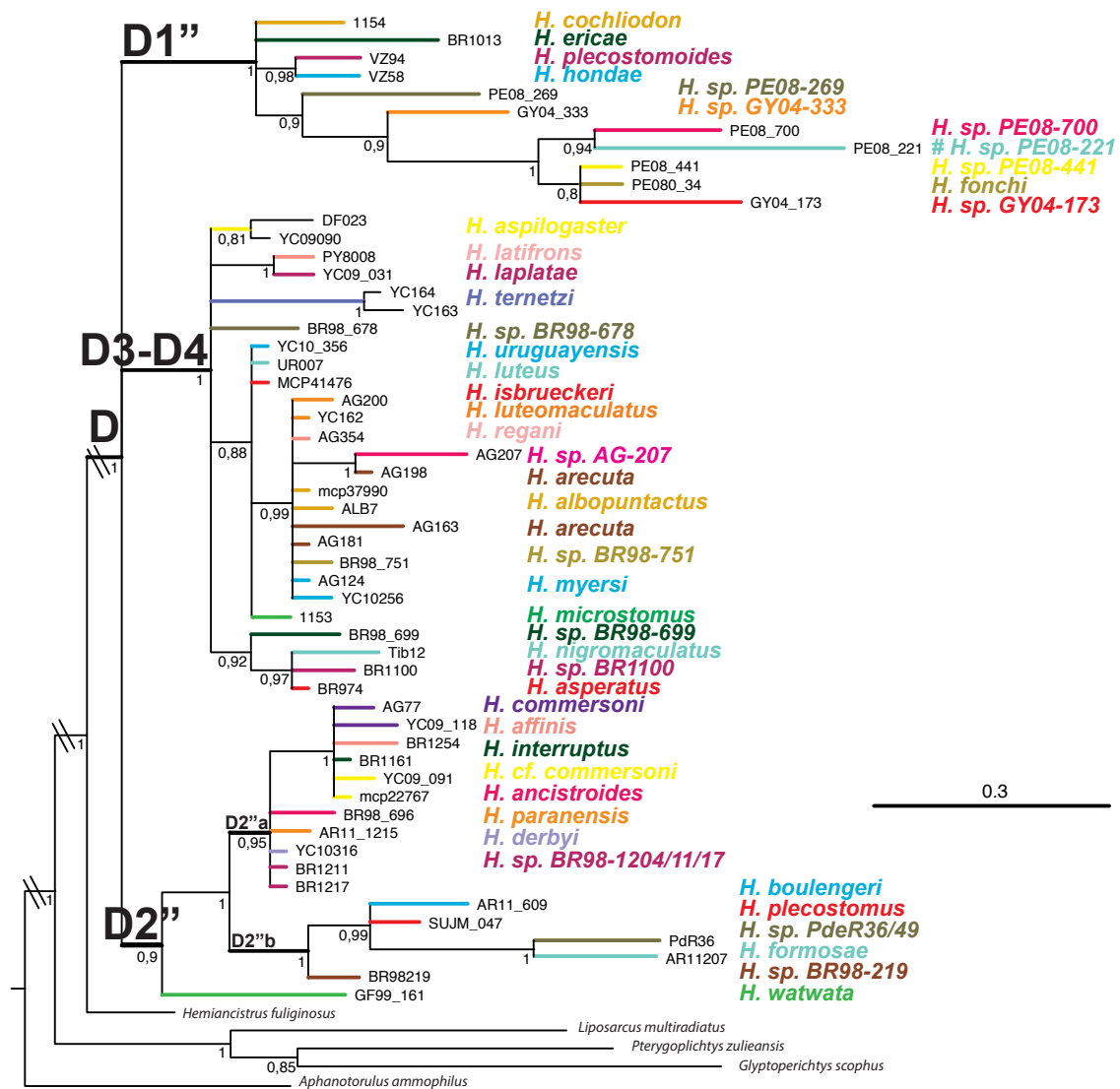


Figura 3.14: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear RAG1. Los valores debajo de las ramas son las probabilidades posteriores. Las especies que presentan una nueva posición en el árbol están marcadas con un #.

dor. Nuevamente el linaje *H. sp.* PE08-221 fue incorporado a este clado y excluido del grupo D2.

El clado D2'' presenta un bajo valor de soporte (16 JN). Al igual que en el análisis de IB, este clado se divide en tres grupos: *H. watwata* que aparece en la base del clado, luego los grupos D2''a y D2''b4. Nuevamente, la especie *H. Boulengeri* correspondiente al subclado D2.^a, aparece dentro del clado D2''b.

El clado D3-D4 (54 JN) presenta una gran politomía donde las relaciones de las especies no están resueltas y donde varias de ellas no presentan monofilia recíproca. Sin embargo, notamos la presencia de un clado cuyas especies pertenecen al clado D3: *H. asperatus*, *H. sp.* BR1100, *H. sp.* BR98-699 y *H. nigromaculatus*.

Al igual que en los análisis de MV e IB, vemos una politomía entre los clados D1'', D2'' y D3-D4.

Análisis basado en Hodz3

El alineamiento final del gen nuclear Hodz3 para el género *Hypostomus* comprendió 60 secuencias de las cuales seis representan el *outgroup*. Se seleccionaron para amplificar las mismas especies y linajes que se han utilizado en los análisis de los genes nucleares CDC27 y RAG11. La única especie que no ha sido analizada fue *H. interruptus* (BR1161) dado que no ha sido posible amplificar esta muestra correctamente. Se obtuvieron en el laboratorio un total de 1055 pb. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es TVM más la distribución gamma.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

El árbol MV obtenido en el programa TreeFinder puede verse en la Fig. 3.16. Por debajo de cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -3251,72$; $\alpha = 0,315$; $\pi(T) = 0,32$; $\pi(C) = 0,22$; $\pi(A) = 0,23$; $\pi(G) = 0,20$.

El resultado obtenido según MV para este gen nuclear, sugiere que el género *Hypostomus* no forma un grupo monofilético dado que el clado que comprende a todas las especies de este género también incluye a una especie de *Hemiancistrus* (59%BB). Sin embargo, al igual que

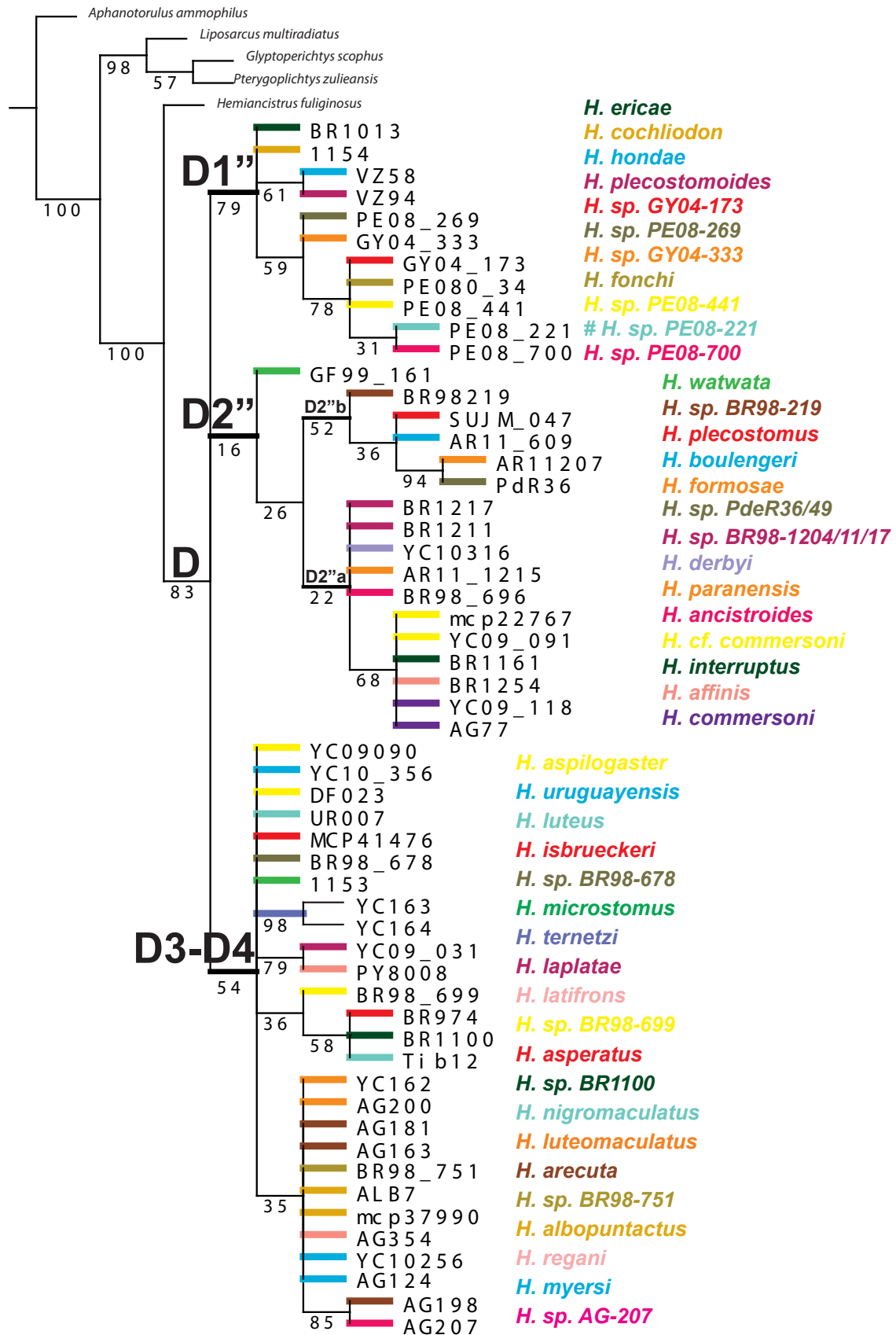


Figura 3.15: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear RAG1. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas. Las especies que presentan una nueva posición en el árbol están marcadas con un #.

los resultados precedentes, observamos que los *Hypostomus* pueden dividirse en los cuatro grupos D1, D2, D3 y D4 y que estos están acompañados por buenos valores de soporte.

El clado D1 (97 %BB) presenta una politomía de grado cuatro con los siguientes subclados: (i) *H. plecostomoides* y *H. hondae* (67 %BB); (ii) un clado compuesto por *H. sp.* PE08-700 en la base y por *H. sp.* PE08-269, *H. ericae*, *H. cochliodon* y *H. sp.* GY04-333 (84 %BB); (iii) *H. sp.* PE08-441 y *H. sp.* GY04-173 (82 %BB) y (iv) la especie *H. fonchi*.

El clado D2 (56 %BB) en este análisis no puede dividirse en dos grupos como vimos anteriormente. En este análisis vemos que el clado D2 presenta a la especie *H. watwata* en la base y luego una gran politomía de grado doce con el resto de las especies que conforman a este clado. Es importante aclarar que según este análisis la especie *H. commersoni* y el linaje *H. cf. commersoni* no aparecen como recíprocamente monofiléticos.

El clado D3 (61 %BB) se presenta aquí sin resolver las relaciones entre sus especies. Además, se excluye a la especie *H. microstomus* y al linaje *H. sp.* BR98-678.

El clado D4 (86 %BB) comprende al clado D3, a *H. microstomus* y a *H. sp.* BR98-678, apareciendo de este modo como un grupo parafilético. Por otro lado, se observa que todas las especies correspondientes al clado D4 se presentan en una politomía, a excepción de los pares *H. uruguayensis* y *H. isbrueckeri* (53 %BB) y *H. ternetzi* y *H. sp.* BR98-678 (53 %BB) que aparecen como especies hermanas, respectivamente. Además, vemos que la especie *H. arecuta* y el linaje *H. sp.* Tib1, al igual que *H. laplatae* y *H. aspilogaster* conforman pares de clados sin diferencias mutacionales.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

La topología del árbol basado en el gen *Hodz3* obtenido por IB fue idéntica al del árbol MV (ver la Fig. 3.16). Por encima de cada rama se encuentran los valores de probabilidades posteriores (PP) de cada una de ellas.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.17, debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte

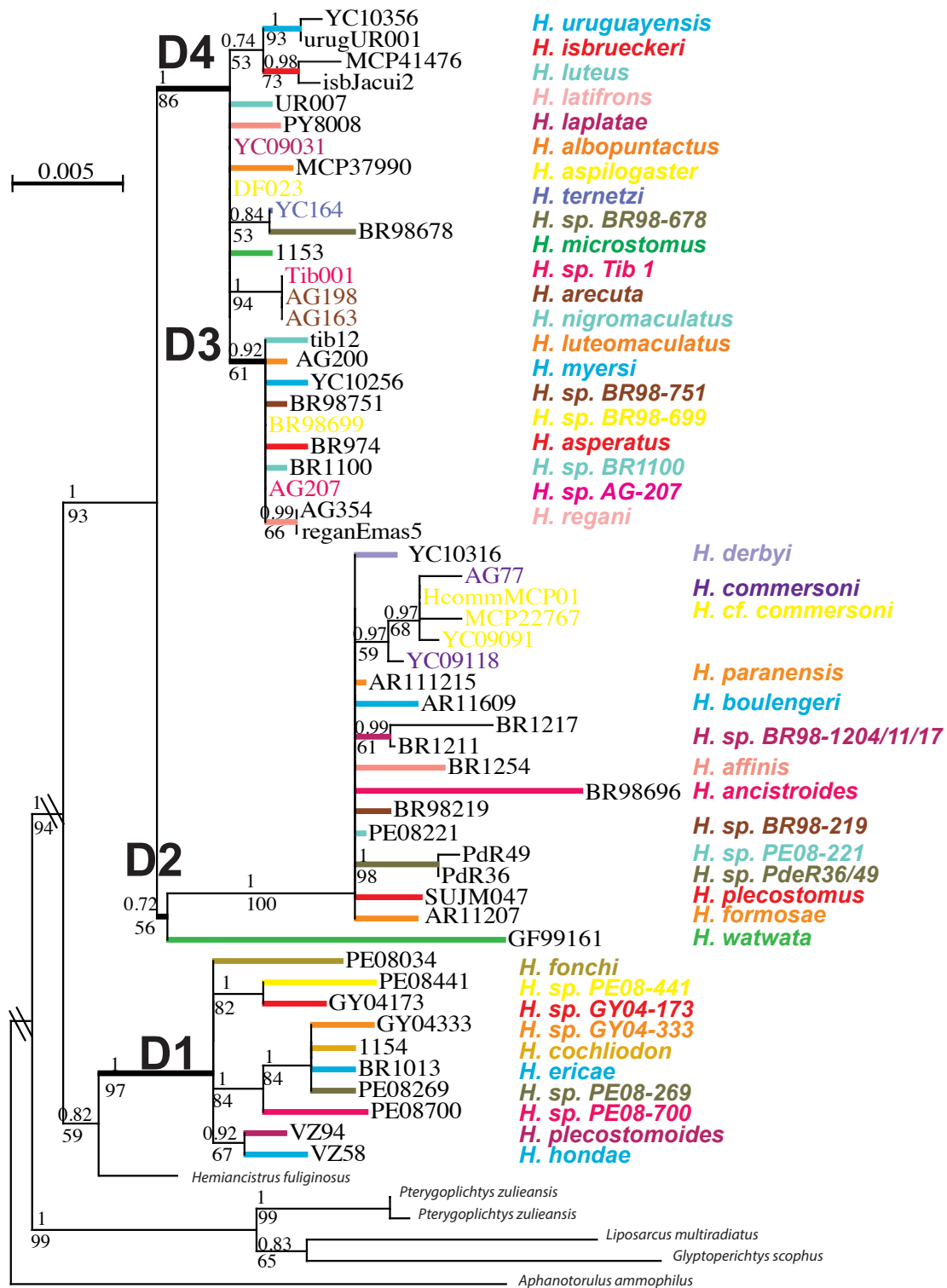


Figura 3.16: Árbol de máxima verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear *Hodz3*. Los valores por debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas. Los valores por encima de las ramas son las probabilidades posteriores.

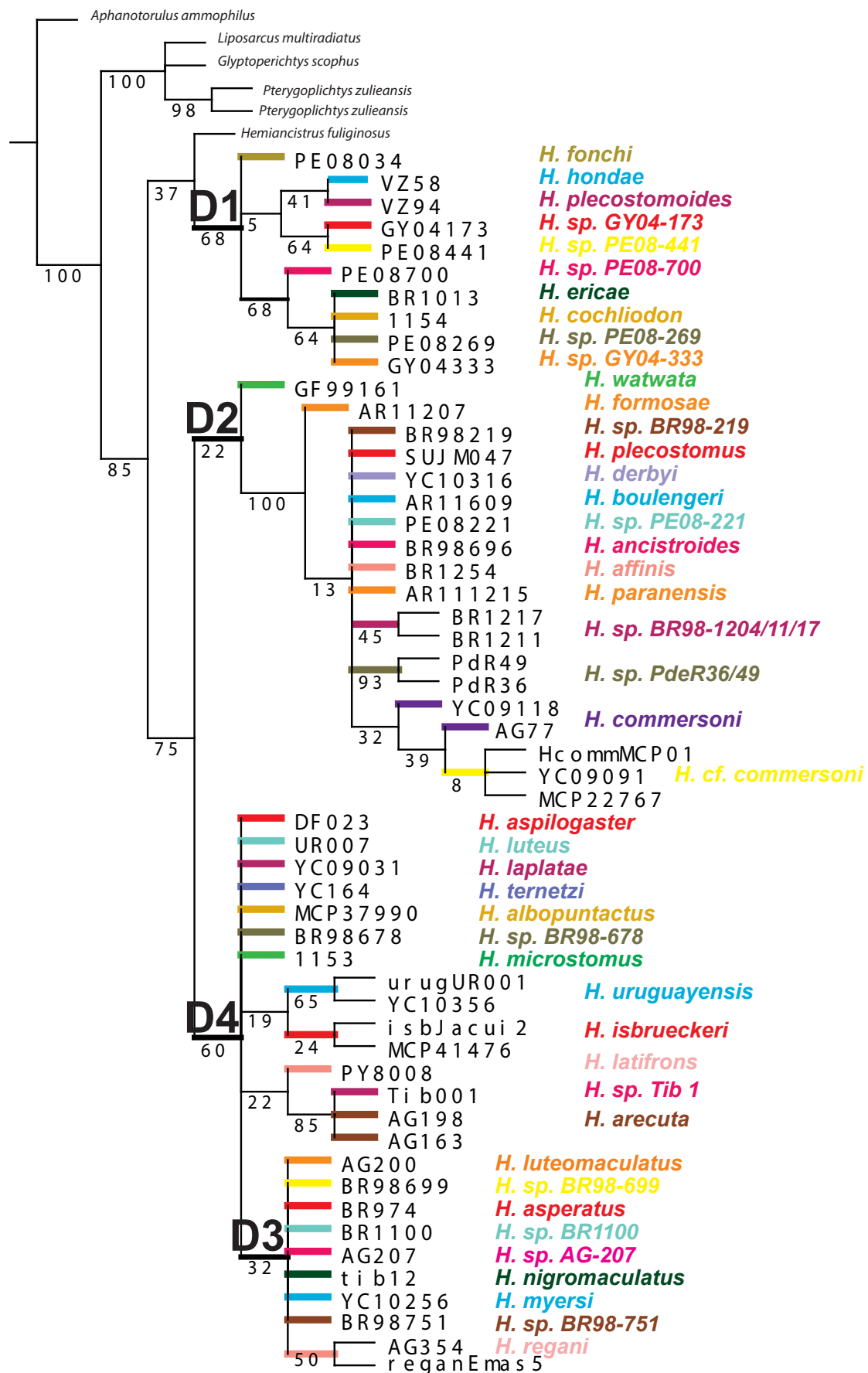


Figura 3.17: Árbol de Máxima Parsimoniapara el género *Hypostomus* basado en el gen nuclear *Hodz3*. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN). Nuevamente en este resultado basado en Hodz3, vemos a la especie *Hemiancistrus fuliginosus* dentro del gran clado del género *Hypostomus* (37 JN).

El clado D1 (68 JN) puede dividirse en tres grupos: (ii) la especie *H. fonchi*; (ii) *H. hondae* y *H. plecostomoides*, más *H. sp.* GY04-173 y *H. sp.* PE08-441 y (iii) el clado D1b (68 JN), el cual se compone del linaje *H. sp.* PE08-700 en la base, luego se observa una politomía con *H. cochliodon*, *H. ericae*, *H. sp.* PE08-269 y *H. sp.* GY04-333.

El clado D2 (22 JN) al igual que los análisis MV e IB presenta a la especie *H. watwata* en la base. La segunda especie en diferenciarse es *H. formosae* (100 JN), a partir de allí vemos una gran politomía con el resto de las especies típicas de este clado. Notablemente la especie *H. commersoni* no aparece como un grupo monofilético en este análisis.

El clado D3 (32 JN) de este análisis de MP, resultó de igual topología que en los análisis anteriores, sin mostrar resolución entre las relaciones de las especies.

El clado D4 (60 JN) nuevamente aparece como parafilético, incluyendo al clado D3. A diferencia de los análisis precedentes, vemos que la especie *H. latifrons* se reúne con el clado *H. sp.* Tib1 y *H. arecuta* (22 JN) y que las especies *H. uruguayensis* y *H. isbrueckeri* aparecen como especies hermanas (19 JN).

Análisis basado en múltiples genes

El alineamiento final utilizado en este análisis de marcadores concatenados (D-loop + COI + CDC27 + RAG11 + Hodz3) para el género *Hypostomus* comprendió 53 secuencias de las cuales cinco representan el outgroup. Se seleccionaron las mismas especies y linajes que se han utilizado en los análisis de los genes nucleares CDC27; RAG11 y Hodz3 analizados individualmente. El alineamiento comprendió la partición de los datos indicando donde empieza y donde termina cada gen. El alineamiento ha comprendido aproximadamente 5000 bp. Según el programa TreeFinder, los mejores modelos para cada sección de la partición son:

Partición 1 (Dloop): TN + G.

Partición 2 (COI): TN + G.

Partición 3 (CDC27): J1 + G.

Partición 4 (RAG11): TVM + G.

Partición 5 (Hodz3): GTR+ G.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

En la Fig. 3.18 se puede observar el árbol MV obtenido en el programa TreeFinder, sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50% obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son:

$\log lk = -24195.28$;

Partición 1 (Dloop): $\pi(T) = 0,31, \pi(C) = 0,20, \pi(A) = 0,37, \pi(G) = 0,10; \alpha = 0,2730$.

Partición 2 (COI): $\pi(T) = 0,32, \pi(C) = 0,23, \pi(A) = 0,27, \pi(G) = 0,17; \alpha = 0,1695$.

Partición 3 (CDC27): $\pi(T) = 0,32, \pi(C) = 0,17, \pi(A) = 0,29, \pi(G) = 0,21; \alpha = 0,6477$.

Partición 4 (RAG11): $\pi(T) = 0,25, \pi(C) = 0,32, \pi(A) = 0,27, \pi(G) = 0,24; \alpha = 0,1390$.

Partición 5 (Hodz3): $\pi(T) = 0,32, \pi(C) = 0,21, \pi(A) = 0,26, \pi(G) = 0,18; \alpha = 0,2584$.

El primer resultado observable de este análisis, es que todas las especies de *Hypostomus* forman un clado monofilético, llamado D (véase la Fig. 3.18) sustentado por el 100%BB. Este clado D, se divide en cuatro grupos D1, D2, D3 y D4. En este análisis de MV, el clado D1 aparece como el grupo basal dentro del gran clado D, luego se diferencia el clado D2 y finalmente D3 y D4 aparecen como hermanos con 100%BB.

El clado D1 (100%BB) puede dividirse en dos grupos, el primero de ellos contempla a las especies *H. hondae* y *H. plecostomoides* (100%BB). El segundo grupo (92%BB), a su vez, también puede dividirse en dos: un grupo que reúne al par *H. sp.* PE08-700 - *H. fonchi* y al par *H. sp.* PE08-441 - *H. sp.* GY04-173, el otro grupo está compuesto por un lado de *H. sp.* PE08-269 y *H. sp.* GY04-333 y por otro por *H. ericae* y *H. cochliodon*.

El clado D2 (96%BB) presenta a la especie *H. watwata* en la base, para luego dividirse en dos grupos, D2a (98%BB) y D2b (83%BB). El clado D2a no presenta valores de soporte elevados en las relaciones entre las especies que lo componen, de hecho se observa una politomía entre *H. Boulengeri*, *H. paranensis* y un clado que comprende a *H. cf. commersoni*, *H. interruptus*, *H. affinis* y *H. commersoni* (52%BB). En el subclado D2b vemos una buena resolución en las relaciones interespecíficas, notando que la especie *H. formosae* aparece como especie hermana del linaje *H. sp.* PdeR36/49 con 50% de BB.

El clado D3 (94 %BB) puede dividirse en dos grupos D3a (100 %BB) y D3b (86 %BB). El subclado D3a está compuesto por el linaje *H. sp.* BR981100 y la especie *H. asperatus*. El subclado D3b presenta en la base a *H. microstomus*, luego se diferencia el linaje *H. sp.* BR98-678. A partir de allí, vemos un clado que contiene a los linajes *H. sp.* BR98-751 y a *H. sp.* AG-207, seguido del trío *H. nigromaculatus*, *H. sp.* BR98-699 y *H. regani* y del par *H. myersi* - *H. luteomaculatus*.

El clado D4 (97 %BB) presenta en su base a la especie *H. albopuntactus*, luego vemos un clado que reúne a un grupo formado por *H. ternetzi* y *H. arecuta* (90 %BB) y el grupo D4a. Este subclado D4a (98 %BB) presenta a *H. latifrons* en la base, al par *H. uruguayensis* - *H. isbrueckeri* y al trío *H. luteus*, *H. laplatae* y *H. aspilogaster*.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol basado en los cinco genes reconstruido por IB para el género *Hypostomus* se puede observar en la Fig. 3.19. Cerca de cada uno de los nodos del árbol, se ven los valores de probabilidades posteriores (PP) de cada uno de ellos. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Hypostomus* forman un clado monofilético D bien sustentado (1 PP). Del mismo modo que en el árbol MV, vemos que este clado también se divide en cuatro grupos.

El clado D1 (1 PP) presenta la misma topología que en el análisis de MV, con valores de PP muy elevados para las relaciones entre las especies, a excepción del par *H. cochliodon* y *H. ericae* que presenta 0,59 de PP.

El clado D2 (1 PP) nuevamente muestra a la especie *H. watwata* en la base y luego a los subgrupos D2a y D2b (ambos con 1 de PP). En este análisis las relaciones entre las especies del subclado D2a están todas resueltas con valores de PP mayores a 0,65. El subclado D2b, a diferencia del análisis MV, propone al linaje *H. sp.* PE08-221 en la base, luego un clado con los pares *H. plecostomus* - *H. formosae* (1 PP) y *H. sp.* BR98-219 y *H. sp.* PdeR36/49 (0,86 PP).

El clado D3 (1 PP) al igual que en el árbol de MV, se puede dividir en dos grupos D3a y D3b (ambos con 1 de PP). D3a está compuesto por *H. sp.* BR981100 y la especie *H. asperatus*. El subclado D3b presenta en la base a *H. microstomus*, luego se diferencian los linajes *H. sp.*

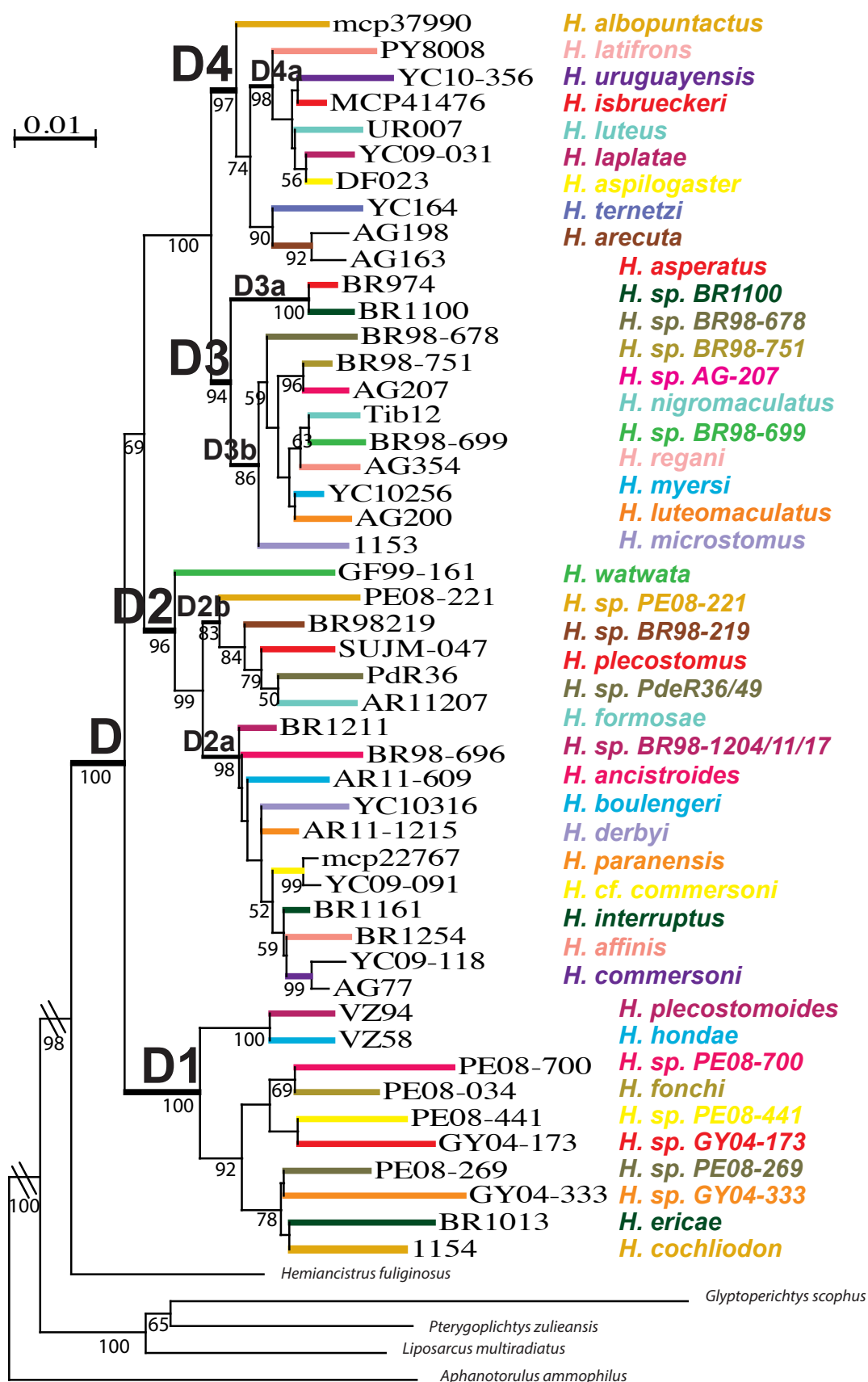


Figura 3.18: Árbol de máxima verosimilitud para el género *Hypostomus* basado en en cinco marcadores (D-loop + COI + CDC27 + RAG1 + Hodz3). Los valores por debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

BR98-751 y a *H. sp.* AG-207 (1 PP) y finalmente un clado que contiene al par *H. myersi* - *H. luteomaculatus* (0,58 PP), luego se diferencia *H. regani*, seguido de *H. nigromaculatus* y terminando con el par *H. sp.* BR98-678 y *H. sp.* BR98-699 (0,77 PP).

El clado D4 (1 PP) como hemos visto en el análisis MV, contiene a la especie *H. albopunctatus* en la base, luego a un clado constituido por las especies *H. ternetzi* y *H. arecuta* (1PP) y un clado llamado D4a (1PP). En el clado D4a se puede ver que las relaciones interespecíficas difieren del análisis MV. *Hypostomus uruguayensis* aparece en la base, luego se diferencia, *H. isbrueckeri*, seguido de *H. luteus*, luego *H. aspilogaster* y finaliza con la pareja *H. laplatae* y *H. latifrons*.

En este análisis de IB, al igual que en los resultados de MV, el clado D1 aparece como el grupo basal dentro del gran clado D, luego se diferencia el clado D2 y finalmente D3 y D4 aparecen como hermanos (1 PP).

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron solamente 11 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 3.20 debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* calculados a partir de 1000 réplicas (JN). Nuevamente, en este resultado basado en los cinco genes, vemos que *Hypostomus* es un grupo monofilético, llamado clado D (100 JN), que puede ser dividido en cuatro grupos diferentes. A diferencia de los análisis de MV e IB, en el árbol de MP, observamos que hay una politomía entre los clados D1, D2 y un nodo que reúne a los clados D3 y D4 (100 JN).

El clado D1 (100 JN) está compuesto por las mismas especies que en los análisis de MV e IB. Nuevamente, vemos que la especie *H. hondae* y *H. plecostomoides* aparecen como hermanas (100 JN). En este análisis, hay algunas relaciones interespecíficas sin resolver, viéndose dos politomías dentro del clado.

El clado D2 (99 JN) nuevamente muestra a la especie *H. watwata* en la base y luego a los subgrupos D2a (99 JN) y D2b (41 JN). En este análisis de MP las relaciones entre las especies del subclado D2a están todas resueltas con valores de JN moderados. El subclado D2b, a diferencia del análisis MV e igual que IB, propone al linaje *H. sp.* PE08-221 en la base, luego

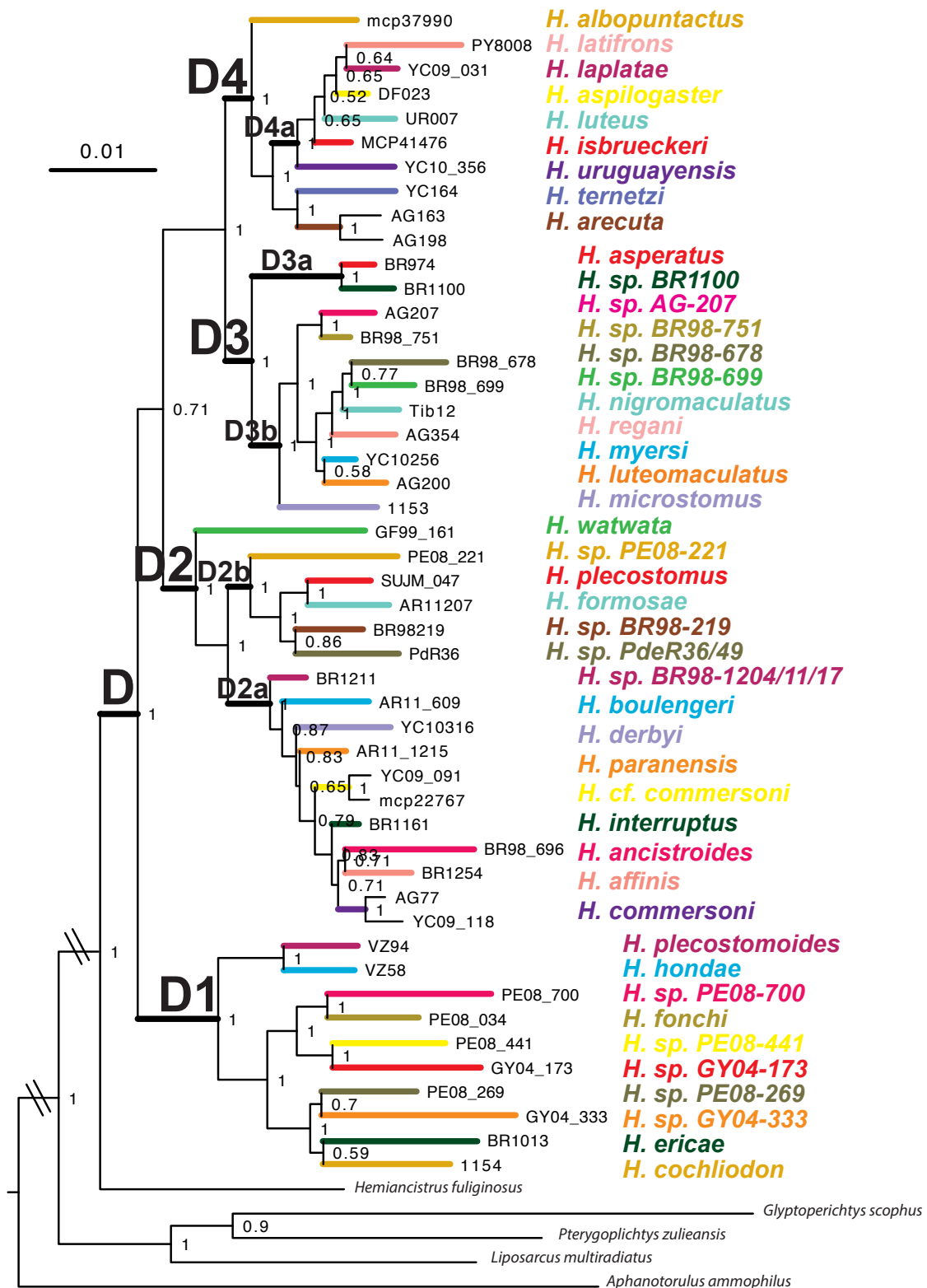


Figura 3.19: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Hypostomus* basado en en cinco marcadores (D-loop + COI + CDC27 + RAG1 + Hodz3). Los valores cerca de los nodos son las probabilidades posteriores.

un clado con los pares *H. plecostomus* - *H. formosae* (93 JN) y *H. sp.* BR98-219 y *H. sp.* PdeR36/49 (74 JN).

El clado D3 (97 JN) puede dividirse en dos grupos D3a (100 JN) y D3b (60 JN). El subclado D3a, al igual que en los análisis anteriores, está compuesto por el linaje *H. sp.* BR981100 y la especie *H. asperatus*. El subclado D3b presenta en la base a *H. microstomus*, pero luego vemos una gran politomía donde no se logran resolver las relaciones entre las especies. Las únicas relaciones sostenidas por este análisis de MP son las que reúnen a los pares *H. sp.* BR98-751 - *H. sp.* AG-207 y *H. myersi* - *H. luteomaculatus*.

El clado D4 (94 JN) como hemos visto en el análisis MV e IB, contiene a la especie *H. albopunctatus* en la base, luego se observa a un clado con las especies *H. ternetzi* y *H. arecuta* (88 JN) y finalmente a un clado llamado D4a (91 JN). Dentro de este clado D4a encontramos las diferencias con los análisis anteriores. La primera especie en diferenciarse en D4a es *H. uruguayensis*, seguida de *H. isbrueckeri*, luego *H. luteus*, después *H. latifrons* y finaliza con el par *H. aspilogaster* - *H. laplatae* (55 JN).

■ Test de topologías

Las diferencias principales entre los árboles generados con los datos concatenados del género *Hypostomus* se encuentran al nivel de las relaciones interespecíficas dentro de cada grupo. Con el objetivo de determinar cuál de estas topologías es la mejor, se efectuó un test de topologías para los resultados obtenidos con MV e IB. Para ello, se utilizó el alineamiento de los datos concatenados y se indicó el mejor modelo de evolución para cada partición. La topología de los resultados de MP, no fueron evaluados dado que este test toma en cuenta el largo de cada rama del árbol para la evaluación de los mejores parámetros.

Los resultados obtenidos con el test de topología en Treefinder, muestran que la topología propuesta por MV es mejor que aquella obtenida por IB (véase tabla 3.2). Los parámetros obtenidos (ELW; BP; KH; SH; WSH y AU) son diferentes maneras de calcular probabilidades (*p-value*) de que el árbol en cuestión sea mejor que el mejor árbol. Si el *p-value* de una topología es menor que 5 %, entonces, se considera que los datos rechazan esa topología. Es importante ver que la topología IB no fue rechazada por ninguno de los parámetros del análisis, y que si bien el árbol MV presenta una mejor topología, según este test, no todos los

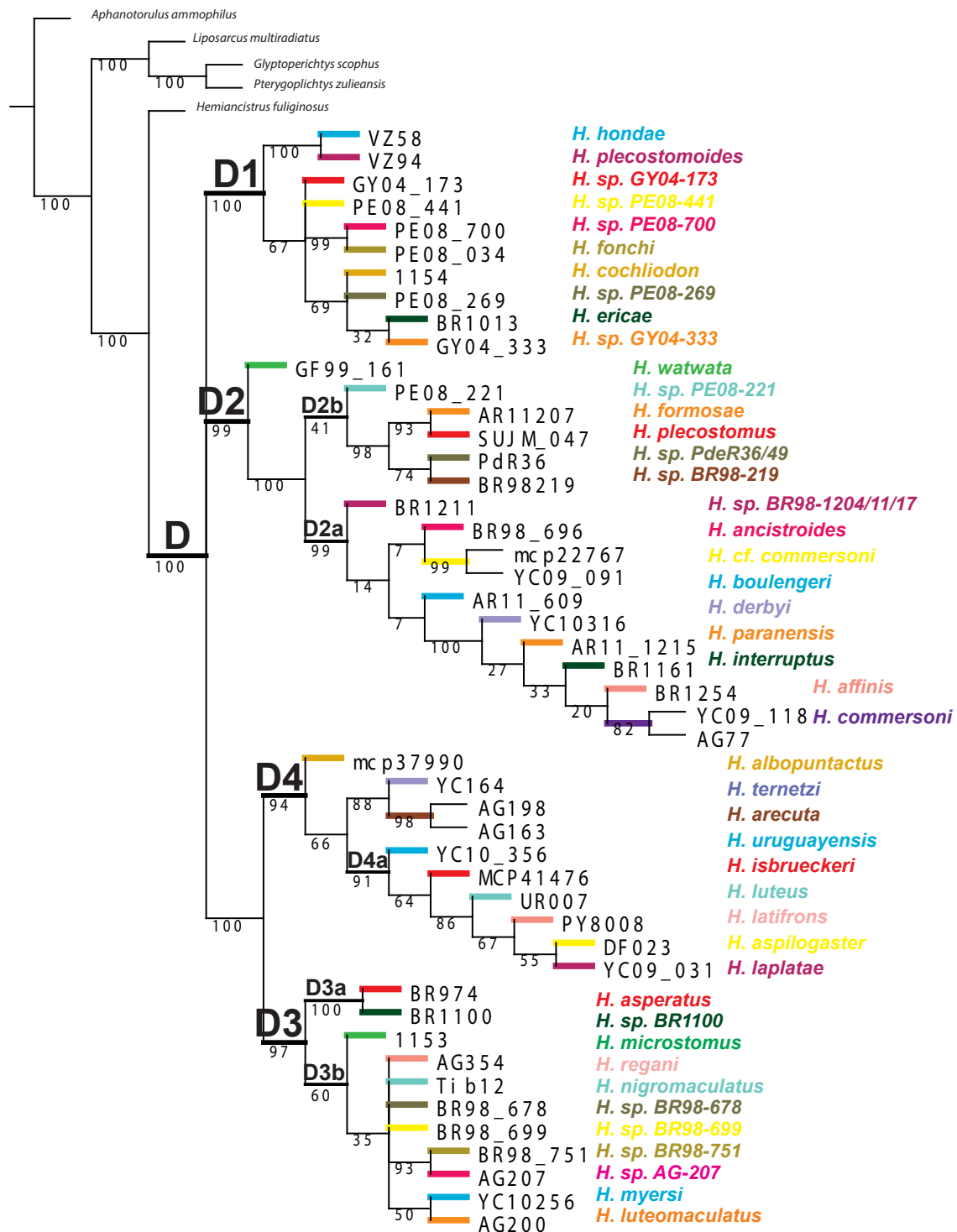


Figura 3.20: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Hypostomus* basado en cinco marcadores (D-loop + COI + CDC27 + RAG1 + Hodz3). Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

Tabla 3.2: Resultados del test de topologías para el género *Hypostomus* basado en los datos concatenados de los cinco marcadores moleculares.

Topología	ELW	BP	KH	SH	WSH	AU	log <i>lk</i>
MV	0,51	0,51	1	1	1	0,50	-24195,35
IB	0,48	0,48	0,49	0,63	0,63	0,49	-24196,25

nodos de este árbol están bien sustentados (con valores de *bootstrap* mayores al 50%).

3.2.3. Calibración del reloj molecular

El test de *log-likelihood ratio*, el cual fue utilizado para verificar que nuestros datos (matriz de los cinco genes concatenados) no poseen tasas de mutación constantes, ha mostrado que las diferencias entre los valores de verosimilitud cuando forzamos los datos a un reloj molecular y cuando no lo hacemos son significativas ($X^2 = 2(\log L_0 - \log L_1) = 337,4628$; d.f. = 51; $P = 8,93327 \times 10^{-44}$). Este resultado indica que las secuencias de los representantes del *ingroup* utilizado evolucionan con una tasa que no es homogénea a lo largo del árbol filogenético.

Con el objetivo de estimar las fechas de los eventos de diversificación en el género *Hypostomus* que habitan la cuenca del Plata, se ha calibrado los datos moleculares basados en cinco genes. El resultado obtenido con el programa BEAST puede observarse en la Fig. 3.21. La topología del árbol reconstruido con BEAST es similar a las obtenidas en la sección anterior con los análisis de MV, IB, y P.

Siguiendo nuestros resultados, observamos que el origen del género del *Hypostomus* se remonta a 32,28 Ma (95 % *highest posterior density interval* o HPD: 21,98-42,34). Mientras que el origen del clado D1 es de 19,63 Ma (95 % HPD: 13,33-26,28). Dentro de este clado, la separación entre las especies de *Hypostomus* que habitan el sistema Amazónico (comprendiendo las cuencas del río Amazonas, las del escudo de las Guayanas y los ríos del norte de Brasil) y las que habitan la cuenca del Plata es de 8,6 Ma (95 % HPD: 5,35-12,29).

El clado D2 tiene una datación estimada de 18 Ma (95 % HPD: 12,65-24,44), siendo en esta fecha la separación de la especie *H. watwata* del resto. En el interior del clado vemos que la diferenciación entre los subclados D2a (Sistema Sur) y D2b (mayor parte del Sistema Norte) es de 14,3 Ma. El subclado D2a, exclusivo del sur de Sudamérica, es datado con 10,38 Ma (95 % HPD: 7,18-14,26). Dentro de este subclado hay especies (*H. affinis* y *H. interruptus*) que habitan exclu-

sivamente los ríos costeros del Sur de Brasil. La separación de estas especies fue estimada en 4,8 Ma (95 % HPD: 2,99-6,92). Por otro lado, el subclado D2b presenta una fecha de 11,37 Ma (95 % HPD: 7,71-16,12).

El clado D3 tiene un origen estimado en 13,94 Ma (95 % HPD: 9,86-19,09), momento en el cual se produce la separación de las dos especies del sistema Amazónico incluidas en este trabajo (*H. asperatus* y *H. sp. 1100* formando el subclado D3a). El resto de las especies de este clado, están incluidas en el subclado D3b y pertenecen al sistema del sur. La fecha estimada para este subclado es de 11,17 Ma (95 % HPD: 7,75-15,46). Dentro de este subclado hay una especie (*H. sp. BR98-751*) que habita en la cuenca del río São Francisco. La separación de esta especie fue estimada en 4,94 Ma (95 % HPD: 2,02-8,34).

En este análisis, el clado D4 no presenta especies del sistema Amazónico, todas las especies son del sur de Sudamérica. El origen de este grupo es de 13,32 Ma (95 % HPD: 9,14-18,47) siendo la especie más basal *H. albopunctatus*.

En este análisis se han incorporado solamente 3 especies con dos representantes: *H. commersoni*, *H. cf. commersoni* y *H. arecuta*. Los resultados obtenidos, dejan ver que las fechas estimadas para la formación de estas tres especies son de 4,8; 5,6 y 8,56 Ma respectivamente. Pero además, vemos que la divergencia dentro de las especies datan de al menos 2,27; 2,06 y 4,55 Ma respectivamente.

Como puede observarse en la Fig.3.21, los intervalos de confianza de 95 % HPD estimados para los subclados D2a y D3b y el clado D4 coinciden temporalmente con las ingresiones marinas del Mioceno que han tenido lugar en la cuenca del Plata.

3.2.4. Reconstrucción de áreas ancestrales

Los distintos escenarios biogeográficos analizados con RASP (S-DIVA, BBM y DEC) están presentados en la Fig. 3.22. El análisis de BBM es el que ha estimado un menor número de áreas ancestrales combinadas. Los tres análisis concuerdan en que el área ancestral del género *Hypostomus* es la región de la cuenca del Amazonas. Sin embargo este resultado hay que tomarlo con precaución dado que en la matriz de distribuciones de las especies *outgroup* fueron todas codificadas como distribuidas en esta cuenca.

Para el clado D1, se observa que la mayor parte de los nodos presentan un área ancestral repre-

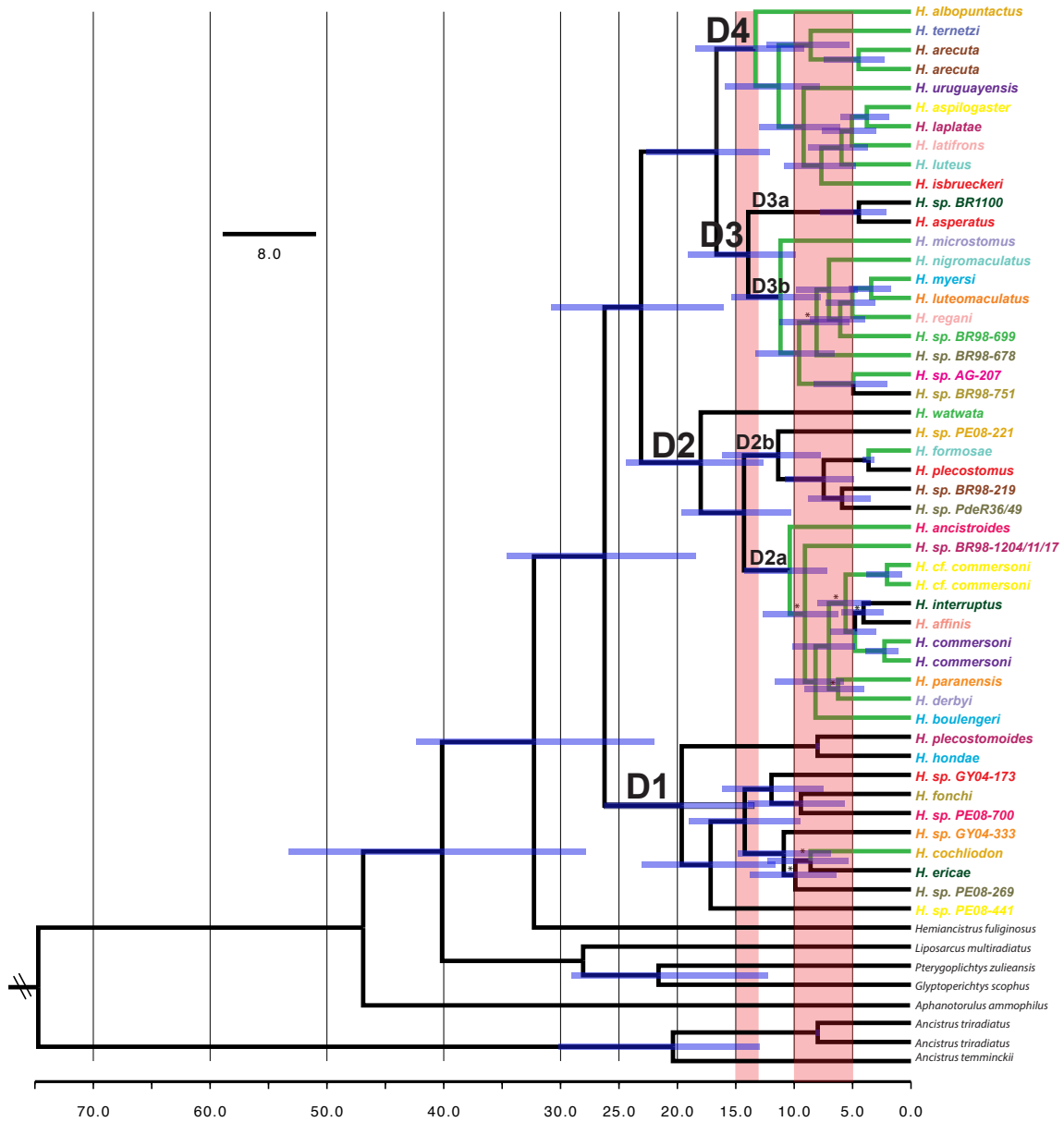


Figura 3.21: Resultados gráficos de los análisis del programa BEAST para el género *Hypostomus*. Las ramas del árbol en verde muestran los clados y especies que habitan en la cuenca del Plata. La escala abarca desde el presente hasta 70 millones de años. Los asteriscos indican nodos con probabilidades posteriores $< 0,75$. Las barras muestran los intervalos de credibilidad del 95%HPD para la estimación de los tiempos de divergencia. Los cuatro grandes clados y subclados del género están indicados. En rojo se indican los dos máximos de inundación de la ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata.

sentada por la región del Amazonas (F). Los análisis de DIVA, BBM y DEC difieren en los nodos más externos de este clado, proponiendo áreas combinadas (DIVA y DEC) para los nodos 91; 92; 94 y 98. Mientras que BBM resuelve estos nodos con áreas ancestrales amazónicas. Dentro de este clado, el nodo 91 representa una relación entre una especie (*H. cochliodon*) de la cuenca del Plata y otra del Amazonas. Todos los análisis proponen un evento de dispersión desde la cuenca del Amazonas hacia la cuenca del Plata como el evento de especiación que ha dado origen a la especie *H. cochliodon*.

Las tres metodologías coinciden en que el clado D2 tiene un origen en la región amazónica o una combinación de áreas en donde esta región está involucrada. Dentro de este clado, el subclado D2a, el cual contiene todas las especies del sur de Sudamérica, tiene como área ancestral a la región del Alto Paraná. Aquí vemos también que la región del sur de Brasil ha jugado un rol importante en los eventos de especiación de este subclado. El subclado D2b, en cambio, tiene una distribución ancestral amazónica. Vemos que la mayor parte de los nodos también contienen esa distribución y que es a partir de allí que las especies se diferencian por eventos de dispersión a otras regiones (Paraguay, norte de Brasil, Guyanas). El nodo 88 que reúne ambos subclados, fue estimado con un área ancestral formada por el Alto Paraná y el Amazonas por DIVA y como amazónica solamente por BBM y DEC.

El clado D3 fue estimado con un área ancestral que comprende en la mayoría de los análisis al Medio Paraná y al Amazonas. BBM propone con mayor probabilidad al área amazónica como única área ancestral, mientras que DEC propone un área combinada con el Medio Paraná, Alto Paraná y Amazonas. Dentro de este clado, el subclado D3b, con especies exclusivamente del Sistema Sur, tiene un área ancestral en el Paraná, DIVA y BBM proponen al Medio Paraná, mientras que DEC propone un área combinada entre Alto y Medio Paraná.

El clado D4 contiene numerosas áreas ancestrales posibles, sin embargo todos los análisis comprenden al Bajo Paraná y al Alto Paraná. Dentro de este clado puede verse que la región del río Uruguay ha jugado un rol importante en la diversificación de las especies.

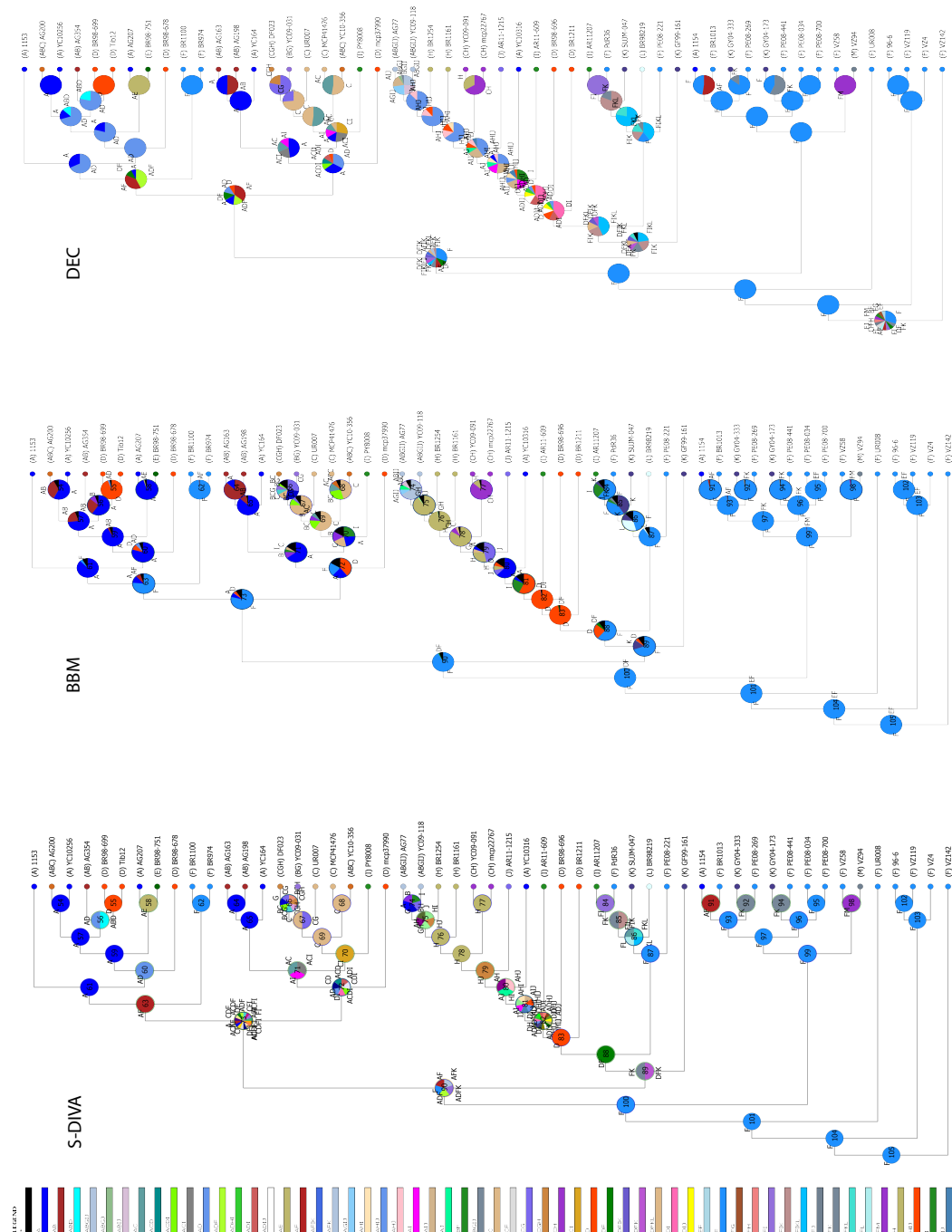


Figura 3.22: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA, BBM y DEC para el género *Hypostomus*. Los tres análisis han sido obtenidos en el programa RASP. Cada región fue codificada con una letra: A=Paraná Medio; B=Paraná Bajo; C=Uruguay; D=Paraná Alto; E=São Francisco; F=Amazonas; G=Río de la Plata; H=ríos costeros del sur; I=Paraguay; J=ríos endorreicos, Salado del norte y Carcarañá; K=ríos del escudo de las Guyanas; L=ríos costeros del norte y M=Lago Maracaibo y río Magdalena. Para una visión gráfica de las áreas, véase la Fig. 5.3.

3.3. Discusión

Considerando al género *Hypostomus* como centro de estudio, este capítulo se enfoca en tres objetivos. El primero es determinar la diversidad de especies de este género en la cuenca del Plata y definir la distribución geográfica de tales especies. El segundo objetivo es conocer la relación filogenética de especies antes definidas. Para este último fin se han realizado análisis basados en cinco marcadores moleculares, dos de ellos mitocondriales y tres nucleares. Se han realizado en total seis reconstrucciones filogenéticas, las primeras cinco con cada marcador separadamente, para luego hacer un análisis donde todos los marcadores han sido analizados simultáneamente. El tercer objetivo de este capítulo ha sido definir la historia biogeográfica del género, para ello se ha calibrado y reconstruido las áreas ancestrales de cada nodo de la filogenia molecular de este grupo. Por lo tanto, esta sección estará organizada de acuerdo a los objetivos antes planteados.

3.3.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Hypostomus* en la cuenca del Plata

Basado en los resultados del marcador mitocondrial D-loop (véase las Figs. 3.4, 3.5 y 3.6) el género *Hypostomus* puede dividirse en al menos 61 especies o linajes diferentes, de las cuales 31 especies habitan la gran cuenca del Plata y 17 de ellas se pueden encontrar en el territorio argentino. Viendo las distribuciones geográficas de las especies definidas anteriormente, notamos que hay zonas de solapamiento en ellas, generando de este modo especies con distribuciones simpátricas y patrones biogeográficos complejos. Sin embargo, se puede afirmar que la cuenca del río Paraná es en donde se encuentra la mayor diversidad de especies para el género *Hypostomus*.

Los resultados obtenidos, han aportado también nueva información a la distribución de las especies de *Hypostomus*, como por ejemplo se publicó en Cardoso *et al.* (2011) donde se hace referencia por primera vez a la especie *H. aspilogaster* para Argentina y en Cardoso *et al.* (2012) donde se extienden varios rangos de distribución para algunas de las especies de este género.

Las distribuciones de las especies *H. luteomaculatus* y *H. uruguayensis* registradas en este trabajo (véase la Tab. 3.1) comprenden las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay. Cabe destacar que estas especies no se encuentran, ni han sido citadas en la literatura, en el Río de la Plata. Por consiguiente, es necesario preguntarse cómo estas especies pueden coexistir en dos cuencas que

hoy en día no presentan ningún tipo de conexión más allá del Río de la Plata. Este mismo patrón de distribución se puede encontrar en la especie *H. ternetzi*, dado que durante este trabajo se ha capturado ejemplares de esta especie en el río Paraná y varios autores la citan para el río Uruguay. Una discusión más detallada de las posibles rutas de conexión entre los ríos Paraná y Uruguay puede verse en Cardoso *et al.* (2012).

3.3.2. Análisis filogenéticos del género *Hypostomus*

El segundo objetivo de este capítulo es estimar la estructura de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Hypostomus*, para ello se ha comenzado con la reconstrucción del árbol filogenético basado en el marcador D-loop mediante tres metodologías diferentes (véase las Figs. 3.4, 3.5 y 3.6). Los tres tipos de análisis han generado árboles con topologías similares donde se puede observar que el género *Hypostomus* es un grupo monofilético que se separa en cuatro grupos diferentes, llamados D1, D2, D3 y D4. Sin embargo, las relaciones entre estos grupos han ido variado según la metodología aplicada, por ejemplo hemos visto que las reconstrucciones por IB y MP coinciden en proponer una relación más estrecha entre los clados D1 y D2. En todos los análisis basados en D-loop, observamos que dentro de cada clado las relaciones interespecíficas no están resueltas en su totalidad y generalmente presentan bajos valores de soporte. No obstante, dentro cada grupo se pueden definir perfectamente subclados, dado que estos se han encontrado mediante los tres tipos de análisis, mostrando, una vez más congruencia en los resultados. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan perfectamente con los datos ya publicados del marcador mitocondrial D-loop para el género *Hypostomus* (Montoya-Burgos *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Cardoso *et al.*, 2012, 2013a).

El segundo análisis filogenético llevado a cabo, se realizó con el gen mitocondrial COI mediante tres metodologías (MV, IB, MP) (véase las Figs. 3.7, 3.8 y 3.9). Estos análisis nuevamente han demostrado la monofilia del género *Hypostomus*. En los análisis de MV e IB se han recuperado los cuatro clados D1, D2, D3 y D4 tal cual se definió en los análisis de D-loop. Estas dos metodologías proponen que los clados D1 y D2 forman un grupo y que D3 y D4 forman otro grupo. En los resultados de MP, también encontramos a los clados D1, D3 y D4, pero el clado D2 no se muestra como un grupo monofilético. Sin embargo, en el árbol de MP, al igual que en los árboles MV e IB, hemos visto que los clados D3 y D4 están más relacionados entre sí que con otros grupos.

En estos análisis, dentro de cada uno de los clados notamos una baja resolución en las relaciones interespecíficas, más aun, varias especies no se presentan con monofilia recíproca. No obstante, dentro de los clados D2 y D3 podemos recuperar las mismas divisiones en subclados propuestos en los análisis de D-loop.

El primero de los marcadores nucleares utilizado en este trabajo fue el gen CDC27. Basándose en las tres metodologías utilizadas, vemos que estas concuerdan en mostrar que el género *Hypostomus*, esta vez, se puede dividir en tres clados, llamados aquí D1', D2' y D3-D4 (véase las Figs. 3.10, 3.11 y 3.12). Este último clado reúne a las especies tanto del clado D3 como del D4 definidos anteriormente con los marcadores mitocondriales. Los clados D1' y D2' se corresponden con los clados D1 y D2, pero difieren en la presencia o ausencia de algunas especies, por ejemplo, vemos a la especie *H. ericae*, correspondiente al clado D1 según los marcadores mitocondriales, según el marcador CDC27 se encuentra dentro del clado D2. También observamos a la especie *H. watwata*, correspondiente al clado D2, fuera de éste. El árbol generado por IB muestra un resultado inesperado dado que en este análisis el género *Hypostomus* no aparece como monofilético. Sin embargo las tres metodologías han propuesto la misma relación entre los clados: D1' se encuentra en la base del género y D2' y D3-D4 se relacionan como grupos hermanos. Dentro del clado D2', vemos que los tres tipos de reconstrucción han coincidido en mostrar la misma división en dos subgrupos, que a su vez concuerdan con la división que se ha planteado con los marcadores mitocondriales. Dentro del gran clado D3-D4, notamos una escasa resolución dentro de las relaciones interespecíficas y vemos, además, que algunas especies no presentan monofilia recíproca.

Los resultados obtenidos con el gen nuclear RAG1, han demostrado mediante las tres metodologías utilizadas que el género *Hypostomus* puede dividirse nuevamente en tres grupos (véase las Figs. 3.13, 3.14 y 3.15). En el árbol inferido por MV, a estos tres grupos se los ha llamado D1, D2 y D3-D4. D1 y D2 se corresponden exactamente con los clados del mismo nombre definidos a partir de los marcadores mitocondriales. D3-D4, al igual que en el análisis basado en CDC27, está compuesto por especies de los clados D3 y D4 de los resultados basados en D-loop y COI. En los árboles de IB y MP basados en RAG1, se han definido nuevos clados llamados D1'' y D2'', estos clados se corresponden a los clados D1 y D2, pero difieren en que el linaje *H. sp.* PE08-221 aparece dentro del clado D1'' y no dentro de D2''. Por otro lado, la reconstrucción por MV, propone que los clados D1 y D2 forman un grupo, mientras que las reconstrucciones por IB y MP muestran una

politomía entre los tres grupos. Nuevamente, dentro de cada uno de los tres clados, las relaciones entre las especies no presentan una alta resolución, existiendo grandes politomías y especies no monofiléticas. Sin embargo dentro de los clados D2 y D2'' vemos la misma división en dos grupos que ha sido propuesta en todos los análisis anteriores.

El último de los genes analizados fue el gen nuclear *Hodz3*. Las tres metodologías de reconstrucción han generado árboles similares en donde observamos que el género *Hypostomus* no aparece como un grupo monofilético, debido a la incorporación de la especie *Hemiancistrus fuliginosus* dentro del clado que reúne a todas las especies de *Hypostomus* (véase las Figs. 3.16 y 3.17). A pesar de ello, en estos resultados, volvemos a encontrar los cuatro grupos definidos con los marcadores mitocondriales (D1; D2; D3 y D4). En esta ocasión, todas las metodologías han propuesto que el clado D3 forma un clado anidado dentro del clado D4, el cual, a su vez se relaciona más con el clado D2, para finalmente encontrar en la base del género al clado D1. Dentro de cada uno de los cuatro clados, se puede ver que la mayoría de las relaciones entre las especies no se han podido resolver. Además, este es el primer resultado donde no se puede dividir al clado D2 en sus dos subgrupos debido a la gran politomía que presenta este clado.

Con el objetivo de obtener una hipótesis filogenética robusta del género *Hypostomus*, se ha realizado un análisis con el conjunto de los datos moleculares disponibles, analizando los cinco genes simultáneamente en un alineamiento de evidencia total. Las tres metodologías han propuesto topologías de árboles muy similares (véase las Figs. 3.18, 3.19 y 3.20), donde vemos al género *Hypostomus* formando un grupo monofilético que puede ser dividido en cuatro grupos, llamados D1, D2, D3 y D4. Estos clados se corresponde exactamente con los clados del mismo nombre definidos en los análisis anteriores basados en los mismos genes pero de manera independientes. Los tres análisis de genes concatenados proponen que el clado D1 se encuentra en la base del género y que luego se diferencia el clado D2, para finalizar con los clados D3 y D4 que se presentan como grupos hermanos. Dentro de cada uno de los clados, podemos observar que en estos análisis se resuelven prácticamente la totalidad de las relaciones interespecíficas, muchas de ellas con valores de soporte elevados. Además, se puede ver que aparecen nuevamente las subdivisiones para los clados D2, D3 y D4 que se habían propuesto originalmente en los análisis basados en los genes mitocondriales. A pesar de ello, hemos visto que las tres metodologías difieren en algunas relaciones interespecíficas, proponiendo diferentes pares de especies hermanas, por ejemplo, vemos que según

la reconstrucción de MV la especie *H. formosae* es hermana del linaje *H. sp.* PdeR36/49 (50%BB), mientras que en los árboles IB y MP, *H. formosae* aparece como hermana de *H. plecostomus* (1 PP y 93 JN). Con el objetivo de obtener el árbol final para el género se ha realizado el test de topologías, el cual ha permitido concluir que la reconstrucción filogenética que mejor se ajusta a nuestros datos es aquella obtenida por MV, siendo entonces este árbol el que se utilizará en los análisis biogeográficos presentados en el capítulo 7 de este trabajo.

Como se ha visto y discutido en cada uno de los seis análisis realizados, todos los árboles inferidos para el género *Hypostomus* son compatibles entre sí. Como era de esperar, a lo largo de este capítulo se ha notado que los marcadores mitocondriales han permitido una mejor resolución de los diferentes grupos dentro del género. Por contraste, en los análisis basados en marcadores nucleares no se ha encontrado la monofilia recíproca de los clados D3 y D4 ni tampoco de algunas especies. Esto se debe, sin lugar a duda, al hecho de que los marcadores mitocondriales tienen una mayor tasa de mutación que los marcadores nucleares. Sin embargo, cuando nos enfocamos en un marco microevolutivo, vemos que la resolución en las relaciones interespecíficas solo la encontramos dentro del análisis de genes concatenados, donde se dispone de una base de datos mucho mayor que en los análisis de cada gen por separados. La explicación de este fenómeno puede deberse a que dentro del género *Hypostomus* la mayor parte de los eventos de especiación han tenido lugar recientemente y las especies no han tenido tiempo de divergencia suficiente para acumular mutaciones a través del mecanismo de deriva génica.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan perfectamente con los datos ya publicados del marcador mitocondrial D-loop para el género *Hypostomus* (Montoya-Burgos *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Carvalho, 2006; Cardoso *et al.*, 2012; JacotdesCombes, 2012; Cardoso *et al.*, 2013a). En estos trabajos, ya se han discutido y analizado los cuatro grupos que dividen a este género, sin embargo, nuestros resultados, al ser más abarcativos en la cantidad de genes analizados y en número de especies utilizadas, han permitido inferir una filogenia donde la mayor parte de las relaciones están resueltas con valores de soporte muy elevados, generando de este modo el árbol más robusto para el género *Hypostomus* (véase las Figs. 3.18, 3.19 y 3.20). No obstante, es interesante discutir el poder de resolución del marcador D-loop para la reconstrucción de la filogenia de este género. A pesar de que el D-loop solamente contiene alrededor de 550 pb (vs. 850 pb de COI y 1000-1100 pb de los marcadores nucleares aproximadamente) con este marcador podemos

obtener una buena aproximación de la historia evolutiva del género y de la posición de cualquier especie dentro de éste con una elevada precisión.

Según nuestros árboles filogenéticos los clados D3 y D4 del género *Hypostomus* están altamente relacionados (véase las Figs. 3.18, 3.19 y 3.20). Este resultado está sustentado también por datos morfológicos. Siguiendo el trabajo de Muller & Weber (1992), las especies que componen los clados D3 y D4 comparten ciertas similitudes entre ellas, como por ejemplo, la presencia de puntos blancos en el cuerpo, que generalmente es más oscuro; mandíbulas anchas y gran número de dientes. Estos autores definieron a este conjunto de especies con el nombre grupo *regani*. Al resto de las especies, que presentaban el cuerpo con puntos oscuros sobre un fondo claro, mandíbulas angostas y escaso número de dientes, las definieron como representantes del grupo llamado grupo *plecostomus*. Este último grupo morfológico corresponde a las características encontradas en las especies que componen el clado D2 definido según nuestros análisis filogenéticos. Por otra parte, estudios basados en citología muestran que algunas de las especies del grupo *regani* tienen un número de cromosomas cercano a 72 (*H. regani* $2n = 72$, *H. albopunctatus* y *H. myersi* $2n = 74$) y que algunas especies del grupo *plecostomus* tienen un número cromosómico cercano a 68 (*H. ancistroides*; *H. derbyi* y *H. commersonii* $2n = 68$) (Zawadzki *et al.*, 2004). Esta información sugiere que los grupos propuestos por Muller & Weber (1992) están bien soportados por datos cromosómicos y filogenéticos. Es interesante notar que dentro de esta discusión de grupos morfológicos que hacen Muller & Weber (1992), no se nombra o caracteriza el llamado grupo *cochliodon*, quedando de este modo como un tercer grupo. Este último grupo se define morfológicamente por presentar un reducido número de dientes en forma de cuchara, los miembros de este grupo han sido considerados dentro del género *Hypostomus* recientemente cuando el género *Cochliodon* fue considerado sinónimo junior de *Hypostomus* (Montoya-Burgos *et al.*, 2002) (para una revisión del grupo *cochliodon* véase Armbruster (2003b)). Los resultados moleculares obtenidos en este trabajo, concuerdan perfectamente con la división de los tres grupos morfológicos-citológicos definidos más arriba, encontrando que el clado D1 representa al grupo *cochliodon* en la base del género; el clado D2 al grupo *plecostomus* y los clados D3 y D4 al grupo *regani* (véase las Figs. 3.18, 3.19 y 3.20).

Para finalizar esta sección, es importante notar, que la diversidad de la cuenca del Plata se ve reflejada en los cuatro clados que dividen al género *Hypostomus*. Dentro del clado D1, vemos solamente una especie que corresponde a esta cuenca. Dentro del clado D2, vemos ocho especies.

Dentro del clado D3 hay nueve especies, mientras que en el clado D4 vemos la mayor diversidad, con once especies que habitan la cuenca del Plata. Este número de especies resulta subestimado mientras haya nuevas especies por descubrir o alguna de éstas se haya extinguido. Sin embargo, no solo el conocimiento del número de especies es importante en la evaluación de la diversidad, si no que también, es indispensable conocer la historia evolutiva mediante la cual esa diversidad fue generada.

3.3.3. Procesos de diversificación en la cuenca del Plata

En esta sección se han abordado varios análisis que permiten estimar los eventos que han podido ser la causa de la diversificación de las especies de *Hypostomus* en la cuenca De Plata, a través de las perspectivas temporal y espacial.

Según los resultados observados, la filogenia de *Hypostomus* puede dividirse en cuatro clados (véase las Figs. 3.18 y 3.21). Dado que en cada clado se incluye al menos una especie que habita en el sistema Sur - el cual comprende a la cuenca del Plata, a los ríos costeros del sur y la cueca del río São Francisco - y de especies del Sistema Norte -comprendiendo a la cuenca del Amazonas, Guyanas y los ríos costeros del norte - se puede deducir que una especiación alopátrica entre sistemas o intercuenca ha participado de la diversificación de las especies de *Hypostomus* de la cuenca del Plata. Además, se ha observado que varios linajes con múltiples especies habitan la cuenca del Plata (en clados D2, D3 y D4 de las Figs. 3.18 y 3.21). Este resultado indica que algún proceso de especiación ha tenido lugar dentro de esta cuenca generando diversidad.

■ Análisis intercuenca

El análisis biogeográfico de la relación intercuenca dentro del clado D1 muestra que la especie *H. cochliodon* de la cuenca del Plata es la especie hermana de *H. ericae* cuya distribución es la cuenca del río Amazonas (véase la Fig. 3.18). Nuestros resultados de calibración indican que este evento de especiación puede ser fechado en 8,6 Ma (véase la Fig. 3.21). Las reconstrucciones de áreas ancestrales proponen un área ancestral amazónica para estas dos especies con un evento de dispersión hacia la cuenca del Plata. Para poder explicar este suceso, nos vemos obligados a suponer conexiones temporales entre las cuencas del Plata y Amazonas posteriores a las fechas de separación de estas cuencas (que se remonta a 30 Ma con la elevación del Arco Michicola) (Lundberg *et al.*, 1998). Dada la distribución de las

especies involucradas, las conexiones temporales deben haber sido entre el Alto Paraná y los afluentes del sur de la cuenca del Amazonas. Cuando estas conexiones temporales finalizan, el aislamiento de las poblaciones en cada cuenca debe haber resultado en una especiación alopátrica que dio lugar a las especies *H. cochliodon* y *H. ericae*. Estas mismas conclusiones han sido presentadas en Cardoso *et al.* (2012), aunque en ese trabajo solo se ha utilizado al marcador D-loop para la construcción de la filogenia del género y para la calibración. La nueva información adicionada en este trabajo de tesis da mayor soporte a la hipótesis planteada por Cardoso *et al.* (2012)

Es muy interesante notar que el evento de especiación que ha dado lugar a *H. cochliodon* en la cuenca del Plata, no sólo ha permitido el incremento en el número de especies observadas en esta cuenca, si no que también ha generado diversidad en cuanto a los grupos morfológicos del género definidos según Muller & Weber (1992) y Armbruster (2003b).

Los resultados dentro del clado D1, también demuestran que es la región del río Amazonas la que ha dado origen a una gran parte de las especies de otras regiones como por ejemplo la región de las Guyanas, con conexiones que datan entre los 15-10 Ma (véase las Fig. 3.21 y 3.22).

Cuando observamos al clado D2 (véase las Figs. 3.18 y 3.21), vemos que la primera especie en diferenciarse es *H. watwata* mostrando nuevamente una relación estrecha entre la región de las Guyanas y el Amazonas, pero esta vez más antiguas que las nombradas anteriormente (18 Ma). El clado D2 presenta dos subclados: D2a con representantes del Sistema Sur y el subclado D2b con la mayoría de las especies del Sistema Norte. Sin embargo, la fecha estimada para la separación de ambos subclados es de 14,3 Ma, en este período parece haber tenido lugar una separación entre ambas cuencas dado que en la Fig. 3.22 vemos que a este nodo le corresponde un área ancestral que abarca tanto el Alto Paraná como el Amazonas, sugiriendo un evento de vicariancia entre ambos clados. Una vez que estos desplazamientos han terminado, las poblaciones en cada una de las cuencas han ido evolucionando de manera aislada hasta obtener su completa diferenciación. Este evento coincide temporalmente con el primer máximo de inundación registrado para la cuenca del Plata (Hernández *et al.*, 2005). Generalmente, para el Neotrópico, se acepta que los períodos de alto nivel del mar son concomitantes con los períodos de grandes lluvias. Es por ello que podemos postular que

durante la ingresión marina del Mioceno, podrían haberse generado conexiones temporales entre ambos sistemas debido al incremento de lluvias en el continente. Estas conexiones temporales podrían haber generado rutas de dispersión para las especies, la cuales podrían haber provocado diferenciación alopátrica en este clado.

Por otro lado, dentro del subclado D2b observamos a la especie *H. formosae*, la cual habita la cuenca del río Paraguay dentro de la gran cuenca del Plata en estrecha relación con otras especies pertenecientes al sistema norte. La relación de *H. formosae* varía según el análisis utilizado, apareciendo como hermana del linaje *H. sp. PdeR36/49* (según MV, Fig. 3.18) o de la especie *H. plecostomus* (según IB, Fig. 3.19). La fecha de especiación entre *H. formosae* y *H. plecostomus* (3,5+/- 0,2 Ma) ha sido uno de los puntos de calibración de nuestro análisis. Los análisis de áreas ancestrales demuestran que el nodo (84 de la Fig. 3.22) que une a *H. sp. PdeR36/49* y *H. formosae* posee un rango de distribución amazónico-Paraguay, proponiendo un evento de geodispersión seguido de un evento de vicariancia. Es decir, el ancestro común a las dos especies primeramente se dispersó desde la cuenca del Amazonas hacia el río Paraguay y luego un evento de vicariancia separó ambas regiones. Estos resultados coinciden plenamente con las eventos de captura de cabeceras del Amazonas por parte del Pilcomayo (Kennan *et al.*, 1997) y concuerdan con nuestra decisión de utilizar las fechas del último desplazamiento del límite entre el Amazonas y Pilcomayo para estas especies.

En el clado D3 (véase las Figs. 3.18 y 3.21) las especies del Sistema Sur están agrupadas dentro del subclado D3b, mientras que el subclado D3a está compuesto por dos especies con distribución amazónica. El origen de estos dos subgrupos ha sido datado en 13,94 Ma. Esta estimación coincide perfectamente con el primer máximo de inundación registrado para la cuenca del Plata (15-13 Ma)(Hernández *et al.*, 2005). Los análisis de áreas ancestrales han propuesto para el nodo (63 de la Fig. 3.22) que une ambos subclados, una región ancestral que comprende tanto al Amazonas como al Medio Paraná (DIVA y BBM) y estas dos áreas más el Alto Paraná (DEC). Proponiendo luego un evento de diferenciación entre Amazonas y Medio Paraná y entre Amazonas y Medio-Alto Paraná según la metodología. Es interesante notar que la división en subclados dentro del clado D3 coincide temporalmente (14,8 y 13,94 Ma) y geográficamente (Amazonas y Medio-Alto Paraná) con la divergencia dentro del clado D2. Esto permite suponer que posiblemente un mismo evento ha podido generar ambas

divergencias dentro del género.

Dentro del clado D4, el análisis de genes concatenados no muestra especies pertenecientes del Sistema Norte (véase la Fig. 3.18). Sin embargo hemos visto en el análisis filogenético basado en el marcador mitocondrial D-loop que en este clado se presenta la especie *H. johnii* (véase las Figs. 3.4, 3.5 y 3.6). Como se ha señalado anteriormente, esta especie no pudo ser amplificada para el resto de los marcadores utilizados en el análisis de genes concatenados. No obstante, se podría afirmar con cierto grado de confianza que *H. johnii* pertenece al clado D3, pero no podemos inferir la fecha de especiación ni las áreas ancestrales del nodo que reúne esta especie con el resto de las especies del clado D3. En recientes publicaciones se ha utilizado al marcador D-loop como base de una calibración del género *Hypostomus*, en Montoya-Burgos (2003) la especiación de *H. johnii* fue estimada en 11,8 Ma, mientras que en Cardoso *et al.* (2012), esta especiación fue inferida en 9,3 Ma e interpretada como otro evento de dispersión más reciente a través de conexiones temporales entre ambas cuencas, tal como hemos visto en los clados D1 y D2b.

En resumen, nuestros resultados y la bibliografía citada, sugieren que al menos cuatro eventos independientes de especiación alopatrica tuvieron lugar entre el Sistema Norte y el Sistema Sur. En el clado D2 y D3 estos eventos de especiación alopatrica podrían explicarse por conexiones temporales entre el Amazonas y el Medio-Alto Paraná durante periodos de grandes lluvias hace 14,3-13,9 Ma. Como indica el clado D1 una especiación alopatrica más reciente ocurrió mediante conexiones temporales entre los afluentes del sur del Amazonas y Medio Paraná. Estos resultados no parecen sorprendentes, dado que ya se ha documentado para otros grupos de peces recientes intercambios entre la cuenca del Amazonas y del Plata. Por ejemplo, Sivasundar *et al.* (2001), encuentran que hace 2,3 y 4,1 Ma las especies del género *Prochilodus* han intercambiado cuencas. Además, otros eventos de dispersiones recientes entre estas cuencas fueron ejemplificadas con los rangos distribución de *Pygocentrus nattereri* (Hubert *et al.*, 2007) y de *Pseudotyloturus augusticeps* (Lovejoy & Araújo, 2000). Estos trabajos y nuestros resultados sugieren que las conexiones temporales entre el Amazonas y la cuenca del Plata pueden ser más frecuentes de lo que previamente se pensaba.

■ Análisis intracuenca.

Con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, podemos asumir que una parte de la diversidad del género *Hypostomus* dentro de la cuenca del Plata debe haber sido moldeada por fuerzas evolutivas que han actuado en el interior de esta cuenca, dando lugar a lo que se ha decidido llamar especiación intracuenca.

En el clado D2, vemos que el subclado D2a contiene siete especies que habitan exclusivamente la cuenca del Plata (véase las Figs. 3.18 y 3.21). Cinco de los siete eventos de especiación de este subclado fueron datados entre los 9-4,8 Ma, según nuestro reloj molecular (véase la Fig. 3.21). Estas fechas coinciden con el segundo evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (10-5 Ma) (Hernández *et al.*, 2005) en la cuenca del Plata. La extensa incursión marina en la cuenca del río Paraná, ha podido aislar a muchos de los tributarios de esta cuenca, generando varias especiaciones alopátricas por medio de vicariancia en diferentes grupos de peces estrictamente de agua dulce. Una vez que el mar se retiró las nuevas especies pudieron haber dispersado a lo largo de toda la cuenca del Plata, enriqueciendo, de este modo, la diversidad de especies endémicas a esta región. Según nuestros análisis de áreas ancestrales, el área ancestral de las especies de la cuencas del Plata dentro del clado D2a fue reconstruida por los dos de las metodologías (DIVA y BBM) como el Alto Paraná. Este resultado se ajusta a los resultados que presentan Hernández *et al.* (2005), dado que no hay indicios de que dicha región haya sido afectada por la segunda gran inundación de la ingresión marina del Mioceno. Es importante notar que dentro de este subclado hay dos especies de los ríos del sur de Brasil (*H. affinis* y *interruptus*), los cuales no son propiamente parte de la cuenca del Plata. La relación de las especies entre ambas regiones y la reconstrucción de las áreas ancestrales demuestran que los ríos costeros del sur de Brasil ha podido jugar un rol importante como refugio de las especies durante la ingresión marina (véase los nodos 79; 78; 76 y 75 de la Fig. 3.22).

En el clado D3, observamos que los miembros de subclado D3b contiene ocho especies que habitan la cuenca del Plata (véase las Figs. 3.18 y 3.21). Seis de los ocho eventos de especiación de este subclado fueron datados entre los 9,58-4,94 Ma, según nuestro reloj molecular (véase la Fig. 3.21). Estas fechas coinciden también con el segundo evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (10-5 Ma) (Hernández *et al.*, 2005) dentro de la cuenca del Plata, quedando excluidos el evento de especiación que dió lugar *H. microstomus*

el cual fue datado en 11,17 Ma, y la separación entre *H. myersi* y *H. luteomaculatus* que fue estimada en 3,41 Ma. Según los análisis biogeográficos, a este subclado D3b le corresponde un área ancestral ubicada en el Paraná Medio (según DIVA y BBM) y Paraná Medio-Paraná Alto (según DEC) (véase la Fig. 3.22). Este último resultado estaría en concordancia con los datos que presentan Hernández *et al.* (2005), dado que la segunda gran inundación de la ingresión marina del Mioceno no habría afectado a la región del Alto Paraná ni a gran parte del Paraná Medio. También dentro de este subclado D3b vemos al linaje *H. sp.* BR98-751 el cual habita la cuenca del río São Francisco, Brasil. Las relaciones filogenéticas y las reconstrucciones de áreas permiten afirmar que un evento de colonización se produjo desde el Paraná hacia el río São Francisco hace 4,94 Ma. Este resultado concuerda con los obtenidos en los trabajos de Montoya-Burgos (2003) y Cardoso *et al.* (2012), los cuales estaban basados solamente en el marcador mitocondrial D-loop.

En el clado D4 el nodo que contiene a todas las especies que habitan la cuenca del Plata fue datado, según nuestros resultados de calibración, en 13,32 Ma, y ha dado lugar a la diversificación de al menos nueve especies en esta cuenca (véase las Figs. 3.18 y 3.21). La fecha estimada aquí, coincide con el primer evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (Hernández *et al.*, 2005). Sin embargo vemos que cinco de los eventos de especiación de este clado corresponden al segundo evento de gran inundación de dicha ingresión marina, demostrando que este evento de fragmentación del hábitat ha jugado un rol muy importante en la diversificación de las especies de este clado. Los análisis biogeográficos han dado muy poca resolución sobre el área ancestral de este clado (véase el clado 72 de la Fig. 3.22), pero se observa que en varios nodos dentro del clado, el río Uruguay podría ser considerado como un refugio durante la ingresión marina (véase los clados 66-70 de la Fig. 3.22).

Nuestros resultados dejan en evidencia que el origen de la diversidad de especies del género *Hypostomus* dentro de la cuenca del Plata concuerda temporalmente y geográficamente con la transgresión marina del Mioceno. Tal como propone la hipótesis de los museos, la gran diversidad de especies de agua dulce de este género, debe haberse originado a partir de una fragmentación alopátrica durante los períodos de alto nivel del mar, antes de dispersarse a su actual área de distribución (Fjeldsø, 1994). El alto grado de especies endémicas observado

en la cuenca del Plata concuerda con los resultados discutidos en Hubert & Renno (2006). Según estos autores, dentro de esta área debe haber existido uno o varios refugios donde las especies se resguardaron durante las ingresiones marinas. Nuestros análisis han permitido estimar dichos refugios para los diferentes clados, sin embargo, para obtener conclusiones robustas de donde las especies se resguardaron durante las ingresiones marinas es necesario obtener las evidencias geológicas y paleontológicas que lo confirmen.

3.4. Consideraciones finales

En este capítulo, los resultados basados en el marcador mitocondrial D-loop y en la distribución de las especies permiten afirmar que de las 61 especies de *Hypostomus* analizadas, 31 de ellas habitan en el Sistema Sur y 17 de estas especies se encuentran actualmente en los ríos de Argentina. Hemos visto que la cuenca que presenta la mayor diversidad de especies es la del río Paraná y que las especies de distribución más amplia son *H. commersoni* y *H. aspilogaster*.

Los seis resultados filogenéticos realizados (dos basados en genes mitocondriales, tres en genes nucleares y uno basado en el conjunto de los cinco marcadores), han demostrado que el género *Hypostomus* forma un grupo monofilético que puede dividirse en cuatro clados, llamados D1, D2, D3 y D4. La relación entre estos clados ha sido variables según los análisis, sin embargo, los árboles de genes concatenados, donde se presenta la mayor evidencia, permiten proponer que el clado D1 se encuentra en la base del género, que luego se diferencia del clado D2 para finalizar con el par D3 y D4 que se presentan como grupos hermanos.

El clado D1 está compuesto por las especies que forman parte del grupo morfológico *H. cochlodon*. Dentro de este clado vemos solamente un representante de la cuenca del Plata. El clado D2 está compuesto por las especies que pueden definirse como grupo *plecostomus*. Este clado, a su vez se puede dividir en dos subclados: D2a, compuesto principalmente por especies de la cuenca del Plata y el clado D2b que contiene en su mayoría a especies de la cuenca del Amazonas y de las Guayanas, sin embargo, dentro de este clado vemos a la especie *H. formosae* descrita para la cuenca del río Paraguay a lo largo de este trabajo de tesis. El clado D3 también se puede dividir en dos subclados: D3a y D3b, encontrándose todas las especies de la cuenca del Plata en el subclado D3b. Por último el clado D4 es el clado que contiene la mayor diversidad de especies para el Sistema

Sur. El conjunto de los clados D3 y D4 representan al grupo *regani* definido por datos morfológicos y cromosómicos.

Por otro lado, se ha analizado que la diversidad de especies de *Hypostomus* dentro de la cuenca del Plata es modulada por dos procesos diferentes. El primero de ellos es una diversificación intercuenca, el cual ha generado grupos de especies que habitan diferentes cuencas como resultado de eventos de dispersión entre el Sistema Sur y el Sistema Norte. En este contexto, los cambios paleohidrológicos durante el Mioceno deben haber promovido rutas de dispersión y posteriores eventos de vicariancia que han permitido alcanzar un alto nivel de diversificación de especies en los peces neotropicales. El otro proceso que modeló la diversidad de especies de *Hypostomus* es una especiación intracuenca, la cual produjo grupos de especies dentro de la cuenca del Plata debido a la fragmentación del hábitat. Se ha demostrado que el origen de la diversidad dentro de la cuenca del Plata concuerda temporal y geográficamente con la incursión marina del Mioceno. Tal como propone la hipótesis de los museos, esta ingresión marina debe haber fragmentado dicha cuenca provocando numerosos procesos de especiación alopátrica simultáneos, explicando de esta manera, la alta diversidad de esta cuenca. La biogeografía histórica del género *Hypostomus* permite argumentar que diferentes cambios hidrogeológicos y cambios en el nivel del mar han influenciado fuertemente los eventos cladogenéticos observados en la filogenia de este género.

CAPÍTULO 4

El género *Loricariichthys*

En este capítulo se estudiará al género *Loricariichthys* en la cuenca del Plata. En un primer apartado se detallarán aspectos taxonómicos, se evaluará la diversidad de este género y su distribución geográfica. En una segunda etapa se mostrarán y discutirán los análisis filogenéticos realizados para este género. Basándose en los datos filogenéticos del marcador COI y a modo de un estudio exploratorio se ha realizado la calibración de la filogenia, así como también la reconstrucción de las áreas ancestrales para este género.

4.1. Introducción

El género *Loricariichthys* pertenece a la subfamilia Loricariinae dentro de la familia Loricariidae. Esta subfamilia está dividida a su vez en dos tribus: Harttiini y Loricariini (Covain & Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008). Covain & Fisch-Muller (2007) propusieron una nueva clasificación donde definen a cuatro grupos morfológicos dentro de la tribu Loricariini: el grupo *Pseudohemiodon*, el grupo *Loricaria*, el grupo *Rineloricaria* y el grupo *Loricariichthys*. Como parte de este último grupo, el género *Loricariichthys* se caracteriza por tener el labio inferior bien desarrollado, de apariencia lisa con dos estructuras semejantes a gruesas almohadillas (véase la Fig. 4.1). Los machos presentan un gran dimorfismo sexual que incluye la hipertrofia del labio para in-



Figura 4.1: Algunas especies del género *Loricariichthys* presentes en Argentina.

cubar los huevos durante el período reproductivo. Los integrantes del género *Loricariichthys* tienen dientes escasamente desarrollados, abdomen totalmente cubierto con placas y poseen un órgano accesorio con función respiratoria que consiste en un bolsillo conectado al esófago. Este carácter fue observado en las especies *L. platymetopon*, *L. anus*, *L. castaneus*, *L. melanocheilus* y *L. rostratus*, pero según Reis & Pereira (2000), su generalidad y valor filogenético aún están siendo analizados. A pesar de que este género está muy bien diagnosticado, las especies son muy similares y difíciles de identificar.

De acuerdo a la tesis doctoral de Rodriguez (2003) en la Argentina estaría confirmada la presencia de seis especies de *Loricariichthys*: *L. anus*, *L. edentatus*, *L. labialis*, *L. melanocheilus*, *L. platymetopon* y *L. rostratus*. *Loricariichthys castaneus* está citada solamente para los arroyos de la costa del sureste de Brasil, entre el sur de São Paulo y el norte de Espírito Santo, incluyendo a la cuenca del río Paraíba do Sul. De este modo, solamente siete especies de *Loricariichthys* estarían presentes en el sur de Sudamérica (Reis & Pereira, 2000).

4.2. Resultados

4.2.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Loricariichthys* en la cuenca del Plata

La Fig. 4.2 muestra las localidades en donde se ha logrado colectar tejidos y/o ejemplares del género *Loricariichthys* a partir de muestreos y colaboraciones. En total se han obtenido aproxima-

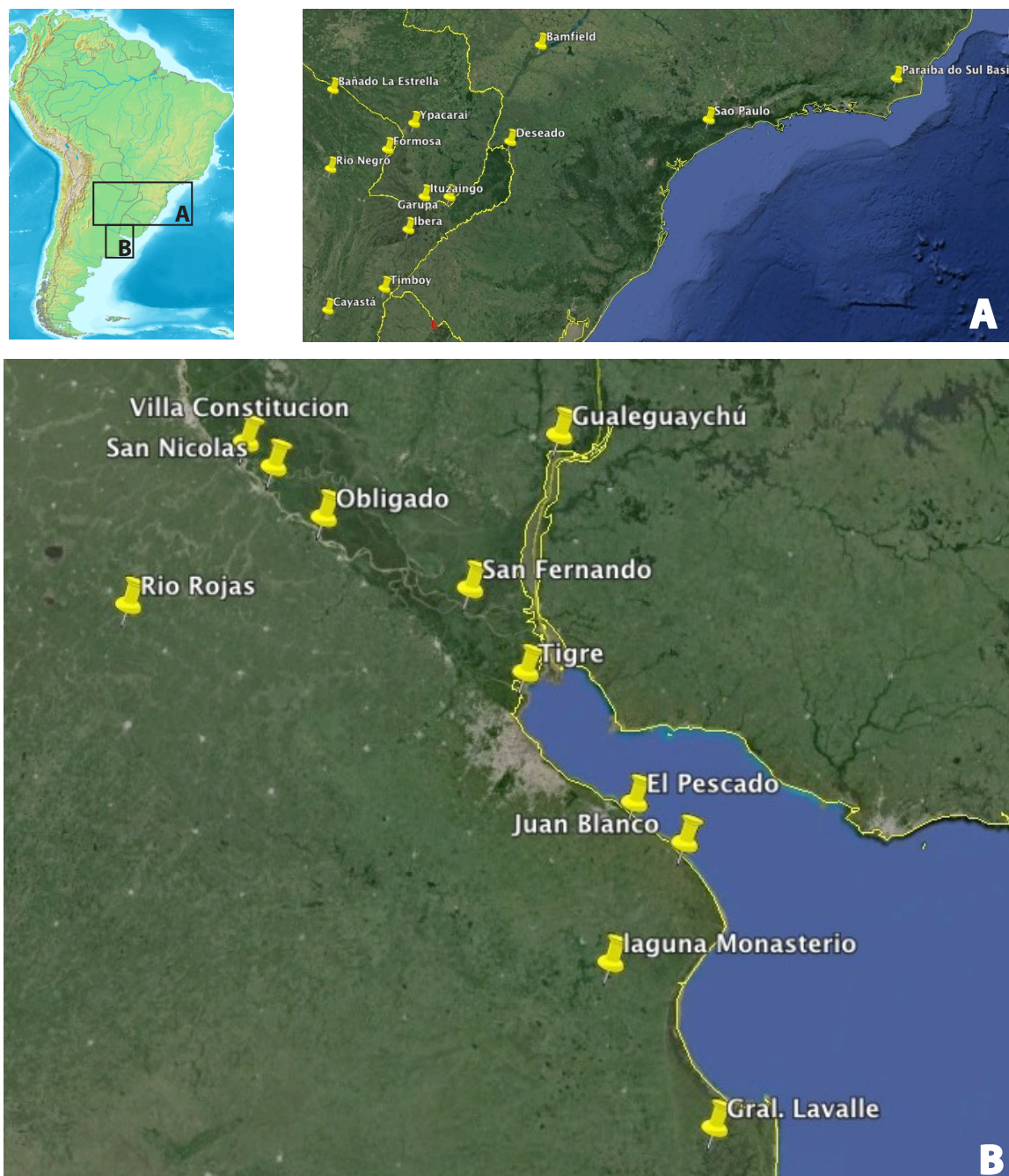


Figura 4.2: Mapa con las localidades de los ejemplares utilizados del género *Loricariichthys*. Ver más detalles sobre la determinación taxonómica y los puntos de muestreos en el apéndice A. La mayor parte de los puntos están ubicados según los datos geo-referenciados registrados durante las campañas de muestreo. Para la realización del mapa se utilizó el programa Google Earth.

damente 80 tejidos que se depositaron en el Banco de Tejidos y ADN del Lab. de Ecología Molecular del CREG, en el MACN o en el ILPLA. En el apéndice A se puede observar la determinación taxonómica y la localidad de cada tejido y/o ejemplar utilizado en los análisis.

La diversidad dentro del género *Loricariichthys* fue evaluada mediante dos técnicas diferentes. La primera de ellas fue la determinación morfológica clásica de medidas y conteos (ver más detalles en la sección 2.5) basándose en las claves de determinación publicadas (Reis & Pereira, 2000). Para muchos de los ejemplares capturados no fue posible llegar a una determinación específica, por ello fue necesario implementar como herramienta de caracterización/limitación de especies al marcador mitocondrial COI.

Cada especie fue definida como un grupo monofilético definido en las reconstrucciones filogenéticas, y en lo posible, acompañada de aspectos morfológicos que puedan caracterizarlo. Además, se implementó el porcentaje de divergencia genética basado en el marcador COI, calculado a partir del modelo K-2P.

Según nuestros resultados moleculares basados en los árboles del COI (véase las Figs. 4.4, 4.5 y 4.6), en el sur de Sudamérica habitan al menos seis especies bien diferenciadas: *L. anus*, *L. castaneus*, *L. labialis*, *L. melanocheilus*, *L. platymetopon* y *Loricariichthys* sp. Este resultado fue obtenido gracias a la secuenciación de al menos un ejemplar por localidad y por morfotipo. Otra modo de evaluar la diversidad de especies fue mediante el criterio de distancias genéticas ínter e intraespecíficas calculados con el modelo K-2P. Los valores de divergencia intraespecíficos fueron de 0,32-0,67% (ver la diagonal de la Tab. 4.1). Como solamente se obtuvo una secuencia de *L. labialis*, la divergencia intraespecífica de esta especie no se pudo calcular. Los valores interespecíficos entre las especies definidas según el árbol basado en COI, han sido de 2,17-11,70% (véase la Tab. 4.1).

Según nuestros resultados, la distribución de cada una de las especies puede resumirse en la Tab. 4.2. Como se observa, las especies de más amplia distribución son *L. melanocheilus*, *L. platymetopon* y *L. anus*, ocupando cada una de ellas dos cuencas. Por otro lado, a excepción del Río de la Plata, el resto de las cuencas alberga dos especies, ésto demuestra que la diversidad de especies en la región es más bien homogénea. Los ríos de la costa sur de Brasil (por ejemplo: Paraíba do Sul) no son parte, hidrogeológicamente, de la cuenca del Plata. Por lo tanto, las especies de la cuenca del Plata serían solamente cuatro. Sin embargo, desde el punto de vista ictiológico, las conexiones

Tabla 4.1: Distancias genéticas para el género *Loricariichthys* calculadas a partir del modelo K-2P. En la diagonal de la tabla, en negrita, se ven las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Los valores son en %.

	<i>L. labialis</i>	<i>L. melanocheilus</i>	<i>L. platymetopon</i>	<i>L. sp.</i>	<i>L. castaneus</i>	<i>L. anus</i>
<i>L. labialis</i>	-					
<i>L. melanocheilus</i>	2.17	0.32				
<i>L. platymetopon</i>	9.13	11.08	0.64			
<i>L. sp.</i>	4.43	4.58	11.70	0.67		
<i>L. castaneus</i>	4.33	5.14	11.25	2.39	0.32	
<i>L. anus</i>	3.54	4.76	11.13	2.69	2.56	0.46

Tabla 4.2: Distribución de las especies del género *Loricariichthys*. La "X" significa que la especie en cuestión habita la cuenca o subcuenca indicada.

	Alto Paraná	Medio Paraná	Bajo Paraná	Uruguay	Río de la Plata	Paraguay	ríos costeros del sur
<i>L. labialis</i>						X	
<i>L. melanocheilus</i>	X	X	X	X			
<i>L. platymetopon</i>	X	X	X			X	
<i>L. sp.</i>							X
<i>L. castaneus</i>							X
<i>L. anus</i>				X	X		

de los ríos de la costa sur de Brasil y la cuenca del Plata es aún incierta.

A lo largo de esta tesis no se ha podido coleccionar tejidos o ejemplares de *L. edentatus* ni de *L. rostratus*, dos especies descritas para la cuenca del Plata, faltando de esta manera la incorporación de estas especies en los análisis filogenéticos y en la identificación genética. Sin embargo, también sería necesario un análisis morfológico exhaustivo para los ejemplares de las especies *Loricariichthys* sp. Esto no se ha podido realizar dado que los ejemplares *voucher* de esta especie están depositados en una colección brasileña a la cual no se ha podido acceder.

Es interesante notar que no se ha obtenido ningún ejemplar de *Loricariichthys* en el sistema de ríos de Mar Chiquita, a pesar de que se ha muestreado de manera exhaustiva esta región. Sin embargo el género ha sido citado para el río Dulce al norte de la ciudad de Córdoba (Liotta, 2005), lo cual resultaría muy interesante de confirmar.

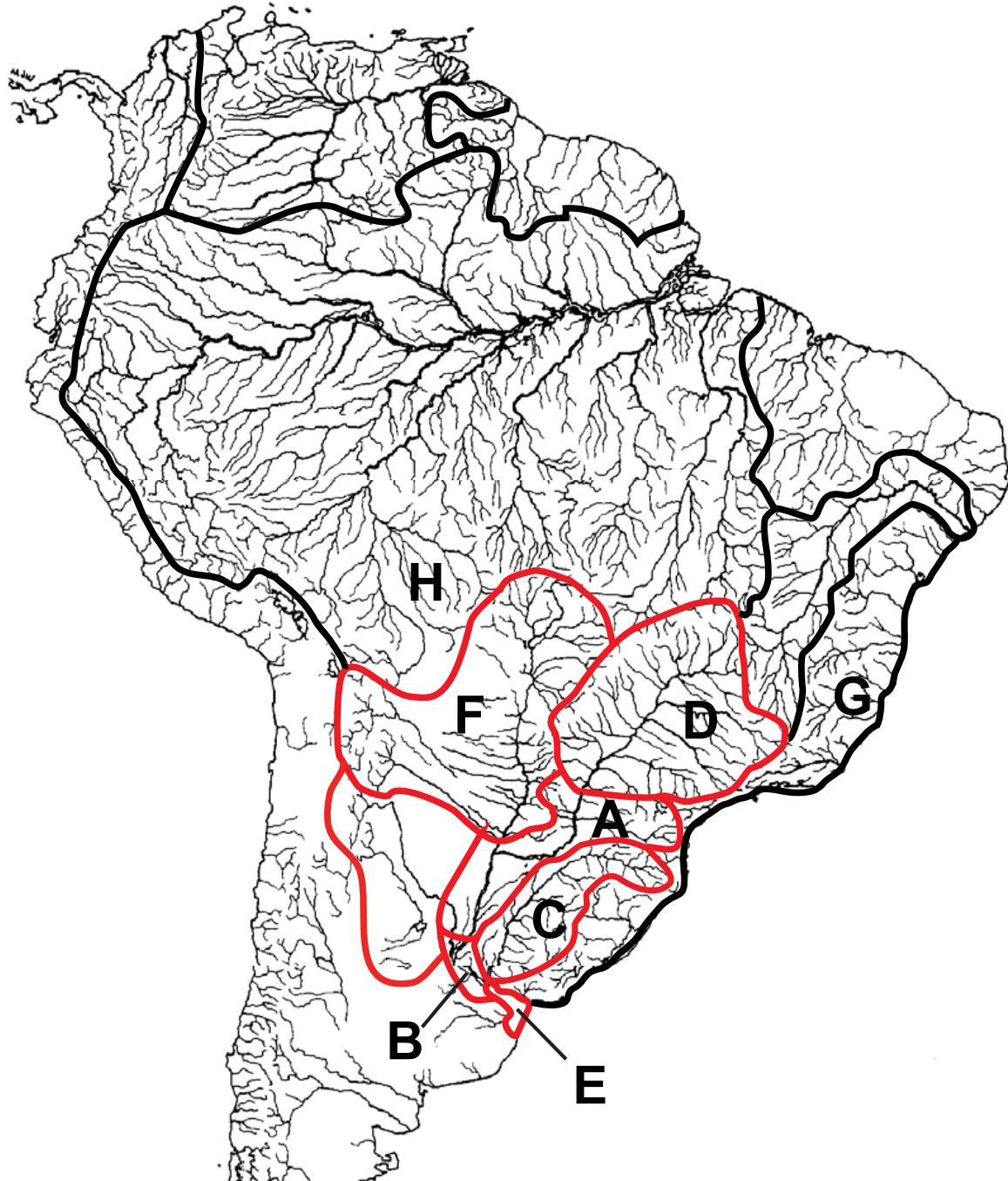


Figura 4.3: Mapa con las áreas utilizadas en los análisis biogeográficos del género *Loricariichthys*. Las líneas rojas muestran las áreas que corresponden a la cuenca del Plata. A= Medio Paraná; B= Bajo Paraná; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= Río de la Plata; F=Paraguay; G= ríos de la costa del sur y H= Amazonas.

4.2.2. Análisis filogenéticos del género *Loricariichthys*

Análisis basados en COI

El alineamiento final de gen mitocondrial COI para el género *Loricariichthys* comprendió 57 secuencias de las cuales diez representan el *outgroup*. Veinticuatro secuencias de un largo de aproximadamente 650 pb han sido tomadas del *Genbank*, el resto se amplificaron en el laboratorio, logrando obtener un total de 859 pb. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos fue J2 más la distribución gamma.

- Árbol según Máxima Verosimilitud (MV).

En la Fig. 4.4 se puede observar el árbol MV obtenido en el programa TreeFinder, sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -4357,427$; $\alpha = 0,225$; $\pi(T) = 0,28$, $\pi(C) = 0,26$, $\pi(A) = 0,27$, $\pi(G) = 0,17$. El clado llamado A de la Fig. 4.4 reúne a todos los miembros del género *Loricariichthys* (95 %BB). Este clado se divide en dos grupos. El primer grupo comprende todos los individuos determinados como *L. platytopon* con ejemplares de Argentina, Paraguay y Brasil (99 %BB). El segundo clado, llamado B (99 %BB), se divide a su vez en dos clados, por un lado el clado C (90 %BB) y por el otro lado D (99 %BB). El clado llamado C reúne los representantes de la especie *L. melanocheilus* (92 %BB) y de la especie *L. labialis*. Mientras que el clado D se divide en dos grupos, por un lado la especie *L. anus* (77 %BB) y por otro lado el clado E (66 %BB), el cual comprende las especies *L. castaneus* (99 %BB) y *Loricariichthys* sp. (99 %BB).

- Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

En la Fig. 4.5 se puede observar el árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes, sobre cada una de las ramas puede observarse los valores de probabilidad posterior. La topología de este árbol es exactamente la misma a la que se obtuvo en el análisis de MV con respecto a las relaciones entre las especies. Los valores de probabilidad posterior para estos nodos son muy elevados, dándole de ese modo un buen sustento a los clados definidos anteriormente. La única diferencia entre los análisis de MV e IB son algunas de las relaciones intraespecíficas entre individuos.

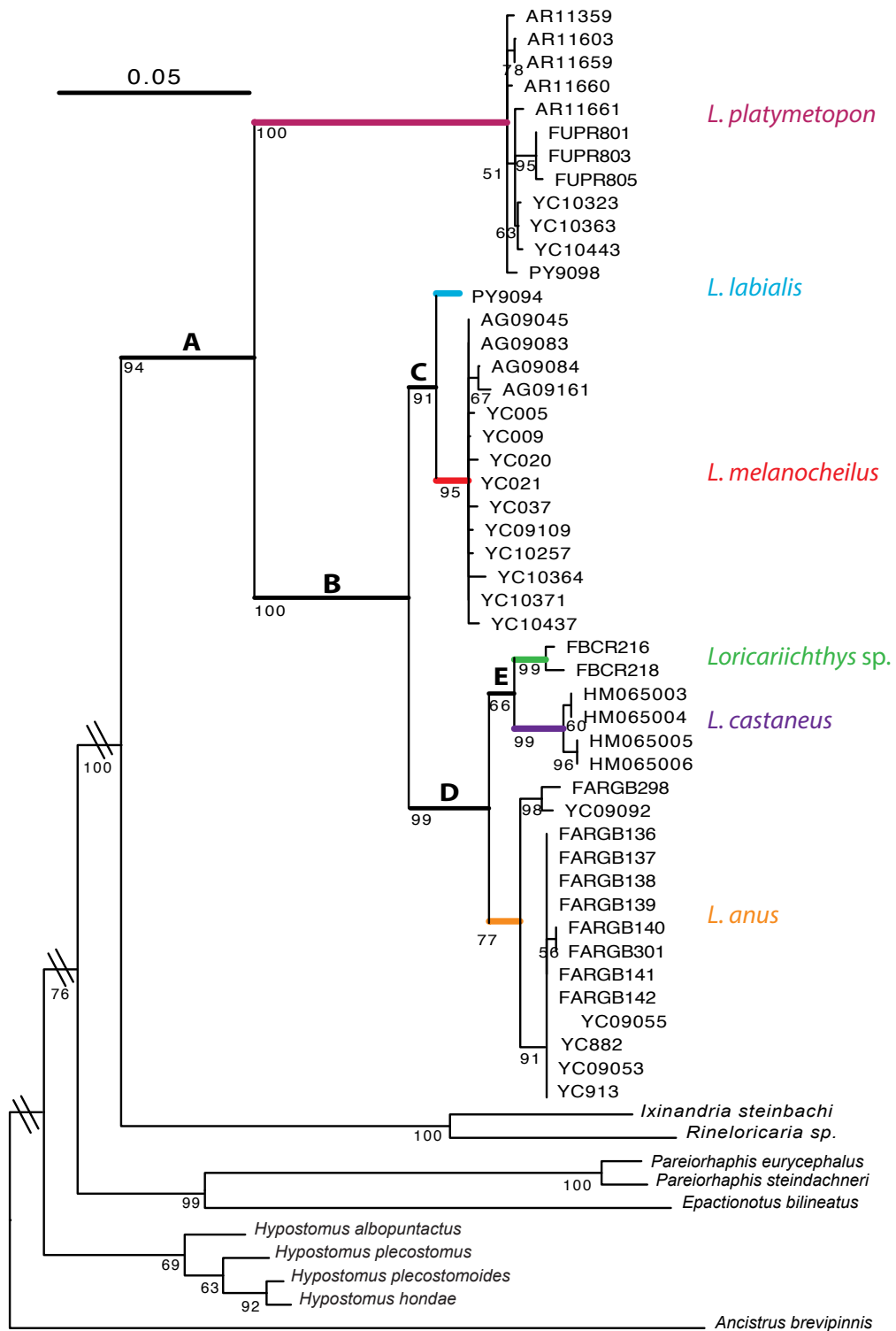


Figura 4.4: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Loricariichthys* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores cerca de los nodos son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

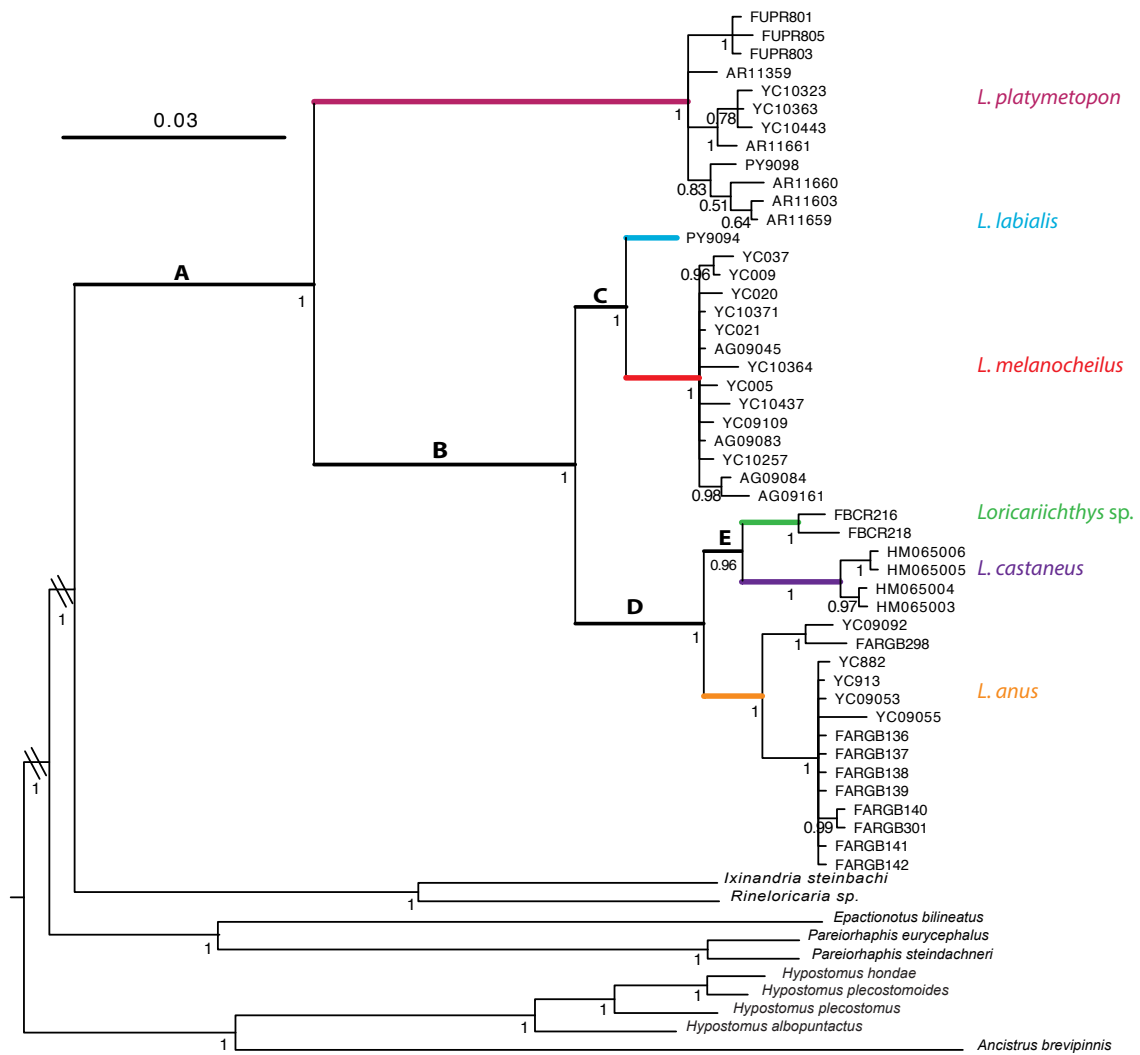


Figura 4.5: Árbol según Inferencia Bayesiana para el género *Loricariichthys* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores cerca de los nodos son las probabilidades posteriores.

- Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 4.6 sobre cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. La topología de este árbol es muy similar a la de los árboles MV e IB. Además, contiene valores de soporte considerablemente altos (mayores a 87 para el nivel de especie). La única diferencia se encuentra en el clado D, el cual en lugar de dividirse en dos, se divide en tres grupos de especies formando una tricotomía: *L. anus*, *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp., por lo cual estas dos últimas especies no se observan como un grupo monofilético (clado E) en el árbol de consenso tal como propone la reconstrucción por MV e IB. Sin embargo, tal resolución es una de las soluciones posibles de esta tricotomía.

Análisis basados en F-reticulon-4

El alineamiento final de gen nuclear F-reticulon-4 (FRTN4) para el género *Loricariichthys* comprendió 12 secuencias dado que aquí se decidió amplificar solamente un ejemplar por especie definida anteriormente sobre la base del análisis del marcador COI. Cuatro secuencias representan el *outgroup*. Dos secuencias de un largo de aproximadamente 2000 pb han sido tomadas del *Genbank* y tres de ellas han sido gentilmente aportadas por el Dr. R. Covain, del Museo de Historia Natural de Ginebra. En este análisis se han incorporado dos especies más para el género: *L. maculatus* y *L. microdon*. El largo de las secuencias ha sido muy variable según las especies 1750-2650 pb, con lo cual el paso de alineamiento ha resultado difícil. No se ha podido amplificar para este gen al linaje *Loricariichthys* sp., debido a que no se ha tenido material genético a disposición (las secuencias COI fue tomadas del *Genbank*).

Dado que la fracción del gen FRT4 amplificada representa a dos intrones y dos exones de la secuencia, se ha particionado el alineamiento indicando el comienzo y el fin de cada uno de estos segmentos. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos fue TN más la distribución gamma tanto para los intrones como para los exones.

- Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

La topología del árbol MV fue idéntica al obtenido por IB para este mismo gen (véase la Fig. 4.7). Sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB)

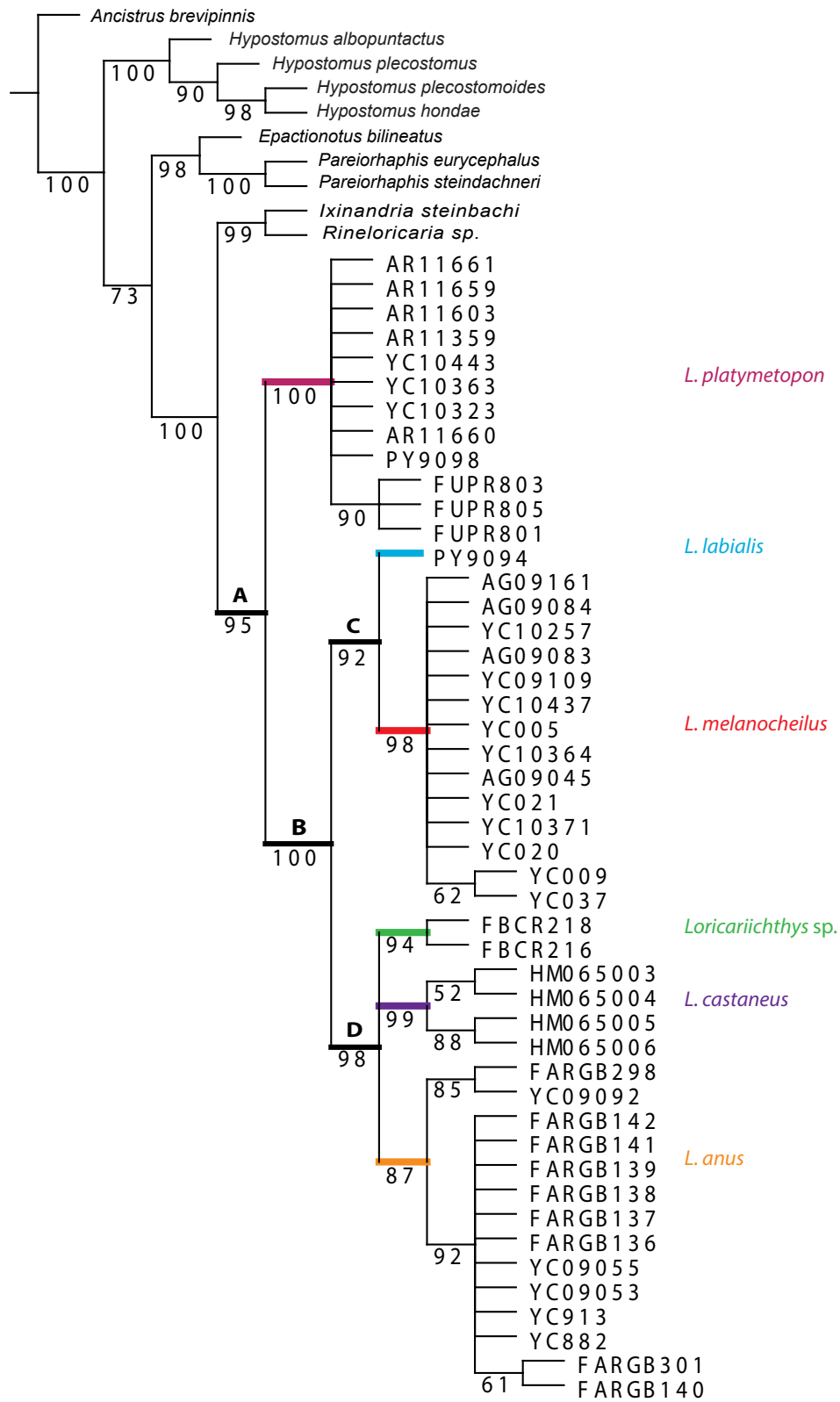


Figura 4.6: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Loricariichthys* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores cerca de los nodos son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son:
 $\log lk = -8421,96$; $\alpha = 1,44$;

Partición 1 (intrones de FRTN4): $\pi(T) = 0,24$, $\pi(C) = 0,20$, $\pi(A) = 0,17$, $\pi(G) = 0,25$.

Partición 2 (exones de FRTN4): $\pi(T) = 0,24$, $\pi(C) = 0,32$, $\pi(A) = 0,18$, $\pi(G) = 0,24$.

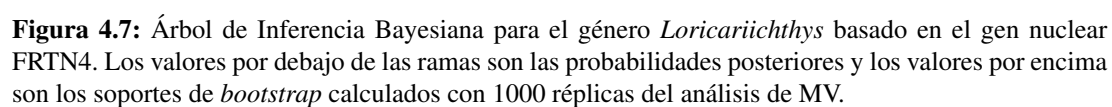
El clado llamado A en la Fig. 4.7 reúne a todos los miembros del género *Loricariichthys* (99 %BB). La primera especie en emerger del clado A es *L. microdon* quedando el resto de las especies dentro del clado B (95 %BB). Dentro de este clado, la especie *L. labialis* se diferencia del resto, las cuales se reúnen a su vez en el llamado clado C (66 %BB). El clado C se divide en dos grupos: el primero de ellos agrupa a las especies *L. maculatus* y *L. platymetopon* (96 %BB) y el segundo es el llamado clado D (56 %BB). Este último clado reúne a la especie *L. melanocheilus* en la base y a *L. anus* y *L. castaneus* que aparecen como especies hermanas (85 %BB).

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

En la Fig. 4.7 se puede observar el árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes, debajo de cada una de las ramas puede observarse los valores de probabilidad posteriores (PP). La topología de este árbol es idéntica a la del árbol MV.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvo solamente un árbol, a partir del cual se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 4.8, debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. En este árbol se puede observar que todos los representantes del género *Loricariichthys* forman un grupo monofilético, clado A (100 JN). El clado A se divide en dos grupos. El primero de ellos (99 JN) está compuesto por un lado por la especie *L. castaneus* en la base, luego se diferencia a *L. melanocheilus* para finalizar con *L. maculatus* y *L. platymetopon*. El segundo clado (100 JN) está representado por la especie *L. anus* en la base y por *L. labialis* y *L. microdon* como especies hermanas (100 JN).



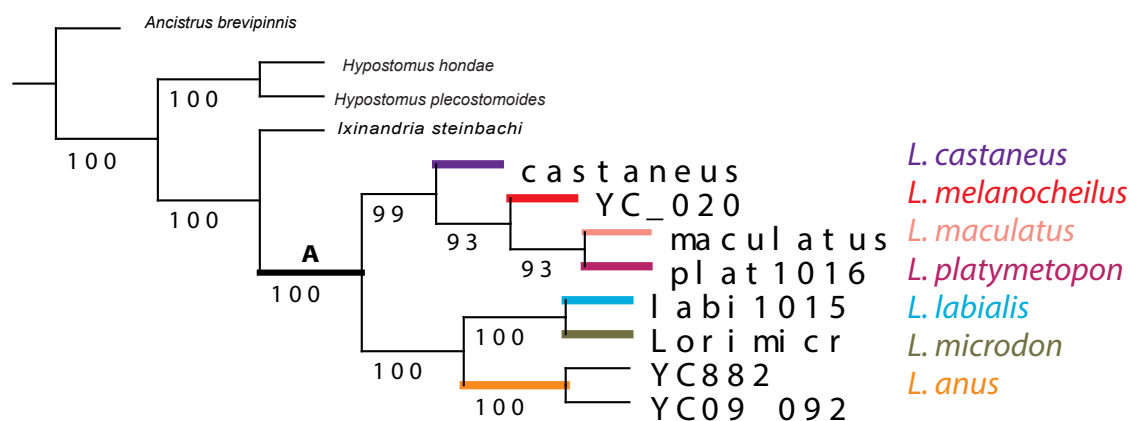


Figura 4.8: Árbol de Máxima Parsimoniapara el género *Loricariichthys* basado en el gen nuclear FRTN4. Los valores cerca de los nodos son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

Análisis a partir de múltiples genes

El alineamiento final de este análisis de genes concatenados (COI + FRTN4) para el género *Loricariichthys* comprendió diez secuencias, cuatro de ellas representan el *outgroup*. Solo se han utilizado aquellas especies para las cuales se ha obtenido ambos marcadores. El alineamiento comprende la partición de los datos indicando donde empieza y donde termina cada gen y donde empieza y donde terminan los intrones y exones del gen nuclear FTRN4. El alineamiento resultante fue de aproximadamente 3500 pb. Según el programa TreeFinder, a la primera partición de este superalineamiento, sección del gen COI, le corresponde el modelo J2 más gamma y a la segunda parte, sección gen FRTN4, le corresponde el modelo TN más gamma tanto para los intrones como para los exones.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

En la Fig. 4.9 se puede observar el árbol MV obtenido en el programa TreeFinder, sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son:

$$\log ll = -11160,15; \alpha = 0,564;$$

$$\text{Partición 1 (COI): } \pi(T) = 0,30, \pi(C) = 0,24, \pi(A) = 0,26, \pi(G) = 0,18.$$

$$\text{Partición 2 (intrones de FRTN4): } \pi(T) = 0,36, \pi(C) = 0,20, \pi(A) = 0,28, \pi(G) = 0,14.$$

$$\text{Partición 3 (exones de FRTN4): } \pi(T) = 0,24, \pi(C) = 0,32, \pi(A) = 0,17, \pi(G) = 0,25.$$

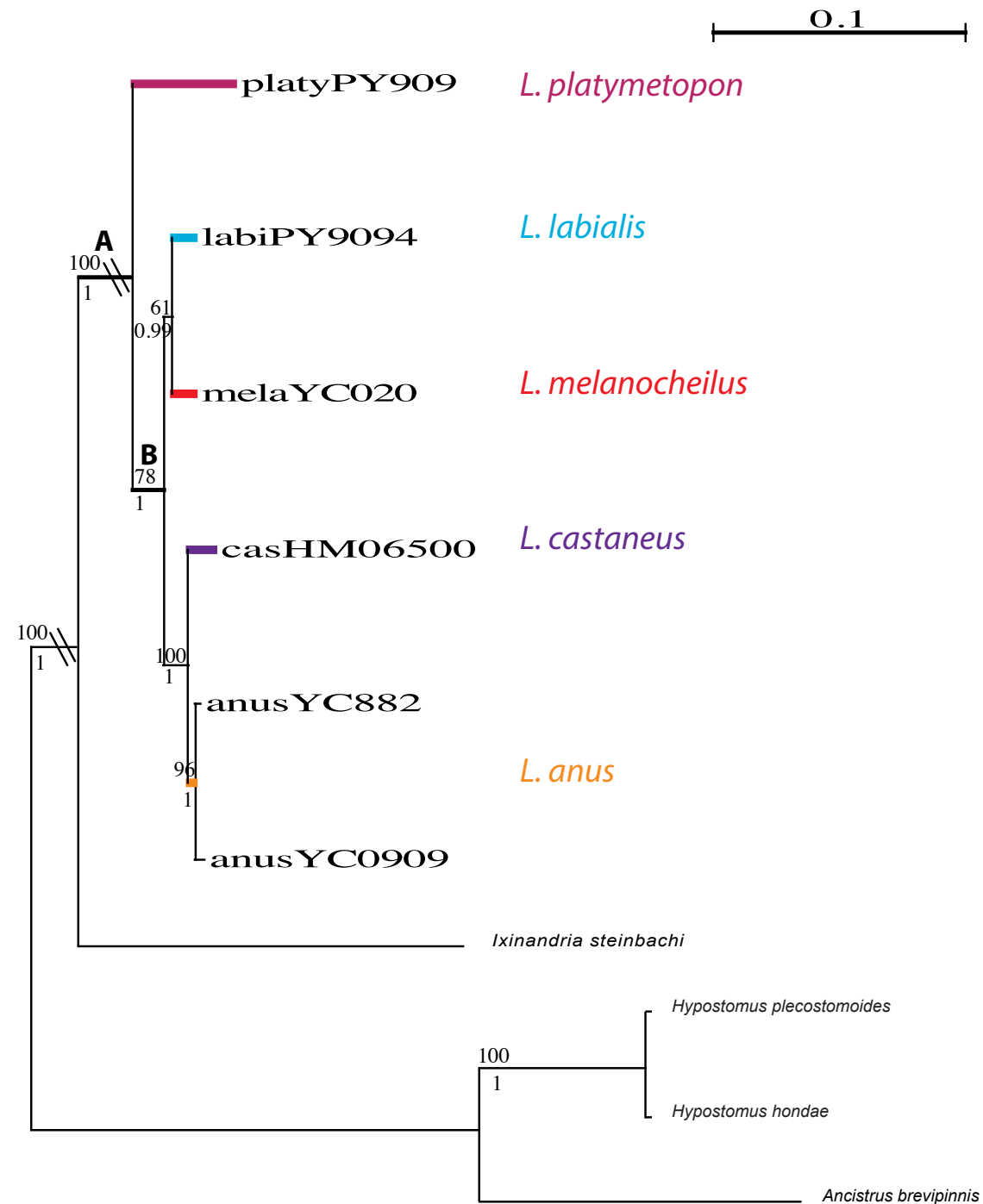


Figura 4.9: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Loricariichthys* basado en dos genes concatenados (COI y FRTN4). Los valores por encima de las rama son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas y los valores por debajo son las probabilidades posteriores calculadas en el análisis IB.

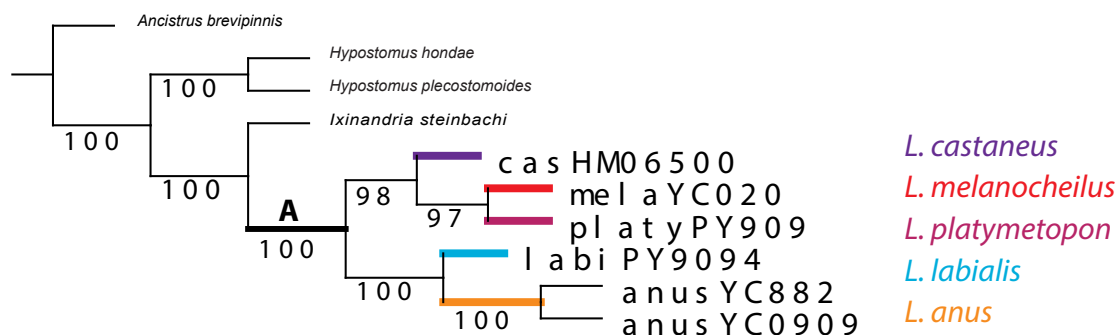


Figura 4.10: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Loricariichthys* basado en dos genes concatenados (COI y FRTN4). Los valores por debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

El clado llamado A de la Fig. 4.9 reúne a todos los miembros del género *Loricariichthys* (100%BB). La primera especie que se diferencia de este clado es *L. platymetopon*. Luego vemos un segundo clado, llamado B (78%BB), el cual está compuesto por un lado por las especies *L. melanocheilus* y *L. labialis* (61%BB) y por otro lado por las especies *L. anus* y *L. castaneus* (100%BB).

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes resultó idéntico al árbol MV. En la Fig 4.9 se observa debajo de cada una de las ramas los valores de probabilidad posterior calculados por IB. Nótese que los valores de soporte de ramas en este análisis han sido muy elevados.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvo solamente un árbol, a partir del cual se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 4.10, por debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas, en este análisis todos los nodos presentan un soporte mayor o igual a 97 JN. En este árbol se puede observar que todos los representantes del género *Loricariichthys* forman un grupo monofilético, clado A. El clado A se divide en dos grupos. El primero de ellos (98 JN) está compuesto por la especie *L. castaneus* en la base, luego aparecen *L. platymetopon* y *L. melanocheilus* como especies hermanas (97 JN). El segundo clado lo componen la especie *L. labialis* junto a *L. anus* (100 JN).

4.2.3. Calibración del reloj molecular

El test de *log-likelihood ratio*, el cual fue utilizado para verificar que nuestros datos (matriz del gen mitocondrial COI) no poseen tasas de mutación constantes, ha mostrado que las diferencias entre los valores de verosimilitud cuando forzamos los datos a un reloj molecular y cuando no lo hacemos son significativas [$X^2 = 2(\log L_0 - \log L_1) = 456,2428$; d.f. = 14; $P = 1,95677 \times 10^{-88}$]. Este resultado indica que las secuencias de los representantes del *ingroup* utilizado evolucionan con una tasa que no es homogénea a lo largo del árbol filogenético.

Con el objetivo de estimar las fechas de los eventos de diversificación en el género *Loricariichthys* que habitan la cuenca del Plata, se ha calibrado los datos moleculares basados en COI. El resultado obtenido con el programa BEAST puede observarse en la Fig. 4.11. La topología del árbol reconstruido con BEAST es similar a las obtenidas en la sección anteriormente con los análisis de MV, IB, y P.

Seguindo nuestros resultados, vemos que el origen del género del *Loricariichthys* se remonta a 87,75 Ma (95 % highest posterior density interval o HPD: 38,38-248,81). Siendo esta edad donde se separa a especie *L. platymetopon* del resto. Luego observamos que el origen del clado B fue estimado en 37,14 Ma (95 % HPD: 11,45-67,12). Dentro del clado C, la especiación entre *L. melanocheilus* y *L. labialis* fue calculada en 12,77 Ma (95 % HPD: 2,26-29,9). Mientras que el origen del clado D con la especie *L. anus* en la base fue de 18,84 Ma (95 % HPD: 4,35-35,95). Por último, la separación de las especies *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp. fue estimada en 14,27 Ma (95 % HPD: 2,76-27,68).

En este análisis, es importante notar que los intervalos de confianza para la estimación de las edades han sido muy grandes, generando de este modo poca precisión en las fechas calculadas.

4.2.4. Reconstrucción de áreas ancestrales

Los distintos escenarios biogeográficos analizados con RASP (S-DIVA, BBM y DEC) están presentados en la Fig. 4.12. El análisis de BBM es el que ha estimado un menor número de áreas ancestrales combinadas. Sin embargo, notamos que los tres métodos utilizados ha generado una muy baja resolución para este análisis. El área ancestral para el género *Loricariichthys* (clado A y nodo 21 de la Fig. 4.12) fue estimado por BBM como Paraná Medio o el río Paraguay. Sin embargo, en este análisis no se ha podido incorporar integrantes del género de numerosas cuencas

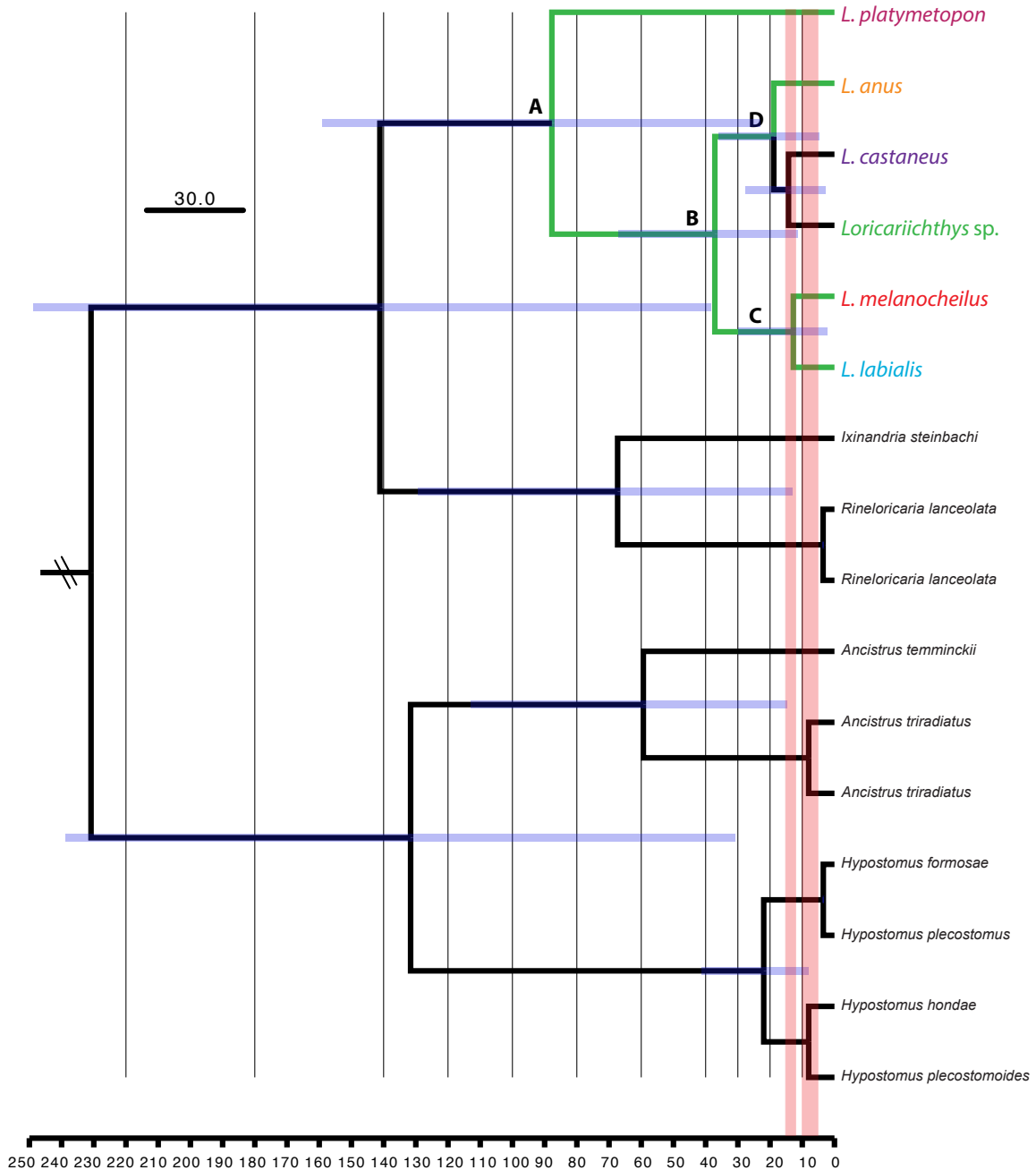


Figura 4.11: Resultados gráficos de los análisis del programa BEAST para el género *Loricariichthys*. Las ramas del árbol en verde muestran los clados y especies que habitan en la cuenca del Plata. La escala abarca desde el presente hasta 250 millones de años. Todos los clados presentan probabilidades posteriores mayores a 0.95. Las barras muestran los intervalos de credibilidad del 95% HPD para la estimación de los tiempos de divergencia. Los cuatro grandes clados y subclados del género están indicados. En rojo se indican los dos máximos de inundación de la ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata.

del continente sudamericano, por lo tanto este resultado debe tomarse con cierta precaución.

Para el clado B, el análisis de S-DIVA ha propuesto al río Uruguay; BBM sugiere al Paraná Medio y al Uruguay y DEC estima que probablemente el área de este nodo (20 de la Fig. sea una área conjunta entre los ríos Paraguay y Uruguay.

Para el clado C, el análisis de DEC estima que el área ancestral para *L. melanocheilus* y *L. labialis* es la región que comprende a todo el río Paraná y Paraguay, sugiriendo una dispersión reciente por parte de *L. melanocheilus* hacia el río Uruguay.

Para el clado D (nodo 18 de la Fig. 4.12), S-DIVA estima que el área ancestral puede haber sido Uruguay y los ríos costeros del sur o el conjunto del Uruguay, los ríos costeros y el Río de La Plata. Según BBM el área más probable es el río Uruguay, mientras que DEC propone a un área formada por el Uruguay y los ríos costeros del sur.

Por supuesto las tres metodologías han estimado que el área ancestral de las especies *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp. es la región de los ríos costeros del sur, donde actualmente se puede encontrar a estas especies.

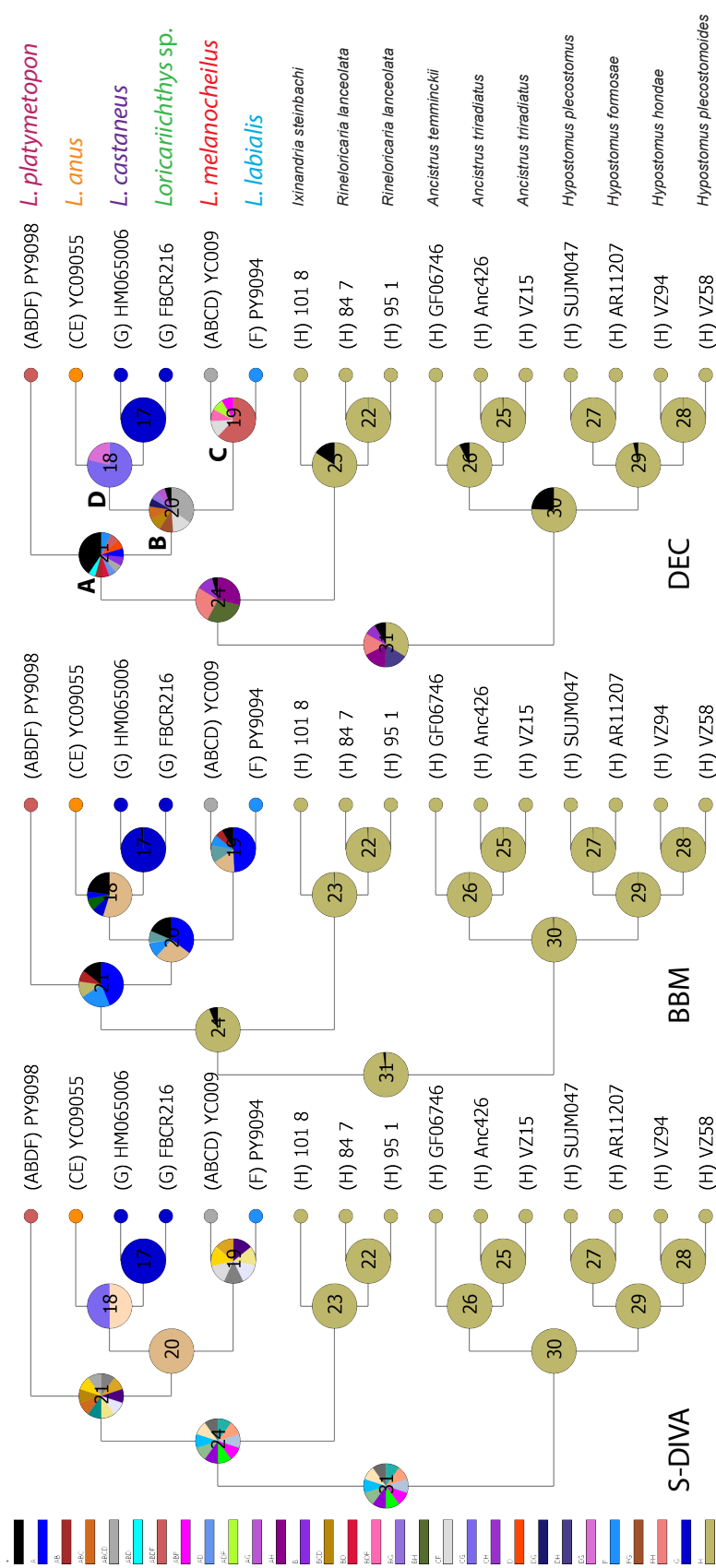


Figura 4.12: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA, BBM y DEC para el género *Loricariichthys*. Los tres análisis han sido obtenidos en el programa RASP. Cada área fue codificada con una letra: A= Medio Paraná; B= Bajo Paraná; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= Río de la Plata; F=Paraguay; G= ríos de la costa del sur y H= Amazonas.

4.3. Discusión

Tomando al género *Loricariichthys* como el centro de estudio, este capítulo se enfoca en tres objetivos. El primero es determinar la diversidad de especies de este género en la cuenca del Plata y definir la distribución geográfica de tales especies. El segundo objetivo es conocer la relación filogenética de las especies antes definidas. Para este último fin se han realizado análisis basado en COI y FRTN4 separadamente para luego hacer un análisis donde ambos marcadores han sido analizados simultáneamente. Finalmente se ha calibrado la filogenia del género y reconstruido las áreas ancestrales de cada nodo. Por lo tanto, esta sección estará organizada de acuerdo a los objetivos antes planteados.

4.3.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Loricariichthys* en la cuenca del Plata

Basándose en los resultados obtenidos para gen mitocondrial COI (véase las Figs. 4.4, 4.5 y 4.6), vemos que el género *Loricariichthys* puede dividirse en al menos seis grupos monofiléticos: *L. anus*, *L. castaneus*, *L. labialis*, *L. melanocheilus*, *L. platymetopon* y *Loricariichthys* sp. Para cada uno de estos grupos se ha calculado las distancias intra e interespecíficas, con el fin de comparar con la bibliografía si estas distancias estaban en el mismo orden de magnitud que lo propuesto para otros grupos de peces. El gen COI ha sido ampliamente estudiado para peces y otros organismos por ser parte del consorcio internacional *Barcoding*. Siguiendo el trabajo propuesto por Ward (2009) la tasa de divergencia entre especies de un mismo género de peces debería ser del orden de 3%; mientras que la tasa de divergencia intraespecífica debería ser cercana a 0.34 %. Ward (2009) aclara también que si dos especies de peces difieren en un 2 %, hay una probabilidad del 95 % de que dichas especies sean dos especies diferentes. En este trabajo de tesis, los valores de las distancias calculadas entre las especies de *Loricariichthys* fueron desde 2.17 % (entre *L. labialis* y *L. melanocheilus*) hasta de 11.70% (entre *L. platymetopon* y *Loricariichthys* sp.). Por lo tanto estos valores concuerdan con los valores de referencia, sustentando la existencia de seis especies de *Loricariichthys* para el sur de Sudamérica.

Viendo las distribuciones geográficas de las seis especies definidas anteriormente, notamos que hay zonas de solapamiento en ellas, generando de este modo especies con distribuciones simpátri-

cas. En la cuenca del río Paraguay conviven *L. platymetopon* y *L. labialis*; en la cuenca del río Uruguay coexisten *L. melanocheilus* y *L. anus*, en la cuenca del río Paraná se encuentran *L. melanocheilus* y *L. platymetopon*. Finalmente, en los ríos de la costa del sur de Brasil habitan *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp.

4.3.2. Análisis filogenéticos del género *Loricariichthys*

El segundo objetivo de este capítulo fue determinar la estructura de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Loricariichthys*, para ello se ha realizado la reconstrucción del árbol filogenético basado en COI mediante tres metodologías diferentes (véase las Figs. 4.4, 4.5 y 4.6). Los tres tipos de análisis han generado la misma topología de árboles para las especies, donde observamos a *L. platymetopon* en la base y luego dos grupos. El primero de ellos compuesto por *L. labialis* y por *L. melanocheilus* (clado C) y el segundo grupo formado por *L. anus*, *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp (clado D). En los análisis de MV e IB (véase las Figs. 4.4, 4.5) vemos que *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp. se presentan como especies hermanas, mientras que en el árbol MP (véase la Fig. 4.6) las relaciones entre las especies *L. anus*, *L. castaneus* y *Loricariichthys* sp. no están resueltas, viéndose allí una politomía.

Las filogenias basadas en el gen nuclear FRTN4 (véase las Figs. 4.7 y 4.8) han generado diferentes topologías de árboles según la metodología utilizada. Los árboles MV e IB han sido idénticos (véase la Fig. 4.7), presentando a la especie *L. microdon* en la base, luego un clado B donde se diferencia a *L. labialis* del clado C. El clado C se divide a su vez en dos grupos, el primero reúne a *L. platymetopon* y *L. maculatus*, y el segundo a *L. melanocheilus*, *L. anus* y *L. castaneus*. En cambio, el análisis de MP (véase las Fig. 4.8) ha sido considerablemente divergente, proponiendo un clado que agrupa *L. labialis*, *L. microdon* y *L. anus* y un segundo clado que relaciona *L. maculatus*; *L. platymetopon*; *L. melanocheilus* y *L. castaneus*.

Finalmente, los análisis filogenéticos basados en las secuencias concatenadas de ambos genes (COI y FRTN4), aportaron árboles plenamente resueltos con altos valores de soporte de ramas en todos los análisis (ver las Figs. 4.9 y 4.10). Los árboles basados en los dos genes concatenados generados a partir de los análisis MV e IB presentan una topología semejante a los árboles MV, IB y MP basados solamente en COI. Nuevamente, el análisis generado a partir de MP (véase la Fig.4.10) ha sido el más divergente, proponiendo para el género dos clados principales, uno de

ellos agrupa a *L. castaneus*; *L. platymetopon* y *L. melanocheilus* y el otro reúne a *L. labialis* y *L. anus*. Esta topología de árbol es semejante a la encontrada en el árbol FRTN4 generada por MP.

Las diferentes relaciones filogenéticas resultantes para el género *Loricariichthys* dependen tanto del gen estudiado como de la metodología aplicada. Hemos visto que generalmente los análisis MV e IB promueven resultados semejantes. Es interesante notar que los árboles basados en los genes concatenados obtenidos por MV e IB resultaron tener idéntica topología que los árboles basados solamente en COI. Mientras que, el árbol de genes concatenados obtenido por MP resultó semejante al árbol basado en FRTN4 obtenido también con esta metodología. Evidentemente, la influencia de cada uno de los genes dentro del análisis de genes concatenados varía según la metodología utilizada.

4.3.3. Procesos de diversificación en la cuenca del Plata

En esta sección se ha abordado varios análisis que permiten estimar los eventos que han permitido la diversificación de las especies del género *Loricariichthys* en la cuenca del Plata, a través de una perspectiva temporal y otra espacial. Para ello se ha utilizado la filogenia reconstruida con el marcador mitocondrial COI. Esta decisión fue establecida para poder analizar el mayor número de especies a disposición. Además, hemos visto que los análisis de genes concatenados (COI y FRTN4) presentaban igual topología que los análisis basados en COI únicamente (véase las Figs. 4.4; 4.5; 4.6; 4.9 y 4.10). Sin embargo es necesario aclarar que creemos que este análisis debería ser completado con mayor evidencia (mayor número de especies y de marcadores moleculares) para poder confirmar los resultados obtenidos en esta primera etapa del análisis que consideramos preliminar.

Según los resultados obtenidos hasta el momento, la filogenia de *Loricariichthys* puede dividirse en dos grupos (véase la Fig. 4.11). Dado que en cada uno de ellos se incluye al menos una especie que habita en el sistema la cuenca del Plata y especies de otros sistemas, se puede deducir que una especiación alopátrica intercuenca ha producido de la diversificación de las especies de *Loricariichthys* de la cuenca del Plata. Además, se ha observado que algunas especies hermanas habitan la cuenca del Plata (dentro del clado B de la Fig. 4.11). Este resultado indica que si duda un proceso de especiación ha tenido lugar dentro de esta cuenca, produciendo una mayor diversidad de especies dentro de ella.

■ Análisis intercuenca

El análisis biogeográfico de la relación intercuenca dentro del primer grupo de la filogenia del género *Loricariichthys*, muestra que la especie *L. platymetopon* es una especie muy antigua que, según nuestro reloj molecular, se ha diferenciando del resto de las especies del género durante el Cretácico (véase la Fig. 4.11). Por otro lado, según los resultados del gen nuclear FTN4 (véase las Figs. 4.7 y 4.8), la especie *L. platymetopon* conforma un clado con *L. maculatus*, cuyo ejemplar utilizado proviene de Surinam, en el noreste del continente. Se conoce que el clado *L. platymetopon*-*L. maculatus* contiene más diversidad de especies (al menos cinco especies más) provenientes de la cuenca del Amazonas y del Orinoco (comunicación personal del Dr. R. Covain y resultados parciales de Covain (2011)). En análisis obtenidos aquí, al no contar con dicha información sobre la diversidad de este clado, se ha calculado al evento de diferenciación de *L. platymetopon* en 87,75 Ma y se le ha asignado un área ancestral de Paraná Medio (véase la Fig. 4.12). Sin embargo, la fecha calculada debe atribuirse al origen del clado *L. platymetopon*-*L. maculatus* y no al proceso de especiación de *L. platymetopon*, cuyo evento debe ser más reciente. A la luz de estos resultados podemos postular que el surgimiento de la especie *L. platymetopon* debe haber sido el resultado de un evento de dispersión desde la cuenca amazónica hacia la cuenca del Plata por parte de algún miembro del clado. El aislamiento posterior a la dispersión debe haber generado la diferenciación de *L. platymetopon* del resto de las especies de su grupo haciendo que esa especie sea endémica de la cuenca del Plata.

Observando al otro grupo dentro del género *Loricariichthys*, clado B, vemos que hay tres especies que están presentes en la cuenca del Plata, mientras otras dos son exclusivas de los ríos costeros del sur de Brasil (véase las Figs. 4.4; 4.5; 4.6 y 4.11). El evento de separación de las dos especies de los ríos costeros ha sido estimado en 18,84 Ma (véase la Fig. 4.11). Este evento coinciden temporalmente con las capturas de cabeceras entre el Paraná y los ríos costeros del sur propuestas por Albert & Reis (2011) hace 28-15 Ma. Según nuestro análisis de reconstrucciones de áreas ancestrales a este nodo le corresponde un área que podría haber estado conformada por el río Uruguay y los ríos costeros de Brasil (véase la Fig. 4.12). Siguiendo los trabajos de Castellanos (1959); Beurlen (1970); Bonetto (1994), hemos visto que la separación entre el río Paraná y Uruguay ha sido bastante más reciente (2,5-7 Ma)

que la fecha propuesta para las capturas de cabeceras entre el Paraná y los ríos costeros del sur (28-15 Ma) (Albert & Reis, 2011). Por lo tanto, podemos suponer que dichas capturas de cabeceras entre el río Paraná y los ríos costeros del sur, también han afectado a la diversidad de especies y linajes que hoy en día observamos en el río Uruguay, dado que en esa época los ríos Paraná y Uruguay conformaban una única cuenca. Este tipo de eventos entre las cabeceras del Paraná y los ríos de la costa sur de Brasil han permitido el intercambio de fauna entre estos ríos, pero también han influenciado en otros ríos del sistema con los cuales han tenido estrecha relación durante la historia del continente.

■ Análisis intracuenca

Con los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo, podemos asumir que una parte de la diversidad del género *Loricariichthys* dentro de la cuenca del Plata debe haber sido moldeada por fuerzas evolutivas que han actuado en el interior de esta cuenca. Estos procesos han dado lugar a lo que se ha decidido llamar especiación intracuenca. El género *Loricariichthys* ha resultado poco diverso en comparación a otros géneros de la familia Loricariidae (véase los capítulos *Hypostomus* y *Ancistrus* de este trabajo de tesis) para la cuenca en estudio. Sin embargo podemos apreciar que un evento de especiación ha dado lugar a dos especies exclusivas de la cuenca del Plata: *L. melanocheilus* y *L. labialis*. Este evento fue estimado en 12,77 Ma según nuestro reloj molecular (véase la Fig. 4.11). Esta fecha coinciden con el primer evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (15-13 Ma) dentro de la cuenca del Plata (Hernández *et al.*, 2005). La extensa incursión marina en la cuenca del río Paraná, ha podido aislar a muchos de los tributarios de esta cuenca, generando varias especiaciones alopátricas por vicariancia en diferentes grupos de peces estrictamente de agua dulce, tal como hemos visto en el capítulo anterior sobre el género *Hypostomus*. Una vez que el mar fue retirado las nuevas especies pudieron haber dispersado a lo largo de toda la cuenca del Plata, enriqueciendo, de este modo, la diversidad de especies. Según nuestros análisis de áreas ancestrales, el área ancestral para *L. melanocheilus* y *L. labialis* es la región que comprende al río Paraná y Paraguay, sugiriendo una dispersión reciente por parte de *L. melanocheilus* hacia el río Uruguay. Este resultado se ajusta a los resultados que presentan Hernández *et al.* (2005), dado que la región del Paraná y Paraguay ha sido la más afectada por esta primera gran inundación marina del Mioceno.

4.4. Consideraciones finales

En este capítulo, los resultados basados en el gen mitocondrial COI han permitido afirmar que al menos seis especies de *Loricariichthys* habitan en el sur de Sudamérica. Cuatro de estas especies están presentes en la cuenca del Plata y dos en los ríos costeros del sur de Brasil.

Los resultados filogenéticos realizados, basados en el gen COI, en el gen FRTN4 y en el análisis concatenado, demuestran que el género *Loricariichthys* es un grupo monofilético. En cinco de los nueve análisis realizados este género presenta en la base a la especie *L. platymetopon*, y luego un clado, llamado B. Este clado está compuesto, por un lado, por las especies *L. melanocheilus* y *L. labialis* y por otro lado, por las especies *L. anus* y *L. castaneus*.

Por otro lado, hemos visto que la diversidad de especies de *Loricariichthys* dentro de la cuenca del Plata es modulada por dos procesos diferentes. El primero de ellos es una diversificación inter-cuenca, el cual ha generado grupos de especies que habitan diferentes cuencas como resultado de eventos de dispersión entre el sistema de la cuenca del Plata y otros sistemas (como el Amazonas o los ríos costeros del sur). En este contexto, los cambios paleo-hidrológicos durante el Mioceno deben haber promovido rutas de dispersión y vicariancia que han permitido alcanzar un alto nivel de diversificación de especies de peces Neotropicales. El otro proceso que modeló la diversidad de especies de *Loricariichthys* es una especiación intracuenca, la cual produjo grupos de especies dentro de la cuenca del Plata debido a la fragmentación del hábitat. Hemos visto que el origen del nodo que contiene dos especies endémicas de *Loricariichthys* de la cuenca del Plata concuerda temporalmente y geográficamente con la incursión marina del Mioceno. Tal como propone la hipótesis de los museos (Fjeldsø, 1994), esta ingresión marina debe haber fragmentado dicha cuenca provocando procesos de especiación alopátricos. La biogeografía histórica del género *Loricariichthys* que se ha esquematizado en este capítulo, permite argumentar que diferentes cambios hidrogeológicos y cambios en el nivel del mar han influenciado fuertemente a los eventos cladogenéticos observados en la filogenia de este género.

CAPÍTULO 5

El género *Rineloricaria*

Este capítulo se enfoca en estudiar al género *Rineloricaria* en la cuenca del Plata. En un primer apartado se detallarán aspectos taxonómicos y se evaluará la diversidad de este género. En un segundo apartado se mostrarán y discutirán los análisis filogenéticos realizados en el transcurso de este tesis doctoral. A modo de un avance exploratorio se ha realizado la calibración de la filogenia, así como también la reconstrucción de las áreas ancestrales para este género basándose en los datos filogenéticos del marcador COI.

5.1. Introducción

El género *Rineloricaria* pertenece a la subfamilia Loricariinae dentro de la familia Loricariidae. Esta subfamilia esta dividida a su vez en dos tribus: Harttiini y Loricariini (Covain & Fisch-Muller,



Figura 5.1: Vistas lateral y dorsal de un ejemplar vivo de *Rineloricaria catamarcensis*.

2007; Covain *et al.*, 2008). Dentro de los Loricariini, el género *Rineloricaria* pertenece al grupo morfológico *Rineloricaria* tal como proponen Covain & Fisch-Muller (2007). Este género se caracteriza por poseer una boca provista de papilas globulares, presencia de muesca postorbital con diferente grado de desarrollo, abdomen total o parcialmente cubierto por placas, una placa pre-anal rodeada anteriormente por 3 a 5 placas y en algunas especies, poseer el radio dorsal de la aleta caudal prolongado en un filamento (Rodríguez, 2003).

Recientemente, se han considerado a los géneros *Hemiloricaria*, *Leliella* y *Fonchiichthys* como sinónimos de *Rineloricaria* (Covain & Fisch-Muller, 2007), además, se incluye al género *Ixinandria* dentro de *Rineloricaria* (comunicación personal del Dr. R. Covain en base a su trabajo de tesis doctoral). De este modo, unas 65 especies son válidas para el género *Rineloricaria* (Vera-Alcaraz *et al.*, 2012). Este género está ampliamente distribuido, habitando ambientes muy diversos que van desde Costa Rica hasta Argentina, encontrándose a ambos lados de la cordillera de los Andes. Los machos maduros de *Rineloricaria* presentan dimorfismo sexual, a través de la hipertrofia de los odontodes de la cabeza o de las aletas pectorales.

Según la tesis doctoral de Rodríguez (2003) en la Argentina estaría confirmada la presencia de siete especies de *Rineloricaria*: *I. steinbachi*, *R. catamarcensis* (ver un ejemplar en la Fig.5.1), *R. microlepidogaster*, *R. misionera*, *R. isacci*, *R. parva* y *R. lanceolata*. Según la revisión del género de Vera-Alcaraz *et al.* (2012) en el río Paraguay se encuentran además las especies *R. aurata* y *R. cacerensis*. En Rodríguez & Reis (2008), se describen *R. malabarbai* y *R. baliola* y se redescubren *R. strigilata*, *R. cadeae*, *R. microlepidogaster* y *R. longicauda* para la laguna dos Patos en el sur de Brasil. Por otro lado, Ghazzi (2008) ha descrito nueve nuevas especies de *Rineloricaria* para el río Uruguay. De este modo, se pueden contar al menos unas 23 especies de *Rineloricaria* para el sur de América del Sur, demostrando así que esta región del planeta presenta una alta diversidad de especies de Loricariidos.

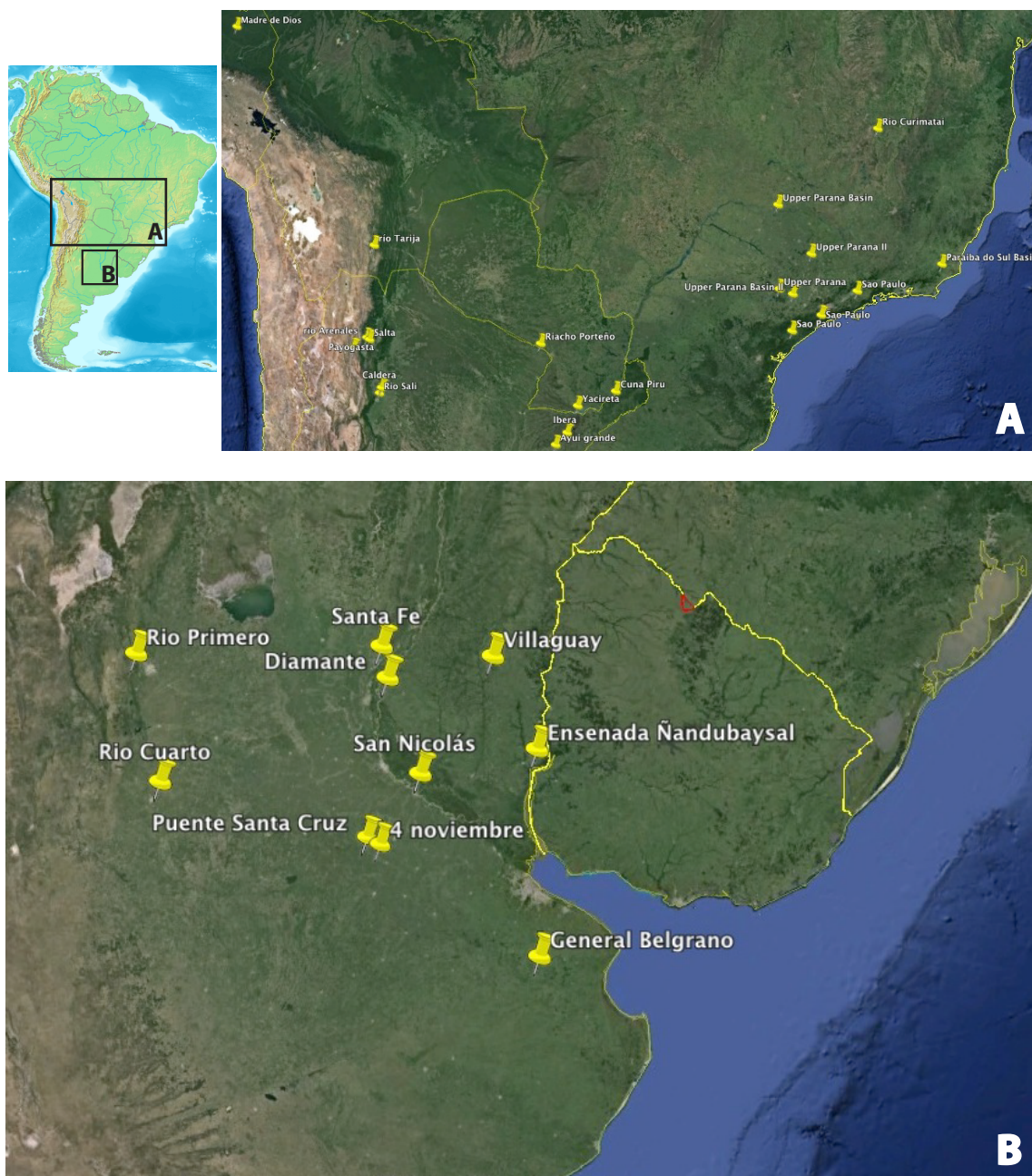


Figura 5.2: Mapa con las localidades de los ejemplares utilizados del género *Rineloricaria*. Ver más detalles sobre la determinación taxonómica y sobre cada punto de muestreos en el apéndice A. La mayor parte de los puntos están ubicados según los datos geo-referenciados registrados durante las campañas de muestreo. Para la realización del mapa se utilizó el programa Google Earth.

Tabla 5.1: Distancias genéticas para el género *Rineloricaria* calculadas a partir del modelo K-2P. En la diagonal de la tabla, en negrita, se ven las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Los valores son están en %.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
(A) <i>R. lanceolata</i>	1.28													
(B) <i>R. latirostris</i>	13.01	0.70												
(C) <i>R. catamarcensis</i>	13.18	9.66	0.98											
(D) <i>R. misionera</i>	13.79	13.79	9.25	-										
(E) <i>R. uracantha</i>	13.18	13.66	14.29	13.33	-									
(F) <i>R. parva</i>	14.08	8.37	8.65	4.84	14.35	0.19								
(G) <i>Rineloricaria</i> sp.1	11.51	6.95	8.97	7.72	12.83	8.89	0							
(H) <i>Rineloricaria</i> sp.2	13.41	5.99	11.34	10.30	13.35	10.48	8.08	0						
(I) <i>Rineloricaria</i> sp. 3	12.87	9.29	5.49	8.18	14.57	7.17	7.98	11.03	0.28					
(J) <i>Rineloricaria</i> sp.4	12.82	6.96	7.96	4.94	12.09	7.69	6.91	9.17	7.86	-				
(K) <i>Rineloricaria</i> sp.5	13.96	8.04	8.94	5.46	12.11	8.39	7.10	9.17	9.10	3.25	-			
(L) <i>I. steinbachi</i>	14.36	7.88	8.98	3.95	11.91	7.55	6.69	9.65	11.03	9.17	9.17	1.17		
(M) <i>R. aff. lima</i>	12.97	9.08	3.01	8.80	13.88	8.32	8.87	11.02	5.48	7.00	8.06	8.12	0	
(N) <i>R. aff. kronei</i>	12.50	7.72	6.04	7.91	13.33	7.07	7.67	9.71	11.03	9.17	6.83	8.40	8.13	0

5.2. Resultados

5.2.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Rineloricaria* en la cuenca del Plata

La Fig. 5.2 muestra las localidades en donde se ha logrado coleccionar ejemplares del género *Rineloricaria* a partir de muestreos y colaboraciones con otras instituciones y colegas. En total se han obtenido aproximadamente 90 tejidos que se depositaron en el Banco de Tejidos y ADN del Lab. de Ecología Molecular del CREG, en el MACN o en el ILPLA. En el apéndice A se puede observar la determinación taxonómica y la localidad de cada tejido y/o ejemplar utilizado en los análisis moleculares.

La diversidad dentro del género *Rineloricaria* fue evaluada mediante dos técnicas diferentes. La primera de ellas fue la determinación morfológica clásica de medidas y conteos basándose en las claves de determinación publicadas (ver más detalles en la sección 2.5). Para muchos de los ejemplares capturados no fue posible llegar a una determinación específica, por ello fue necesario implementar como herramienta de caracterización o limitación de especies al marcador mitocondrial COI.

Cada especie fue definida como un grupo monofilético obtenido en las reconstrucciones filogenéticas, y en lo posible, acompañada de aspectos morfológicos que puedan caracterizarlo. Además, se implementó el porcentaje de divergencia genética basado en el marcador COI, cal-

culado a partir del modelo K-2P.

Según nuestros resultados moleculares basados en los árboles del COI (véase las Figs. 5.4 y 5.5) en el sur de Sudamérica habitan al menos 14 especies bien diferenciadas del género *Rineloricaria*. Este resultado fue obtenido gracias a la secuenciación de al menos un ejemplar por localidad y por morfotipo. Otro modo de evaluar la diversidad de especies fue mediante el criterio de distancias genéticas ínter e intraespecíficas calculados con el modelo K-2P. Los valores de divergencia intra-específicos fueron de 0- 1.17 % (véase la diagonal de la Tab. 5.1). Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular (y en la diagonal de la Tab. 5.1 se observa un —). Los valores inter-específicos entre las especies definidas según el árbol basado en COI, han sido de 3,01- 14,57 % (véase la Tab. 5.1). Encontrándose el valor más bajo entre *R. catamarcensis* y *R. aff. lima*. Observamos en estos resultados que de las 14 especies cinco no están aún identificadas y podrían representar nuevas especies. Se ha decidido llamarlas linajes hasta su formal descripción o identificación.

En el territorio argentino, se ha verificado la presencia de siete especies de *Rineloricaria*, dos de ellas serían linajes que corresponden a nuevas especies a describir o a identificar: *Rineloricaria* sp. 4 y *Rineloricaria* sp. 5. En ambos casos, se ha logrado colectar pocos ejemplares, por consecuencia, hasta no obtener un mayor número de individuos no será posible trabajar en la descripción de estas potenciales nuevas especies.

Según nuestros resultados, la distribución de cada una de las especies puede resumirse en la Tab 5.2 y en la Fig. 5.3. Como se observa, las especies más ampliamente distribuidas son *R. catamarcensis* presente en gran parte de la cuenca del Plata y en el sistema endorreico de Mar Chiquita; *R. parva* en los ríos Paraná y Paraguay y *R. lanceolata* que, sorpresivamente, se encuentra tanto en la cuenca del Plata como en la cuenca del Amazonas.

5.2.2. Análisis filogenéticos del género *Rineloricaria*

Análisis basados en COI

El alineamiento final de gen mitocondrial COI para el género *Rineloricaria* comprendió 108 secuencias de las cuales seis representan el *outgroup*. Setenta secuencias de un largo de aproximadamente 650 pb han sido tomadas del *Genbank* o del consorcio internacional *Barcoding*. El resto de las secuencias se amplificaron en el laboratorio, logrando obtener un total de 744 pb. Según el

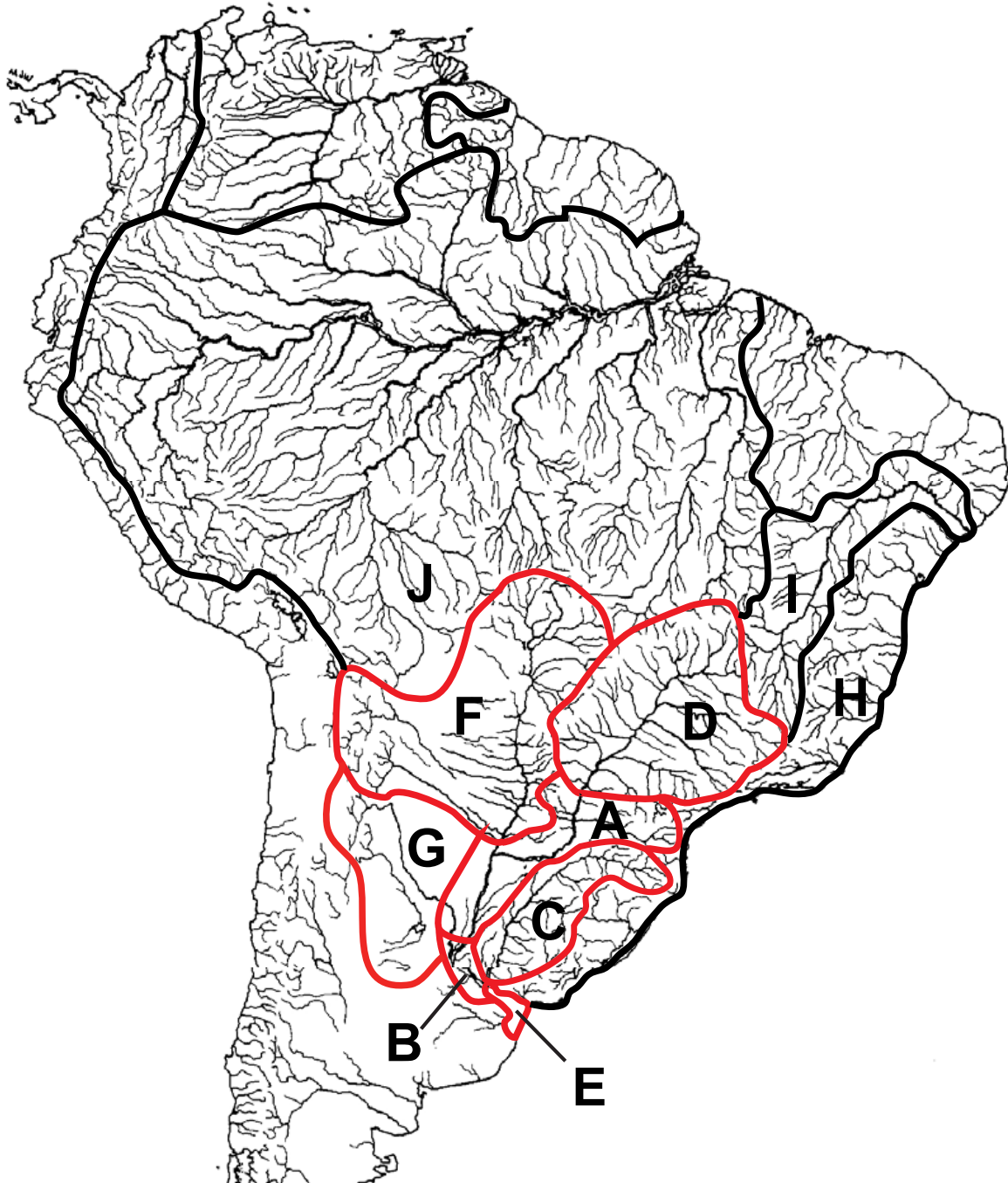


Figura 5.3: Mapa con las áreas utilizadas en los análisis biogeográficos. Las líneas rojas muestran las áreas que corresponden a la cuenca del Plata. Cada área fue codificada con una letra: A= Medio Paraná; B= Paraná Bajo; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= Río de la Plata F=Paraguay; G= Sistema Mar Chiquita; H= ríos costeros del sur; I= São Francisco y J= Amazonas.

Tabla 5.2: Distribución de las especies del género *Rineloricaria*. Los nombres de las cuencas o sub-cuencas han sido codificados del siguiente modo: D=Alto Paraná; A=Medio Paraná; B=Bajo Paraná; C=Uruguay; E=Río de la Plata; F=Paraguay; H=ríos de la costa sur de Brasil; I=São Francisco; J=Amazonas y G= sistema endorreico de Mar Chiquita. La "X" significa que la especie en cuestión habita la cuenca o sub-cuenca indicada.

	D	A	B	C	E	F	H	I	J	G
<i>R. lanceolata</i>		X				X			X	
<i>R. latirostris</i>	X									
<i>R. catamarcensis</i>		X	X	X	X					X
<i>R. misionera</i>		X								
<i>R. uracantha</i>	X									
<i>R. parva</i>		X	X			X				
<i>R. sp. 1</i>	X									
<i>R. sp. 2</i>								X		
<i>R. sp. 3</i>							X			
<i>R. sp. 4</i>				X						
<i>R. sp. 5</i>		X								
<i>I. steinbachi</i>		X				X				
<i>R. aff. lima</i>							X			
<i>R. aff. kronei</i>							X			

programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es TIM2+I+G.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

La topología del árbol MV fue idéntica al obtenido por IB. En la Fig. 5.4 se puede observar esta topología. Sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -4423,05$; $\alpha = 0,191$; $\pi(T) = 0,29$, $\pi(C) = 0,26$, $\pi(A) = 0,26$, $\pi(G) = 0,17$.

Como observamos, en este resultado, el género *Rineloricaria* es un grupo monofilético, reuniendo a todas las especies analizadas en el clado A (80 %BB). Dentro del género, la primera especie en diferenciarse es *R. uracantha*, seguida por *R. lanceolata* (100 %BB). Luego, vemos un clado llamado B (95 %BB), el cual presenta una politomía de grado tres compuesta por: (i) el linaje *Rineloricaria* sp. 1 (100 %BB); (ii) un clado que contiene a *R. latirostris* y al linaje *Rineloricaria* sp. 2 (100 %BB) y (iii) el clado llamado C (56 %BB). Este último clado puede dividirse a su vez en dos grupos: D (66 %BB) y E (63 %BB). El clado D presenta dos pares de especies hermanas, por un lado *R. misionera* e *I. steinbachi* (59 %BB) y por otro lado a los linajes *Rineloricaria* sp. 4 y *Rineloricaria* sp. 5 (73 %BB). Finalmente, el clado E

muestra en su base a la especie *R. parva* (100%BB), luego definimos al clado F (100%BB), el cual muestra a *R. aff. lima* (100%BB), seguida del linaje *Rineloricaria* sp. 3 (100%BB), y del par *R. aff. kronei* (100%BB) y *R. catamarcensis* (98%BB).

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

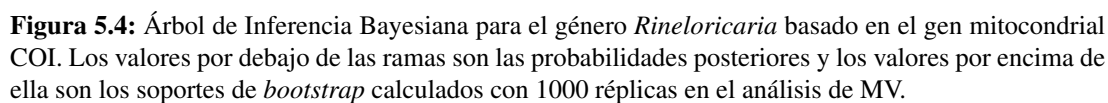
En la Fig. 5.4 se puede observar el árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes. Debajo de cada una de las ramas puede observarse los valores de probabilidad posteriores. La topología de este árbol es idéntica a la del árbol obtenido por MV.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 100 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 5.5. Debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. En este resultado encontramos varios de los grupos definidos en los análisis de MV e IB. En este análisis vemos que el clado A (87 JN), el cual reúne todas las especies de *Rineloricaria* presenta una politomía entre las especies *R. uracantha*; *R. lanceolata* (100 JN) y el clado B (97 JN). También observamos la presencia del clado C (70 JN) en este árbol, pero, a diferencia de los análisis anteriores, dentro de este clado vemos una politomía de grado seis compuesta por *R. misionera*; *I. steinbachi*; *Rineloricaria* sp. 4; *Rineloricaria* sp. 5; *R. parva* y por el clado F (91 JN). Este Clado F, al igual que en los análisis MV e IB, presenta a *R. aff. lima* (99 JN), seguida del linaje *Rineloricaria* sp. 3 (98 JN), y del par *R. aff. kronei* (100 JN) y *R. catamarcensis* (94 JN).

Análisis basados en F-reticulon-4

El alineamiento final de gen nuclear F-reticulon-4 (FRTN4) para el género *Rineloricaria* comprendió 17 secuencias dado que aquí se decidió amplificar solamente un ejemplar por especie definida a partir del marcador COI. Seis secuencias representan el *outgroup*. Tres secuencias de un largo de aproximadamente 2200 pb han sido tomadas del *Genbank* y tres han sido gentilmente aportadas por el Dr. R. Covain del Museo de Historia Natural de Ginebra. En este análisis, se han incorporado dos especies más para el género: *R. platyura* y *R. osvaldoi*. El largo de las secuencias ha sido muy variables según las especies, con lo cual el paso de alineamiento ha resultado muy la-



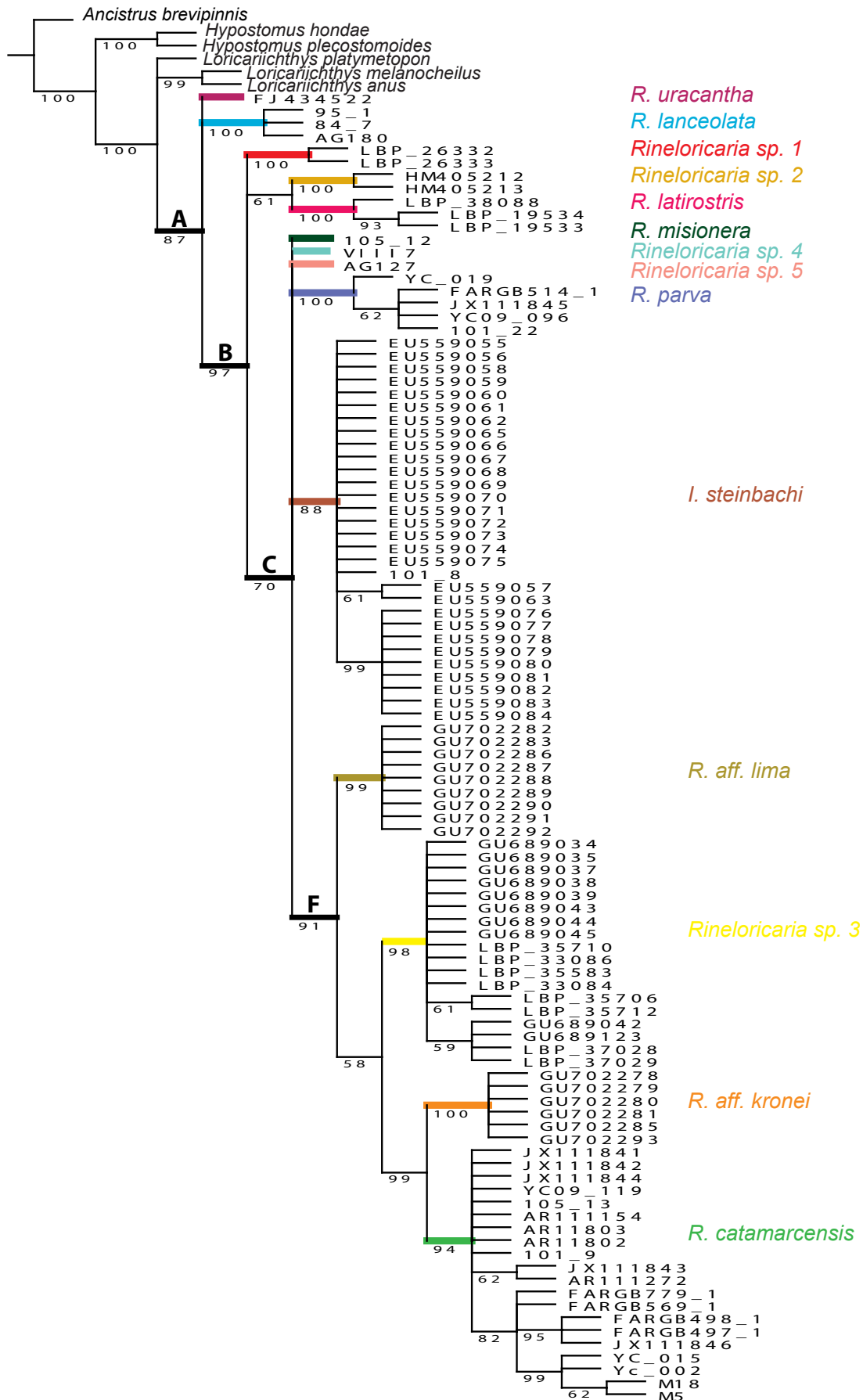


Figura 5.5: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Rineloricaria* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores debajo de cada rama son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

borioso. El alineamiento final fue de 2700 pb. No se ha podido amplificar este gen para las especies *R. uracantha*, *R. aff. kronei*, *R. aff. lima*, *Rineloricaria* sp. 1, *Rineloricaria* sp. 2, ni *Rineloricaria* sp. 3 debido que no se ha logrado obtener material genético a disposición (las secuencias COI de estas especies han sido tomada del *Genbank*). Para el linaje *Rineloricaria* sp. 4, no se ha logrado obtener una secuencia FRTN4 de buena calidad y utilizable para este análisis.

Dado que la fracción del gen FRT4 amplificada representa a dos intrones y dos exones, se ha particionado el alineamiento indicando el comienzo y el fin de cada uno de estos segmentos. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos es GTR más la distribución gamma tanto para los intrones como para los exones.

- Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

La topología del árbol MV fue idéntica al obtenido por IB. En la Fig. 5.6 se puede observar esta topología. Sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 % obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -43567,976$; $\alpha = 0,134$;

Partición 1 (intrones de FRTN4): $\pi(T) = 0,22$, $\pi(C) = 0,22$, $\pi(A) = 0,17$, $\pi(G) = 0,24$.

Partición 2 (exones de FRTN4): $\pi(T) = 0,24$, $\pi(C) = 0,32$, $\pi(A) = 0,18$, $\pi(G) = 0,24$.

En este análisis, encontramos nuevamente que el género *Rineloricaria* forma un grupo monofilético, reuniendo a todas las especies en el clado A (100% BB). La adición de la especie *R. platyura*, ha permitido redefinir un nuevo clado, dado que es esta especie la que encontramos en la base del género en este nuevo análisis. A partir de allí, podemos ver dos grupos bien sustentados para el resto de las especies. El primero de ellos está compuesto por las especies *R. osvaldoi* y *R. lanceolata* (52%BB). El segundo clado, llamado C (97%BB), se corresponde al clado C definido anteriormente en el análisis del marcador COI. Este clado está formado por la especie *R. parva* en la base, seguido *R. catamarcensis*, luego *I. steinbachi* y finalmente *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera*. El clado que reúne a *I. steinbachi*, *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera* (100%BB) está en concordancia con el clado D definido con el marcador mitocondrial COI.

- Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

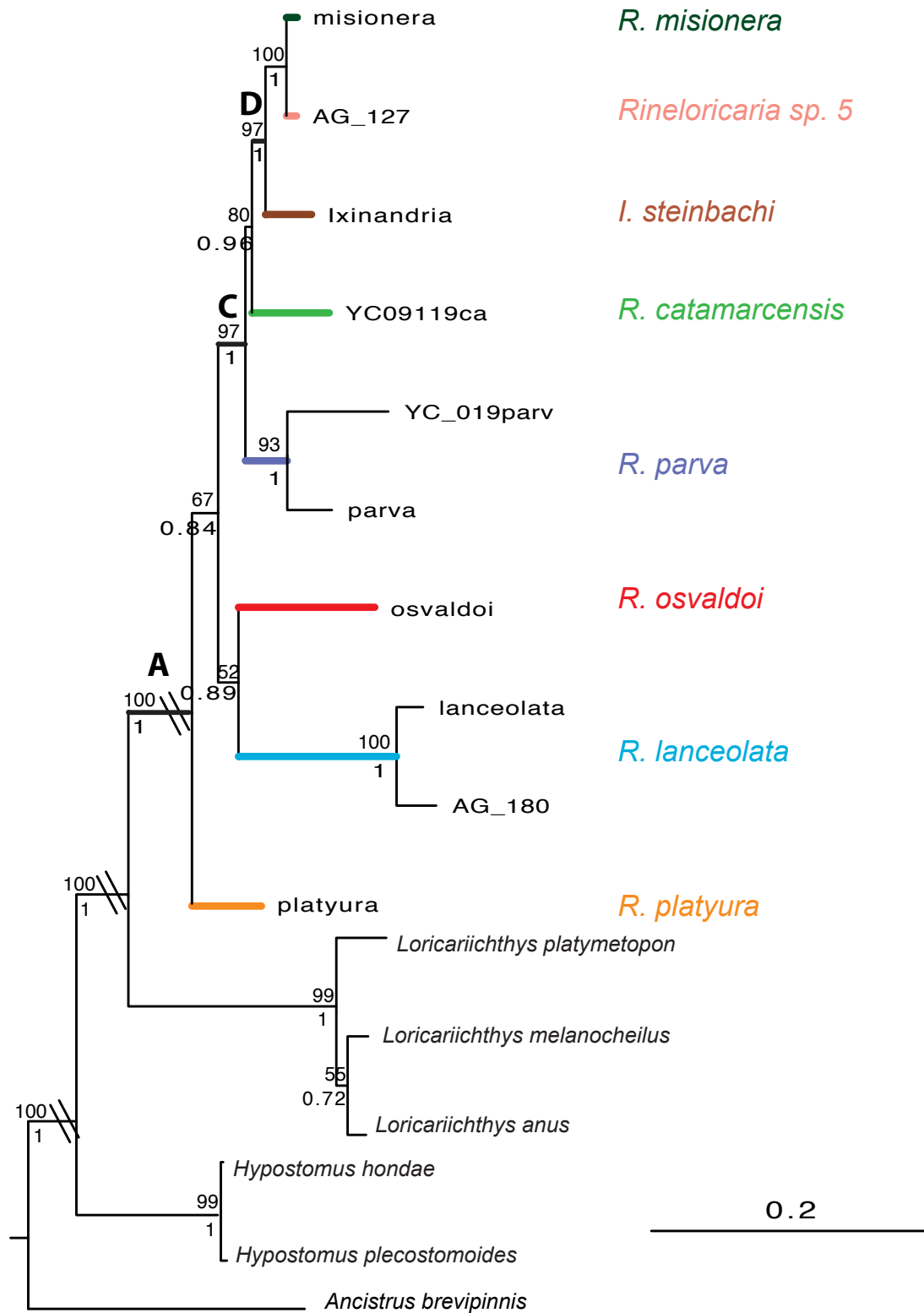


Figura 5.6: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Rineloricaria* basado en el gen nuclear FRTN4. Los valores por debajo de las ramas son las probabilidades posteriores y los valores por encima de ellas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

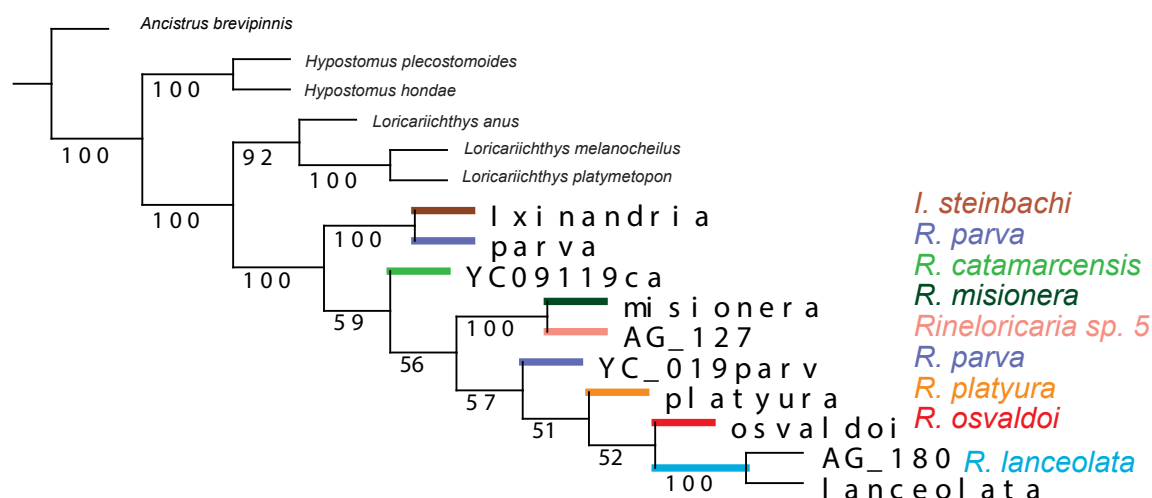


Figura 5.7: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Rineloricaria* basado en el gen nuclear FRTN4. Los valores debajo de cada rama son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

En la Fig. 5.6 se puede observar el árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes. Debajo de cada una de las ramas puede observarse los valores de probabilidad posterior. La topología de este árbol es idéntica a la del árbol obtenido por MV.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis de MP, se retuvo solamente un árbol para en el cual se calcularon los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. El árbol MP puede verse en la Fig. 5.7, debajo de cada una de las ramas se observan los valores de JN. A partir de este análisis vemos que nuevamente el género *Rineloricaria* forma un grupo monofilético, clado A (100 JN). Contrariamente a los análisis anteriores, aquí observamos que las especies que se encuentran en la base del género son *I. steinbachi* y un representante de *R. parva* (100 JN). Luego se diferencia *R. catamarcensis*, seguida de un clado que reúne a *Rineloricaria sp. 5* y *R. misionera* (100 JN). Luego es el turno del otro representante de *R. parva*, de *R. platyura*, *R. osvaldoi* para terminar con *R. lanceolata*. Nótese que en este análisis la especie *R. parva* no aparece como monofilética y que *R. lanceolata* y *R. osvaldoi* serían las especies más derivadas. Este resultado resulta completamente opuesto a todos los análisis realizados anteriormente.

Análisis a partir de múltiples genes

El alineamiento final de este análisis de genes concatenados (COI + FRTN4) para el género *Rineloricaria* comprendió 15 secuencias, seis de ellas representan el *outgroup*. Solo se han utilizado aquellas especies para las cuales se ha obtenido ambos marcadores. El alineamiento comprende la partición de los datos indicando donde empieza y donde termina cada gen y donde empieza y donde terminan los intrones y exones del gen nuclear FRTN4. El alineamiento resultante fue de aproximadamente 3440 pb. Según el programa TreeFinder, a la primera partición de este superalineamiento, sección del gen COI, le corresponde el modelo J2 más gamma y a la segunda parte, sección gen FRTN4, le corresponde el modelo TN más gamma tanto para los intrones como para los exones.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

En la Fig. 5.8 se puede observar la topología del árbol MV obtenido en el programa TreeFinder, sobre cada una de las ramas del árbol se observan los valores de *bootstrap* (BB) mayores al 50 %, obtenidos con 1000 réplicas. Los parámetros calculados para este árbol son:

$\log lk = -41160,15$; $\alpha = 0,143$;

Partición 1 (COI): $\pi(T) = 0,29$, $\pi(C) = 0,25$, $\pi(A) = 0,25$, $\pi(G) = 0,20$.

Partición 2 (intrones de FRTN4): $\pi(T) = 0,35$, $\pi(C) = 0,21$, $\pi(A) = 0,28$, $\pi(G) = 0,14$.

Partición 3 (exones de FRTN4): $\pi(T) = 0,24$, $\pi(C) = 0,31$, $\pi(A) = 0,18$, $\pi(G) = 0,26$.

En este análisis donde se ha utilizado la máxima evidencia a disposición, encontramos nuevamente que el género *Rineloricaria* forma un grupo monofilético, reuniendo a todas las especies en el clado A (100% BB). En la base del género vemos a *R. lanceolata*. Luego, a partir de allí observamos al clado C, definido anteriormente (99%BB), donde se diferencia la especie *R. parva*, seguida *R. catamarcensis*, luego *I. steinbachi* y finalmente *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera*. El clado que reúne a *I. steinbachi*, *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera* (100%BB) está en concordancia con el clado D definido con COI y FRTN4.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

En la Fig. 5.8 se puede observar el árbol IB obtenido en el programa Mr Bayes. Debajo de cada una de las ramas puede verse los valores de probabilidad posteriores. La topología de este árbol es idéntica a la del árbol obtenido por MV.

Figura 5.8: Árbol de Inferencia Bayesiana para el género *Rineloricaria* basado en dos genes concatenados (COI y FRTN4). Los valores por debajo son las probabilidades posteriores y los valores por encima de las rama son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas en el análisis de MV.

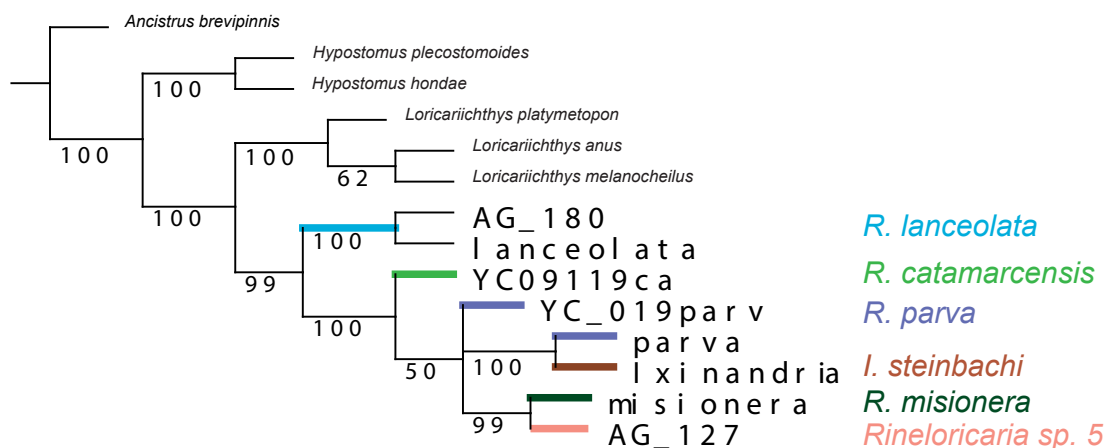


Figura 5.9: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Rineloricaria* basado en dos genes concatenados (COI y FRTN4). Los valores por debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvo solamente un árbol, a partir del cual se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 5.9 por debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. En este árbol se puede observar que todos los representantes del género *Rineloricaria* forman un grupo monofilético (99 JN). La primera especie en diferenciarse es *R. lanceolata*. Luego se puede diferenciar a la especie *R. catamarcensis*. A partir de allí se observa una tricotomía: (i) un representante de *R. parva*, (ii) un clado con otro representante de *R. parva* y *I. steinbachi* (100 JN) y (iii) otro clado que reúne a *R. misionera* y *Rineloricaria* sp. 5 (99 JN).

5.2.3. Calibración del reloj molecular

El test de *log-likelihood ratio*, el cual fue utilizado para verificar que nuestros datos (matriz de los cinco genes concatenados) no poseen tasas de mutación constantes, ha mostrado que las diferencias entre los valores de verosimilitud cuando forzamos los datos a un reloj molecular y cuando no lo hacemos son significativas ($X^2 = 2(\log L_0 - \log L_1) = 667,9675$; d.f. = 22; $P = 1,3456 \times 10^{-127}$). Este resultado indica que las secuencias de los representantes del *ingroup* utilizado evolucionan con una tasa que no es homogénea a lo largo del árbol filogenético.

Con el objetivo de estimar las fechas de los eventos de diversificación en el género *Rinelo-*

ricaria que habitan la cuenca del Plata, se ha calibrado los datos moleculares basados en el gen mitocondrial COI. El resultado obtenido con el programa BEAST puede observarse en la Fig. 5.10. La topología del árbol reconstruido con BEAST es similar a las obtenidas en la sección anteriormente con los análisis de MV y IB (véase la Fig. 5.4) salvo que en este nuevo análisis se han resuelto todas las politomías. Siguiendo nuestros resultados, vemos que el origen del género del *Rineloricaria*, clado A de la Fig. 5.10, se remonta a 80,6 Ma (95 % highest posterior density interval o HPD: 46,61-126,02). Esta fecha estima la separación de la especie *R. uracantha* del resto de las especies del género. Mientras que la diferenciación de la especie *R. lanceolata* fue estimada en 73 Ma (95 % HPD: 40,94-111,98). Sin embargo aquí hay que ser cauteloso con este resultado dado que los valores de soporte para este nodo son muy bajos dejando en duda la relación de esta especie dentro del género.

El origen del clado B fue estimado en 47,92 Ma (95 % HPD: 28,53-73,88). Este clado se puede dividir según el análisis en BEAST en dos grupos. El primero de ellos compuesto por tres especies y contiene dos fechas de especiación. Uno de los eventos de especiación fue calculado en 41,41 Ma y el otro en 25,26 Ma. El otro grupo está indicado como clado C. El origen de este clado fue estimado en 41,92 Ma (95 % HPD: 23,75-63,94). El clado C puede dividirse en dos grupos llamados D y E.

El clado D contiene especies exclusivas de la cuenca del Plata, su origen fue estimado en 23,86 Ma (95 % HPD: 11,86-39,09), mientras que los dos eventos de especiación dentro de este clado fueron datados en 16,7 y 15,24 Ma (95 % HPD: 6,62-28,83 y 6,06-26,53 respectivamente).

El clado E, presenta en la base a la especie *R. parva*, la fecha de diferenciación para esta especie que se encuentra en la cuenca del Plata, fue calculada en 35,29 Ma (95 % HPD: 19,49-55,54). Dentro de este clado vemos que la especie *R. catamarcensis*, también presente en la cuenca del Plata y cuya fecha de especiación fue estimada en 9,01 Ma (95 % HPD: 3,25-16,49).

5.2.4. Reconstrucción de áreas ancestrales

Los distintos escenarios biogeográficos analizados con RASP (S-DIVA, BBM y DEC) están presentados en la Fig. 5.11. El análisis de S-DIVA es el que ha estimado un menor número de áreas ancestrales combinadas. Ninguno de los tres análisis ha podido estimar con certeza cual es el área ancestral del género *Rineloricaria* (nodo 39, clado A de la Fig. 5.11). Sin embargo este resultado hay que tomarlo con precaución dado que en la matriz de distribuciones de las especies

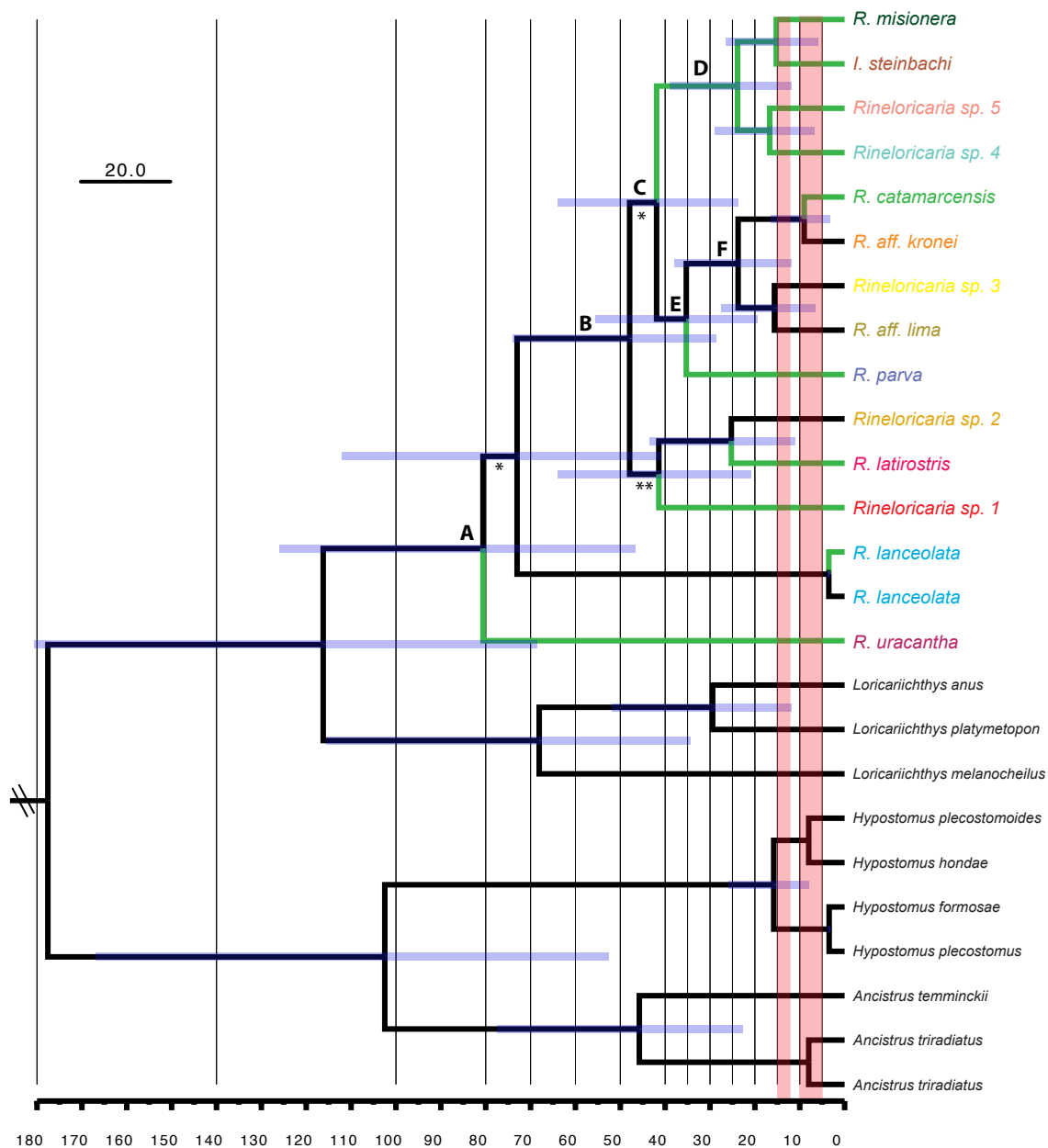


Figura 5.10: Resultados gráficos de los análisis del programa BEAST para el género *Rineloricaria*. Las ramas del árbol en verde muestran los clados y especies que habitan en la cuenca del Plata. La escala abarca desde el presente hasta 180 millones de años. Un asterisco indica nodos con probabilidades posteriores de 0,75-0,51, dos asteriscos nodos de < 0,50 de PP. Las barras muestran los intervalos de credibilidad del 95 %HPD para la estimación de los tiempos de divergencia. Los cuatro grandes clados y subclados del género están indicados. En rojo se indican los dos máximos de inundación de la ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata.

outgroup fueron todas codificadas como distribuidas en la cuenca del Amazonas y que además hay muchas especies del género que faltan en este análisis. El análisis de DEC ha sido el que más áreas combinadas ha propuesto, dejando la mayor parte de los nodos sin resolver.

Los análisis de S-DIVA y DEC muestran que el nodo que reúne a los dos ejemplares de la especie *R. lanceolata* tiene un área ancestral que combina al río Paraná Medio y al Amazonas (nodo 26 de la Fig. 5.11) y proponen entonces un evento vicariante entre ambas regiones como el proceso que podría haber tenido lugar para llevar a cabo la actual distribución de esta especie.

Para el clado B, la única metodología que ha sugerido una única área fue S-DIVA, la cual estimó que el área ancestral de este clado estaría conformada por un área compuesta por Paraná Medio y el Paraná Alto (ver el nodo 37 de la Fig. 5.11). Sin embargo en el análisis de BBM podemos ver que las dos áreas con mayor probabilidades de ser el áreas ancestral de este clado son también el Paraná Medio y Alto.

Para el clado C, tanto S-DIVA como BBM han sugerido que el área ancestral estaría representada por el Paraná Medio (nodo 34 de la Fig. 5.11). Mientras que DEC ha estimado al menos cinco áreas posibles todas ellas siendo una combinación de varias áreas.

El áreas ancestral del clado D fue estimado por las tres metodologías como el Paraná Medio. Dentro de este clado el nodo 32 fue estimado también por las tres metodologías como el Paraná Medio, mientras que el nodo 31 fue estimado por S-DIVA y DEC con un área combinada entre Paraná Medio y Uruguay, proponiendo entonces un evento vicariante para explicar la distribución actual de las especies *Rineloricaria* sp 4 y *Rineloricaria* sp. 5.

El clado E esta representado por uno de los nodos (30 de la Fig. 5.11) menos resueltos del análisis de reconstrucción de áreas. Sin embargo, según BBM podemos ver que el Paraná Medio ha jugado un rol importante en este nodo.

Para el clado F el único análisis que permite ver cierta resolución en la reconstrucción de las áreas ancestrales es el análisis de BBM. Esta metodología ha estimado que el área ancestral más probable para este nodo (29 de la Fig. 5.11) es la región de los ríos costeros del sur de Brasil.

Finalmente, es interesante notar que el área ancestral para el nodo que reúne a la especie *R. catamarcensis* con *R. aff kronei* (nodo 27 de la Fig. 5.11), fue estimado según BBM como los ríos costeros del sur, los cual supone una dispersión posterior de *R. catamarcensis* hacia su distribución actual. Mientras que el análisis de DEC propone lo contrario: un área ancestral que corresponde a

la actual distribución de *R. catamarcensis* y una dispersión por parte de *R. aff kronei* hacia los ríos costeros del sur de Brasil. S-DIVA no ha podido estimar el área ancestral de este nodo.

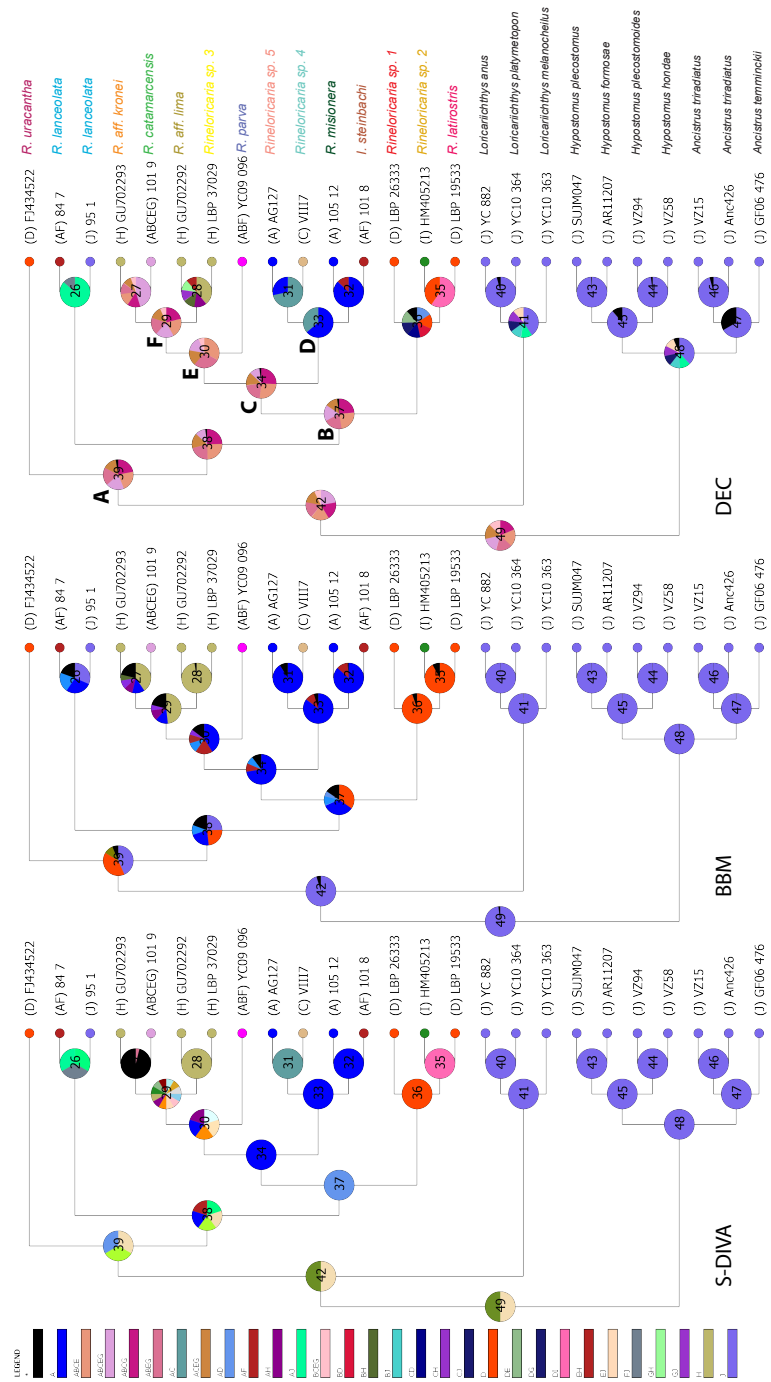


Figura 5.11: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA, BBM y DEC para el género *Rineloricaria*. Los tres análisis han sido obtenidos en el programa RASP. Cada región fue codificada con una letra: D=Alto Paraná; A=Medio Paraná; B=Bajo Paraná; C=Bajo Paraná; E=Río de la Plata; F=Paraguay; H=Ríos de la costa sur de Brasil; I=São Francisco; J=Amazonas y G= sistema endorreico de Mar Chiquita.

5.3. Discusión

El género *Rineloricaria* ha sido el modelo de estudio de este capítulo. Aquí, se ha trabajado tres objetivos diferentes. El primero de ellos fue determinar la diversidad de especies de este género en la cuenca del Plata y definir la distribución geográfica de cada una de ellas. El segundo objetivo fue conocer la relación filogenética de las especies antes definidas, para lo cual, se ha realizado análisis basado en COI y FRTN4 separadamente para luego hacer un análisis donde ambos marcadores han sido analizados simultáneamente. Finalmente se ha calibrado la filogenia del género *Rineloricaria* y reconstruido las áreas ancestrales de cada nodo. Por lo tanto, esta sección estará organizada de acuerdo a los objetivos antes planteados.

5.3.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Rineloricaria* en la cuenca del Plata

Basado en los resultados del gen mitocondrial COI (véase las Figs. 5.4 y 5.5) el género *Rineloricaria* puede dividirse en al menos 14 grupos monofiléticos. Para cada uno de estos grupos se ha calculado las distancias intra e interespecíficas, con el fin de comparar con la bibliografía si estas distancias estaban en el mismo orden de magnitud que lo propuesto para otros grupos de peces. El gen COI ha sido ampliamente estudiado para peces y otros organismos por ser parte del consorcio internacional *Barcoding*. Siguiendo el trabajo de Ward (2009) la tasa de divergencia entre especies de un mismo género de peces debería ser del orden de 3%; mientras que la tasa de divergencia intraespecífica debería ser cercana a 0.34%. Ward (2009) aclara también que si dos especies de peces difieren en un 2%, hay una probabilidad del 95% de que dichas especies sean dos especies diferentes. En este trabajo de tesis, los valores de las distancias calculadas entre las especies de *Rineloricaria* fueron desde 3,01% (entre *R. catamarcensis* y *R. aff. lima*) hasta de 14,57% (entre *R. uracantha* y *Rineloricaria* sp. 3). Por lo tanto estos valores concuerdan con los valores de referencia, sustentando la existencia de, por lo menos, 14 especies de *Rineloricaria* para el sur de Sudamérica.

Analizando las distribuciones geográficas de las especies definidas anteriormente, notamos que hay zonas de solapamiento entre ellas, generando de este modo especies con distribuciones simpátricas. En la cuenca del río Paraguay conviven *R. lanceolata*, *R. parva* y *I. steinbachi*; en la

cuenca del río Uruguay coexisten *R. catamarcensis* y *Rineloricaria* sp. 4; en la cuenca del río Paraná se encuentra la mayor diversidad de especies, contándose al menos nueve especies y siendo solamente, *R. aff. lima*; *R. aff. kronei*; *Rineloricaria* sp. 2 y *Rineloricaria* sp. 3 las especies que no habitan esta cuenca.

5.3.2. Análisis filogenéticos del género *Rineloricaria*

El segundo objetivo de este capítulo es reconstruir la estructura de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Rineloricaria*, para ello se ha empezado por analizar el gen COI mediante tres metodologías diferentes. Los tres tipos de análisis han generado topologías similares de árboles para las especies (véase las Figs. 5.4 y 5.5). En estos resultados hemos observado que las especies *R. uracantha* y *R. lanceolata* están en la base de género. Luego vemos una politomía donde se diferencian: (i) un clado que reúne *R. latirostris* y *Rineloricaria* sp. 2; (ii) *Rineloricaria* sp. 1 y finalmente (iii) un grupo llamado C donde encontramos al resto de las especies analizadas. Los análisis de MV e IB resuelven las relaciones de las especies restantes, proponiendo un clado D, E y F. La reconstrucción por MP no logra resolver la totalidad de las relaciones entre estas especies, sin embargo en este análisis se puede observar, al igual que en los análisis de MV e IB al clado llamado F, el cual reúne con altos valores de soporte a *R. aff. lima*; *Rineloricaria* sp. 3; *R. aff. kronei* y *R. catamarcensis*.

Las filogenias basadas en el gen nuclear FRTN4 (véase las Figs. 5.6 y 5.7) han generado diferentes topologías de árboles según la metodología utilizada. Los árboles MV e IB han sido idénticos (representado en la Fig. 5.6), presentando a la especie *R. platyura* en la base, luego un clado donde se reúne las especies *R. osvaldoi* y *R. lanceolata*. Finalmente observamos un clado con *R. parva* en la base, luego *R. catamarcensis*, *I. steinbachi*, *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera*. Estos análisis concuerdan con el árbol basado en COI dado que aquí también se recuperan a los clados C y D. En cambio, el análisis de MP (Fig. 5.7) ha sido considerablemente divergente, proponiendo un clado que agrupa *I. steinbachi* y *R. parva* y otro clado que reúne al resto de las especies, donde *R. catamarcensis* está en la base, luego aparecen *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera*, después, se puede observar otro ejemplar de *R. parva*, *R. platyura*, *R. osvaldoi* y *R. lanceolata*. Las únicas similitudes entre los análisis de COI y FRTN4 según MP, son el clado que reúne *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera* y el clado que une *R. osvaldoi* y *R. lanceolata*.

Finalmente, los árboles basados en los dos genes concatenados generados a partir de los análisis MV e IB (véase la Fig.5.8) presentan una topología semejante. Estos análisis son completamente idénticos a los resultados encontrados en los árboles MV e IB basados en FRTN4, concordando también con los análisis basados en COI donde se observa a *R. lanceolata* en la base del género y se pueden encontrar a los clados C y D definidos anteriormente. El análisis de genes concatenados, generado a partir de MP (véase la Fig.5.9) ha sido, una vez más, el más divergente. Este análisis propone a *R. lanceolata* en la base del género, resultado que concuerda con todos los análisis basados en COI y con los análisis basados en FRTN4 reconstruidos por MV e IB. Luego vemos que se diferencia la especie *R. catamarcensis* y a partir de allí se observa una politomía. Al igual que en el análisis MP basado en FRTN4, la especie *R. parva* no aparece como un grupo monofilético, una de las razones posibles de este resultado puede ser que una de las secuencias de esta especie presenta varios sitios de datos faltantes, lo cual genera diferencias artificiales entre las secuencias de la misma especie. En este últimos análisis, volvemos a encontrar que las especies *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera* aparecen como especies hermanas.

Las diferentes relaciones filogenéticas resultantes para el género *Rineloricaria* dependen tanto del gen estudiado como de la metodología aplicada. Hemos visto que generalmente los análisis MV e IB promueven resultados semejantes. Es interesante notar que los árboles basados en los genes concatenados obtenidos por MV e IB resultaron ser concordantes con los árboles basados COI y FRTN4 separadamente. Mientras que, el árbol de genes concatenados obtenido por MP resultó más semejante al árbol basado en COI obtenido también con esta metodología. Evidentemente, la influencia de cada uno de los genes dentro del análisis de genes concatenados varía según la metodología utilizada. Esto mismo se ha observado en los análisis filogenéticos del género *Loricariichthys* en el capítulo 4 de este trabajo.

5.3.3. Procesos de diversificación en la cuenca del Plata

Con el objetivo de analizar la historia biogeográfica del género *Rineloricaria* se ha abordado varios análisis que permiten estimar los posibles eventos que han dado lugar a la diversificación de las especies de este género en la cuenca De Plata. Uno de los análisis realizado orienta sobre una perspectiva temporal y el otro sobre una perspectiva espacial.

Según los resultados observados, la filogenia de *Rineloricaria* puede dividirse en cuatro clados

(véase las Figs. 5.4; 5.5 y 5.10). Dado que en algunos de estos clados se incluye al menos una especie que habita en la cuenca del Plata y especies de otros sistemas se puede deducir que una especiación alopátrica intercuenca ha participado de la diversificación de las especies de *Rineloricaria* de la cuenca del Plata. Pero, además, se ha observado que dentro de la filogenia del género hay en un clado con varios linajes que habitan exclusivamente la cuenca del Plata (en clado D de la Fig. 5.10). Este resultado indica que algún proceso de especiación ha tenido lugar dentro de esta cuenca generando diversidad de especies dentro de ella.

■ Análisis intercuenca

Para comenzar a discutir el análisis intercuenca del género *Rineloricaria* vamos a hacer referencia al proceso de diversificación de la especie *R. uracantha* (véase la Fig. 5.10). Este proceso fue calibrado por nuestro análisis en 80.6 Ma. Aunque en nuestro árbol esta especie se encuentra sola en la base de la filogenia, sabemos por medio de otros análisis que en realidad es parte de un clado que comprende más diversidad de especies, entre ellas *R. platyura* [incluida en nuestros análisis del gen nuclear FTN4 presentado en la Fig. 5.6). La mayoría de las especies del clado en el cual se encuentra *R. uracantha* están distribuidas en la cuenca del Amazonas y del Orinoco (comunicación personal del Dr. R. Covain según su trabajo de tesis doctoral (Covain, 2011)]. Por lo tanto, podemos postular que la edad de 80,6 Ma estimada en nuestros análisis no puede atribuirse a la fecha de especiación de *R. uracantha*, si no que debe ser interpretada como la fecha de origen del clado que comprende a esta especie. El surgimiento de la especie *R. uracantha* debe haber sido posterior a la edad calculada aquí. Sin embargo, a la luz de este razonamiento y siguiendo la distribuciones de las especies, podemos especular que un evento de especiación por parte de *R. uracantha* podría haber sido el resultado de un proceso alopátrico entre la cuenca amazónica y la cuenca del Plata.

El segundo proceso intercuenca que ha generado diversidad en el género *Rineloricaria* de la cuenca del Plata, no puede atribuirse a un evento de especiación dado que este proceso está representado por la especie *R. lanceolata*. Esta especie se encuentra tanto en la cuenca del Amazonas; en los ríos del escudo de las Guayanas como en la cuenca del Plata. En nuestro análisis se ha utilizado como punto de calibración del reloj molecular la divergencia entre dos individuos de *R. lanceolata*, uno de ellos proveniente del Amazonas y el otro del

Paraná Medio (véase la Fig. 5.10). Siguiendo el trabajo de Kennan *et al.* (1997) le se le ha asignado a este nodo la edad de 3,5 Ma, fecha en la cual los autores han documentado el último desplazamiento de los límites entre la cuenca amazónica y la cuenca del Plata. Por otra parte hemos visto que los análisis de reconstrucción de áreas ancestrales el nodo que reúne a los dos ejemplares de *R. lanceolata* tiene un área ancestral que combina al río Paraná Medio y al Amazonas, proponiendo un evento vicariante entre ambas regiones como el proceso que podría haber tenido lugar para llevar a cabo la actual distribución de esta especie.

El clado E está representado por cinco especies (véase la Fig. 5.10). Dos de ellas, *R. parva* y *R. catamarcensis*, se encuentran en la cuenca del Plata y las otras tres son exclusivas de los ríos costeros del sur de Brasil. La diferenciación de la especie *R. parva* ha sido calculada en 35,29 Ma según nuestro reloj molecular. Mientras que la fecha de especiación de *R. catamarcensis* fue estimada en 9,01 Ma por el mismo análisis. Ninguna de estas dos fechas puede atribuirse a algún evento hidro-geográfico documentado hasta el momento para las regiones geográficas que estas especies ocupan. Las fechas estimadas para el surgimiento de las especies de Loricariidos de los ríos costeros del sur han sido muy variables en la literatura (Montoya-Burgos, 2003; Roxo *et al.*, 2012) e incluso dentro de este mismo trabajo (ver capítulos sobre *Hypostomus*, *Loricariichthys* y *Ancistrus*).

Dentro de la filogenia del género *Rineloricaria* hemos visto un clado que contiene tres especies: *Rineloricaria* sp. 2; *R. latirostris* y *Rineloricaria* sp. 1 (véase la Fig. 5.10). A pesar de tener un bajo nivel de soporte, vale la pena discutir las relaciones de estas especies. *Rineloricaria latirostris* y *Rineloricaria* sp. 1 son especies que se encuentran en el Alto Paraná dentro de la cuenca del Plata, mientras que *Rineloricaria* sp. 2 esta distribuida en la cuenca del río São Francisco, Brasil. La fecha estimada para la separación entre esta última especie fue estimada en 30 Ma. Dos de los análisis de reconstrucción de áreas ancestrales han propuesto un evento vicariante entre el Alto Paraná y el São Francisco. Sin embargo el análisis de BBM propone un evento de dispersión desde el Paraná hacia el São Francisco (véase la Fig. 5.11). La relaciones faunísticas entre estas cuencas tiene una historia compleja. Se ha documentado numerosos intercambios de biota entre estas cuencas. Buckup (2011) demostró que el Alto Paraná y el río São Francisco comparte 63 especies de peces, esto representa el 19,6 % de la diversidad de peces del Alto Paraná y el 34,0 % de la diversidad del São Francisco. El alto

número de especies compartidas sugiere que una conexión geológica reciente entre ambas cuencas ha posibilitado en la dispersión de las especies. En este mismo trabajo de tesis hemos visto que para el género *Hypostomus* se ha identificado un evento de dispersión desde el Paraná hacia el río São Francisco hace 4.94 Ma, resultados que concuerdan con los obtenidos por Montoya-Burgos (2003) y Cardoso *et al.* (2012). Sin embargo, nuestros resultados para el género *Rineloricaria* proponen que los intercambios entre el Alto Paraná y el São Francisco pueden haber comenzado hace al menos 30 Ma.

En resumen, nuestros resultados y la bibliografía citada, sugieren que dentro del género *Rineloricaria* al menos cuatro eventos independientes de especiación alopátrica tuvieron lugar entre la cuenca del Plata y otros sistemas como el del Amazonas, los ríos costeros del sur de Brasil y el São Francisco. Algunos de estos eventos de especiación alopátrica podrían explicarse por conexiones temporales entre los sistemas, por ejemplo, durante períodos de grandes lluvias. Sin embargo la compleja historia geológica del continente sudamericano ha generado desplazamientos de los límites de las cuencas, generando eventos de dispersión y vicariancia enriqueciendo de este modo a la diversidad de especies.

■ Análisis intracuenas

El clado D es el único clado dentro de la filogenia del género *Rineloricaria* que contiene exclusivamente especies y linajes que habitan la cuenca del Plata (véase la Fig. 5.10). La diversidad dentro de este clado debe haber sido moldeada por fuerzas evolutivas que han actuado al interior de dicha cuenca, dando lugar a lo que se ha decidido llamar especiación intracuenca. El clado D presenta cuatro especies de *Rineloricaria*. El origen de este clado fue estimado en 23.86 Ma y la mayor parte de las áreas ancestrales del clado fueron inferidas como el Paraná Medio. Los dos eventos de especiación dentro de este clado fueron datados en 16.7 y 15.24 Ma. Estas fechas son muy cercanas al primer evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (15-13 Ma) (Hernández *et al.*, 2005). La extensa incursión marina en la cuenca del río Paraná, dentro de la cuenca del Plata, ha podido aislar a muchos de los tributarios de esta cuenca, generando varias especiaciones alopátricas por vicariancia en diferentes grupos de peces estrictamente de agua dulce. Una vez que el mar se ha retirado las nuevas especies pudieron haber dispersado a lo largo de toda la cuenca del Plata,

enriqueciendo, de este modo, la diversidad de especies.

5.4. Consideraciones finales

Basados en los resultados del gen mitocondrial COI, podemos afirmar que al menos 14 especies de *Rineloricaria* habitan en el sur de Sudamérica. Diez de estas especies están presentes en la cuenca del Plata, dos en los ríos de la costa del sur de Brasil, una en la cuenca del río São Francisco. La especie *R. lanceolata* parece tener una distribución muy amplia abarcando tanto la cuenca del Plata como la cuenca del Amazonas.

Los resultados filogenéticos realizados, basados en el gen COI, en el gen FRTN4 y en el análisis concatenado, demuestran que el género *Rineloricaria* es un grupo monofilético. En ocho de los nueve análisis realizados este género presenta en la base a la especie *R. lanceolata*, y luego un clado, llamado C. Este clado está compuesto por *R. parva* en la base, luego se diferencia *R. catamarcensis*, le sigue *I. steinbachi*, y por último aparecen las especies *Rineloricaria* sp. 5 y *R. misionera*.

Por otro lado, se ha analizado de manera preliminar los procesos que han podido generar la diversidad de especies de *Rineloricaria* dentro de la cuenca del Plata. Nuestros resultados han demostrado que la diversidad de este género es modulada por dos procesos diferentes. El primero de ellos es una diversificación intercuenca, el cual ha generado grupos de especies que habitan diferentes cuencas como resultado de eventos de dispersión o vicariancia entre la cuenca del Plata y otros sistemas tales como el Amazonas; los ríos costeros del sur y São Francisco. En este contexto, los cambios paleohidrológicos durante el Mioceno deben haber promovido rutas de dispersión y vicariancia que han permitido alcanzar un alto nivel de diversificación de especies de peces neotropicales. El otro proceso que ha jugado un rol importante en la diversidad de especies de *Rineloricaria* es una especiación que ha actuado dentro de la cuenca del Plata, y lo que se ha denominado: intracuenca. Este proceso produjo grupos de especies dentro de la cuenca del Plata debido a la fragmentación del hábitat. Hemos visto que el origen de la diversidad dentro de la cuenca del Plata concuerda temporalmente y geográficamente con la incursión marina del Mioceno. Tal como propone la hipótesis de los museos (Fjeldsø, 1994), esta ingresión marina debe haber fragmentado dicha cuenca provocando numerosos procesos de especiación. La biogeografía histórica del género *Rineloricaria* que se ha realizado en este trabajo, argumenta que diferentes cambios hidrogeológicos y cambios en el

nivel del mar han influenciado fuertemente a los eventos cladogenéticos observados en la filogenia de este género.

CAPÍTULO 6

El género *Ancistrus*

Este capítulo se centra en estudiar al género *Ancistrus* en la cuenca del Plata. En un primer apartado se detallarán aspectos taxonómicos y se evaluará la diversidad de este género y en un segundo apartado se mostrarán y discutirán los análisis filogenéticos realizados en el transcurso de esta tesis doctoral. A modo de un análisis preliminar, se ha realizado la calibración de la filogenia, así como también la reconstrucción de las áreas ancestrales para este género a partir en los datos filogenéticos obtenidos con el marcador COI.

6.1. Introducción

El género *Ancistrus* Kner, 1854, perteneciente a la tribu Ancistrini, subfamilia Hypostominae, cuenta con casi 60 especies que se distribuyen desde Panamá hasta el Río de la Plata. Existen es-



Figura 6.1: Tres ejemplares del género *Ancistrus* colectados en Argentina.

pecies de este género que pueden habitar ambientes de alta montaña (e.g. *Ancistrus bufonius* a más de 2000m de altura en Perú) así como también en zonas insulares (e.g. *Ancistrus cirrhosus* se encuentra en el Delta del río Paraná). Entre las particularidades de este género podemos nombrar la capacidad de revertir los odontodes y la hipertrofia de los mismos. Esta última característica, junto a la presencia de tentáculos carnosos en el dorso y los márgenes del hocico les permite tener un marcado dimorfismo sexual. Los machos maduros presentan tentáculos cutáneos en número variable, mientras que en las hembras estos tentáculos son pequeños, poco numerosos o están ausentes (véase la foto central de la Fig. 6.1). Sin embargo, existen algunas especies que no poseen estas características, como es el caso de *A. gymnorhichus*, en la que tanto machos como hembras poseen los tentáculos reducidos.

Actualmente el género *Ancistrus* está representado por 59 especies nominales (Ferraris, 2007). Según Fisch-Muller (2003), siete especies de *Ancistrus* fueron descritas y son válidas para la cuenca del Plata: *A. cirrhosus* (Valenciennes, 1836), *A. claro* (Knaack, 1999), *A. cuiabae* (Knaack, 1999), *A. formoso* (Sabino & Trajano, 1997), *A. pirareta* (Muller, 1989), *A. piriformis* (Muller, 1989) y *A. taunayi* (Miranda-Ribeiro, 1918). Además, de las especies nombradas, Fisch-Muller (2003) también cita para la cuenca del río Paraguay a las especies amazónicas *A. hoplogenyis* (Günther, 1864) y *A. dubius* (Eigenmann & Eigenmann, 1889). En el trabajo de Gasparetto-Bifi *et al.* (2009) los autores no logran obtener material de referencia de las especies *A. hoplogenyis* y *A. dubius* para el río Paraguay. Es por ello que consideran que las citas de estas especies para la cuenca del Plata fueron recogidas de viejas referencias (tales como Regan, 1904; Eigenmann & Kennedy, 1903) las cuales deben haber sido el resultado de malas identificaciones. Gasparetto-Bifi *et al.* (2009) describieron tres nuevas especies de *Ancistrus* para el río Iguazú: *A. abilhoai*, *A. agostinhoi* y *A. mullerae*, sumando, de este modo, un total de 12 especies para la gran cuenca del Plata.

Ancistrus cirrhosus, la especie tipo del género, fue descrita por Valenciennes en 1836 para Buenos Aires y Misiones, Argentina. Aparentemente no se ha preservado el holotipo de esta descripción. Pasado más de un siglo, en 1980 Isbrücker, designa como lectotipo y paralectotipos de esta especie a ejemplares provenientes de Buenos Aires. Sin embargo este procedimiento fue considerado inválido por Fisch-Muller (2003), dado que para ella, la localidad tipo debería ser alguna localidad cercana a Itaibaté en la provincia de Corrientes (comunicación personal). Para esta proposición Fisch-Muller sigue cuidadosamente las notas del viaje realizado por Valenciennes, en nuestro

país durante el siglo XIX. Allí, Fisch-Muller constata que Valenciennes relata su viaje desde la ciudad de Buenos Aires pero que éste llama *Misiones* a lo que en la actualidad corresponde a localidades de la provincia de Corrientes. Esto tal vez fue el resultado de la falta de comunicación debido a la diferencia del idioma o a la falta de detalles de las cartas geográficas utilizadas en la época.

6.2. Resultados

6.2.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Ancistrus* en la cuenca del Plata

La Fig. 6.2 muestra las localidades en donde se ha logrado coleccionar tejidos y/o ejemplares del género *Ancistrus* a partir de muestreos y colaboraciones. En total se han obtenido aproximadamente 80 tejidos que se depositaron en el Banco de Tejidos y ADN del Lab. de Ecología Molecular del CREG, en el MACN o en el ILPLA. En el apéndice A se puede observar la determinación taxonómica y la localidad de cada tejido y/o ejemplar utilizado en los análisis.

La diversidad dentro del género *Ancistrus* fue evaluada mediante dos técnicas diferentes. La primera de ellas fue la determinación morfológica clásica de medidas y conteos (ver más detalles en la sección 2.5) basándose en las claves de determinación publicadas (Gasparetto-Bifi *et al.*, 2009). Para muchos de los ejemplares capturados no fue posible llegar a una determinación específica, por ello fue necesario implementar como herramienta de caracterización de especies al marcador mitocondrial COI.

Cada especie fue definida como un grupo monofilético definido en las reconstrucciones filogenéticas, y en lo posible, acompañada de aspectos morfológicos que puedan caracterizarlo. Además, se implementó el porcentaje de divergencia genética basado en el marcador COI, calculado a partir del modelo K-2P.

Según nuestros resultados moleculares basados en el marcador mitocondrial COI al menos 19 linajes diferentes de *Ancistrus* fueron observados. Diecisiete de estos linajes están presentes en el sur de Sudamérica, mientras que dos de ellos son del norte de continente. Este resultado fue obtenido gracias a la secuenciación de al menos un ejemplar por localidad muestreada y por morfotipo observado. La diversidad de especies fue estimada mediante el criterio de distancias genéticas inter e intraespecíficas calculados con el modelo K-2P. Los valores de divergencia intraespecíficos fue-



Figura 6.2: Mapa con las localidades de los ejemplares utilizados del género *Ancistrus*. Ver más detalles sobre la determinación taxonómica y sobre cada punto de muestreos en el apéndice A. La mayor parte de los puntos están ubicados según los datos geo referenciados registrados durante las campañas de muestreo. Para la realización del mapa se utilizó el programa Google Earth.

ron de 0-1,74% (ver la diagonal de la Tab. 6.1). De las especies que solamente se ha obtenido una secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular. Los valores interespecíficos entre las especies definidas según COI, han sido de 2,22-11,0% (véase de la diagonal hacia abajo de la Tab. 6.1).

Tabla 6.1: Distancias genéticas para el género *Ancistrus* calculadas a partir del modelo K-2P. En la diagonal de la tabla se ven las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Los valores son expresados en %.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
(A) A. sp. 1	1.36																		
(B) A. sp. 2	3.06	0.51																	
(C) A. sp. 3	2.22	2.66	1.56																
(D) A. sp. 4	3.49	3.71	3.00	-															
(E) A. sp. 5	2.92	3.36	2.48	3.79	-														
(F) A. sp. 6	3.09	3.54	2.57	3.62	2.57	-													
(G) A. cirrhusus	3.09	3.77	3.47	4.44	3.74	3.92	0.23												
(H) A. brevipinnis	3.27	4.42	3.56	4.62	4.27	4.45	3.03	1.37											
(I) A. sp. 7	4.15	5.14	4.11	4.86	5.04	4.87	4.08	3.27	-										
(J) A. sp. 8	3.27	4.60	3.71	3.97	4.32	4.51	3.56	3.04	2.23	-									
(K) A. tanayui	3.39	4.24	3.36	4.86	3.80	3.80	3.56	3.27	3.27	3.45	-								
(L) A. multispinis	2.98	3.37	2.58	4.33	3.63	3.81	3.03	2.81	3.10	3.10	2.57	-							
(M) A. sp. 9	3.64	4.45	3.64	4.52	4.17	4.36	3.76	2.76	4.00	3.64	3.29	3.30	-						
(N) A. dubius	8.68	9.17	8.81	8.71	8.97	9.37	10.0	9.01	8.80	8.24	9.44	8.96	10.2	1.74					
(O) A. sp. 10	3.74	4.60	4.15	4.86	4.86	4.51	3.38	3.06	3.79	3.62	2.57	3.10	3.46	9.10	0.00				
(P) A. sp. 11	3.91	4.24	3.84	5.03	5.03	5.22	4.08	3.38	3.79	4.15	3.61	2.74	2.24	9.20	3.79	0.00			
(Q) A. sp. 12	4.68	5.32	4.38	5.58	5.22	5.41	4.27	3.92	3.62	4.33	3.80	3.63	3.47	9.64	4.68	2.22	-		
(R) A. triradiatus	9.80	9.11	8.91	9.36	8.62	9.94	10.1	9.50	8.66	9.14	8.43	9.06	9.20	11.0	8.54	8.53	9.43	0.56	
(S) A. temminiki	6.18	6.77	6.17	6.12	7.04	7.38	7.13	6.52	5.56	5.55	6.45	6.48	7.22	5.43	6.49	6.88	7.05	9.30	-

Según nuestros resultados, la distribución de cada una de las especies puede resumirse en la Tab. 6.2. Como se observa, las especies más ampliamente distribuidas son *A. cirrhosus* (presente en el Río de la Plata y Uruguay); *Ancistrus* sp. 3 (en el alto y medio Paraná) y *A. dubius* que, sorprendentemente, se encuentra tanto en el río Paraná como en la cuenca del río Amazonas. Es interesante notar que no se ha hallado ningún representante del género *Ancistrus* en el Bajo Paraná, en el río Paraguay ni en el sistema de ríos endorreicos de Mar Chiquita, a pesar que se ha muestreado con intensidad en estas zonas durante este trabajo de tesis, encontrándose sí otros miembros de la familia Loricariidae de hábitos ecológicos semejantes a los requeridos por los miembros del género *Ancistrus*. Como puede observarse, el Paraná Medio, el Uruguay y los ríos costeros del sur de Brasil poseen la mayor diversidad de especies con cinco especies o linajes cada uno.

6.2.2. Análisis filogenéticos del género *Ancistrus*

Análisis basados en COI

El alineamiento final de gen mitocondrial COI para el género *Ancistrus* comprendió 50 secuencias de las cuales nueve representan el *outgroup*. Diez secuencias de un largo de aproximadamente 650 pb han sido tomadas del *Genbank*, el resto se amplificaron en el laboratorio, logrando obtener un total de 859 pb. Según el programa TreeFinder, el modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos fue J2 más la distribución gamma.

■ Árbol según Máxima Verosimilitud (MV)

En la Fig. 6.4 se puede observar el árbol MV obtenido en el programa TreeFinder, el género *Ancistrus* es monofilético. Los parámetros calculados para este árbol son: $\log lk = -48953,150$; $\alpha = 0,24$; $\pi(T) = 0,28$, $\pi(C) = 0,27$, $\pi(A) = 0,27$, $\pi(G) = 0,14$. Este clado se divide en dos grupos. El primer grupo, comprende a las especies *A. dubius* y *A. temminckii* (99%BB). El segundo clado, presenta en la base a la especie *A. triradiatus* y luego al clado llamado A (99%BB). Dentro del clado A, vemos una sucesión de especies que se diferencian, la primera de ellas es *A. sp. 12*, luego *A. sp. 11*, *A. sp. 9*, le sigue un ejemplar de *A. brevipinnis*. Luego observamos la separación de un clado que contiene a *A. tanaui* y *A. sp. 10*. A partir de este punto se ve una tricotomía compuesta por: un nodo que reúne a *A. sp. 7* y *A. sp. 8*; dos ejemplares de *A. brevipinnis* y un gran nodo llamado B. Dentro del nodo B observamos que la

Tabla 6.2: Distribución de las especies del género *Ancistrus*. Los nombres de las cuencas o subcuencas han sido codificados del siguiente modo: A= Medio Paraná; B= Río de la Plata; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= ríos costeros del sur; F=Amazonas; G= Guyanas y H= Lago Maracaibo y río Orinoco . La "X" significa que la especie en cuestión habita la cuenca o subcuenca indicada. Los ríos que forman parte de la cuenca del Plata están indicados con #, así como también las especies que habitan en dicha cuenca. Véase también la Fig. 6.3

	D #	A #	C #	B #	E	F	H	G
A. sp. 1 #		X						
A. sp. 2 #		X						
A. sp. 3 #	X	X						
A. sp. 4 #		X						
A. sp. 5 #		X						
A. sp. 6 #	X							
A. cirrhosus #			X	X				
A. brevipinnis					X			
A. sp. 7 #			X					
A. sp. 8 #			X					
A. tanauyi #			X					
A. multispinis					X			
A. sp. 9					X			
A. dubius #		X				X		
A. sp. 10 #			X					
A. sp. 11					X			
A. sp. 12					X			
A. triradiatus							X	
A. temminki								X

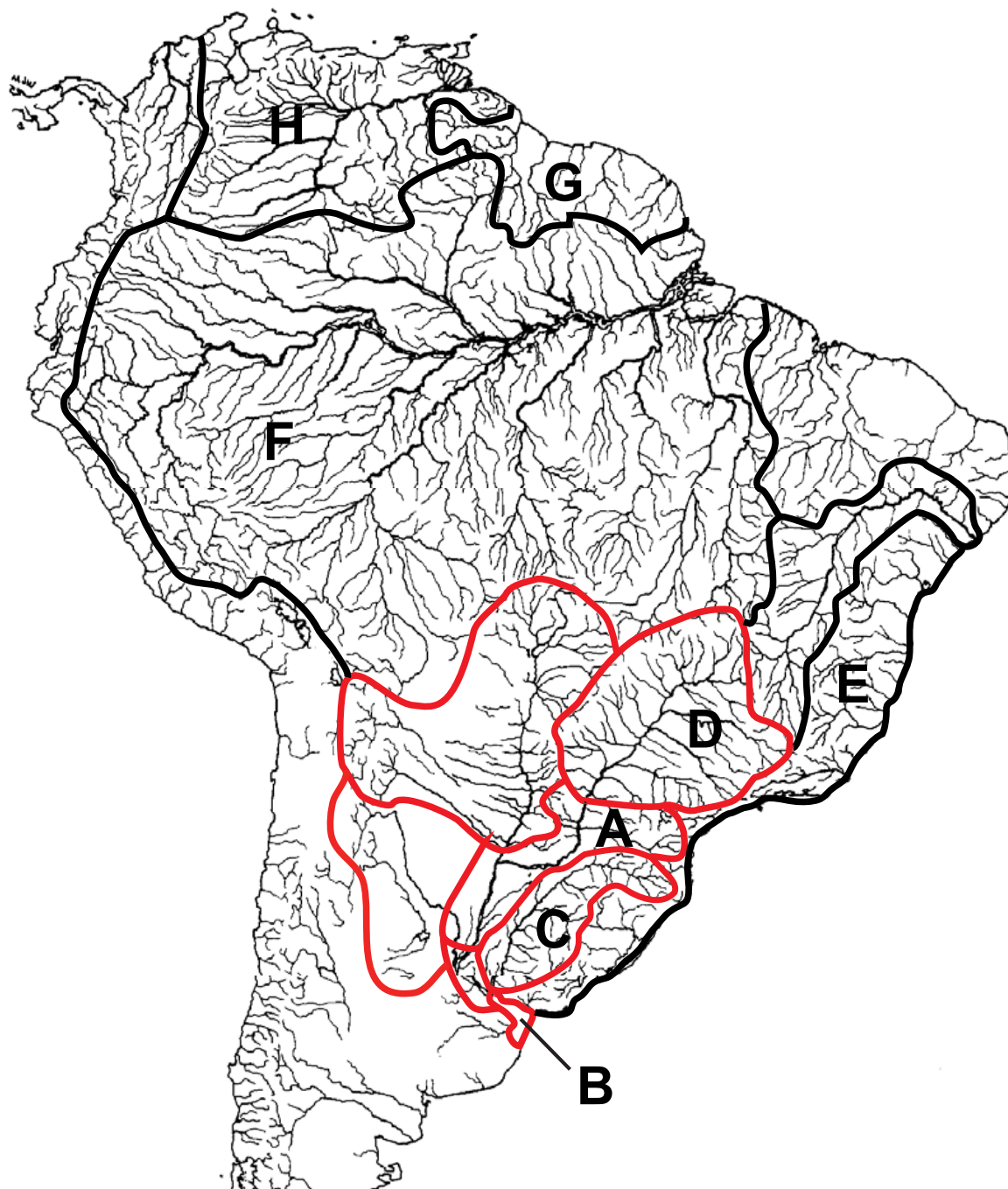


Figura 6.3: Mapa con las áreas utilizadas en los análisis biogeográficos. Las líneas rojas muestran las áreas que corresponden a la cuenca del Plata. Cada área fue codificada con una letra: A= Medio Paraná; B= Río de la Plata; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= ríos de la costa del sur; F=Amazonas; G= Guyanas y H= Lago Maracaibo y río Orinoco.

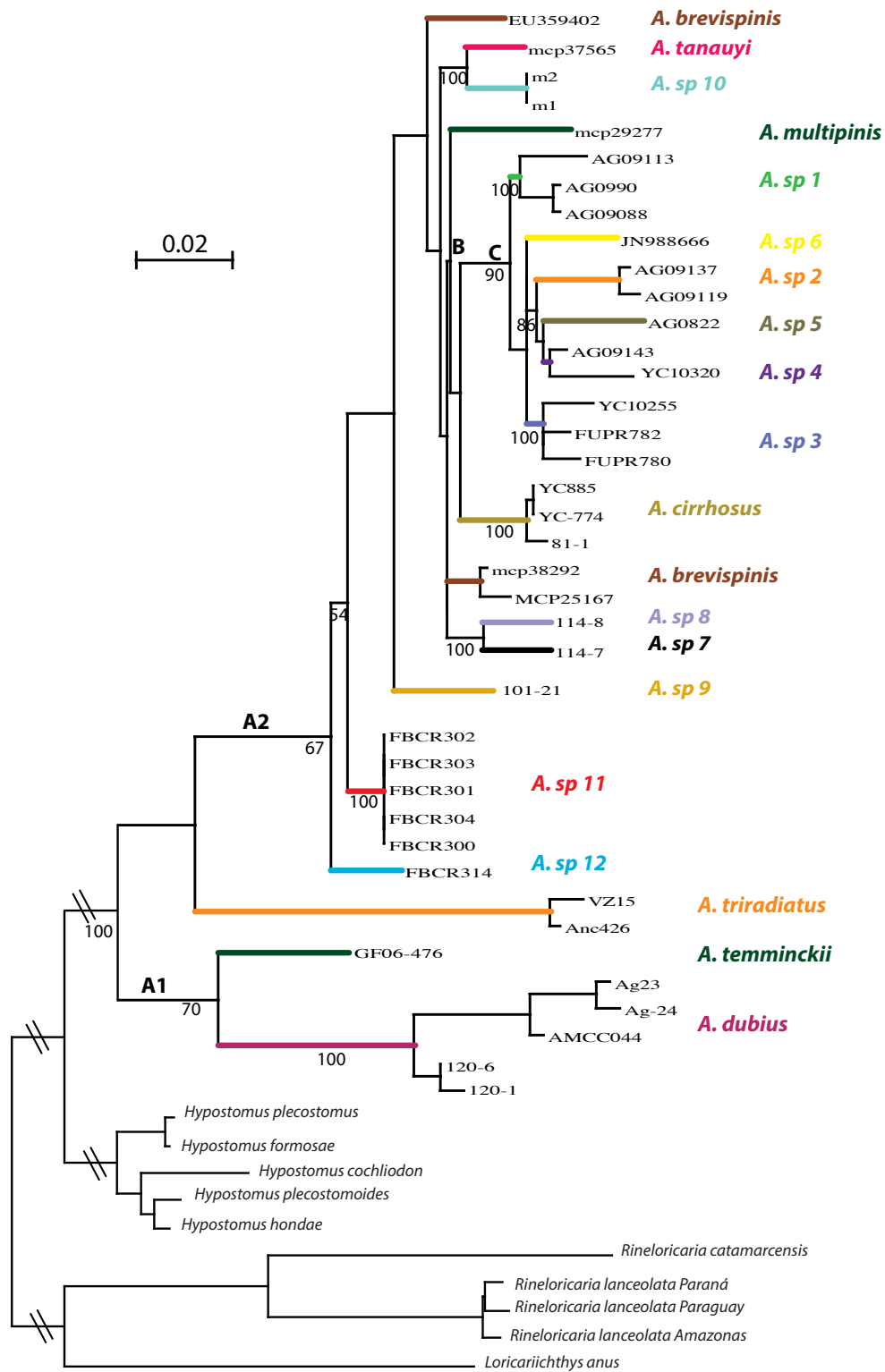


Figura 6.4: Árbol de Máxima Verosimilitud para el género *Ancistrus* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores por debajo de las ramas son los soportes de *bootstrap* calculados con 1000 réplicas.

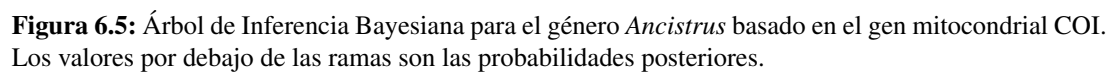
especie *A. multispinis* es la primera en diferenciarse, luego le sigue *A. cirrhosus* y finalmente se presenta al nodo llamado C. Este último nodo está compuesto por los linajes *A. sp. 1*; *A. sp. 2*; *A. sp. 3*; *A. sp. 4*; *A. sp. 5* y *A. sp. 6*. Es importante observar que la especie *A. brevipinnis* se muestra como polifilética en este análisis.

■ Árbol según Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol basado en COI reconstruido por IB para el género *Ancistrus* se puede observar en la Fig. 6.5. Cerca de cada una de las ramas del árbol, se ven los valores de probabilidades posteriores (PP) de cada una de ellas. En los resultados aportados por IB vemos que todos los representantes del género *Ancistrus* forman un clado monofilético bien sustentado (1 PP). Este clado se divide en dos grupos. El primer grupo (54 PP), comprende a las especies *A. triradiatus* y al par *A. dubius* y *A. temminckii* (0.88 PP). Por otro lado observamos al clado llamado A (0.96 PP) el cual contiene a las mismas especies que el análisis MV (véase la Fig. 6.4). Sin embargo en este árbol IB el clado A comienza con una tricotomía compuesta por los linajes: *A. sp. 12*; *A. sp. 11* y un gran clado. Este último clado presenta en la base al linaje *A. sp. 9*, seguido por un ejemplar de *A. brevipinnis*. A partir de allí vemos una politomía de grado seis que contiene: un clado con *A. tanauii* y *A. sp. 10* (0.99 PP); *A. cirrhosus*; *A. multispinis*; un clado que reúne a *A. sp. 7* y *A. sp. 8* (1 PP); dos ejemplares de *A. brevipinnis* y el nodo llamado C (1 PP). A diferencia del análisis anterior el clado C aquí presenta al linaje *A. sp. 1* en la base y luego una gran politomía, donde se puede observar que el linaje *A. sp. 4* no se presenta como un grupo monofilético.

■ Árbol según Máxima Parsimonia (MP)

En este análisis, se retuvieron 72 árboles igualmente parsimoniosos, a partir de los cuales se generó el árbol de consenso estricto donde se calcularon los valores de soporte. El árbol MP final puede verse en la Fig. 6.6. Debajo de cada una de las ramas se observan los valores de soporte de *Jackknife* (JN) con 1000 réplicas. En este resultado encontramos que en la base del género aparece una tricotomía con la especie *A. triradiatus*; el clado de *A. dubius* y *A. temminckii* (38 JN) y el gran clado A (96 JN). Dentro del clado A también se observa una tricotomía con los linajes *A. sp. 12*; *A. sp. 11* y clado que comprende a *A. sp. 9* en la base, luego a un ejemplar de *A. brevipinnis*. En este análisis no encontramos al clado B visto en el



árbol MV (véase la Fig. 6.4), en su lugar se observa un gran politomía en donde solamente podemos encontrar la resolución de las relaciones entre: *A. sp. 7* y *A. sp. 8* (50 JN); *A. tanaui* y *A. sp. 10* (57 JN) y el clado C (53 JN).

6.2.3. Calibración del reloj molecular

El test de *log-likelihood ratio*, el cual fue utilizado para verificar que nuestros datos (matriz del gen mitocondrial COI) no poseen tasas de mutación constantes, ha mostrado que las diferencias entre los valores de verosimilitud cuando forzamos los datos a un reloj molecular y cuando no lo hacemos son significativas ($X^2 = 2(\log L_0 - \log L_1) = 115,6910$; d.f. = 48; $P = 1,6231 \times 10^{-7}$). Este resultado indica que las secuencias de los representantes del *ingroup* utilizado evolucionan con una tasa que no es homogénea a lo largo del árbol filogenético.

Con el objetivo de estimar las fechas de los eventos de diversificación en el género *Ancistrus* que habitan la cuenca del Plata, se ha calibrado los datos moleculares basados en el gen COI. El resultado obtenido con el programa BEAST puede observarse en la Fig. 6.7. La topología del árbol reconstruido con BEAST es similar a la obtenida en la sección de análisis filogenéticos basados en IB, a diferencia que en este análisis se resuelven todas las relaciones interespecíficas.

Siguiendo nuestros resultados, vemos que el origen del género *Ancistrus* se remonta a 66,33 Ma (95 % *highest posterior density interval* o HPD: 34,94-108,26). Mientras que el origen del primer clado A1 es de 51,88 Ma (95 % HPD: 27,06-85,61). Dentro de este clado, la separación entre las especies de *Ancistrus* que habitan el sistema Amazónico (comprendiendo las cuencas del río Amazonas, las del escudo de las Guyanas y los ríos del norte de Brasil) y las que habitan la cuenca del Plata es de 18,5 y 8,96 Ma (95 % HPD: 8,58-34,06 y 3,17-17,61 respectivamente).

El clado A2 tiene una fecha estimada de 38,47 Ma (95 % HPD: 20,69-64,52), siendo en esta fecha la separación de la especie *A. sp. 12* del resto. Al interior de este clado, vemos que tres eventos diferentes han generado las especies y linajes que pertenecen a la cuenca del Plata (clados B; D y F). Estos tres nodos separan a las especies de los ríos costeros del sur de las especies de la cuenca del Plata.

El clado B tiene un origen en 22,42 Ma (95 % HPD: 12,76-36,79), momento en el cual se produce la separación de un clado con especies exclusivamente de la cuenca del Plata, llamado nodo C y otro clado con especies tanto de dicha cuenca como también de los ríos costeros del sur.

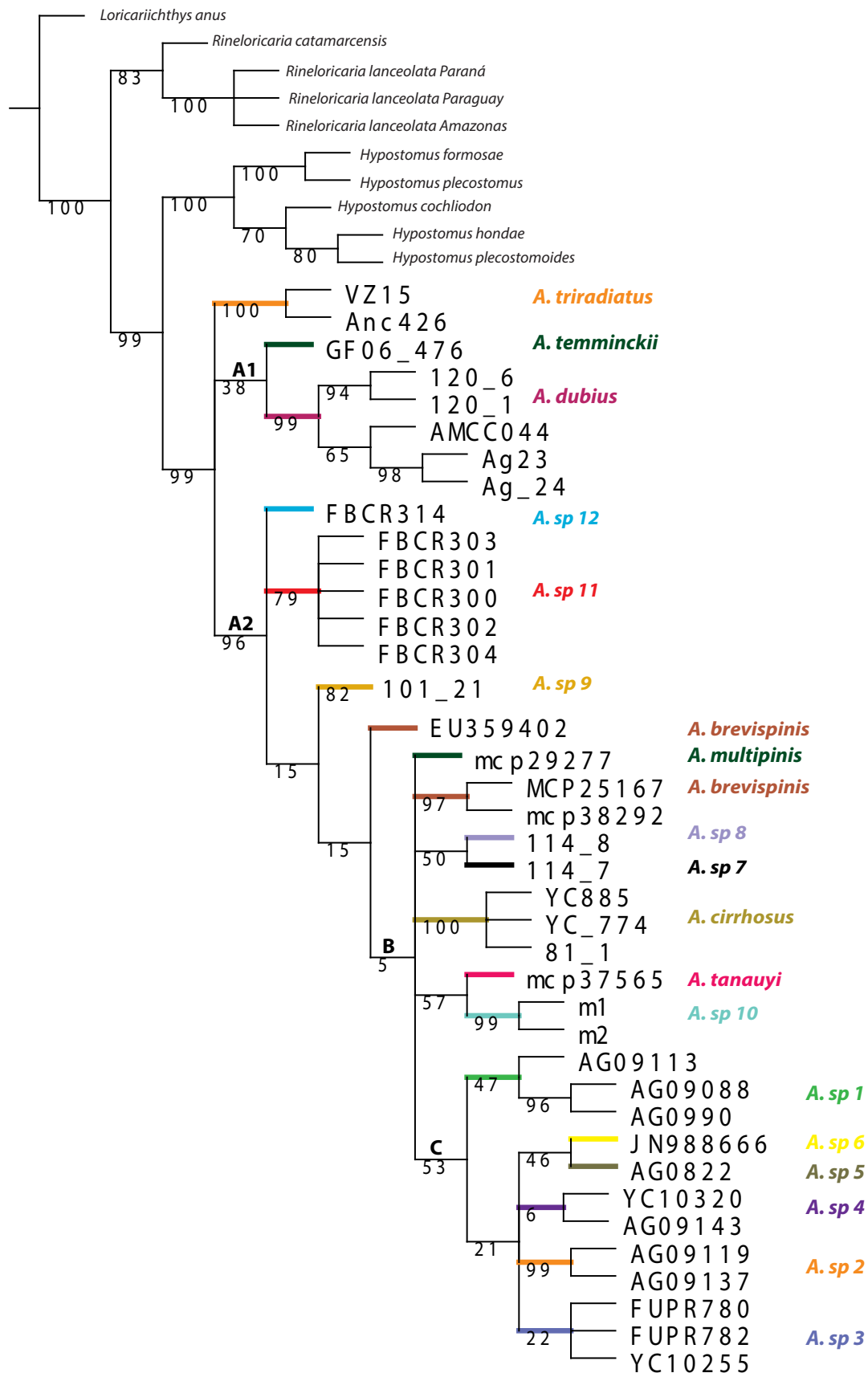


Figura 6.6: Árbol de Máxima Parsimonia para el género *Ancistrus* basado en el gen mitocondrial COI. Los valores debajo de las ramas son los soporte de *Jackknife* calculados con 1000 réplicas.

Dentro del clado C observamos seis linajes diferentes cuyo origen fue estimado en 15,7 Ma (95 % HPD: 8,5-26,47), siendo el linaje más basal es *A. sp. 1*.

El clado D también puede dividirse en dos subclados, uno de ellos con tres especies que se encuentran solamente en la cuenca del Plata (clado E). El origen del clado D fue estimado en 19,63 Ma (95 % HPD: 10,46-32), mientras que para el clado E se obtuvo una calibración de 15,9 Ma (95 % HPD: 7,34-26,72).

En el clado F, se encuentra el último evento que da lugar a linajes de la cuenca del Plata. Este evento fue estimado en 16,23 Ma (95 % HPD: 7,9-27,99) y generó la divergencia de dos nuevas especies en dicha cuenca.

6.2.4. Reconstrucción de áreas ancestrales

Los distintos escenarios biogeográficos analizados con RASP (S-DIVA, BBM y DEC) están presentados en la Fig. 6.8. El análisis de S-DIVA es el que ha estimado un menor número de áreas ancestrales combinadas. Los tres análisis han estimado que el área ancestral del género *Ancistrus* (nodo 88) podría abarcar el Amazonas y los ríos costeros del sur o una combinación de ambos. Sin embargo este resultado hay que tomarlo con precaución dado que en la matriz de distribuciones de las especies *outgroup* fueron todas codificadas como distribuidas en la cuenca amazónica.

Para el clado A1, los análisis de DIVA, BBM y DEC difieren en la resolución del área ancestral (nodo 87). Sin embargo los tres análisis proponen que los ríos de las Guayanas han jugado un papel importante. Dentro de este clado vemos que para la especie *A. dubius*, S-DIVA y DEC proponen uno o dos evento de vicariancia, mientras que BBM estima un evento de dispersión desde el Paraná Medio hacia el Amazonas.

Las tres metodologías coinciden en que el origen del clado A2 (nodo 88) los ríos costeros del sur han participado mediante la combinación con otras áreas. A partir de este nodo, las áreas ancestrales han sido estimadas en los ríos costeros del sur por los tres análisis (nodos 80, 79, 74 y 72).

El clado B fue estimado con un área ancestral que comprende a los ríos costeros del sur y al Paraná Medio (según S-DIVA y DEC) (nodo 71). El clado C tiene su origen en el Paraná Medio. Dentro de el clado C, BBM propone dos eventos de dispersión desde esta área hacia el Alto Paraná, mientras que S-DIVA y DEC proponen dos eventos vicariantes entre estas áreas.

Por otro lado, el clado D fue estimado con un área que contiene a los ríos costeros del sur y

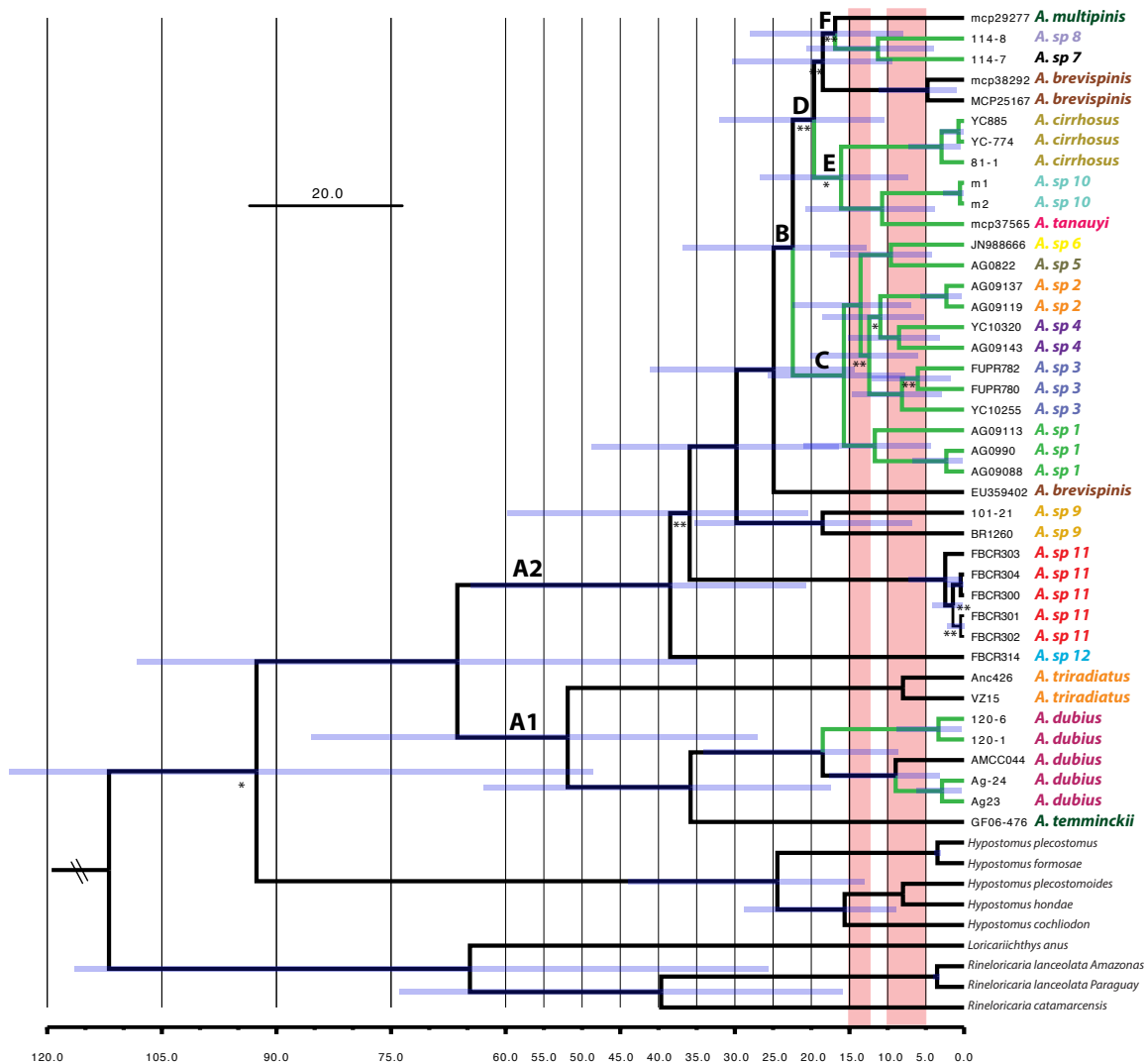


Figura 6.7: Resultados gráficos de los análisis del programa BEAST para el género *Ancistrus*. Las ramas del árbol en verde muestran los clados y especies que habitan en la cuenca del Plata. La escala abarca desde el presente hasta 120 millones de años. Un asterisco indica nodos con probabilidades posteriores 0,75-0,51, dos asteriscos nodos de < 0,50 de PP. Las barras muestran los intervalos de credibilidad del 95%HPD para la estimación de los tiempos de divergencia. En rojo se indican los dos máximos de inundación de la ingresión marina del Mioceno en la cuenca del Plata.

al río Uruguay con S-DIVA y DEC, mientras que BBM solo sugiere a los ríos costeros del sur. Dentro de este grupo, el clado E presenta un área ancestral que comprende al río Uruguay y una dispersión hacia el Río de la Plata. Finalmente para el clado F, BBM ha estimado un área ancestral que comprende a los ríos costeros del sur y una dispersión hacia el río Uruguay, mientras que S-DIVA y DEC proponen un evento vicariante entre estas áreas.

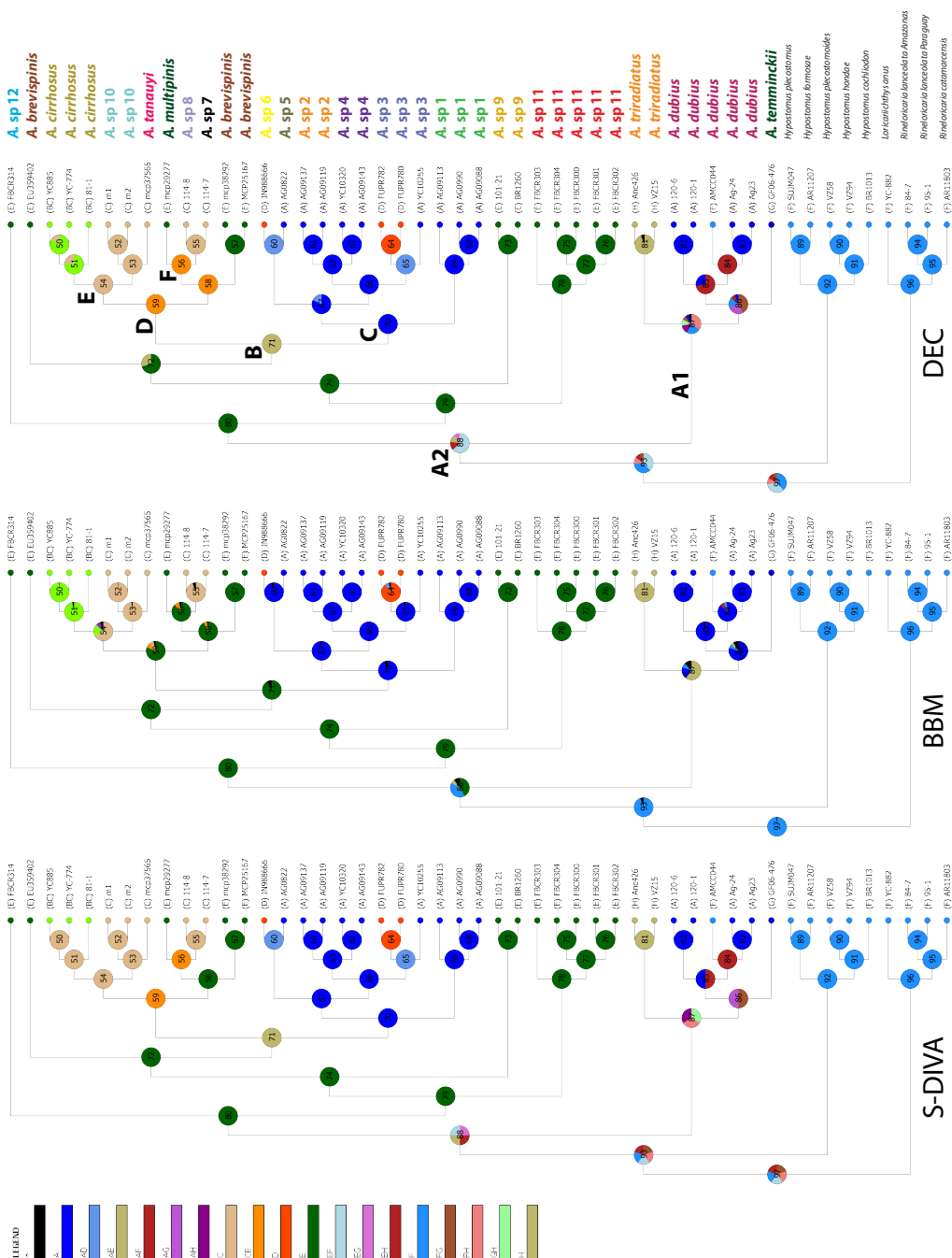


Figura 6.8: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA, BBM y DEC para el género *Ancistrus*. Los tres análisis han sido obtenidos en el programa RASP. Cada área fue codificada con una letra: A= Medio Paraná; B= Río de la Plata; C= Uruguay; D= Alto Paraná; E= ríos de la costa del sur; F=Amazonas; G= Guyanas y H= Lago Maracaibo y río Orinoco.

6.3. Discusión

Tomando al género *Ancistrus* como el centro de estudio, este capítulo se enfoca en tres objetivos diferentes. El primero es determinar la diversidad de especies de este género en la cuenca del Plata y definir la distribución geográfica de tales especies. El segundo objetivo es conocer la relación filogenética de especies antes definidas. Para este último fin se han realizado análisis basados en el gen mitocondrial COI. El objetivo final de este capítulo ha sido definir la historia biogeográfica del género, para ello se ha calibrado y reconstruido las áreas ancestrales de cada nodo de la filogenia molecular de este grupo. Por lo tanto, esta sección estará organizada de acuerdo a los objetivos antes planteados.

6.3.1. Diversidad y distribución geográfica de las especies de *Ancistrus* en la cuenca del Plata

Basado en los resultados del gen mitocondrial COI (ver Figs. 6.4, 6.5 y 6.6) el género *Ancistrus* puede dividirse en al menos 19 linajes o especies. Para cada uno de estos linajes se ha calculado las distancias intra e interespecíficas, con el fin de comparar con la bibliografía si estas distancias estaban en el mismo orden de magnitud que lo propuesto para otros grupos de peces. El gen COI ha sido ampliamente estudiado para peces y otros organismos por ser parte del consorcio internacional *Barcoding*. Siguiendo el trabajo propuesto por Ward (2009) la tasa de divergencia entre especies de un mismo género de peces debería ser del orden del 3%; mientras que la tasa de divergencia intraespecífica debería ser cercana a 0,34 % o nula. Ward (2009) aclara también que si dos especies de peces difieren en un 2 %, hay una probabilidad del 95 % de que dichas especies sean dos especies diferentes. En este trabajo de tesis, los valores de las distancias calculadas entre las especies de *Ancistrus* fueron desde 2,23 % (entre *A. sp. 7* y *A. sp. 8*) hasta 11 % (entre *A. triradiatus* y *A. dubius*). Por lo tanto, estos valores concuerdan con los valores de referencia, sustentando la existencia de 19 especies o linajes de *Ancistrus* en nuestros análisis.

Viendo las distribuciones geográficas de las especies y linajes definidas anteriormente para el sur de Sudamérica, notamos que las cuencas con mayor diversidad son el Paraná Medio, el río Uruguay y los ríos costeros del sur. Un importante resultado obtenido ha sido que no se ha podido coleccionar ningún miembro del género *Ancistrus* en el Paraná Bajo, en el río Paraguay, ni en los ríos

endorreicos del sistema de Mar Chiquita, dejando una gran incógnita sobre el por qué de la ausencia del género en esas regiones. Concordando con nuestros resultados, en una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre la distribución de *Ancistrus* en Argentina, se ha notado que nunca se ha citado al género para esas cuencas. De este modo, pareciera que efectivamente esas regiones no son habitadas por los *Ancistrus*, y que no se trata de una falla de muestreo.

Otro resultado interesante es que las especies o linajes tienen un área de distribución más bien restringida. Las dos especies que se encuentran con rangos más amplios (abarcando dos cuencas) son *A. dubius* y *A. cirrhosus*. Esto puede deberse a una especiación ecológica, a una tasa de migración extremadamente baja o a un territorialismo muy marcado dentro de este género. Este resultado permite suponer que la diversidad de especies del género *Ancistrus* debe ser mucho más alta que el número de especies descritas o linajes definidos en este trabajo. Esto puede comprobarse dado que no hay especies descritas para la sección media ni alta del río Paraná, una región que abarca un gran río y numerosas subcuencas con un alto endemismo de especies de peces (López & Miquelarena, 2005) y además que ha habido numerosas citas de *Ancistrus* no identificados al nivel de especies.

Nuestros resultados también han permitido demostrar que la especie *A. dubius*, comúnmente presente en la cuenca del Amazonas extiende su distribución hasta la cuenca del Plata. Este hecho deja en evidencia que, a pesar de su antigüedad, algunas citas biogeográficas son tan válidas como las modernas, lo cual contrasta con algunas de las conclusiones que proponen Gasparetto-Bifi *et al.* (2009) sobre la distribuciones del género *Ancistrus* en el sur del continente.

La evaluación de la diversidad del género *Ancistrus* y sus rangos de distribución dejan en evidencia que la especie tipo del género, *A. cirrhosus*, debe ser estudiada con mayor detalle. Hemos visto aquí que la distribución de esta especie se restringe a la cuenca del Río de la Plata y al río Uruguay. Sin embargo la descripción original de la especie toma como localidades tipo a Buenos Aires y Misiones, pero que según la Dra. Fisch-Muller la localidad tipo debería ser Itaibaté (Corrientes). Según nuestros resultados, todos los ejemplares colectados en Misiones, en Corrientes y en Buenos Aires son linajes bien diferenciados entre sí, ocupando diferentes posiciones filogenéticas y presentando distancias interespecíficas muy significativas. Un minucioso estudio sobre las diferencias morfológicas de estos linajes y el estudio detallado de la historia taxonómica de la especie es necesario para la clarificación de este tipo de problemas comúnmente encontrados en la sistemática de

viejos taxones con descripciones muy escuetas y sin material de referencia.

6.3.2. Análisis filogenéticos del género *Ancistrus*

El segundo objetivo de este capítulo es ver la estructura de las relaciones filogenéticas entre las especies y linajes del género *Ancistrus*. Para ello se ha realizado la reconstrucción del árbol filogenético basado en el gen mitocondrial COI mediante tres metodologías diferentes (véase las Figs. 6.4, 6.5 y 6.6). Los tres tipos de análisis han generado topología de árboles similares, en donde las politomías han sido muy importantes. A pesar que estos resultados son tomados como preliminares, se ha visto que en la base de los árboles siempre se ha propuesto al par *A. dubius* y *A. temminckii*. Luego se observa a un clado A que contiene al resto de las especies analizadas y, según la metodología, a la especie *A. triradiatus* (véase las Figs. 6.4 y 6.5). Dentro del clado A las politomías han sido numerosas en todos los análisis, sin embargo, el clado C se ha presentado siempre con un buen soporte de ramas. Este clado C está compuesto por especies del Paraná Medio y Alto Paraná, siendo el linaje *A. sp. 1* su linaje basal. Las politomías observadas han sido resueltas mediante el análisis de calibración realizado en el programa BEAST (véase la Fig. 6.7). La falta de resolución en las filogenias basadas en COI es algo frecuente, dado que este marcador molecular presenta saturación de sustituciones en los sitios más variables. No obstante, me ha parecido pertinente utilizar la información obtenida para este marcador ya que representaba el primer análisis molecular realizado para el género *Ancistrus* del sur de Sudamérica. Dentro del mismo marco de interés de esta tesis, me he propuesto amplificar el gen mitocondrial D-loop y el gen nuclear F-RTN para este grupo. Se han obtenido ya algunas secuencias pero aún no se han completado los datos para realizar un análisis filogenético con este nuevo material. Sin embargo, se espera poder realizar estos análisis en el corto plazo y con ello obtener una hipótesis filogenética más robusta para el género *Ancistrus*.

A la luz de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo podemos ver que la diversidad del género *Ancistrus* encontrada en la cuenca del Plata fue extremadamente mayor de lo que se pensaba al comienzo del trabajo. Si bien los análisis filogenéticos presentados aquí no son exhaustivos ya dejan ver que posiblemente habría un número importante de linajes independientes dentro de la cuenca del Plata. Luego de un análisis morfológico detallado de estos linajes y de la comparación con las especies ya citadas y descritas para la región, estos podrían resultar en nuevas especies a describir. Un completo análisis de revisión del género es necesario para la futura comprensión

de este taxón, incluyendo redescriptiones de especies y asignación de lectotipos, cuando fuera necesario. Este tipo de aportes son de extrema importancia a la hora de evaluar la diversidad de las especies y la historia evolutiva del género, así como también en el manejo de los recursos ictiológicos y de las áreas de interés en conservación.

6.3.3. Procesos de diversificación en la cuenca del Plata

En esta sección se ha abordado varios análisis que permiten estimar los eventos que han podido moldear la diversificación de las especies de *Ancistrus* en la cuenca De Plata, a través de una perspectiva temporal y otra espacial. Según los resultados observados, la filogenia de *Ancistrus* puede dividirse en dos clados (véase las Figs. 6.4, 6.5 y 6.6). Dado que en cada clado se incluye al menos una especie que habita en la cuenca del Plata y especies de otras cuencas, se puede deducir que una especiación alopátrica intercuenas ha participado de la diversificación de las especies de *Ancistrus* de la cuenca del Plata. Además, se han observado clados con múltiples especies que habitan la cuenca del Plata (en clados C y E). Este resultado indica que algún proceso de especiación ha tenido lugar dentro de esta cuenca.

■ Análisis intercuenca

El análisis biogeográfico de la relación intercuenca dentro del clado A1 muestra que dentro de la especie *A. dubius* hay un ejemplar cuya distribución es la cuenca del río Amazonas, mientras que el resto de los ejemplares son del Paraná Medio. Nuestros resultados de calibración indican que este evento de dispersión puede ser fechado en 8,9 Ma (véase la Fig. 6.7). Para poder explicar este suceso, nos vemos obligados a suponer conexiones temporales entre las cuencas del Plata y Amazonas posteriores a las fechas de separación de estas cuencas (30-20 Ma elevación del Arco Michicola) (Lundberg *et al.*, 1998). Dada la distribución de las especies involucradas, las conexiones temporales deben haber sido entre el Alto Paraná y los afluentes del sur de la cuenca del Amazonas. Cuando estas conexiones temporales finalizan, el aislamiento de las poblaciones en cada una de las cuencas debe haber resultado en una diferenciación por alopatría. Sin embargo, a pesar de los 8,9 Ma transcurridos desde la separación de los ejemplares de *A. dubius*, vemos que no poseen rangos distintivos que permita llevar a cabo la especiación. Este resultado es comparable con los datos que se ha utilizado para la calibración de este árbol, donde dos ejemplares de la especie *A. triradiatus*

presentan una distribución disyunta (lago Maracaibo y río Orinoco) desde hace 8 Ma cuando el levantamiento de los Andes ha dividido la región.

Observando al clado A2, hemos visto que hay tres eventos en donde se generan clados con especies pertenecientes a la cuenca del Plata. El primero de ellos se ubica en el clado B dando origen a los clados C (con linajes exclusivos de la cuenca del Plata) y D. La fecha estimada para la separación de ambos subclados es de 22,42 Ma (véase la Fig. 6.7), en este período parece haber tenido lugar una separación entre los ríos costeros del sur y el Paraná Medio. En la Fig. 6.8 vemos que a este nodo le corresponde un área ancestral que abarca dichas cuencas, sugiriendo un evento de diferenciación entre ambos subclados. Este evento coincide temporalmente con las capturas de cabeceras entre el Paraná y los ríos costeros del sur propuestas por Albert & Reis (2011) hace 28-15 Ma. Una vez que estos desplazamientos han terminado, las poblaciones en cada una de las cuencas han ido evolucionando de manera aislada.

El segundo evento que ha generado especies de la cuenca del Plata se encuentra en el clado D, donde se diferencia el clado E (con linajes exclusivos de la cuenca del Plata) del F y de la especie *A. brevipinnis*. La fecha calculada para esta diferenciación es de 19,63 Ma. Los análisis de áreas ancestrales han propuesto para el nodo que une estos subclados (59 de la Fig. 6.8) una región ancestral que comprende tanto al río Uruguay como a los ríos costeros del sur (S-DIVA y DEC) o solamente a los ríos costeros del sur (BBM). La fecha estimada aquí, también coincide con las capturas de cabeceras sugeridas por Albert & Reis (2011) hace 28-15 Ma aunque este caso de diferenciación intercuenca comprende al río Uruguay y los ríos costeros del sur y no al río Paraná propiamente dicho. Sin embargo, se ha sugerido que la separación entre el río Paraná y Uruguay ha sido bastante más reciente (2,5-7 Ma) y que hasta entonces ambos ríos formaban una única cuenca (Castellanos, 1959; Beurlen, 1970; Bonetto, 1994). Por lo tanto, podemos suponer que las capturas de cabeceras entre el río Paraná y los ríos costeros del sur hace 28-15 Ma también han afectado a la diversidad de especies y linajes que hoy en día observamos en el río Uruguay.

El tercer evento que da lugar a especies de la cuenca del Plata es la diferenciación de los linajes *A. sp. 7* y *A. sp. 8* dentro del clado F. Este evento ha sido estimado en 16,88 Ma (véase la Fig. 6.7) y el área ancestral reconstruida para el nodo F (56 de la Fig. 6.8) es un área que abarca a los ríos costeros del sur y al río Uruguay (S-DIVA y DEC) o solamente a los ríos

costeros del sur (BBM). Nuevamente, observamos que la fecha estimada coincide con las capturas de cabeceras entre el río Paraná y los ríos costeros del sur hace 28-15 Ma (Albert & Reis, 2011) y que durante este período los ríos Paraná y Uruguay formaban una única cuenca. Por lo tanto los cambios en las cabeceras del Paraná podrían haber afectado fuertemente a la diversidad de la cuenca del río Uruguay.

En resumen, nuestros resultados sugieren que al menos cuatro eventos independientes de especiación alopátrica tuvieron lugar entre la cuenca del Plata y otros sistemas (Amazonas y ríos costeros del sur). Dentro del gran clado A2 los tres eventos de especiación intercuenca podrían explicarse mediante numerosas capturas de cabeceras entre el Paraná y los ríos costeros del sur tal como proponen Albert & Reis (2011). Nuestros resultados, concuerdan con los encontrados en otro grupo de Loricariidos (Neoplecostominae) en donde se han estimado divergencias de grandes clados pertenecientes al Paraná y a los ríos costeros del sur en 38,1-15,4 Ma (Roxo *et al.*, 2012). Además, como indica el clado A1 una dispersión alopátrica más recientes ocurrió por medio de conexiones temporales entre los afluentes del sur del Amazonas y Medio Paraná. Estos resultados no parecen sorprendentes, dado que ya se ha documentado para otros grupos de peces recientes intercambios entre la cuenca del Amazonas y del Plata. Por ejemplo, Sivasundar *et al.* (2001), encuentran que hace 2,3 y 4,1 Ma las especies del género *Prochilodus* han intercambiado cuencas. Además, otros eventos de dispersión recientes entre estas cuencas fueron ejemplificados con los rangos distribución de *Pygocentrus nattereri* (Hubert *et al.*, 2007) y *Pseudotyllosurus augusticeps* (Lovejoy & Araújo, 2000). Estos trabajos y nuestros resultados (véase también los capítulos sobre los géneros *Hypostomus*; *Loricariichthys* y *Rineloricaria* de esta tesis) sugieren que las conexiones temporales entre el Amazonas y la cuenca del Plata pueden ser más frecuentes de lo que previamente se pensaba.

■ Análisis intracuenca.

Con los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo, podemos asumir que parte de la diversidad del género *Ancistrus* dentro de la cuenca del Plata debe haber sido moldeada por fuerzas evolutivas que han actuado al interior de esta cuenca, dando lugar a lo que se ha decidido llamar especiación intracuenca.

El clado C contiene seis especies que habitan la cuenca del Plata. Los eventos de especiación de este subclado fueron datados entre los 15,7-9,58 Ma, según nuestro reloj molecular (Fig. 6.7). Estas fechas coinciden parcialmente con el primer evento de máxima inundación de la ingresión marina del Mioceno (15-13 Ma) (Hernández *et al.*, 2005). La extensa incursión marina en la cuenca del río Paraná, dentro de la cuenca del Plata, ha podido aislar a muchos de los tributarios de esta cuenca, generando varias especiaciones alopátricas por vicariancia en diferentes grupos de peces estrictamente de agua dulce. Una vez que el mar fue retirado las nuevas especies pudieron haber dispersado a lo largo de toda la cuenca del Plata, enriqueciendo, de este modo, la diversidad de especies. Según nuestros análisis de áreas ancestrales, el área ancestral de las especies de la cuenca del Plata fue reconstruida por las tres metodologías como el Paraná Medio. Este resultado no se ajusta a los resultados que presentan Hernández *et al.* (2005), dado que hay indicios de que dicha región ha sido afectada por la gran inundación de la ingresión marina del Mioceno. Sin embargo, la mayoría de los ejemplares de este clado han sido colectados en el territorio misionero de nuestro país, abarcando el río Iguazú y cuencas cercanas que hoy día se encuentran a más de 300 m sobre el nivel del mar. Según Hernández *et al.* (2005), la inundación de hace 15-13 Ma fue causada por una elevación de 150 m del nivel del mar, por lo tanto, podemos especular que varios afluentes del río Paraná Medio, pudieron actuar como refugios para las especies estrictamente de agua dulce durante este período.

Dentro del clado E observamos tres especies de la cuenca del Plata. Los eventos de especiación de este clado fueron datados en 16,1-10,7 Ma. Nuevamente vemos que estas fechas concuerdan de manera parcial con la primera gran inundación de la ingresión marina del Mioceno (15-13 Ma) (Hernández *et al.*, 2005). Según la reconstrucción de áreas ancestrales, el área para este clado sería el río Uruguay. Sin embargo, hemos visto que durante este período los ríos Paraná y Uruguay formaban una única cuenca. Por lo tanto, me permito especular que tal vez la ingresión marina ha podido tener cierta influencia en la diversidad de especies que hoy día observamos habitando la cuenca del río Uruguay.

En el clado F, la divergencia entre las dos especies de la cuenca del Plata fue datada en 11,27 Ma según nuestro reloj molecular. Esta fecha que es intermedia entre los dos máximos de inundación de la ingresión marina del Mioceno (Hernández *et al.*, 2005). Además las espe-

cies involucradas en este nodo son parte de la diversidad del río Uruguay. Si bien no podemos atribuir una divergencia alopátrica causada por la ingresión marina entre estas especies, podemos asegurar que para la fecha de especiación estimada aun los ríos Paraná y Uruguay formaban una misma cuenca y que probablemente los cambios climáticos, responsables de cambio del nivel del mar y de las fluctuaciones de los períodos de lluvias, podrían haber jugado un rol importante.

6.4. Consideraciones finales

En este capítulo, los resultados basados en el gen mitocondrial COI han permitido afirmar que de las 19 especies de *Ancistrus* analizadas, 12 de ellas habitan la cuenca del Plata y que 10 de estas especies se encuentran hoy día en los ríos de Argentina. Hemos visto que la cuenca que presenta la mayor diversidad de especies es la del río Uruguay y que las especies de distribución más amplia son *A. cirrhosus* y *A. dubius*.

Los resultados filogenéticos realizados, han demostrado que el género *Ancistrus* forma un grupo monofilético que puede dividirse en dos clados, llamados A1 y A2. La relación entre estos clados ha sido variable según los análisis, sin embargo, se ha visto que en la base de los árboles siempre se ha propuesto al par *A. dubius* y *A. temminckii* formando el clado A1. Luego se observa a un clado A2 que contiene al resto de las especies analizadas y, según la metodología, a la especie *A. triradiatus*. Dentro del clado A2 las politomías han sido numerosas en todos los análisis, no obstante, el clado C, compuesto por especies del Paraná Medio y Alto Paraná, se ha presentado siempre con un buen soporte de ramas.

Por otro lado, sobre la base de los datos filogenéticos del género se ha realizado un análisis para dilucidar los eventos que han podido promover la diversidad de especies de *Ancistrus* dentro de la cuenca del Plata. Este análisis, aunque lo consideramos preliminar, deja ya a la luz algunas conclusiones posibles. La diversidad de especies de *Ancistrus* es modulada por dos procesos diferentes: el primero de ellos es una diversificación intercuenca, el cual ha generado grupos de especies que habitan diferentes cuencas como resultado de eventos de dispersión entre la cuenca del Plata y Amazonas y del Plata y los ríos costeros del sur. En este contexto, los cambios paleo-hidrológicos durante el Mioceno deben haber promovido rutas de dispersión y eventos de vicariancia que

han permitido alcanzar un alto nivel de diversificación de especies de peces neotropicales. El otro proceso que modeló la diversidad de especies de *Ancistrus* es una especiación intracuenca, la cual produjo grupos de especies dentro de la cuenca del Plata debido a la fragmentación del hábitat. Hemos visto que el origen de la diversidad dentro de la cuenca del Plata concuerda temporalmente y geográficamente con la incursión marina del Mioceno. Tal como propone la hipótesis de los museos (Fjeldsá, 1994), esta ingresión marina debe haber fragmentado dicha cuenca provocando numerosos procesos de especiación. Los estudios biogeográficos históricos del género *Ancistrus* que se ha realizado argumenta que diferentes cambios hidrogeológicos y cambios en el nivel del mar han influenciado fuertemente a los eventos cladogenéticos observados en la filogenia de este género.

Biogeografía comparada de Loricariidos en la cuenca del Plata

En los capítulos anteriores, el mayor interés ha sido estimar la diversidad de especies e inferir las relaciones filogenéticas de cuatro géneros de Loricariidos. Además, para cada uno de los géneros se ha evaluado que tipo de eventos cladogenéticos han podido moldear la diversidad observada. Este capítulo, se centrará en reconstruir la historia de la cuenca del Plata a partir de los resultados obtenidos para los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus*. El objetivo es analizar las relaciones históricas entre las diferentes áreas de la cuenca del Plata y entre esta cuenca y otras cuencas de la región Neotropical. Se verificará, de este modo, si los cuatro géneros en estudio tienen patrones de repartición similares entre sí y cómo esta información puede ser utilizada para comprender la historia del área en estudio.

7.1. Introducción

El objetivo fundamental de la biogeografía ha sido siempre la definición de los patrones y los procesos responsables de la distribución de las especies. Los procesos preceden siempre a los patrones, sin embargo el biogeógrafo debe en primer término identificar el patrón para luego investigar los eventos causales que lo han configurado. La identificación de los patrones mayores de especiación similares entre géneros permiten caracterizar las fuerzas de diversificación que hayan afectado

a toda la comunidad ictiológica dentro de una región.

En cuanto a las diferentes metodologías existentes para abordar este tipo de problemas, el análisis de Parsimonia de Brooks (BPA) permite identificar la historia de los miembros de los grupos con respecto a su distribución geográfica, evidenciando de este modo un patrón general de estas áreas (Brooks *et al.*, 2001). Mientras que los enfoques basados en eventos como los análisis de dispersión-vicariancia (DIVA), dan información acerca de los sucesos que dan forma a las relaciones entre las áreas. Este tipo de análisis permite reconstruir escenarios biogeográficos, que incluyen la posibilidad de la existencia de relaciones reticuladas entre las áreas y no únicamente relaciones de tipo jerárquico. Las reconstrucciones de DIVA para diferentes grupos de organismos que habitan las mismas áreas pueden ser comparadas para contrastar hipótesis acerca de eventos biogeográficos generales (Ronquist, 1997). Para la aplicación del DIVA se construyó una matriz de datos que incluye las distribuciones de los taxones y la información cladística correspondiente. A partir del BPA se obtienen cladogramas generales de áreas que muestran las relaciones jerárquicas entre las áreas implicadas, mientras que DIVA reconstruye las distribuciones ancestrales posibles para cada nodo y arroja una serie de estadísticos que indican las frecuencias de eventos de dispersión y vicariancia posibles entre dos o más áreas. El método de BPA optimiza los eventos debidos a vicariancia, mientras que las frecuencias de eventos para reconstruir escenarios biogeográficos obtenidas por DIVA permiten evaluar si las relaciones que manifiestan los cladogramas generales de área han sido influidas por la dispersión o responden exclusivamente a eventos de vicariancia (Crisci *et al.*, 2000; Morrone, 2009).

Los estudios biogeográficos basados en taxones acuáticos no han sido muy frecuentes en los últimos tiempos (Posadas *et al.*, 2013), sin embargo, López *et al.* (2008) presentan un análisis biogeográfico de Argentina a partir de los datos de las especies de peces de agua dulce y sus distribuciones. En este trabajo los autores usan métodos cuantitativos para identificar cinco provincias zoogeográficas. Estas provincias representan la primera clasificación para la ictiogeografía de Argentina basada en datos objetivos. Según López *et al.* (2008) la provincia de los *Grandes ríos* corresponde a la gran región subtropical definida por la Mesopotamia argentina (el área entre el río Paraná y Uruguay) y las áreas adyacentes. Es decir, gran parte de la cuenca del Plata, a excepción del sistema de Mar Chiquita, la cuenca del río Carcarañá y del Salado del norte (zona J de la Fig. 7.2). Las relaciones entre cada uno de los componentes de la cuenca del Plata no han sido estudia-

dos hasta el momento, dejando inconclusa, desde el punto de vista biogeográfico, la historia de esta importante cuenca.

7.2. Resultados

7.2.1. Análisis de Parsimonia de Brooks (BPA)

Para llevar a cabo este análisis, se ha realizado en primer lugar los cladogramas de áreas para los cuatro géneros en estudio. A partir de los árboles más resueltos obtenidos para cada grupo, se ha remplazado el nombre de las especies por el nombre del área o las áreas que ellas habitan (véase la Fig. 7.2). De este modo el análisis considera a las especies como estados de carácter de las áreas en estudio.

El árbol del género *Hypostomus* ha presentado el mayor número de zonas dado que ha sido el género que contiene el mayor número de especies y un muestreo más completo para el continente sudamericano. En total se han utilizado 13 zonas diferentes de las cuales siete son subzonas dentro de la cuenca del Plata, área en donde se centra nuestro estudio. El árbol del género *Loricariichthys* presentó solamente ocho regiones de las cuales seis son parte de la cuenca del Plata. Las otras dos áreas están representadas por el Amazonas y los ríos costeros del sur de Brasil. El género *Rineloricaria* presentó diez áreas para este estudio, siendo faltantes las regiones del norte del continente. Esto es debido a una falta de material a disposición, y no a la ausencia del género en esas regiones. El árbol del género *Ancistrus* ha presentado ocho áreas. En esta filogenia quedaron ausentes varias zonas pertenecientes a la cuenca del Plata, como por ejemplo, el río Paraguay, el Paraná Bajo y el sistema de ríos endorreicos de Mar Chiquita. Este resultado se debe a la ausencia de miembros de este género en dichas áreas.

Para aplicar este método, se construyó luego la matriz de áreas por componentes, incluyendo los componentes de los cladogramas antes mencionados, obteniéndose una matriz de 13 áreas por 90 componentes informativos, más un área que ha sido tomada para enraizar el árbol. La matriz resultante puede verse en el apéndice C.

Con el programa TNT, utilizando una búsqueda exacta, se ha encontrado seis árboles igualmente parsimoniosos que pueden verse en la Fig. 7.1. En todos estos cladogramas observamos que las áreas pertenecientes a la cuenca del Plata forman un grupo monofilético. Los árboles A, B y C de la

Fig. 7.1 presentan igual topología para la resolución de las áreas dentro de la cuenca del Plata. Encontrándose a los ríos endorreicos del sistema de Mar Chiquita en la base, luego se ve la separación del río Paraguay y finalmente dos clados. El primero de ellos con las tres áreas que representan al río Paraná, en donde el Alto Paraná aparece en la base. El segundo clado está compuesto por los ríos costeros del sur, el Río de la Plata y el río Uruguay, siendo estos dos últimos grupos hermanos. Las diferencias entre los árboles A, B y C encontrados en este análisis se observan en la posición que toman el río São Francisco y los ríos costeros del norte dentro del cladograma. Los otros tres árboles obtenidos mediante BPA, son los árboles D, E y F de la Fig. 7.1. Estos tres árboles también muestran, entre sí, la misma topología para las áreas de la cuenca del Plata. En esta nueva topología, a diferencia de la anterior, observamos que el río Paraguay se agrupa con las áreas del río Paraná y que el río Uruguay aparece como hermano de los ríos costeros del sur. Es muy interesante notar que en las dos topologías posibles para las áreas de la cuenca del Plata, vemos que los ríos costeros del sur de Brasil quedan incorporados dentro del clado que reúne a todos los componentes de esta cuenca. Finalmente, a partir de los seis árboles posibles, se ha construido un cladograma de consenso estricto, donde observamos a los ríos del sistema endorreicos de Mar Chiquita en la base, luego una tricotomía compuesta por: (i) el río Paraguay, (ii) las tres áreas del río Paraná en donde el Bajo y Medio Paraná se agrupan como hermanos, y (iii) un clado, también tricotómico con el río Uruguay, los ríos costeros del sur y el Río de la Plata.

Vale la pena aclarar que las diferencias en las posiciones de los ríos que no pertenecen a la cuenca del Plata, no me parece pertinente discutirlos dado que la información obtenida para estas áreas no ha sido suficiente y en realidad estas áreas han sido incorporadas en este análisis para corroborar la monofilia de las áreas pertenecientes a la cuenca del Plata (véase la topología G de la Fig. 7.1)

7.2.2. Análisis de dispersión-vicariancia

Para realizar los estudios sobre la biogeografía histórica se ha realizado un análisis con el programa DIVA 1.1 (Ronquist, 1997) basado en los cuatro árboles filogenéticos obtenidos para los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* y en la distribución de sus especies (véase el archivo completo en el apéndice D). Dado que el programa DIVA 1.1 solo permite un máximo de ocho áreas para generar sus estadísticos, se ha tenido que unir áreas. En un primer paso,

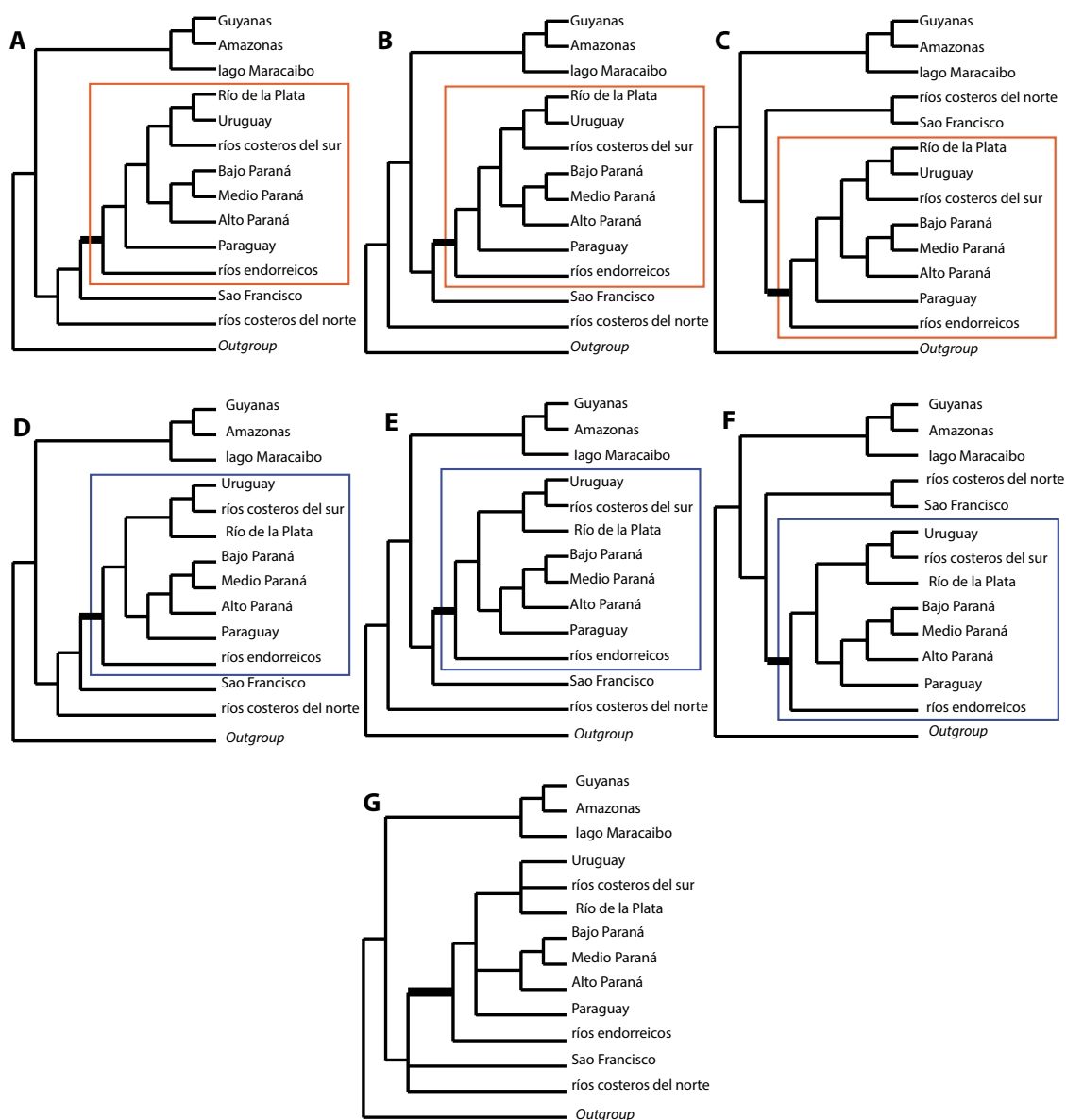


Figura 7.1: Cladogramas generales de áreas obtenidos mediante el análisis de parsimonia de Brooks. Las áreas correspondientes a la cuenca del Plata han sido encuadradas. Los árboles A, B y C presentan igual topología para la resolución de las áreas dentro de la cuenca del Plata. Los árboles D, E y F también coinciden en la topología de las áreas para dicha cuenca. El árbol G muestra el cladograma de consenso estricto de los árboles A-F.

se ha decidido unir las áreas que corresponden al Bajo y Medio Paraná, dado que esta separación pareciera ser más una diferencia geográfica que biológica. En una segunda instancia, se ha decidido unir a todas las áreas que no corresponden a la cuenca del Plata en una única área la cual fue llamada, resto del continente. La única excepción que se ha realizado para este razonamiento fue, que dejamos al área de los ríos costeros del sur como un área independiente, dado que se ha visto en la bibliografía que estos ríos presentaban un estrecha relación con la cuenca del Plata. De esta manera se ha podido estimar qué tipos de eventos son los que predominan en las relaciones entre las diferentes áreas de la cuenca del Plata.

La Tabla 7.1 muestra todos los eventos de dispersión entre áreas individuales y sus frecuencias, las cuales se expresan como porcentaje del total de eventos de dispersión entre áreas individuales resultantes del DIVA. Los eventos de dispersión más frecuentes involucraron a las siguientes áreas: río Uruguay a Río de la Plata (22,50 %), ríos costeros del sur a río Uruguay (18,75 %), Medio y Bajo Paraná a Alto Paraná (15 %) y Medio y Bajo Paraná a río Paraguay (9,61 %). Es importante aclarar que los eventos de dispersión entre dos áreas tienen una dirección determinada.

La Tabla 7.2 muestra los eventos de vicariancia que implican a más de dos áreas, con sus respectivas frecuencias calculadas como porcentaje del total de este tipo de eventos. Los dos eventos de vicariancia más frecuente implicaron la separación del Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+Costeros del sur del resto del continente (13,96 %), y Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Paraguay+Costeros del sur del resto del continente (13,63 %). Este segundo evento, a diferencia del primero, no contiene al Río de la Plata ni al sistema de ríos endorreicos de Mar Chiquita.

7.3. Discusión

En este capítulo, con el objetivo de reconstruir la historia biogeográfica de la cuenca del Plata, se ha abordado un análisis comparativo basado en las diferentes filogenias obtenidas a lo largo de esta tesis y en las distribuciones de las especies analizadas. El análisis de BPA ha permitido ver como se encuentran relacionadas las diferentes áreas de esta cuenca, pero sin saber cuales son los eventos que rigen el comportamiento de estas relaciones (Posadas & Morrone, 2003). Además, el análisis de BPA ha propuesto dos reconstrucciones posibles para la historia de estas áreas. Mediante

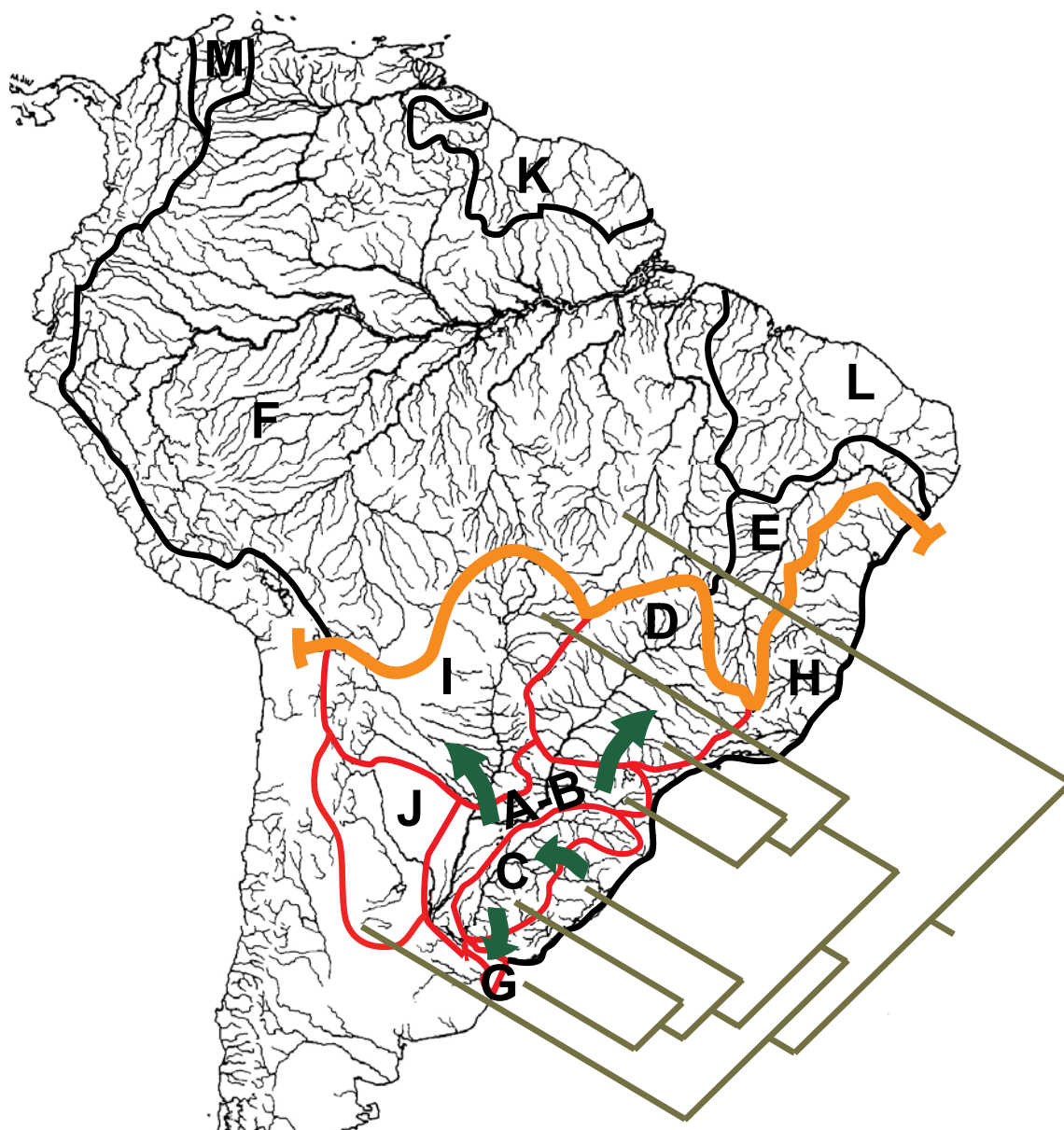


Figura 7.2: Síntesis de los resultados de BPA y DIVA sobre el mapa con las áreas utilizadas en los análisis biogeográficos. Las líneas rojas muestran las áreas que corresponden a la cuenca del Plata. Cada área fue codificada con una letra: A= Paraná Medio; B= Paraná Bajo; C= Uruguay; D= Paraná Alto; E= São Francisco; F= Amazonas; G= Río de la Plata; H= ríos costeros del sur; I= Paraguay; J= ríos endorreicos del sistema Mar Chiquita, Salado del norte y Carcarañá; K= ríos del escudo de las Guayanas; L= ríos costeros del norte y M= Lago Maracaibo y río Magdalena. Las flechas indican los eventos de dispersión más frecuentes y la línea naranja el evento de vicariancia más importante.

Tabla 7.1: Eventos de dispersión entre áreas individuales obtenidos a partir del DIVA. Los valores indican la frecuencia de cada evento como porcentaje del total de eventos de este tipo de postulados por DIVA.

Áreas implicadas	%
río Uruguay a Río de la Plata	22,50
ríos costeros del sur a río Uruguay	18,75
Medio y Bajo Paraná a Alto Paraná	15,00
Medio y Bajo Paraná a río Paraguay	9,61
Medio y Bajo Paraná a resto del continente	7,90
Alto Paraná a resto del continente	7,50
Medio y Bajo Paraná a río Uruguay	7,50
río Paraguay a Medio y Bajo Paraná	5,95
ríos costeros del sur a Medio y Bajo Paraná	3,75
río Paraguay a resto del continente	0,70
río Uruguay a río Paraguay	0,42
resto del continente a Medio y Bajo Paraná	0,20
resto del continente a río Paraguay	0,20

el análisis de DIVA se ha podido estimar cuáles han podido ser los sucesos que permiten relacionar a las diferentes áreas analizadas, sin generar una estructura, sino observando las relaciones entre pares. A partir de ambos análisis y de la historia hidrogeológica documentada para la cuenca del Plata, podemos regenerar la historia biogeográfica de los ríos que componen a la cuenca del Plata.

Nuestros resultados del análisis de BPA han demostrado que todas las subáreas que componen la cuenca del Plata forman un grupo monofilético, donde también se incorporan los ríos costeros del sur. El análisis de DIVA ha mostrado que el agrupamiento que contiene mayor porcentaje de ocurrencia reúne a todos los componente de la cuenca del Plata y a los ríos costeros del sur. Ambos resultados permiten confirmar entonces, que dicha cuenca ha funcionado como una *unidad* evolutiva.

Con el análisis de BPA se ha obtenido un primer clado compuesto por el río Uruguay, los ríos costeros del sur y el Río de la Plata, sin embargo, este análisis no ha permitido definir la relación entre estos tres ríos (véase la Fig. 7.1). Según el análisis de DIVA, hemos visto que los dos eventos de dispersión más importantes fueron desde el río Uruguay hacia el Río de la Plata (22,50%) y desde los ríos costeros del sur hacia el río Uruguay (18,75 %), demostrando también la gran relación entre ellos. Observando la topología actual del río Uruguay, vemos que la desembocadura de este río se presenta en total conexión con el Río de la Plata. Teniendo en cuenta esta configuración, se ha decidido tomar como más plausible la reconstrucción de BPA que reúne al río Uruguay con el Río de la Plata y presenta a los ríos costeros del sur en la base (véase las topologías A, B y

Tabla 7.2: Eventos de vicariancia entre más de dos áreas obtenidos a partir del DIVA. Los valores indican la frecuencia de cada evento como porcentaje del total de eventos de este tipo de postulados por DIVA. Los signos + indican conjuntos de áreas, las / indican las separaciones debidas a eventos de vicariantes.

Áreas implicadas	%
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur / resto del continente	13,96
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Paraguay+costeros del sur / resto del continente	13,63
Uruguay+Río de la Plata+Endorreico / costeros del sur	6,82
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Endorreico / costeros del sur	6,82
Alto Paraná / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur	6,18
Medio y Bajo Paraná / Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur	4,57
Medio y Bajo Paraná+Paraguay / resto del continente	3,82
Medio y Bajo Paraná+Alto Paraná+Paraguay / Uruguay+costeros del sur	3,56
Medio y Bajo Paraná / Uruguay+costeros del sur	3,41
Medio y Bajo Paraná / Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	3,14
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná / Paraguay	3,03
Paraguay / Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	3,00
Medio y Bajo Paraná+Paraguay / Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	2,81
Alto Paraná / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	2,73
Alto Paraná / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur+resto del continente	2,27
Medio y Bajo Paraná+Uruguay / Paraguay	1,51
Uruguay+Alto Paraná / Paraguay	1,51
Uruguay+Paraguay / costeros del sur	1,51
Alto Paraná / Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	1,36
Medio y Bajo Paraná+Alto Paraná / Uruguay+Paraguay+costeros del sur	1,19
Alto Paraná / Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur	1,09
Paraguay / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	0,91
Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur / Medio y Bajo Paraná+Paraguay+resto del continente	0,82
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur / Paraguay+resto del continente	0,82
Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur / Medio y Bajo Paraná+Paraguay+resto del continente	0,82
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur / Paraguay+resto del continente	0,82
Medio y Bajo Paraná+Uruguay / costeros del sur	0,76
Uruguay+Alto Paraná / costeros del sur	0,76
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Paraguay / costeros del sur	0,76
Uruguay+Alto Paraná+Paraguay / costeros del sur	0,76
Medio y Bajo Paraná+Paraguay / Uruguay+Alto Paraná+costeros del sur	0,72
Alto Paraná+Paraguay / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+costeros del sur	0,72
Paraguay / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	0,41
Paraguay+Medio y Bajo Paraná / Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Endorreico+costeros del sur	0,41
Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur / Medio y Bajo Paraná+resto del continente	0,41
Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur / Medio y Bajo Paraná+resto del continente	0,41
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná / costeros del sur	0,38
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+Paraguay / costeros del sur	0,38
Medio y Bajo Paraná / Uruguay+Alto Paraná+Paraguay+costeros del sur	0,25
Alto Paraná / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Paraguay+costeros del sur	0,25
Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur / resto del continente	0,22
Medio y Bajo Paraná / Uruguay+Alto Paraná+Río de la Plata+Paraguay+Endorreico+costeros del sur	0,20
Paraguay / Medio y Bajo Paraná+Uruguay+Alto Paraná+costeros del sur	0,15

C de la Fig. 7.1 y la Fig. 7.2). Siguiendo también los resultados de DIVA, observamos que un 19,16 % del total de los eventos de vicariancia, separan a los ríos costeros del sur de uno o más ríos pertenecientes a la cuenca del Plata. Cabe destacar que estos ríos actualmente no están conectados, desde el punto de vista hidrológico, con dicha cuenca. No obstante, según los trabajos de Beurlen (1970) y Bonetto (1994), durante el fin del Mioceno, el río Uruguay desembocaba en la laguna de los Patos, la cual sí forma parte del sistema de los ríos costeros del sur, demostrando una historia en común entre ambos. De este modo, el resultado más destacable que se ha observado en este análisis es la presencia de los ríos costeros del sur dentro del agrupamiento de los ríos de la cuenca del Plata (véase la Fig. 7.1). Este hecho concuerda también con los numerosos eventos de capturas de cabeceras ocurridos entre los 28-15 Ma entre los ríos costeros del sur y la cuenca del Plata, tal como proponen Albert & Reis (2011). Sin embargo, Albert & Reis (2011) y Roxo *et al.* (2012) proponen que los ríos costeros del sur están fuertemente relacionados con el Alto Paraná, no obstante, nuestros resultados argumentan que estos ríos costeros del sur poseen una relación más estrecha con el río Uruguay y el Río de la Plata que con el Paraná.

Por otra parte, el análisis de BPA no deja definir por sí solo la posición del río Paraguay dentro del cladograma general de áreas. Según el análisis de DIVA, vemos que los eventos de dispersión que comprenden al río Paraguay con el Bajo y Medio Paraná suman (tomando en cuenta los dos sentidos de la dispersión) el 15,56 % de los eventos de dispersión totales. Este resultado, además del hecho que actualmente el río Paraguay está en pleno contacto con el Bajo y Medio Paraná, permite postular que la posición del río Paraguay dentro de la historia de la cuenca del Plata, es aquella que lo presenta como grupo hermano del río Paraná (véase las topologías D, E y F de la Fig. 7.1 y la Fig. 7.2).

Es muy interesante discutir la posición del Río de la Plata según el análisis de BPA (véase la Fig. 7.2). Observando la posición hidrogeográfica actual del Río de la Plata no es evidente que se pueda relacionar más a este río con el Paraná o con el Uruguay. Sin embargo, nuestros resultados permiten establecer que el Río de la Plata comparte más especies en común con el río Uruguay que con cualquier otra área, y que los eventos de dispersión son muy abundantes entre ellos. El tramo final del valle aluvial del río Paraná se extiende en su desembocadura formando un delta, el cual es un importante macrosistema de humedales con características ecológicas particulares (Bó *et al.*, 2002). Es posible que para un número considerable de especies acuáticas el delta del Paraná pueda actuar

como barrera para la dispersión dado sus particularidades ecológicas, claro que esto dependerá de manera muy diferente en los distintos grupos de organismos según sus capacidades adaptativas. Nuestros resultados están basados en peces de la familia Loricariidae, generalmente bien adaptados tanto a ambientes léntico como lóticos, a excepción del género *Ancistrus* que solamente se encuentra en aguas bien oxigenadas con fuerte corriente. Sería de gran interés, estudiar con otro grupo de organismos dulceacuícolas, si la relación Río de la Plata-Uruguay se mantiene, demostrando entonces el rol que podría tener el delta del Paraná en la distribución de las especies.

El análisis de DIVA ha proporcionado un porcentaje bastante elevado de dispersión entre el Medio y Bajo Paraná y el río Uruguay (7,50 %). Este resultado es muy interesante dado que implica una conexión entre estos ríos que no contempla el pasaje por el Río de la Plata, su actual y evidente conector. Hemos visto y discutido tres ejemplos de especies de *Hypostomus* que ejemplifican este tipo de conexión entre los ríos Paraná y Uruguay (véase el capítulo 3 de este trabajo y el apéndice E). El análisis de DIVA y los resultados observados en el género *Hypostomus* permiten suponer, tal como habían propuesto Iriondo & Krohling (2008), que deben haber existido conexiones temporales entre estos dos ríos recientemente. Los mencionados autores, aseguran que cuando la laguna Iberá y el río Gualeguay (cuenca del río Paraná) superan cierta cota pueden desbordar hacia el río Miriñay y Gualeguaychú respectivamente (cuenca del río Uruguay). Sin embargo, un análisis exhaustivo de genética de poblaciones sería de gran utilidad para estimar cuáles son las rutas de dispersión por las cuales las especies se dispersan desde el río Paraná al Uruguay y mantienen su flujo génico.

Los resultados obtenidos del análisis de BPA y de DIVA, han demostrado que los ríos del sistema de Mar Chiquita presentan un conjunto de especies particulares con escasos casos de dispersión hacia o desde el sistema de la cuenca del Plata (véase la Fig. 7.2). Este resultado acuerda perfectamente con lo propuesto por López *et al.* (2008), quienes definen a esta área como la provincia de la Región Pampeana, diferenciándola de la región de los Grandes Ríos la cual se compone de todos los ríos de la cuenca del Plata.

Los análisis realizados han demostrado que el evento vicariante más importante es el que separa a la cuenca del Plata del resto de los ríos del continente, a excepción de los ríos costeros del sur (véase las Figs. 7.1 y 7.2). La separación del gran Sistema norte (compuesto mayormente por el Amazonas, Orinoco y los ríos de las Guayanas) del Sistema sur (cuenca del Plata y ríos endorreicos de Mar Chiquita) mediante el levantamiento del Arco Michicola hace 30 Ma (Lundberg, 1998) debe

haber implicado la separación y diferenciación de las poblaciones y especies que antes preexistían en una gran cuenca única. Este suceso, evidentemente ha tenido un papel muy importante en la compleja historia de diversificación de las especies neotropicales.

Tal como hemos visto en otros capítulos de este trabajo, los resultados obtenidos aquí demuestran que una de las fuerzas mayores de diversificación en la cuenca del Plata es la historia de los ríos que la componen. Este hecho corrobora la hipótesis hidrogeológica propuesta para la diversificación neotropical (Montoya-Burgos, 2003) e indica que todos los modelos propuestos para la evolución de la diversidad acuática deben considerar a la larga y compleja historia de los sistemas de ríos de Sudamérica. La formación de las cuencas, sus divisorias de agua, los eventos de captura de cabeceras, los cambios en el nivel del mar deben promover eventos de geodispersión y vicariancia que resultan en la diversificación de los taxones, enriqueciendo la biota (Lundberg, 1998). De este modo, hemos visto que los análisis filogenéticos de grupos que muestran una gran distribución en los mayores sistemas de ríos neotropicales proveen información natural de la reconstrucción de los eventos históricos que originaron su propia diversificación.

Por otra parte, Morrone (1997) ha propuesto que los cladogramas generales de áreas, pueden poseer un valor aplicado a la conservación de la biodiversidad. Una vez que se ha seleccionado un área para su conservación, la siguiente área debería ser elegida de acuerdo con su complementariedad, es decir que juntas deberían maximizar el número de especies conservadas. Análisis como los que se han realizado en este capítulo, pero basados en numerosos taxones acuáticos, serán de una importancia extrema dado que permitirán tener en cuenta las relaciones de áreas basadas en recursos hídricos. Desde el punto de vista biogeográfico, este tipo de ambientes han sido poco estudiados (Posadas *et al.*, 2013) a pesar de que presentan una fuente de recursos económicos y ecológicos muy importantes. Sin embargo, la increíble diversidad dentro de los ambientes de agua dulce, que está aun muy mal definida geográfica y filogenéticamente, el aislamiento y el tamaño de algunos sistemas hidrológicos de América del Sur representan un desafío considerable para los investigadores (Lovejoy & Araújo, 2000).

7.4. Consideraciones finales

Este capítulo tiene como objetivo reconstruir la historia de la cuenca del Plata a partir de las filogenias moleculares de los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* y de los rangos de distribución de sus especies. Se ha verificado, de este modo, si los cuatro géneros tienen patrones de repartición similares que permitan caracterizar las fuerzas de diversificación que han afectado a la comunidad íctica de esta cuenca.

Basándose en los análisis de BPA, DIVA y sobre la historia hidrogeológica de los ríos que componen la cuenca del Plata se ha reconstruido un único cladograma general de áreas: (sistema endorreico de Mar Chiquita (Paraguay (Alto Paraná (Medio Paraná, Bajo Paraná))) (ríos costeros del sur (Rio de La Plata, Uruguay))). Este resultado concuerda perfectamente con la historia hidrogeológica documentada para la cuenca del Plata, reforzando de este modo la identificación de los patrones mayores de especiación. La biogeografía histórica de los géneros estudiados soporta la hipótesis de que diferentes cambios hidrogeológicos han influenciado fuertemente los eventos cladogenéticos observados en las filogenias de estos cuatro géneros.

CAPÍTULO 8

Conclusiones general

Cómo y cuándo han surgido las especies dentro de los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* han sido los interrogantes más importantes planteados en este trabajo. Sin embargo, para abordar esta temática se ha tenido que evaluar, en primer término, cuán diversos son estos géneros en la cuenca del Plata. Para ello, además de los conteos y medidas morfológicas clásicas, se ha implementado el uso de las herramientas moleculares para la determinación de las especies. En los cuatro géneros en estudio, se ha observado numerosos linajes no identificados que podrían resultar nuevas especies luego de un detallado estudio morfológico.

Basándose en los resultados filogenéticos de cada género, así como también en la calibración y en la reconstrucción de las áreas ancestrales de cada nodo de estas filogenias, se ha evaluado los eventos que han podido generar la diversidad de especies de estos cuatro grupos dentro de la cuenca del Plata. Nuestros resultados demuestran que la diversidad de especies de los cuatro géneros estudiados es modulada por dos procesos diferentes. El primero de ellos es una diversificación intercuenca, el cual ha generado grupos de especies que habitan diferentes cuencas como resultado de eventos de dispersión y/o vicariancia entre diferentes sistemas, como por ejemplo la cuenca del Plata y el Amazonas o la cuenca del Plata y los ríos costeros del sur. En este contexto, los cambios paleohidrológicos durante el Mioceno deben haber promovido rutas mediante las cuales se ha generado un alto nivel de diversificación de las especies en los peces neotropicales, tal como propone la

hipótesis hidrogeológica (Montoya-Burgos, 2003). El otro proceso que ha promovido la diversidad de especies dentro de estos grupos de Loricaridos de la cuenca del Plata es una especiación intra-cuenca. Este tipo de especiación produjo grupos de especies dentro de dicha cuenca debido, por ejemplo, a la fragmentación del hábitat. Según nuestros resultados, el origen de la diversidad dentro de la cuenca del Plata para cada uno de los géneros en estudio concuerda temporal y geográficamente con la incursión marina del Mioceno. De este modo podemos concluir que, tal como propone la hipótesis de los museos (Fjeldså, 1994), esta ingresión marina sobre la cuenca del Plata, debe haber fragmentado esta cuenca provocando numerosos procesos de especiación alopátrica simultáneos, afectando de este modo al conjunto de los peces estrictamente de agua dulce.

Finalmente, se han analizados las filogenias de los cuatro géneros en estudio, con el objetivo de identificar patrones de distribución en común entre ellos. Este tipo de análisis ha ayudado a establecer la historia de las diferentes áreas que comprenden a la cuenca del Plata y a conocer cuales son los eventos de dispersión o vicariancia que predominan entre éstas. Estos resultados proveen una contribución a la geología para la reconstrucción de los detalles de la evolución de los sistemas hídricos del Neotrópico. Sin embargo, debido a que la historia de los ríos parece ser muy compleja y que el conocimiento de la ictiofauna es aún incompleto, es necesario poseer una mirada generalizada sobre cómo y cuándo la evolución de los ríos ha participado como la fuerza mayor de diversificación de la ictiofauna.

A partir de este trabajo, se puede confirmar que dos de las hipótesis acerca de los procesos de diversificación de especies de peces de agua dulce neotropicales han tenido un rol preponderante en la diversificación de los géneros *Hypostomus*, *Loricariichthys*, *Rineloricaria* y *Ancistrus* de la cuenca del Plata: la hipótesis de los museos y la hipótesis hidrogeológica. Los diferentes enfoques biogeográficos históricos que se han aplicado a lo largo de esta tesis, tanto a nivel de taxones individuales como a nivel comparado, permiten sostener que los diferentes cambios hidrogeológicos y los cambios en el nivel del mar a lo largo de la historia geológica de América del Sur han influenciado fuertemente a los eventos cladogenéticos observados en la filogenia de cada uno de los géneros estudiados.

Las iniciativas tomadas en el marco de estas tesis demuestran lo importante que resulta tener una buena estimación de la diversidad de las especies y abren una nueva ventana hacia la sistemática de los grupos estudiados. A lo largo de este trabajo se ha hallado un gran número de linajes a nivel

molecular que no han sido reconocibles a nivel morfológico, demostrando de este modo la necesidad de incrementar el conocimiento sistemático de los géneros en estudio. También nuestro trabajo abre las puertas a nuevos estudios sobre biogeografía de peces de agua dulce, particularmente en la cuenca del Plata, así como también al uso de herramientas moleculares para la evaluación de los procesos que han generado y mantienen la diversidad de dicha región.

APÉNDICE **A**

Lista del material utilizado

Especies utilizadas como *outgroups* en los análisis moleculares.

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank	Colección
<i>Isoinelloricaria spinosissima</i>	Ecuador: río Babahoyo, Los ríos		AJ318365(D-loop)	MHNG2575.51
<i>Aphanatorulus amnophilus</i>	Venezuela: río San Carlos, near Las Vegas	JWA95-32	AJ318346(D-loop)	INHS 34738
<i>Squaliforma squalina</i>	Venezuela: río Caipe, Apure Masparro bassin, Barinas	VZ62	AJ318363(D-loop)	INHS 34684
<i>Squaliforma emarginata</i>	Peru: río Tambopata, río Madre de Dios bassin		AJ318364(D-loop)	MHNG2588.62
<i>Pterygoplichthys zuliaensis</i>	Venezuela: río Escalante, Maracaibo bassin, Zulía	VZ3	AJ318360(D-loop)	INHS 35384
<i>Glyptoperichthys scrophus</i>	Peru: Loreto	Peru 96-6	AJ318362(D-loop)	INHS 38845
<i>Liposarcus multiradiatus</i>	Venezuela: río Aguaro, Orinoco bassin, Guarico	VZ119	AJ318361(D-loop)	INHS 34423
<i>Hemiancistrus fuliginosus</i>	Brasil: río Uruguay, Itapiranga, Río Grande do Sul	UR008	AJ318359(D-loop)	MCP 20417
<i>Hemiancistrus chlorostictus</i>	Brasil: Passo Fundo, Ronda Alta, Río Grande do Sul	MCP002	AJ318345(D-loop)	MCP 19941
<i>Pareiorhaphis steindachneri</i>	Brasil		EU359451(COI)	MCP 41289
<i>Pareiorhaphis eurycephalus</i>	Brasil		EU359439(COI)	MCP 41458
<i>Epactionotus bilineatus</i>	Brasil		EU371009(COI)	MCP 26964
<i>Pseudancistrus niger</i>	Guyana Francesa	GF06-295	EF688087(D-loop)	MHNG
<i>Lasiancistrus</i> sp.	Guyana	GY04-312	FJ263976(D-loop)	MHNG

Los *Ancistrus* utilizados en los análisis moleculares.

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank	Colección
<i>A. aff. hoplogenus</i>	Perú: río Ucayali, Cordillera Azul Norte, Río Alto Pisqui	CA-039		
<i>A. aff. hoplogenus</i>	Brasil: río Guama, entre Acara et Concordiada, Para	BR98-062		
<i>A. brevipinnis</i>	Brasil: Río Grande do Sul, São Goncalo			MCP25167
<i>A. brevipinnis</i>	Brasil: Río Grande do Sul, São Goncalo			MCP38292
<i>A. brevipinnis</i>	Brasil: río Jacui			MCP21246
<i>A. cirrhosus</i>	Argentina: Buenos Aires, El Pescado	YC-885		ILPLA 1905
<i>A. cirrhosus</i>	Argentina: Buenos Aires	PR-001 (121.03)		MHNG

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank	Colección
<i>A. cirrhosus</i>	Argentina:Entre Ríos, río Uruguay	MUS-202 (81.01)		MHNG
<i>A. cirrhosus</i>	Argentina:Buenos Aires, La Chozá	MUS-100 (44.01)		MHNG
<i>A. cf. leucostictus</i>	Guyana Francesa:río Maroni	GF00-132		MHNG
<i>A. cf. leucostictus</i>	Guyana Francesa:río Approuague	GF03-182		MHNG
<i>A. dolichopterus</i>	Brasil:río Negro, Río Demini	MUS-09		
<i>A. dolichopterus</i>	Brasil:río Negro, Río Demini	MUS-012		
<i>A. dolichopterus</i>	Brasil:río Solimões, Lago Tefé	MUS-014		
<i>A. dubius</i>	Perú:río Amazonas, Region Iquitos, Río Napo	MUS-025		
<i>A. dubius</i>	Brasil:río Madeira, Río Guaporé, Río São Miguel	MUS-138		
<i>A. dubius</i>	Bolivia:río Mamoré, río Chiripe	AN-013		
<i>A. dubius</i>	Bolivia:río Mamoré, río Chiripe	AN-014		
<i>A. dubius</i>	Bolivia:río Mamoré, río Chiripe	AN-015		
<i>A. dubius</i>	Bolivia:río Mairana, Ichilo, Santa Cruz de la Sierra	DC 522	(COI)	AMCC 102112
<i>A. dubius</i>	Paraguay:río Paraná, río Monday	MORO-15 (120.06)		
<i>A. dubius</i>	Paraguay:río Paraná, río Monday	MORO-07 (120.01)		
<i>A. dubius</i>	Paraguay:río Paraná, río Monday	MORO-42 (101.19)		
<i>A. dubius</i>	Argentina:Corrientes, río Paraná, Itá Ibaté	AG-024		
<i>A. dubius</i>	Argentina:Corrientes, río Paraná, Itá Ibaté	AG-023		
<i>A. leucostictus</i> sp.	Guyana:río Essequibo	GY04-045		
<i>A. leucostictus</i>	Guyana: río Siparuni	GY04-342		MHNG
<i>A. lithurgicus</i>	Guyana: río Siparuni	GY04-355		MHNG
<i>A. multispinis</i>	Brasil:Santa Catalina, Mampituba			MCP29277
<i>A. multispinis</i>	Brasil:río de Janeiro, río Macacu	BR1260		
<i>A. taunayi</i>	Brasil:Río Grande do Sul, río Uruguay, Jaguari			MCP37565
<i>A. taunayi</i>	Brasil:Río Grande do Sul, río Uruguay, Jaguari			MCP43914

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank	Colección
<i>A. temminckii</i>	Suriname:río Suriname	SU01-098		MHNG
<i>Ancistrus</i> sp. 11	Brasil:São Paulo	FBCR314-09	(COI)	LBP-35729
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:São Paulo	FBCR300-09	(COI)	LBP-35467
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:São Paulo	FBCR301-09	(COI)	LBP-35468
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:São Paulo	FBCR302-09	(COI)	LBP-35469
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:São Paulo	FBCR303-09	(COI)	LBP-35470
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:São Paulo	FBCR304-09	(COI)	LBP-35471
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:Alto Paraná	FUPR780-09	GU701863(COI)	LBP-35959
<i>Ancistrus</i> sp. 10	Brasil:Alto Paraná	FUPR782-09	GU701865 (COI)	LBP-35987
<i>Ancistrus</i> sp. 5	Brasil:Alto Paraná	FUPR787-09	JN988666 (COI)	LBP-35471
<i>Ancistrus</i> sp. 1	Argentina:Misiones	AG09-088		
<i>Ancistrus</i> sp. 1	Argentina:Misiones	AG09-090		
<i>Ancistrus</i> sp. 1	Argentina:Misiones	AG09-113		
<i>Ancistrus</i> sp. 2	Argentina:Misiones	AG09-119		
<i>Ancistrus</i> sp. 3	Argentina:Misiones	AG09-143		
<i>Ancistrus</i> sp. 2	Argentina:Misiones	AG09-137		
<i>Ancistrus</i> sp. 3	Argentina:Misiones, Deseado	YC10-255		
<i>Ancistrus</i> sp. 4	Argentina:Misiones, río Uruzu	YC10-320		
<i>Ancistrus</i> sp.	Argentina:Misiones, río Paraná, Cuña Piru	MUS-521 (121.02)		
<i>Ancistrus</i> sp.	Argentina:Misiones, río Paraná, Piray Mini	AG06-003 (114.03)		
<i>Ancistrus</i> sp.	Argentina:Misiones, río Paraná, río Iguazú	AG06-001 (114.01)		
<i>Ancistrus</i> sp. 8	Argentina:Misiones, río Uruguay, Lopez Guerrero	AG06-008 (114.08)		
<i>Ancistrus</i> sp.	Argentina:Misiones, río Paraná, Cuña Piru	AG06-010 (114.10)		
<i>Ancistrus</i> sp. 7	Argentina:Misiones, río Uruguay, Fortaleza	AG06-007 (114.07)		
<i>Ancistrus</i> sp.	Paraguay:río Paraná, río Monday	MORO-09 (120.03)		

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank	Colección
<i>Ancistrus</i> sp.	Paraguay:río Paraná, río Monday	MORO-08 (120.02)		
<i>Ancistrus</i> sp. 6	Argentina:Corrientes, río Paraná, Itá Ibaté	AG-022		
<i>Ancistrus</i> sp.	Brasil:río tapajos	MUS-052		
<i>Ancistrus</i> sp.B	Suriname:ríoNickerie	SU01-134		MHNG
<i>Ancistrus</i> sp.A	Guyana:río Surama	GY04-225		MHNG
<i>Ancistrus</i> sp. 9	Argentina:Entre Ríos, río Uruguay, arroyo Urquiza	M1		
<i>Ancistrus</i> sp. 9	Argentina:Entre Ríos, río Uruguay, arroyo Urquiza	M2		
<i>Ancistrus</i> sp.	Brasil:río Madeira	MUS-139		

Los *Hypostomus* utilizados en los análisis moleculares.

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. affinis</i>	Brasil:São Paulo, río Agua Santa, río Paraíba do Sul	BR 1254	AJ318358(D-loop)	MHNG 2587.55
<i>H. albob punctatus</i>	Brasil:São Paulo, río Mogi Guacu		AJ318379	MHNG 2547.18
<i>H. albob punctatus</i>	Brasil:río Iguazu, BarRAG1em de Caxias			MCP 37990
<i>H. ancistroides</i>	Brasil:Minas Gerais, río Grande bassin	BR98-696	AJ318369(D-loop)	MHNG 2602.91
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Corrientes, Yahapé	AG-163	JF290442(D-loop)	MACN-ict 9678
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-198	JF290445(D-loop)	MACN-ict 9677
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-181	JF290441(D-loop)	MACN-ict 9679
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-193		
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Misiones	TAE1	JF290443(D-loop)	
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Misiones	TAE2	JF290444(D-loop)	
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Santa Fé	PB031	JF290446(D-loop)	MHNG PB-031
<i>H. arecuta</i>	Argentina: Misiones, Candelaria	CIA45		
<i>H. asperatus</i>	Brasil: Goiás, río Bateia	BR-974	AJ318370(D-loop)	PSM06-2053
<i>H. aspilogaster</i>	Brasil: Río Grande do Sul	DF-023	AJ31837(D-loop)	MCP 21319

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. aspilogaster</i>	Argentina: Entre Ríos, Mandisoví Grande	YC09-090		ILPLA 2156
<i>H. aspilogaster</i>	Argentina: Buenos Aires, Ensenada	regata6		
<i>H. aspilogaster</i>	Argentina: Buenos Aires, Ensenada	regata7		
<i>H. aspilogaster</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-011		ILPLA 2154
<i>H. aspilogaster</i>	Brasil: Río Grande do Sul, río Jacui			MCP 21319
<i>H. boulengeri</i>	Paraguay: río Paraguay, near Asuncion	ASU7	AJ318344(D-loop)	MHNG2519.23
<i>H. boulengeri</i>	Argentina: Formosa, Formosa Capital	AR11-609	JX290097(D-loop)	MACN-Ict 9723
<i>H. boulengeri</i>	Argentina: Formosa, Formosa Capital	AR11-612	JX290098(D-loop)	MACN-Ict 9723
<i>H. boulengeri</i>	Argentina: Formosa, Formosa Capital	AR11-611	JX290099(D-loop)	MACN-Ict 9723
<i>H. cf. commersoni</i>	Brasil: Passo Fundo, Ronda Alta, Río Grande do Sul	MCP01	AJ318356(D-loop)	
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, Mandisoví Grande	YC09-085		
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, Camba Cua	YC09-091		
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Gualeguaychú	YC-016		
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Arroyo Urquiza	M9		
<i>H. cf. commersoni</i>	Brasil: Río Grande do Sul, Jacui	MCP22767		MCP22767
<i>H. cf. commersoni</i>	Brasil: Río Grande do Sul, río Ibicuí	MCP26678		MCP26678
<i>H. cf. commersoni</i>	Brasil: Río Grande do Sul, río Ibicuí-Mirim	MCP28416		MCP28416
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, río Ayuí grande	YC-013		
<i>H. cf. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, Arroyo Yohazá	YC09-095		
<i>H. cochliodon</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG09-016	JF290476(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, La Plata	YC-957	JF290452(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Ensenada	regatas2	JF290456(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Parque Nacional PreDelta	14802	JF290454(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Misiones, arroyo Garupa	AG09-077	JF290457(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Santa Fé, arroyo Manucho	YA09-124	JF290451(D-loop)	

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Ensenada	regatas1		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, Aquarium (río Corrientes)	YC09-607	JF290453(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Misiones, arroyo Tabay	AG09-129	JF290450(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Arroyo Arregui	YC09-587		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Villa Paranacito	YC-042		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Villa Paranacito	YC-043		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Villa Paranacito	YC-047		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Villa Paranacito	YC-050		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Los Talas, Berisso	YC09-118		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-350		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-333		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-349		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, San Nicolas de los Arroyos	YC10-413		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-351		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG09-013	JF290455(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, arroyo El Pescado	YC-926	JF290458(D-loop)	ILPLA1907
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, La Plata	YC-958		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-325	JX290096(D-loop)	
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-326		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-358		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos	AR11-081		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Formosa, El Colorado	AR11-325		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Sant. del Estero, Embalse río Hondo	AR11-1007		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Sant. del Estero, Embalse río Hondo	AR11-1008		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Corrientes, arroyo Pehuajo	AR11-152		

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Buenos Aires, Tigre, Buenos Aires	YC-60		
<i>H. commersoni</i>	Argentina: Entre Ríos, Brazo largo	YC-59		
<i>H. derbyi</i>	Argentina: Misiones, río Uruzu	YC10-316	JF290447(D-loop)	
<i>H. ericae</i>	Brasil: Goiás, río Maranhao	BR 1013	AJ318347(D-loop)	PSM06-2053
<i>H. ericae</i>	Peru			
<i>H. fonchii</i>	Peru	Ca37	AJ318350(D-loop)	MHNG 2613.67
<i>H. fonchii</i>	Peru	PE08-034		
<i>H. formosae</i>	Argentina: Formosa, río Pilcomayo	YC-941	JX290092(D-loop)	ILPLA 1972
<i>H. formosae</i>	Argentina: Formosa, arroyo Saladillo	AR11-207	JX290093(D-loop)	MACN-Ict 9721
<i>H. formosae</i>	Argentina: Formosa, Bañado La Estrella	AR11-452	JX290095(D-loop)	MACN-Ict 9722
<i>H. formosae</i>	Argentina: Formosa, arroyo Saladillo	AR11-208	JX290094(D-loop)	MACN-Ict 9720
<i>H. gymnorhynchus</i>	Guyana Francesa: río Sinnamary	GF98-099	AJ412849(D-loop)	MHNG2595.48
<i>H. hondae</i>	Venezuela: río Muyapa, Maracaibo, Merida	VZ94	AJ318348(D-loop)	INHS 35598
<i>H. interruptus</i>	Brasil: Paran, río Branco do Sul	BR1161		MHNG2586.54
<i>H. isbrueckeri</i>	Brasil: Río Grande do Sul, río Jacui,		AJ318376(D-loop)	MCP(Jacui)
<i>H. isbrueckeri</i>	Brasil: río Uruguay, Río Grande do Sul	MCP41476		MCP41476
<i>H. isbrueckeri</i>	Brasil: río Uruguay, Santa Catarina	MCP21125		MCP21125
<i>H. johnii</i>	Brasil: río Parnaíba	BR98-268	AJ412830(D-loop)	MHNG
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, San Fernando	YC-024		ILPLA 1911
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, San Fernando	YC-033		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Entre Ríos, PNPD	AG-349		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-010		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-012		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-032		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-080		

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Punta Lara	YC09-083		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-341		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-342		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-359		
<i>H. laplatae</i>	Argentina: Buenos Aires, San Pedro	YC10-381		
<i>H. latifrons</i>	Paraguay: río Salado	PY 8008	AJ318378(D-loop)	MHNG 2528.16
<i>H. latirostris</i>	Paraguay: Trementina	PY 8045	AJ318373(D-loop)	MHNG 2528.11
<i>H. luetkeni</i>	Brasil: río Paraiba do Sul		AJ412831(D-loop)	MHNG 2587.26
<i>H. luetkeni</i>	Brasil: São Paulo, río Paraiba do sul	BR-1235		MNHG 2587.26
<i>H. luetkeni</i>	Brasil: São Paulo, río Bacaina, río Paraiba do sul	BR-1249		MHNG 2587.47
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-012		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Corrientes, Yahapé	AG-157		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-190		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-200		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Misiones, Candelaria	CIA283		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Santa Fé, Puerto Gaboto	YC10-450		
<i>H. luteomaculatus</i>	Argentina: Chaco, Antequera	YC-162		
<i>H. luteomaculatus</i>	Brasil: Pedra Fortaleza, Itapiranga	UR002		MCP19990
<i>H. luteomaculatus</i>	Brasil: Pedra Fortaleza, Itapiranga	UR006	JF290460	MCP
<i>H. luteomaculatus</i>	Brasil: Pedra Fortaleza, Itapiranga	UR003	AJ318372	MCP19989
<i>H. luteus</i>	Brasil: río Uruguay, Pedra Fortaleza, Itapiranga	UR007	AJ318374(D-loop)	MCP19991
<i>H. microstomus</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG09-015	JF290461(D-loop)	
<i>H. myersi</i>	Argentina: Misiones, arroyo Tabay	AG09-123	JF290474(D-loop)	
<i>H. myersi</i>	Argentina: Misiones, arroyo Tabay	AG-124	JF290473(D-loop)	
<i>H. myersi</i>	Argentina: Misiones, arroyo Tabay	AG-131	JF290475(D-loop)	

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. myersi</i>	Argentina: Misiones, arroyo El Deseado	YC10-256	JF290472(D-loop)	
<i>H. nigromaculatus</i>	Brasil: río Tibaji	TIBAJ112	AJ318355(D-loop)	MZUETib012
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, Córdoba Capital	YC-026	JF290448(D-loop)	ILPLA1914
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, Córdoba Capital	YC-025	JF290449(D-loop)	ILPLA1914
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Tucumán, río Caldera	AR11-782		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Tucumán, río Caldera	AR11-783		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Primero, Carlos Paz	AR11-1147		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Segundo	AR11-1214		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Segundo	AR11-1215		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Cuarto	AR11-1280		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Quinto	AR11-1294		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba, río Quinto	AR11-1295		
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba	cordo14		MHNG
<i>H. paranensis</i>	Argentina: Córdoba	cordo12		MHNG
<i>H. plecostomoides</i>	Venezuela: Apure, Barinas	VZ58	AJ318349(D-loop)	INHS 34687
<i>H. plecostomus</i>	Suriname: Marshall Creek	SUJM-047		
<i>H. punctatus</i>	Brasil: río de Janeiro, río Ubatiba		AJ318357(D-loop)	MHNG 2543.27
<i>H. regani</i>	Brasil: São Paulo, río Mogi Guacu	Emas 4	AJ318371(D-loop)	MHNG 2547.17
<i>H. regani</i>	Brasil: São Paulo, río Mogi Guacu	Emas 6	AJ318371(D-loop)	MHNG 2547.17
<i>H. regani</i>	Argentina: Entre Ríos, PNPD	AG-354		
<i>H. sp. BR1100</i>	Brasil: río Tocantins	BR 1100	AJ412834(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. BR1134</i>	Brasil: río Tocantins	BR 1134	AJ412850(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. AG09-207</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG09-207		
<i>H. sp. BR1026</i>	Brasil: río Tocantins	BR1026	AJ412833(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. BR1204/11/17</i>	Brasil: río Tiete	BR1211	AJ412844(D-loop)	MHNG 2587.10

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. sp. BR1204/11/17</i>	Brasil: río Tiete	BR1204	AJ412843(D-loop)	MHNG 2586.1
<i>H. sp. BR1204/11/17</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul	BR1217		MHNG 2587.16
<i>H. sp. BR906</i>	Brasil: río Tocantins	BR906	AJ412832(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. BR98-177</i>	Brasil: río Gurupi	BR98-177	AJ412847(D-loop)	
<i>H. sp. BR98-219</i>	Brasil: río Itapicuru	BR98-219	AJ412848(D-loop)	MHNG 2602.47
<i>H. sp. BR98-270</i>	Brasil: Piauí, río Paranaíba	BR98-270	AJ315762(D-loop)	
<i>H. sp. BR98-691</i>	Brasil: río Ribeira do Iguape	BR98-691	AJ412846(D-loop)	MHNG 2586.54
<i>H. sp. BR98-716/732</i>	Brasil: río Paranaíba	BR98-716	AJ412841(D-loop)	FL980813-2
<i>H. sp. BR98-716/732</i>	Brasil: río Paranaíba	BR98-732	AJ412842(D-loop)	FL980813-3
<i>H. sp. BR98-678</i>	Brasil: río Tiete	BR98-678	AJ412836(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. BR98-699</i>	Brasil: río Grande	BR98-699	AJ412835(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. BR98-738</i>	Brasil: río São Francisco	BR98-738	AJ412838(D-loop)	FL980814-1
<i>H. sp. BR98-748</i>	Brasil: río São Francisco	BR98-748	AJ412840(D-loop)	FL980814-2
<i>H. sp. BR98-751</i>	Brasil: río São Francisco	BR98-751	AJ412839(D-loop)	FL980814-3
<i>H. sp. GY04-171</i>	Guyana: Takutu	GY04-171		MHNG
<i>H. sp. GY04-173</i>	Guyana: Takutu	GY04-173		MHNG
<i>H. sp. GY04-333</i>	Guyana: Siparuni	GY04-333		MHNG
<i>H. sp. PdeR36/49</i>	Peru: río Ucayali, near Contamana	PR49	AJ315763(D-loop)	MHNG 2588.82
<i>H. sp. PdeR36/49</i>	Peru: río Ucayali, near Contamana	PR36	AJ315764(D-loop)	MHNG 2588.77
<i>H. sp. PE08-221</i>	Peru: Loreto	PE08-221		MHNG
<i>H. sp. PE08-269</i>	Peru: Loreto	PE08-269		MHNG
<i>H. sp. PE08-441</i>	Peru: Loreto	PE08-441		MHNG
<i>H. sp. PE08-700</i>	Peru: Loreto	PE08-700		MHNG
<i>H. sp. Tib1</i>	Brasil: río Tibaji	Tib1	AJ412829(D-loop)	MHNG
<i>H. sp. Tib13</i>	Brasil: río Tibaji	Tib13	AJ412845(D-loop)	MHNG

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>H. ternetzi</i>	Argentina: Chaco, Antequera	YC-163		
<i>H. ternetzi</i>	Argentina: Chaco, Antequera	YC-164		
<i>H. ternetzi</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG-160		
<i>H. uruguayensis</i>	Brasil: río Uruguay, Pedra Fortaleza, Itapiranga	UR001	AJ318377(D-loop)	MCP
<i>H. uruguayensis</i>	Argentina: Corrientes, Yahapé	AG09-159	JF290464(D-loop)	
<i>H. uruguayensis</i>	Argentina: Entre Ríos, PNP	14731	JF290465(D-loop)	
<i>H. uruguayensis</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-356		
<i>H. uruguayensis</i>	Argentina: Santa Fé, Puerto Gaboto	YC10-471		
<i>H. watwata</i>	French Guiana: Crique Coswine	GF98-144	AJ318353(D-loop)	MHNG 2595.32
<i>H. watwata</i>	French Guiana: Oyapok river	GF99-162	AJ318352(D-loop)	MHNG
<i>H. watwata</i>	French Guiana: Oyapok river	GF99-161		MHNG

Los *Loricariichthys* utilizados en los análisis moleculares.

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>Loricariichthys</i> sp.	Brasil: São Paulo	FBCR216-09		LBP-35547
<i>Loricariichthys</i> sp.	Brasil: São Paulo	FBCR218-09		LBP-35549
<i>L. anus</i>	Argentina: Corrientes, Timboy	YC09-092		
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, Juan Blanco	YC-913		
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, El Pescado	YC-882		
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, General Lavalle, Canal 2	YC09-053		
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, General Lavalle, Canal 2	YC09-055		
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, Tributario río Rojas	FARGB298-11	JX111786 (COI)	UNMDP-T 0466
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, 4 de noviembre	FARGB301-11	JX111788 (COI)	UNMDP-T 0469
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB136-11	JX111784 (COI)	UNMDP-T 0304
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB142-11	JX111782 (COI)	UNMDP-T 0310

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB140-11	JX111780 (COI)	UNMDP-T 0308
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB137-11	JX111787 (COI)	UNMDP-T 0305
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB139-11	JX111785 (COI)	UNMDP-T 0307
<i>L. anus</i>	Argentina: Buenos Aires, laguna Salada de Monasterio	FARGB138-11	JX111783 (COI)	UNMDP-T 0306
<i>L. castaneus</i>	Brasil: río de Janeiro, Paraiba do Sul Basin	FPSR292-09	HM065006 (COI)	LBP-16091
<i>L. castaneus</i>	Brasil: río de Janeiro, Paraiba do Sul Basin	FPSR290-09	HM065004 (COI)	LBP-16089
<i>L. castaneus</i>	Brasil: río de Janeiro, Paraiba do Sul Basin	FPSR291-09	HM065005 (COI)	LBP-16090
<i>L. castaneus</i>	Brasil: río de Janeiro, Paraiba do Sul Basin	FPSR251-09	HM065003 (COI)	LBP-16092
<i>L. castaneus</i>	Brasil			
<i>L. labialis</i>	Paraguay	PY9094		
<i>L. maculatus</i>	Surinam: río Sarramaca	SU01-56	HM623642(FRTN4)	MHNG2621.42
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Corrientes, Puerta Abra	AG09-045		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Misiones, Garupa	AG09-083		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Misiones, Garupa	AG09-084		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaigó	AG09-161		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Entre Ríos, Gualeguaychú	YC-037		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Buenos Aires, San Fernando	YC-005		ILPLA 1921
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Entre Ríos, Gualeguaychú	YC-009		ILPA 1920
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Buenos Aires, Tigre	YC-020		ILPLA 1919
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Buenos Aires, Tigre	YC-021		ILPLA 1919
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Corrientes, laguna Iberá	YC09-109		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Misiones, Deseado	YC10-257		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-364		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado	YC10-371		
<i>L. melanocheilus</i>	Argentina: Santa Fé, Cayastá	YC10-437		

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (Gen)	Colección
<i>L. microdon</i>	Guyana: río Rupununi	GY04-12	HM623643(FRTN4)	MHNG2650.54
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Buenos Aires, San Nicolás	YC10-323		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Buenos Aires, Vuelta de Obligado:	YC10-363		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Santa Fé, Cayastá	YC10-443		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Formosa, La Estrella	AR11-359		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Formosa, Formosa Capital	AR11-603		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Chaco, río Negro	AR11-659		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Chaco, río Negro	AR11-660		
<i>L. platymetopon</i>	Argentina: Chaco, río Negro	AR11-661		
<i>L. platymetopon</i>	Brasil: Paraná, río Paraná	FUPR805-09		LBP-26393
<i>L. platymetopon</i>	Brasil: Paraná, río Paraná	FUPR803-09		LBP-17294
<i>L. platymetopon</i>	Brasil: Paraná, río Paraná	FUPR801-09		LBP-19262
<i>L. platymetopon</i>	Paraguay: lago Ypacarai	PY9098		

Los *Rineloricaria* utilizados en los análisis moleculares.

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (gen)	Colección
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702293(COI)	LBP-29103
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702285(COI)	LBP-29140
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702283(COI)	LBP-29081
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702281(COI)	LBP-29381
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702280(COI)	LBP-29380
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702279(COI)	LBP-29379
<i>R. aff. lima</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702278(COI)	LBP-29378
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702292(COI)	LBP-29102
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraiba do Sul Basin		GU702291(COI)	LBP-29101

A. Lista del material utilizado

237

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (gen)	Colección
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702290(COI)	LBP-29123
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702289(COI)	LBP-29122
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702288(COI)	LBP-29121
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702287(COI)	LBP-29120
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702286(COI)	LBP-29119
<i>R. aff. kronei</i>	Brasil: São Paulo, Paraíba do Sul Basin		GU702282(COI)	LBP-29076
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Salta	101-9		
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Córdoba, río Cuarto	AR11-1272		
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Tucumán, río Caldera	AR11-802		
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Tucumán, río Caldera	AR11-803		
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Córdoba, río Primero	AR11-1154		
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: río Salí	105-13		MHNG 2680.33
<i>R. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, General Belgrano	YC09-119		
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, 4 de noviembre		JX111843(COI)	UNMDP-T 0517
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, Puente Santa Cruz		JX111841(COI)	UNMDP-T 0525
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, 4 de noviembre		JX111844(COI)	UNMDP-T 0518
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, 4 de noviembre		JX111842(COI)	UNMDP-T 0519
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina: Buenos Aires, 4 de noviembre		JX111846(COI)	UNMDP-T 0381
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina	FARGB497-1		
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina	FARGB498-1		
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina	FARGB569-1		
<i>R. cf. catamarcensis</i>	Argentina	FARGB779-1		
<i>R. lanceolata</i>	Argentina: Corrientes, Ituzaingó	AG180		
<i>R. lanceolata</i>	Perú: Madre de Dios	PE96-011	HM623640(FRTN4)	MHNG 2588.059
<i>R. lanceolata</i>	Brasil: río Paraguay	95-1		

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (gen)	Colección
<i>R. latirostris</i>	Brasil: río Paraná		GU701525 (COI)	LBP-38088
<i>R. latirostris</i>	Brasil: río Paraná		GU701523(COI)	LBP-19533
<i>R. latirostris</i>	Brasil: río Paraná		GU701526(COI)	LBP-19534
<i>R. misionera</i>	Argentina: Misiones, Cuna Piru	105-12		
<i>R. osvaldoi</i>	Bresil: río Maranhao	BR1114	HM623652(FRTN4)	UFRJ6-EF4
<i>R. parva</i>	Argentina: Formosa, Riacho Porteno	YC-019		
<i>R. parva</i>	Argentina: Santa Fé	101-22		
<i>R. parva</i>	Argentina: Corrientes, laguna Iberá	YC09-096		
<i>R. parva</i>	Argentina: Buenos Aires, San Nicolás		JX111845(COI)	UNMDP-T 0537
<i>R. parva</i>	Argentina	FARGB514-1		
<i>R. parva</i>	Argentina: Entre Ríos	M5		
<i>R. parva.</i>	Argentina: Entre Ríos	M18		
<i>R. parva</i>	Argentina: Entre Ríos, Ensenada Ñandubaysal	YC-002		
<i>R. parva</i>	Argentina: Corrientes, río Ayui Grande	YC-015		ILPLA 1915
<i>R. platyura</i>	Guyana:río Rupununi	GY04-83	HM623641(FRTN4)	MHNG 2651.009
<i>Rineloricaria sp. 1</i>	Brasil: río Paraná		GU701524	LBP-26333
<i>Rineloricaria sp. 1</i>	Brasil: río Paraná		GU701520	LBP-26332
<i>Rineloricaria sp. 2</i>	Brasil: Minas Gerais, río Curimatai, São Francisco	DCC01143	HM405213(COI)	
<i>Rineloricaria sp. 2</i>	Brasil: Minas Gerais, río Curimatai, São Francisco	DCC00655	HM405212(COI)	
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	37029		LBP-37029
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	37028		LBP-37028
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	35712		LBP-35712
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	35706		LBP-35706
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	33084		LBP-33084
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	35583		LBP-35583

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (gen)	Colección
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	33086		LBP-33086
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil: São Paulo	35710		LBP-35710
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689045(COI)	LBP-21374
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689044(COI)	LBP-21375
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689043(COI)	LBP-21377
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689123(COI)	LBP-37028
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689042(COI)	LBP-37029
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689039(COI)	LBP-38427
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689038(COI)	LBP-38085
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689037(COI)	LBP-38086
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689035(COI)	LBP-21378
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	Brasil		GU689034(COI)	LBP-38083
<i>Rineloricaria sp. 4</i>	Argentina: Entre Ríos, río Gualaguay	VIII7		
<i>Rineloricaria sp. 5</i>	Argentina: Misiones	AG127		
<i>R. uracantha</i>		18552	FJ434522(COI)	LBP-2762
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta	101-8		
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.2-10	EU559084(COI)	MCNI 1286
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.2-9	EU559083(COI)	MCNI 1286
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.2-8	EU559082(COI)	MCNI 1286
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.2-6	EU559081(COI)	MCNI 1286
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.1-5	EU559080(COI)	MCNI 1287
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.1-4	EU559079(COI)	MCNI 1287
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.1-3	EU559078(COI)	MCNI 1287
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.1-2	EU559077(COI)	MCNI 1287
<i>I. steinbachi</i>	Bolivia: cerca de Tarija, río Bermejo	Bermejo2.1-1	EU559076(COI)	MCNI 1287

Identificación	Localidad	Código de campo	Genbank (gen)	Colección
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.2-11	EU559075(COI)	MCNI 1287
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.2-10	EU559074(COI)	GEN 1716
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.2-9	EU559073(COI)	GEN 1715
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.2-8	EU559072(COI)	GEN 1714
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-7	EU559071(COI)	GEN 1712
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-6	EU559070(COI)	GEN 1711
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-5	EU559069(COI)	GEN 1710
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-4	EU559068(COI)	GEN 1709
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-3	EU559067(COI)	GEN 1708
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: cerca de Salta, río Bermejo	Bermejol.1-1	EU559066(COI)	GEN 1707
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento2-10	EU559063(COI)	MCNI 1382
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento2-12	EU559065(COI)	MCNI 1382
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-9	EU559062(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-8	EU559061(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-7	EU559060(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-6	EU559059(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento2-5	EU559058(COI)	MCNI 1382
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-4	EU559057(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento1-3	EU559056(COI)	MCNI 1222
<i>I. steinbachi</i>	Argentina: Salta, Arenales, río Juramento	Juramento2-2	EU559055(COI)	MCNI 1382

B.1. Extracción de ADN con sales

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un eppendorf de 1.5 μ l .
2. Agregar 200 μ l de buffer de lisis y 25 μ l de proteinasa K a 1 mg/ml.
3. Encubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 hs o hasta toda la noche.
Opcional: Una hora antes de finalizar, agregar 5 μ l de RNasa A.
4. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 min.
5. Pipetear 180 μ l del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiera).
6. Agregar 150 μ l de cloruro de sodio 5 M, agitar brevemente y centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos.
7. Pipetear 300 μ l del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a -20°C o el doble de volumen de etanol absoluto a -20°C . Agitar levemente primero, luego mezclar completamente. Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20°C por 2 hs o toda la noche.
8. Centrifugar a 13.000 rpm por 15 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.

9. Lavar cuidadosamente con unos 150 μl de etanol 70°C evitando perder o disgregar el pellet.
10. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
11. Resuspender en 100 μl de TE. Agitar, y opcionalmente encubar a 55°C (o menos) por 2 hs.
12. Guardar a -20°C .

B.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1. Verificar el programa en el termociclador. Esterilizar el área de trabajo.
2. Rotular los tubos de PCR(0.2 ml) según corresponda.
3. Preparar el mix en un tubo 1.5 ml conteniendo para cada reacción de PCR:
 - 42 μl de agua destilada.
 - 5 μl de Buffer 10x de PCR .
 - 1 μl de dNTP.
 - 1 μl de primer directo (10 pmol/ μl).
 - 1 μl de primer reverso (10 pmol/ μl).
 - 0.2 μl de Taq polimerasa 5unidades/ μl .
4. Mezclar y distribuir 49 μl en cada tubo de PCR.
5. Agregar 1 to 4 μl de muestra de ADN.
6. Colocar los tubos en el termociclador.

Programa para PCR:

- Desnaturalización inicial: de 3 a 4 minutos a 94°C
- Ciclos: de 25 a 43
 1. Desnaturalización 30 segundos a 94°C
 2. Annealing 30 segundos a 51-59°C

3. Elongación de 1 a 3 minutos a 72°C o 74°C

- Elongación final 5 minutos a 72°C o 74°C
- Pausa a 4°C

primers usados para amplificar D-loop:

- Para el género *Ancistrus*:

DLC-D: 5'-AAA GAG AGA TTY YAA CTC CCA C-3'

DLA-R: 5'-AGT CAG GAC CAA RCC TTT GTG C-3'

AnDLi-D: 5'-TAG TAT AHW CCC CAT -3'

AnDLi-R: 5'- GGG TTT GAC GCG YAG-3'

- Para el género *Hypostomus*:

HygDL-R: 5'-WTG CKA RTA TGT GCC GYY TG -3'

DLA III: 5'-TAT TTA AAG RCA TAA TCT CTT GAC -3'

primers usados para amplificar COI:

SilCOI-D: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'

SilCOI-R: 5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

primers usados para amplificar F-reticulon-4:

F-reticul4-D: 5'-AGG CTA ACT CGC TYT SGG CTT TG-3'

F-reticul4-D2: 5'-CTT TGG TTC GGA ATG GAA AC-3'

F-reticul4-R: 5'-GGC AVA GRG CRA ART CCA TCT C-3'

F-reticul4-R2: 5'-AAR TCC ATC TCA CGC AGG A-3'

primers usados para amplificar RAG1:

F74: 5'-TTT CGG AAT GGA AGT TTA AGC TST TTC G -3'

R1333: 5'-GTC AAA CAC ACA GAC TTC ACA TC -3'

primers usados para amplificar CDC27:

CDC27-D5: 5'- -3'

CDC27-R3: 5'- -3'

primers usados para amplificar Hoz3:

B.3. Electroforesis

1. Preparación de geles de agarosa 1,5 %.
 - 3 g de agarosa.
 - 200 ml de TBE 0,5 %.
 - Fundir hasta que esté totalmente homogéneo.
 - Agregar 1 μ l de EtBr.
 - Colocarlo en una cama de electroforesis con peines. Esperar a que se solidifique.
2. Preparación de muestras y DNA ladder para cargar en el gel.
 - 1 μ l de solución de Gel loading (type I, 6x)(SIGMA TM).
 - 2 μ l de producto PCR o de extracción de ADN o 100 bp DNA ladder 1 μ l (Invitrogen TM).
3. Cargar las muestras y el DNA ladder.
4. Migración por 45 minutos a 100 V.
5. Visualización y fotografía del gel a partir de transiluminador de luz ultra violeta y guardado de la foto.

APÉNDICE C

Matriz de datos para la obtención del cladograma general de áreas a partir del análisis de parsimonia de Brooks (BPA)

```
Begin data;
dimensions ntax=14 nchar=90;
format missing=?;
matrix
out 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000
00000 00000 00000 00000 00000
Medio Paraná 11100 10011 00001 11111 11111 11000 11111 11111 10110 11110 11011 11111
11111 10011 10110 00011 11111 11111
Bajo Paraná 11101 11011 11111 11111 11011 11000 11111 11100 00000 01110 11011 01100
00111 10011 1???? ????? ????? ?????
Uruguay 00110 10100 11111 11111 11011 11000 01111 11100 00000 01101 11111 01000
11111 10011 11001 11100 00111 11001
Alto Paraná 00000 01000 00000 01011 11011 11000 00001 11100 00000 01110 11011 00000
00000 01111 10100 00011 11111 11001
São Francisco 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 011?? ????? 00000
```

00000 01111 1???? ????? ????? ?????

Amazonas 00000 00000 00000 00000 00000 11011 00000 01111 11111 111?? ????? 00010
00000 00001 10010 00000 00000 00111

Río de la Plata 00011 00010 11111 11000 00000 01000 11111 11100 00000 01101 00111
01000 00111 10011 11000 01100 00111 11001

ríos costeros del sur 00010 00100 11111 11000 00111 11000 11111 11100 00000 01100 00111
00000 00111 10011 10001 10100 00111 11001

Paraguay 00000 00010 10000 00000 00000 01111 11111 11100 00000 01110 01011 10111
01001 10011 1???? ????? ????? ?????

ríos endorreicos Mar Chiquita 00000 00000 00000 00000 00000 01000 00000 00000 00000
011?? ????? 01000 00111 10011 1???? ????? ????? ?????

Guyanas 00000 00000 00000 00000 00000 00111 00000 01100 11110 111?? ????? ????? ?????
????? ?0000 00000 00000 00111

ríos costeros del norte 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 011??
????? ????? ????? ????? ????? ????? ????? ?????

lago Maracaibo 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00000 00001 101?? ????? ?????
????? ????? ?0000 00000 00000 00011 ;

end;

APÉNDICE D

Archivo de datos para DIVA 1.1

Las letras en la distribución corresponden a: a= Medio Paraná y Bajo Paraná, b= Uruguay, c= Alto Paraná, d= Río de la Plata, e= Paraguay, f= ríos endorreicos de Mar Chiquita, g= ríos costeros del sur y h=São Francisco+Amazonas+Guyanas+ríos costeros del norte+lago Maracaibo.

```
/* datos para análisis de la cuenca del Plata
/* biogeografía con Loricariidos?/*
/* taxlabels BPA/MPA a URU b APA c RLP d PAR e END f CSU g São/CNO/AMA/GUY/MAR
h
output delplata4.out;
reset classes=2;
reset unambiguous;
reset sumareas=8;
tree Hypostomus ((1,((((((2,(3,((((4,5),((6,7),(8,9))),((10,11)),12))),((13,((14,15),(16,17))))),18),((19,
((20,(21,22))),((23,(((24,25),26),27),28))))),((29,30),(31,(((32,(((33,34),35),36)),37),(38,39))))),((40,
41),(((42,(43,44)),(45,((46,47),48))),49))),50),(51,(52,53))),((54,55),56));
distribution h c c dg dg g g adef adef j a e h e h h h c a a a ab bdg ae e b b h h a c a ab a c c a
h h h h h h h a h h h h h h h h h h h;
tree Loricariichthys (((1,((2,(3,4)),(5,6))),((7,(8,9))),((10,(11,12))),((13,14),(15,16))));
```

distribution ace bg g g abc e h h h h h h h h;

optimize;

tree Rineloricaria (((1,(2,3)),((4,5),(6,7))),((8,((9,10),((((11,12),(13,14)),15),(16,17),(18,19))),
(20,(21,22))))),((23,24),25));

distribution h h h h h h h c ae h g abdf g g ae a b a ae c h c h h h;

optimize;

tree Ancistrus (((1,(((2,((((3,4),5),((6,7),8)),((9,(10,11)),(12,13))),(((14,15),(((16,17),(18,19)),
((20,21),22))),((23,(24,25)))))),(26,27)),(28,((29,30),(31,32))))),((33,34),(((35,36),(37,(38,39))),40))),
((41,42),((43,44),45))),46,((47,48),49)); distribution g g db db db b b b g b b g g c a a a a c c a a
a a g g g g g g h h a h a a k h h h h h h h h;

optimize;

sum;

return;

APÉNDICE E

Trabajos Publicados

Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894). Distribution extension and first record for Argentina

Yamila P. Cardoso^{1*}, Florencia Brancolini², Lucila Protogino³ and Marta Lizarralde¹

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG), Avenida Calchaquí Km 23,5, Florencio Varela, C.C. 1888, BA, Argentina.

² Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" (UNLP-CONICET-CCT La Plata), C.C. 712, 1900 La Plata, BA, Argentina.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" (CONICET-CCT La Plata), C.C. 712, 1900 La Plata, BA, Argentina.

* Corresponding author. E-mail: yamilapcardoso@gmail.com

ABSTRACT: The present work extends to Argentina the distribution of *Hypostomus aspilogaster* originally described from Uruguay River in southern Brazil. The examined specimens were sampled in the stream Mandisoví Grande, affluent of Uruguay River in Entre Ríos province, and in Punta Lara, from Río de la Plata basin, in Buenos Aires province, Argentina. This represents the first country record for this species.

Among the Siluriformes, the Loricariidae family is one of the most diverse in number of genera and species in the Neotropical Region and comprises seven subfamilies (Chiachio *et al.* 2008). In the subfamily Hypostominae, the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 includes approximately 130 species. This genus constitutes an assemblage of bottom-dwelling fishes with algivorous or detritivorous habits. *Hypostomus* are found in lentic and lotic freshwater environments. The wide distribution range of this genus covers from Colombia to Salado River basin in Buenos Aires province, Argentina (López and Miquelarena 1991; Ferraris 2007).

The species *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894) was originally described from Jacui River in Rio Grande do Sul, Brazil. Cope (1894) mentioned for this species that: "the scuta are not keeled, but are distinctly angular on the dorsolateral and ventrolateral rows, and traces of keels exist on the anterior scuta of the two median lateral rows". Later, Reis *et al.* (1990) in the review of the *Hypostomus* genus, proposed the following diagnostic characters of *H. aspilogaster*: larger number of lateral scutes 29-31, 3-5 scutes bordering the posterior margin of the supraoccipital bone and longer lower caudal fin spine (3.0-3.5 in standard length).

The specimens examined in this work were collected in the stream Mandisoví Grande, tributary of Uruguay River, Entre Ríos province and Punta Lara, Río de la Plata basin, Buenos Aires province, Argentina (Figure 1). The permissions to collect fish were given by Ministerio de Asuntos Agrarios, Buenos Aires province (MAA N°79) and Dirección de Recursos Naturales, Ministerio de Producción, Entre Ríos province. Fish specimens (Figure 2), were fixed in formalin and then in ethanol 70% and are deposited at Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" (Institutional Code: ILPLA). Tissue sampling for molecular analyses was performed in the field. Tissues were fixed in ethanol 96%. Details on the material examined can be

found in Appendix 1.

Morphology measurements and counts follow Reis *et al.*, (1990), see Table 1. All measurements were taken point to point with digital calipers Digimess to the nearest 0.1 mm. Moreover, for two specimens (one of each locality sampled), we performed molecular analysis. DNA was extracted using the salt-extraction protocol (Aljanabi and Martinez 1997). The PCR amplification of the D-loop or control region of the mitochondrial DNA was performed using the following primers: DLA-III 5'-TATTTAAAGRCATAATCTCTTGAC-3' and HygDL-R 5'-WTGCKARTATGTGCCGYTG-3'. The PCR products were



FIGURE 1. *Hypostomus aspilogaster* distribution: black square: type locality; white square: localities cited in Reis *et al.* 1990; black circle: stream Mandisoví Grande, Entre Ríos province, Argentina; white circle: Punta Lara, Buenos Aires province, Argentina.

purified and sequenced in MAGROGEN Korea. The DNA sequences were edited and aligned using the BioEdit 7.0.1 program (Hall 1999). The sequences obtained were analyzed with other 28 sequences of *Hypostomus* genus deposited in GenBank. Among these 28 sequences, we used a sequence of *H. aspilogaster* from the type locality. This allows us to infer the phylogenies of *Hypostomus* genus using the Maximum Likelihood method with the TreeFinder program (Jobb et al. 2004).

The molecular results (Figure 3) show that the sequences of the specimens collected in Uruguay and

Río de la Plata rivers, Argentina, and the sequences of *H. aspilogaster* from the type locality are a monophyletic group.

An analysis which makes up molecular, morphometric and meristic data represents an invaluable tool for clarifying the systematics of complex groups on which, at the moment, we do not have complete knowledge. As an outcome of this integrated analysis, we allow to extend the distribution of *H. aspilogaster* in the Neotropical Region and present the first record of this species in Argentina.



FIGURE 2. Dorsal, lateral and ventral views of a live specimen of *Hypostomus aspilogaster* collected in the stream Mandisoví Grande, Entre Ríos province, Argentina. ILPLA 2156, (YC09-090), 285.2 mm SL.

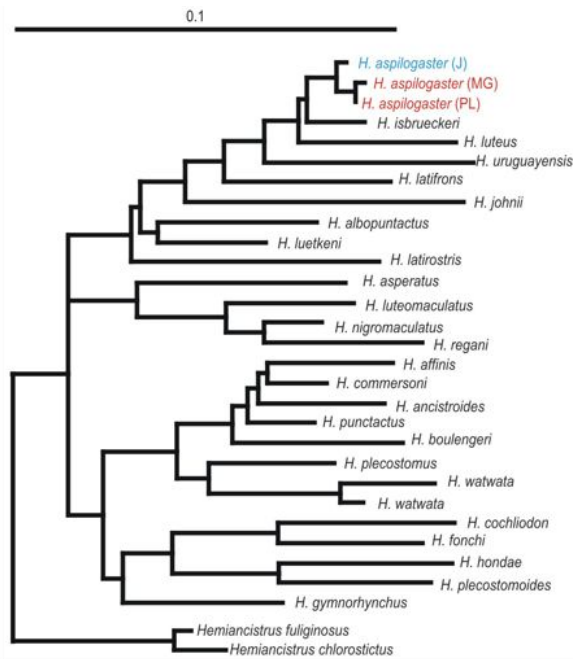


FIGURE 3. *Hypostomus* phylogenetic tree, based in D-loop mitochondrial marker; *H. aspilogaster* from type locality Rio Jacui, Brazil (J); stream Mandisoví Grande, Argentina (MG) and Punta Lara, Argentina (PL).

ACKNOWLEDGMENTS: The authors wish to thank to CONICET and Montoya-Burgos for the financial support. We are grateful to Roberto E. Reis (MCP) for his useful photography comments. Thanks are also due to Diego Barrasso and Javier Negrete for helping in the field trip in Entre Ríos province.

LITERATURE CITED

- Aljanabi, S.M. and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Chiachio, M.C., C. Oliveira and J.I. Montoya-Burgos. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 606-617.
- Cope, E.D. 1894. On the fishes obtained by the naturalist expedition in Rio Grande do Sul. *Proceeding of the American Philosophical Society* 33(144): 84-108.
- Ferraris, C.J.Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.
- Jobb, G., A. von Haeseler and K. Strimmer. 2004. TreeFinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4: 18.
- López, H.L. and A. Miquelarena. 1991. Los Hypostominae (Pisces: Loricariidae) de Argentina. *Programa de Fauna de Agua Dulce Museo de La Plata. Argentina* 40(2): 1-64.
- Reis, R.E., C. Weber and L.H. Malabarba. 1990. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue suisse Zoology* 97(3): 729-766.

RECEIVED: May 2011

LAST REVISED: August 2011

ACCEPTED: August 2011

PUBLISHED ONLINE: September 2011

EDITORIAL RESPONSIBILITY: Sergio Maia Queiroz Lima

TABLE 1. Morphometric and meristic data of *Hypostomus aspilogaster* (n=4) from Argentina.

CHARACTER	LOW	HIGH	MEAN	SD
Standard length (mm)	281.2	395.0	333.6	58.89
Predorsal distance	2.6	2.9	2.8	0.13
Cleithral width	3.5	3.9	3.7	0.19
Head length	3.5	3.6	3.6	0.05
Length of dorsal fin spine	3.2	3.6	3.3	0.21
Length of dorsal fin base	3.6	3.9	3.8	0.11
Dorsal base to adipose spine	4.2	5.3	4.8	0.44
Pectoral fin spine length	3.2	3.4	3.3	0.09
Pelvic fin spine length	4.0	4.2	4.1	0.10
Trunk length	4.2	4.5	4.4	0.12
Abdominal length	4.2	4.6	4.4	0.19
Caudal peduncle length	3.1	3.1	3.1	0.03
Caudal peduncle depth	10.9	11.8	11.3	0.39
Adipose fin spine length	16.7	23.0	20.1	3.22
Upper caudal ray length	3.8	3.9	3.9	0.09
Lower caudal ray length	3.1	4.1	3.5	0.46
Head length				
Head depth	1.5	1.6	1.5	0.06
Snout length	1.5	1.7	1.6	0.08
Least interorbital width	2.7	2.7	2.7	0.04
Horizontal eye diameter	8.2	10.0	9.0	0.84
Rictal barbel	7.5	11.0	8.8	1.53
Right mandibular ramus	4.8	6.3	5.6	0.68
Counts				
Series of lateral scutes	30	30	30	0.00
Predorsal scutes	3	4	4	0.58
Scutes at dorsal fin base	9	10	10	0.50
Dorsal to adipose fin scutes	9	9	9	0.00
Adipose to caudal fin scutes	5	6	6	0.50
Scutes at anal fin base	3	3	3	0.00
Anal to caudal fin scutes	14	16	15	0.96
Teeth on left premaxilla	30	36	33	3.00
Teeth on right premaxilla	33	44	39	4.86
Teeth on left dentary	34	50	43	8.06
Teeth on right dentary	35	43	40	3.40
Plates bordering supraoccipital	4	4	4	0.00

APPENDIX 1. Museum records of species analyzed. ILPLA: Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" (CONICET-UNLP), La Plata, Buenos Aires province, Argentina.

Hypostomus aspilogaster: Argentina: ILPLA 2154 (YC09-011), 395.0 mm SL, Buenos Aires province, Punta Lara, Río de la Plata basin, 34°46'23.44" S, 57°59'14.04" W, Col. Fisherman, 01/09/09; ILPLA 2155 (YC09-082), 372.9 mm SL, Buenos Aires province, Punta Lara, Río de la Plata basin, 34°45'47.8" S, 57°59'9.14" W, Col. Fisherman, 22/09/09; ILPLA 2156 (YC09-089, YC09-090), 281.2-285.2 mm SL, Entre Ríos province, stream Mandisoví Grande, Federación department, Uruguay River basin, 30°53'50.64" S, 58°02'34.92" W, Col. Y.P. Cardoso, D. Barrasso and J. Negrete, 10/11/09.



Article

urn:lsid:zoobank.org:pub:16DA5467-36FD-45FE-8984-FD59392C08BE

Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species

YAMILA P. CARDOSO^{1*}, ADRIANA ALMIRÓN², JORGE CASCIOTTA², DANILO AICHINO³, MARTA S. LIZARRALDE¹ & JUAN I. MONTOYA-BURGOS⁴.¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Regional de Estudios Genómicos, UNLP, Av. Calchaquí 23, 5km, C. C. 1888, Fco. Varela, Buenos Aires, Argentina.² División Zoología Vertebrados, Museo de La Plata, UNLP, Paseo del Bosque, C. C. 1900, La Plata, Argentina.³ Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNAM, Félix de Azara, C.C. 1552, Misiones, Argentina.⁴ Department of Genetics and Evolution, University of Geneva, 30 quai Ernest Ansermet, 1211, Geneva 4, Switzerland.

Abstract

Within the Loricariidae, the genus *Hypostomus* is one of the most diversified freshwater catfish groups. Using new sequence data from the mitochondrial Control Region (D-loop) we examined the phylogeny of this genus. Our phylogenetic analyses suggest that, in the Paraná river basin, species diversity in the genus *Hypostomus* has been shaped by two processes: 1) by inter-basin diversification, generating groups of species that inhabit different basins, as a result of dispersal events; and 2) via intra-basin speciation as a result of basin fragmentation due to past marine transgressions, which produced groups of species within a basin. Using the D-loop as a molecular clock, each event of diversification was dated and linked with documented hydrological events or sea level changes. We also assessed the possible dispersal routes between the Paraná and Uruguay rivers, in addition to the obvious dispersal route via the Río de la Plata estuary. Finally, we describe a new species of *Hypostomus* inhabiting Middle Paraná river, *Hypostomus arecuta* n. sp. This species can be separated from all other *Hypostomus* by having light roundish dots on a darker background and by number of premaxillary/dentary teeth.

Key words: Armored catfish; Control Region; phylogeny; Paraná river.

Introduction

In South America, the Loricariidae is the most species-rich endemic family of freshwater fishes. This family of suckermouth-armored catfishes comprises 818 species (Eschmeyer and Fricke, 2011) and new species are frequently discovered and described (e.g. Hollanda Carvalho *et al.*, 2010; Zawadzki *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, in preparation). Within the Loricariidae, the genus *Hypostomus* constitutes a rich assemblage of species, with approximately 130 recognized species (Weber, 2003; Ferraris 2007; Zawadzki *et al.*, 2010, Hollanda Carvalho *et al.*, 2010). Representatives of *Hypostomus* are bottom-dwelling fishes widely distributed throughout tropical and subtropical South America, occurring in a variety of freshwater ecosystems such as mountain streams and large lowland rivers and ponds. Species delineation and diagnosis in *Hypostomus* is difficult, in particular due to the diversity and widespread distribution of the genus, to elevated intra-specific morphological variability, and because some older descriptions are too short or incomplete.

Numerous species of *Hypostomus* inhabit the La Plata basin, which comprises the Paraguay, Paraná, and Uruguay rivers and the Río de la Plata (López and Miquelarena, 1991). Understanding the diversification history of *Hypostomus* as a "model" genus might allow the development of a comprehensive view of the processes that shaped the rich ichthyological diversity in the Paraná river basin.

According to the reconstruction of paleo basins in South America, from about 60 to 10 million years ago (Ma), the paleo Amazon–Orinoco system was a large watershed with waters flowing northward toward the Caribbean Sea, while the La Plata basin was already oriented as present (Lundberg, 1998). This author suggested that at 12–10

Ma, the boundary between the paleo Amazon–Orinoco and the La Plata basins underwent a final and important shift southward to its current location. This boundary displacement must have occasioned exchanges of water and fishes between the two main basins 12 to 10 Ma, as proposed by Montoya-Burgos (2003). However, the boundary displacement might have been more progressive, covering the last 10 Ma (Rasanen *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998), opening occasional dispersal routes between these two river systems.

During the Miocene (24–5 Ma), two main components of the La Plata basin, the upper plus middle Paraná river on one hand, and Uruguay river on the other, which were forming a single large river flowing southward into the Río de la Plata estuary, disconnected from one another resulting in the modern configuration (Beurlen, 1970). According to Bonetto (1994), geological changes caused this disconnection by modifying the course of the middle Paraná river that subsequently reached the course of the Paraguay river. Today, the Paraná and Uruguay rivers are connected exclusively via the Río de la Plata estuary.

Furthermore, in the second half of the Miocene, 15–5 Ma, marine transgressions occurred at least twice along distinct paleogeographic corridors. The first maximum flooding event occurred between 15 and 13 Ma and the second between 10 and 5 Ma. The two marine transgressions covered most of the Paraná river basin (Hernández *et al.*, 2005). It is likely that the diversity of strictly freshwater organisms might have been seriously impacted by these marine transgressions. For example, the museum hypothesis of diversification (Nores, 1999) states that the Miocene marine incursions have been major diversifying events via the fragmentation of emerged land resulting in allopatric speciation.

The goals of the present work are: (1) to expand the phylogeny of the genus *Hypostomus* that was previously proposed by Montoya-Burgos (2003) using new sequence data from the mitochondrial Control Region, (2) to infer the origin of the diversity of *Hypostomus* species in the Paraná river basin, (3) to assess the possible dispersal routes between the Paraná and Uruguay river, in addition to the obvious dispersal route via the Río de la Plata estuary, and (4) to describe a new species of *Hypostomus* inhabiting the Middle Paraná river basin.

The use of genetic markers is a powerful tool to estimate the extent of hidden biodiversity. For example, the mitochondrial D-loop region is frequently used for answering a broad range of biological questions relative to population processes, phylogeography (e.g. Cardoso and Montoya-Burgos, 2009) and species identification (e.g. Cardoso *et al.*, 2011). Here we used this molecular tool in order to infer the phylogenetic relationships among *Hypostomus* species and to analyse the origin of species diversity in the río Paraná basin.

Materials and methods

Taxon sampling and morphological analyses

Fish specimens were collected in 15 different localities in the Paraná river basin, Argentina (Fig. 1). Most of them were sampled in the middle and lower section of the Paraná river basin. We also used available data from the upper section of this basin taken from GenBank. Fishes were caught using gill nets, cast nets, hand nets, and seine. Tissue samples for genetic studies were preserved in ethanol 96 % and frozen at -20 °C, the vouchers specimens were fixed in formalin 10 % for morphological studies and deposited at MHNG, IPLA, and MACN according to the institutional abbreviations are as listed in Ferraris (2007). Table I has more information about the specimens analysed.

All measurements were taken point to point with digital calipers to the nearest 0.01 mm, under a dissecting microscope when necessary. Measurements and counts of bilaterally symmetrical features were taken from the left side of the body whenever possible; if a feature was missing or broken on the left side, it was examined on the right side. Counts and measurements follow Boeseman (1968), Weber (1985), and Reis *et al.* (1990). Body plate counts and nomenclature follow Oyakawa *et al.* (2005). The oral disk width was measured at point of insertion of the maxillary barbels.

DNA amplification and sequencing

The genomic DNA was extracted using the salt-extraction protocol (Aljanabi and Martinez, 1997). The PCR amplification of the Control Region (D-loop) of the mitochondrial DNA was performed using the following primers: DLA-III 5'-TATTTAAAGRCATAATCTCTTGAC-3' and HygDL-R 5'-WTGCKARTATGTGCCGYTTG-3'. The amplifications were performed in a total volume of 50 µl, containing 5 µl of 10x reaction buffer, 1 µl of deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) mix at 10 mM each, 1 µl of each primer at 10 µM, 0.2 µl of *Taq* DNA

Polymerase equivalent to 1 unit of Polymerase per tube, and 1 µl of DNA. Cycles of amplification were programmed as follows: (1) 3 min. at 94°C (initial denaturing), (2) 30 sec. at 94°C, (3) 30 sec. at 55–57°C, (4) 1 min. at 74°C, and (5) 5 min. at 74°C (final elongation). Steps 2 to 4 were repeated 42 times. The PCR products were purified and sequenced by the company MAGROGEN (Korea). Sequences were deposited in GenBank (Table I).

TABLE I. Details of the specimens used in the molecular phylogeny with GenBank accession numbers.

Species	GenBank	Field number	Locality
<i>H. arecuta</i>	JF290442	AG09-163	Yahapé (27°22'12.1"S-57°39'14.6"W)
<i>H. arecuta</i>	JF290441	AG09-181	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. arecuta</i>	JF290445	AG09-198	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. arecuta</i>	JF290446	PR-031	Santa Fé, Santa Fé, Argentina
<i>H. arecuta</i>	JF290443	TAE01	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. arecuta</i>	JF290444	TAE02	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. derby</i>	JF290447	YC10-316	Uruzú (25°55'38.25"S-53°56,031"W)
<i>H. paranensis</i>	JF290449	YC-025	Suquia (31°24'11,9"S-64°12'11,4"W)
<i>H. paranensis</i>	JF290448	YC-026	Suquia (31°24'11,9"S-64°12'11,4"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290450	AG09-129	Tabay (26°59'56.3"S-55°10'44.9"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290451	YC09-124	Manucho (31°15'S- 60°53' W)
<i>H. commersoni</i>	JF290452	YC-957	El Bosque (34°54'37.55"S-57°56'15.65"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290453	YC-607	Corrientes (29°48,574'S-59°23.600'W)
<i>H. commersoni</i>	JF290454	14802	P. N. Pre-Delta (32°08'08.8"S- 60°37'26.2"W).
<i>H. commersoni</i>	JF290455	AG09-013	Ituzaingó (25°29'54.5"S- 56°42'47.0"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290456	Reg02	Ensenada (34°50'23,96"S-57°55'13,04"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290457	AG09-077	Garupa (27°29'10.2"S-55°44'23.1"W)
<i>H. commersoni</i>	JF290458	YC-926	El Pescado (34°57,790'S- 57°46,696'W)
<i>H. cochliodon</i>	JF290476	AG09-016	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290471	YC-162	Antequera (27°27'43.43" S-58°52'0.03" W)
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290469	UR004	Pedra Fortaleza, Itapiranga, Brazil
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290470	UR002	Pedra Fortaleza, Itapiranga, Brazil
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290468	AG09-157	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290467	AG09-200	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290459	AG09-012	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. luteomaculatus</i>	JF290466	CIA283	Candelaria (27°26'92"S-55°44'50"W)
<i>H. microstomus</i>	JF290461	AG09-015	Ituzaingó (27° 29'32"S-56° 39'38"W)
<i>H. myersi</i>	JF290472	YC10-256	Deseado (25°47'1.30" S-54°2'21.40" W)
<i>H. myersi</i>	JF290474	AG09-123	Tabay (26°59'56.3"S-55°10'44.9"W)
<i>H. myersi</i>	JF290473	AG09-124	Tabay (26°59'56.3"S-55°10'44.9"W)
<i>H. myersi</i>	JF290475	AG09-131	Tabay (26°59'56.3"S-55°10'44.9"W)
<i>H. regani</i>	JF290460	Reg.06	Rio Mogi Guaçu, Brazil
<i>H. ternetzi</i>	JF290462	YC-164	Antequera (27°27'43.43" S-58°52'0.03" W)
<i>H. ternetzi</i>	JF290463	AG09-160	Yahapé (27°22'12.1"S-57°39'14.6"W)
<i>H. uruguayensis</i>	JF290464	AG09-159	Yahapé (27°22'12.1"S-57°39'14.6"W)
<i>H. uruguayensis</i>	JF290465	14731	P. N. Pre-Delta (32°07'18.0"S- 60°40'12.0"W)

Sequence alignment, phylogenetic reconstruction, and molecular clock calibration

The mitochondrial D-loop sequences were obtained for 36 individuals from Argentina (for more details see Fig.1 and Table I). We also used sequences of different species of *Hypostomus* deposited in GenBank and nine others species of the family Loricariidae as outgroups, as in Montoya-Burgos (2003). The editing of the new sequences and the alignment were performed using BioEdit 7.0.1 (Hall, 1999). Prior to phylogenetic reconstruction, appropriate substitution models were estimated with the Akaike information criterion (AIC) as implemented in MrAIC (Nylander, 2004). We used a total of 74 sequences of *Hypostomus* to reconstruct the phylogeny. Two phylogenetic reconstruction methods were used. First, maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction was performed using TreeFinder (Jobb *et al.*, 2004). Confidence values for the edges of the ML tree were computed by bootstrapping (Felsenstein, 1985), with 1000 replications. Second, Bayesian Inference analysis (BI) was conducted using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Four chains were run simultaneously (three heated, one cold) for 20,000,000 generations, with tree space sampled every 100th generation. After a graphical analysis of the evolution of the likelihood scores, the first 300,000 generations were discarded as burn-in. The remaining trees were used to calculate the final consensus tree.

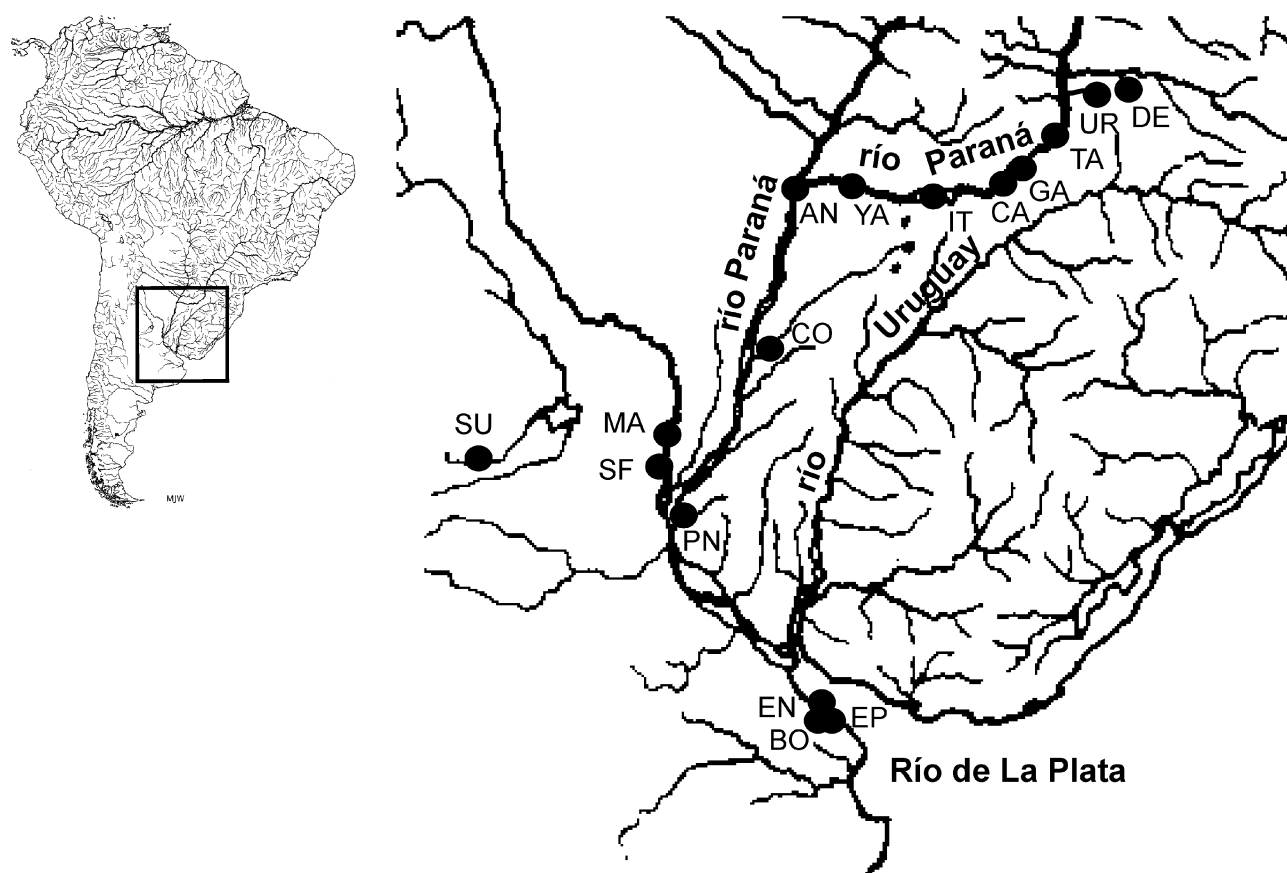


FIGURE 1. Map showing the sampling localities. The abbreviations mean: DE (arroyo Deseado, Iguazú river, Misiones); UR (arroyo Uruzú, Paraná river, Misiones); GA (arroyo Garupá, Paraná river, Misiones); TA (arroyo Tabay, Paraná river, Misiones); CA (Candelaria, Paraná river, Misiones); IT (Ituzaingó, Paraná river, Corrientes); YA (Yahapé, Paraná river, Corrientes); CO (Corrientes river, Corrientes); AN (Antequera, Paraná river, Chaco); SU (Suquia river, Cordoba); MA (Manucho river, Paraná river, Santa Fé); SF (Paraná river, Santa Fé); PN (Parque Nacional Pre-Delta, Paraná river, Entre Ríos); EN (Ensenada, Río de La Plata, Buenos Aires); EP (arroyo El Pescado, Río de la Plata, Buenos Aires) and BO (lago del Paseo del Bosque, La Plata).

Additionally, we performed molecular clock tests with HyPhy (Kosakovsky Pond *et al.*, 2005) using the HKY85 model. The null hypothesis of constant molecular clock was tested for the ingroup taxa using the log likelihood ratio test (Huelsenbeck and Crandall, 1997). Prior to these analyses, the data set was pruned to include only one representative of each species. In addition, the sequence corresponding to *H. fonchii* and *H. sp.* Tib1 – used in Montoya-Burgos (2003) – were discarded because it showed a particularly long branch in the phylogenetic tree.

TABLE II. Morphometric data and counts of holotype and 23 paratypes of *Hypostomus arecuta* n. sp.

	Holotype	range	Mean / SD
Standard length (mm)	185.5	127.0–268.1	
		Percents of SL	
Predorsal length	38.6	37.4–44.0	39.1 ± 1.57
Head length	32.1	29.5–34.4	31.3 ± 1.32
Cleithral width	32.3	29.2–32.7	30.9 ± 0.89
Head depth	19.5	17.2–19.9	18.9 ± 0.70
Dorsal-fin spine length	33.1	26.8–34.5	31.6 ± 2.28
Dorsal-fin base length	27.2	25.1–30.0	27.2 ± 1.20
Dorsal-adipose distance	16.3	15.1–16.9	16.1 ± 0.48
Thoracic length	24.0	19.8–26.2	23.3 ± 1.56
Pectoral-fin spine length	33.4	29.7–35.6	32.0 ± 1.23
Abdominal length	25.6	22.1–25.6	23.9 ± 0.84
Pelvic-fin spine length	24.9	22.3–25.8	24.1 ± 0.95
Caudal-peduncle length	27.4	27.4–33.3	30.6 ± 1.52
Caudal-peduncle depth	11.7	10.4–12.0	11.3 ± 0.45
Adipose-fin spine length	10.3	8.0–10.9	9.6 ± 0.86
Anal width	12.6	10.0–13.5	11.7 ± 0.79
Upper caudal-fin ray length	33.0	27.4–35.3	30.7 ± 2.06
Lower caudal-fin ray length	36.2	28.1–36.3	31.9 ± 2.44
		Percents of head length	
Head depth	60.8	57.7–63.6	60.7 ± 1.91
Snout length	61.3	61.2–66.8	63.0 ± 1.75
Orbital diameter	18.9	16.0–19.0	18.1 ± 0.94
Interorbital with	38.4	33.6–38.9	37.3 ± 1.47
Maxillary barbel length	12.2	9.3–15.2	12.1 ± 1.66
Mandibular ramus length	24.5	21.7–25.4	23.3 ± 1.23
Counts			mode
Median plates series	27/27	26/28	27
Predorsal plates	3	3–3	3
Dorsal plates below dorsal-fin base	9	9–10	9
Plates between dorsal and adipose fin	6	5–6	6
Plates between adipose and caudal fin	4	4–5	5
Plates between anal and caudal fin	14	12–14	14
Premaxillary teeth	74/79	66–85	77
Dentary teeth	71/72	63–84	80

In order to evaluate the temporal diversification of species in the genus *Hypostomus* in the Paraná river basin, the rate of evolution of the D-loop region needed to be calibrated. To do so, we used the same calibration point as in Montoya-Burgos (2003), which is based on the following reasoning: the phylogeny of *Hypostomus* shows that *H. hondae*, distributed only in the Lago Maracaibo and Magdalena basins, is the closest relative to *H. plecostomoides*, which is known only from the Orinoco basin and some localities of upper Amazon. Because these distribution patterns match the vicariant episode that separated Lago Maracaibo system from Amazon and Orinoco basins 8 Ma (Hoorn, 1993), it is reasonable to attribute this age to the speciation event that gave rise to *H. hondae* and *H. plecostomoides*. This geological event has also been used for calibrating other Neotropical fish phylogenies (e.g. Lovejoy *et al.*, 2000, Sivasundar *et al.*, 2001).

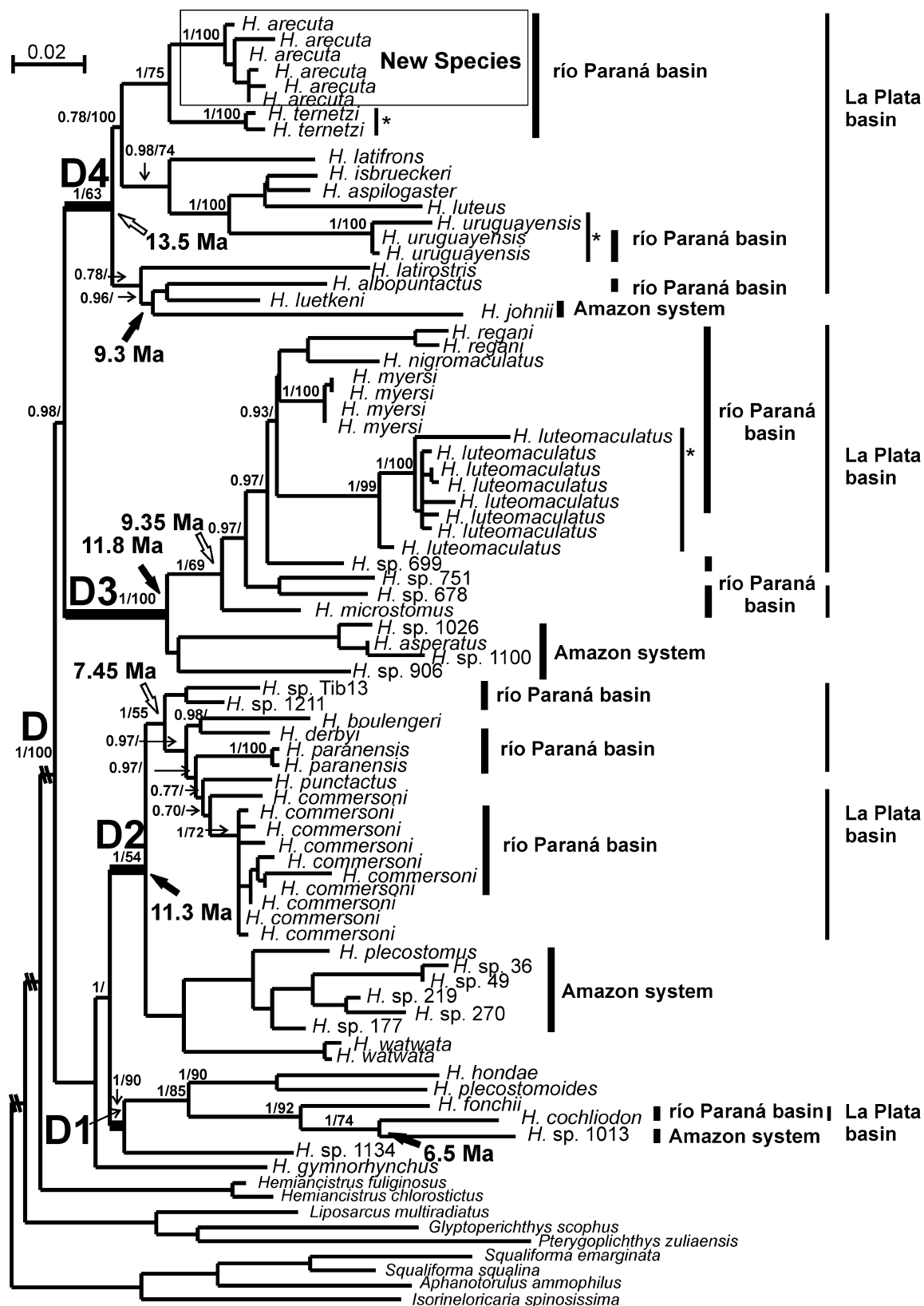


FIGURE 2. Maximum likelihood *Hypostomus* phylogenetic tree based on D-loop haplotypes ($-\ln L = 5192.34998$). The ML tree was derived using the HKY + G model of sequence evolution. Numbers next to branches are Bayesian posterior probabilities followed by bootstrap values when these are above 50%, respectively. These support values are showed only for the relevant relationships of this work. Bold letters are abbreviations used for naming clades (see text). The specimens from Paraná river basin and Amazon system (Amazon basin, French Guyana and Northeastern South America coastal rivers) are indicated. The three species marked with * inhabit the Paraná and Uruguay rivers, but not on the Río de La Plata. Also, we show the estimated ages of dispersal events between basins (black arrow) and for vicariance events inside the La Plata basin (white arrow).

Results

Phylogenetic analyses

A molecular phylogenetic approach was used to investigate the diversity of *Hypostomus* species from the Paraná river basin. The sequence alignment comprised 592 positions, from which 179 were variable within the ingroup. Base composition and structural characteristics of *Hypostomus* D-loop sequences are described elsewhere (Montoya-Burgos *et al.*, 2002). The model of sequence evolution that fit the best our sequence data set is HKY + gamma, according to MrAIC (Nylander, 2004). The ML and Bayesian phylogenetic trees obtained have similar topologies. The ML tree is shown in Fig. 2.

The evolutionary relationships of the outgroup species is the same as found in Montoya-Burgos (2003). All *Hypostomus* species form a monophyletic clade named Clade D (Fig. 2). This clade can be organized into four monophyletic groups, D1, D2, D3, and D4. Clade D1 clusters together with D2 and Clade D3 with D4. The relationships among these clades are supported by high Bayesian posterior probabilities but relatively low bootstrap values. *Hypostomus gymnorhynchus* is placed as the sister species to clades D1 and D2 and thus forms a distinct monospecific lineage. The Clade D1 (Fig. 2) forms the *H. cochliodon* group including *H. cochliodon* from the Paraná river basin, *H. plecostomoides* from Orinoco basin, *H. hondae* from Lago Maracaibo and Magdalena basins, *H. fonchii* and *Hypostomus* sp. 1013 from the Amazon basin (see Montoya-Burgos (2003) for the non described species mentioned in this work).

Clade D2 is subdivided into two monophyletic groups: the first contains species from French Guyana (*H. watwata* and *H. plecostomus*), Amazon basin (represented with *Hypostomus* spp.: 36, 49), and Northeastern South America coastal rivers (*Hypostomus* spp.: 177, 219, and 270 from Gurupí, Itapicurú, and Parnaíba rivers, respectively). The second clade includes species from Eastern South America coastal rivers (*H. puntactus* from Ubatiba), and the La Plata basin (*H. commersoni*, *H. derbyi*, *H. paranensis*, *H. boulengeri*, and two *Hypostomus* spp.: Tib13 and 1211).

Clade D3 is also subdivided into two groups, one clade including species from the Amazon basin (*H. asperatus* and three *Hypostomus* spp.: 906, 1100, and 1026). The other clade contains species from La Plata basin and São Francisco river (*H. regani*; *H. luteomaculatus*; *H. microstomus*; *H. myersi*, *H. nigromaculatus*, and three *Hypostomus* spp.: 678, 699, and 751).

Finally, clade D4 includes species inhabiting the La Plata basin: *Hypostomus arecuta* n. sp. (described below), *H. ternetzi*, *H. uruguayensis*, *H. aspilogaster*, *H. luteus*, *H. isbrueckeri*, *H. latifrons*, *H. latirostris*, and *H. albopunctatus*. This clade comprises also *H. luetkeni* from Eastern South America coastal rivers (Parnaíba river) and *H. johnii* from an northeastern South America coastal river (Parnaíba river).

Our results show that at least one species inhabiting Paraná river basin is present in each of the four main *Hypostomus* clades (i.e. *H. cochliodon* in clade D1; *H. commersoni*, *H. derbyi*, *H. paranensis*, and *Hypostomus* spp: Tib13 and 1211 in clade D2; *H. luteomaculatus*; *H. microstomus*, *H. myersi*, *H. regani*, *H. nigromaculatus*, and *H. sp* 699 in clade D3; finally, the new species *Hypostomus arecuta* n. sp., *H. ternetzi*, *H. uruguayensis*, and *H. albopunctatus* in clade D4).

Phylogenetic tree calibration.

When analysing the ingroup taxa, with the exclusion of *H. fonchi* which has a particularly long terminal branch (clade D in Fig. 2), the log-likelihood ratio test of homogeneous evolutionary rate showed no significant differences between the likelihood scores obtained when enforcing or not the molecular clock ($X^2 = 56.03$; d.f. = 43; $P = 0.087$). This result indicates that the sequences of the ingroup representatives are evolving at a homogeneous rate. With the aim of evaluate the temporal diversification of the genus *Hypostomus* in the Paraná river basin, we calibrated the D-loop region. We found that the splitting between the *Hypostomus* from the Amazon system (comprising the Amazon basin, French Guyana and North-eastern South America coastal rivers) and La Plata basin is estimated to 6.5 Ma in clade D1, 11.3 Ma in clade D2, 11.8 Ma in clade D3 and 9.3 Ma in clade D4. Moreover, the origin of temporal diversification among the lineages inhabiting the La Plata basin is dated to 7.45 Ma in clade D2, 9.35 Ma in clade D3 and 13.5 Ma in clade D4.



FIGURE 3. *Hypostomus arecuta* n. sp., Holotype. MACN-ict 9677 (198), 185.5 mm SL. Dorsal, lateral, and ventral views. Photos by Yamila P. Cardoso.

Hypostomus arecuta n. sp.

Fig. 3.

Here, we describe a new species that inhabit the Paraná river basin and which contributes to the understanding of the origin of the species diversity in this basin (see discussion).

Holotype: MACN-Ict 9677 (198), 185.5 mm SL, Argentina, Corrientes province, Ituzaingó, Paraná River (27°29'54.5"S - 56°42'47.0"W). Col: Gonzalez *et al.*, November, 2009.

Paratypes: MACN-ict 9678 (163, 166), 2 ex., 174.0–243.3 mm SL, Argentina, Corrientes province, Yahapé, Paraná river, (27°22'12.1"S-57°39'14.6"W). Col: Gonzalez *et al.*, November, 2009. MACN-ict 9679 (181, 191, 192, 193, 195, 196, 197, 199), 9 ex., 156.5–268.1 mm SL, same data as holotype. MACN-ict 9680 (CIA 284–285), 2 ex., 127.0–134.7 mm SL, Argentina, Misiones province, Candelaria city, Paraná river (27°26'92"S-55°44'50"W). Col: Aichino and Capli, November, 2009.

Diagnosis

Hypostomus arecuta n. sp. is distinguished from its congeners by the following combination of characters: dorsum of head and body and all fins dark grey covered by numerous rounded cream dots. Ventral surface of head and belly a plain cream color. This color pattern distinguishes *H. arecuta* n. sp. from *Hypostomus* species that have dark roundish dots on a lighter background (such: *H. ancistroides*, *H. brevis*, *H. commersoni*, *H. fluviatilis*, *H. hermanni*, *H. iheringii*, *H. nigromaculatus*, *H. paulinus*, *H. topavae*, *H. isbruekeri*, *H. aspilogaster*, *H. uruguayensis*, *H. latifrons*, and *H. latirostris*). Among the species that have light roundish dots or irregular light marks on a darker background, *H. arecuta* n. sp. is distinguished by number of premaxillary/dentary teeth (66–85/63–84) as compared to *H. albopunctatus* (26–32/22–26), *H. luteus* (22–38/26–40), *H. regani* (63–107/63–104), *H. luetkeni* (30–69/38–68), *H. strigaticeps* (about 60), *H. multidens* (115–260/122–267) and *H. microstomus* (7–11/7–13). *Hypostomus arecuta* n. sp. is distinguished from its sister species *H. ternetzi* by the colour pattern of dorsum of head and body, and all fins dark grey covered by numerous rounded cream dots vs. dorsum homogeneously dark, and greater number of scutes at dorsal-fin base (9–10 vs. 8). Also, some morphometric characters differentiate *H. arecuta* n. sp. from *H. ternetzi*: cleithral width (3.0–3.4 vs. 2.8–2.9 in SL), abdominal length (3.9–4.5 vs. 4.6–5.4 in SL), eye diameter (5.2–6.2 vs. 6.2–6.9 in HL), pelvic fin-spine length (3.9–4.5 vs. 3.1–3.8 in SL), caudal peduncle depth (8.3–9.6 vs. 7.5–8.1 in SL), upper caudal-ray length (2.8–3.6 vs. 2.0–2.3 in SL), lower caudal-ray length (2.4–3.5 vs. 1.8–2.0 in SL), and right mandibular ramus (3.9–4.6 vs. 4.8–5.6 in HL). Besides, *H. arecuta* n. sp. differs from *H. luteus* by short dorsal spine length (mean 31.6 % vs. 34.4 % of SL), the length of right mandibular ramus (3.9–4.6 vs. 4.8–6.1 in HL), abdominal length (3.9–4.5 vs. 4.4–5.0 in SL), head depth (1.6–1.7 vs. 1.7–1.9 in HL), and interorbital width (2.6–3.0 vs. 2.9–3.6 in HL). Also some ratios distinguish *H. arecuta* n. sp. from *H. luetkeni*: predorsal length (2.3–2.6 vs. 2.5–3.0 in SL), cleithral width (3.0–3.4 vs. 3.3–4.0 in SL), pectoral-fin spine length (2.8–3.3 vs. 3.1–3.8 in SL), and caudal peduncle length (3.0–3.6 vs. 2.8–3.1). Finally, short dorsal spine length separates *H. arecuta* n. sp. from *H. luteomaculatus* (mean 31.6 % vs. 40% of SL).

Hypostomus arecuta can be differentiated from *H. boulengeri*, *H. commersoni* and *H. cochliodon* by the colour pattern. Also, *H. commersoni* has strong lateral keels which are absent in *H. arecuta*, *H. cochliodon* bears fewer premaxillary and dentary teeth than *H. arecuta* n. sp. (8/9 vs. 66–85/63–84, respectively). *Hypostomus arecuta* shares with *H. luteomaculatus* and *H. microstomus* a similar dorsal colour pattern, however *H. luteomaculatus* and *H. microstomus* have dark ventral surface of head and body with light vermiculated dots vs. head and belly plain cream in *H. arecuta*. Some counts distinguish *H. arecuta* from *H. luteomaculatus*: scutes along lateral line 26–28 (mode 27) vs 28–29 (mode 29), scutes between end of dorsal fin to adipose fin 5–6 (mode 6) vs 6–7 (mode 7); scutes from adipose to caudal fins 3–5 (mode 5) vs. 5–8 (mode 6), and scutes from anal to caudal fins 12–14 (mode 14) vs. 14–16 (mode 16), respectively. Finally *H. arecuta* n. sp. has a greater number of teeth than *H. microstomus* (66–85/63–84 vs. 7–11/7–13).

Description

Meristic and morphometric data are presented in Table I. Dorsal profile slightly convex from snout tip to anterior margin of eyes, straight at interorbital area, convex from interorbital area to dorsal-fin origin, and almost straight from dorsal-fin origin to end of adipose fin. Body width at cleithral region larger than head depth. Head broad and shallow dorsally covered with plates, except for a quadrangular naked area on snout tip.

Supraoccipital bone with a shallow median ridge, and with a relatively well developed posterior process bordered by a wide nuchal plate. A shallow ridge originating laterally to the nares, passing through supraorbital, and extending to median portion of pterotic-supracleithrum. Opercle small, with odontodes more developed distally.

Oral disk ovoid, lower lip covered with numerous papillae decreasing in size posteriorly. Maxillary barbels moderately developed, about as long as orbital diameter. Sixty-six to 85 (holotype 74) teeth in premaxilla, 63 to 84 (holotype 72) in dentary. Teeth bicuspid, curved inward distally, mesial cusp two or three times longer than lateral cusp, distal margin of mesial cusp rounded in replacement teeth and straight in functional ones. Body covered with five rows of moderately spinulose scutes. Tip of snout mostly naked even in large specimens, bearing two lateral vertical patches of odontodes.

Ventral surface of head naked, with small or large patch of platelets before branchial opening. Abdomen covered with minute platelets, with exception of small area around pectoral fin and small or large area around pelvic-fin insertions, and small area at urogenital opening. Preanal plate absent. Caudal peduncle laterally compressed, rather ovoid in cross section.

Twenty-one to 23 (mode 22) dorsal plates, 25–26 (mode 24) mid-dorsal plates, 24–25 (mode 25) median plates, 26–28 (mode 27) mid-ventral plates, 21–22 (mode 22) ventral plates. Three predorsal plates, 9–10 (mode 9) plates below dorsal fin, 5–6 (mode 6) preadipose plates, 4–5 (mode 5) plates between adipose fin and caudal fin, 12–14 (mode 14) plates between anal fin and caudal fin.

Dorsal-fin II,7, its origin placed at vertical closer to pelvic-fin origin than pectoral-fin origin. Dorsal-fin margin straight. Adipose-fin spine compressed and curved backward. Pectoral fin I,6, its posterior border straight. Pectoral-fin spine slightly curved inward, covered with weakly developed odontodes, slightly more developed on its distal portion in larger specimens. Tip of pectoral fin reaching one-third pelvic-fin spine length. Pelvic-fin I,5, its posterior border slightly roundish. Pelvic-fin spine surpassing anal-fin origin. Anal fin I,4, its tip reaching the 6th plate after its origin, 2nd and 3rd branched rays longer. Caudal-fin margin concave, I,14,I, with inferior lobe longer than superior one.

Phylogenetic position of *Hypostomus arecuta*

The new species described above, *Hypostomus arecuta*, is distinguished from others species of the genus by a combination of morphological and molecular features. *Hypostomus arecuta* is apparently endemic to the Paraná river in Argentina. According to our phylogenetic tree, *H. arecuta*, together with *H. ternetzi*, *H. isbruekeri*, *H. aspilogaster*, *H. uruguayensis*, *H. latifrons*, *H. latirostris*, *H. luteus*, *H. albopunctatus*, *H. johnii* and *H. luetkeni* form the clade D4 (see Fig. 2). Although our results show that the node that clusters clades D4 and D3 shows low statistical support in the ML analysis, other data support this relationship: following Muller and Weber (1992), the *Hypostomus* species of clade D4 shares with species of clade D3 the presence of white spots on the body, wide mandible, and long-crowned teeth (defining the so called *Hypostomus regani* group). Species belonging to other clades (D1 and D2, Fig. 2) display black widespread spots on the body, medium-sized mandible, and short-crowned teeth (forming the so called *Hypostomus plecostomus* group). Moreover, karyological studies show that some species of the *Hypostomus regani* group have a fundamental chromosome number of near 72 and some species of the *Hypostomus plecostomus* group have a fundamental number near 68 (Zawadzki *et al.*, 2004). Therefore, these morphological, colour pattern and karyological data support our phylogenetic analyses showing a division of *Hypostomus* species into two principal clades, clade D1+D2 (*Hypostomus plecostomus* group) and clade D3+D4 (*Hypostomus regani* group). Thus, the new species *H. arecuta* is considered as a member of the *Hypostomus regani* group.

Colour in alcohol

Overall ground colour of body and fins dark grey. Overall ground color of ventral area a plain, lighter, cream color in some specimens. Dorsal surface of head, body, and fins entirely covered by numerous rounded cream dots, smaller and closer on head. Dorsal, pectoral, and pelvic- fins with dots regularly or irregularly arranged in rows along their rays. Adipose fin with rounded, cream dots. Caudal fin with scattered, rounded cream dots on rays and membranes.

Distribution

Hypostomus arecuta is known from the Paraná river at Yahapé and Ituzaingó (Corrientes province), Candelaria (Misiones province), and Santa Fé (Santa Fé province), Argentina. *Hypostomus arecuta* is sympatric with *H. commersoni*, *H. cochliodon*, *H. uruguayensis*, *H. latifrons*, *H. ternetzi*, *H. luteomaculatus*, *H. microstomus*, and *H. boulengeri*.

Etymology

The specific epithet *arecuta* is a Guaraní word *arecutá* that means loricariid fish.

Habitat

The specimens of *Hypostomus arecuta* were collected in coastal areas of the Paraná river main channel. The bottom was composed mostly by large boulders of sandstone with patches of sand and pebbles. The species was found in well oxygenated waters having moderate current speed, about 0.60 m s⁻¹. Water transparency was within the most frequent range registered in the river (1.50–2.40 m). Conductivity was generally low and typical for the river (50.9–59.6 µS cm⁻¹). The pH was slightly acidic to neutral (6.8–7.1).

Discussion

The origin of species diversity of *Hypostomus* in the Paraná river basin

According to the results presented here and to Montoya-Burgos (2002, 2003), the phylogenetic tree of the genus *Hypostomus* can be divided into four principal clades (Fig. 2). Since each clade includes at least one species from the Paraná river basin and at least one from the large Amazon system, it can be deduced that old inter-basin allopatric speciation has participated in the diversification of *Hypostomus* in the Paraná river basin. In addition, lineages with multiple species inhabiting the Paraná river basin are found in clades D2, D3 and D4. This indicates that speciation within the basin also shaped the diversity of *Hypostomus* there.

The biogeographic analysis of the inter-basin relationships in clade D1 shows that *H. cochliodon*, from the Paraná river, clusters with *Hypostomus* sp. 1013, from the Amazon basin (Fig. 2), and our calibrations indicate that the splitting event can be dated to 6.5 Ma. To explain this age, we would have to invoke temporal connections between the upper Paraguay and Southern tributaries of the Amazon posterior to the inferred age of the boundary displacements and water interchange between the Northern paleo Amazon-Orinoco basin and La Plata basin (11.8–10 Ma) (Lundberg *et al.*, 1998). When these temporal interconnections ceased, the isolation of populations in both basins would have resulted in the allopatric speciation that gave rise to *H. cochliodon* and *H. sp.* 1013.

The clade D2 shows that species inhabiting the Amazon system cluster with species from La Plata basin + Eastern South America coastal rivers (Fig. 2). According to the D-loop molecular clock, the splitting event between these two groups can be dated to 11.3 Ma. This result is in accordance with the estimated date for this clade in Montoya-Burgos (2003). This inferred age matches with the documented boundary displacements between the Northern paleo Amazon-Orinoco system and the La Plata basin that occurred at about 11.8–10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). Once the headwater exchanges due to the boundary displacement were finished, the isolation of populations in both basins would have resulted in speciation, giving rise to the two lineages of clade D2.

Within clade D3, the species inhabiting the Amazon basin and those from La Plata basin + São Francisco river (see Fig. 2) form two distinct lineages that originated about 11.8 Ma according to the D-loop data. In Montoya-Burgos (2003), this event had a slightly more recent date (10.2–10.1 Ma.). However, both estimations correspond well with the date estimated for the last major water interchange between the paleo Amazon-Orinoco and La Plata basin reported above for clade D2.

In clade D4, the splitting between species inhabiting North-eastern South America coastal rivers (being part of the Amazon system), represented by *H. johnii*, and species from the Paraná river + Eastern South America coastal rivers, represented by *H. albopunctatus* + *H. luetkeni*, was dated to 9.3 Ma. Differing from what was proposed in Montoya-Burgos (2003), this estimated age does not correspond to the boundary displacements between the Northern paleo Amazon-Orinoco system and La Plata basin (11.8–10 Ma). This difference can be explained by the exclusion of the sequence of *Hypostomus* sp. (Tib 1), used in Montoya-Burgos (2003), from our analysis and also because in this work we used a smaller segment of D-loop marker than in Montoya-Burgos (2003). According to our results, the diversification episode within clade D4 would be another case of more recent water interchange via a temporal connection between the two main basins, as was already the case for clade D1. In addition, the

evolutionary position of *H. johnii* within the clade D4 (fig. 2) would allow us to suggest that the direction of the dispersal event was from the La Plata basin towards the Amazon system.

In summary, our results suggest that at least four independent allopatric speciation episodes occurred between the Amazon system and the Paraná basin river + São Francisco + Eastern South America coastal rivers. In clade D2 and D3, these allopatric speciations may be explained by the boundary displacement between the Northern paleo Amazon–Orinoco and the Southern La Plata basin which occurred between 11.8–10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). As indicated in clades D1 and D4, two more recent allopatric speciations (6.5 Ma for clade D1 and 9.3 Ma for clade D4) occurred by headwater exchanges and subsequent isolation between the northern and southern river systems, involving probably the upper Paraguay and Southern tributaries of the Amazon (Lundberg *et al.*, 1998). Accordingly, more recent population splitting between the Amazon and Paraná river basins has been reported (between 2.3 and 4.1 Ma) for the migratory fish *Prochilodus* (Sivasundar *et al.*, 2001). Moreover, other recent dispersal events between these two basins are further exemplified by the distribution ranges of *Pygocentrus nattereri* (Hubert *et al.*, 2007) and *Pseudotyllosurus augusticeps* (Lovejoy and De Araújo, 2000). These data and our results suggest that the temporary connections between the Amazon and Paraná river basins would be more frequent than previously thought.

The second origin of the diversity of *Hypostomus* species in the Paraná river basin is shaped by intra-basin speciation and occurs within the La Plata basin. In clade D2, the node including all species present in La Plata basin (seven species) was estimated to 7.45 Ma according to our molecular clock. This date coincides with the second reported event of maximum flooding of marine transgression during the Miocene (10–5 Ma) (Hernández *et al.*, 2005). The extensive marine incursion onto the Paraná river basin could have isolated the tributaries of this basin, generating several allopatric speciations in different and strictly freshwater organisms that habited the La Plata basin. Once the sea retreated, the newly formed species would have dispersed throughout the current La Plata basin, enriching its biodiversity. It is important to note that *H. puntactus* from Eastern South American coastal rivers emerges within the group inhabiting the La Plata basin. This fact was explained by Montoya-Burgos (2003) as a dispersal event from the La Plata basin towards the Eastern South American coastal rivers.

In clade D3, the calculated age for the origin of the species occupying the La Plata basin is 9.35 Ma. (eight species). This estimated age also coincides with the event of the marine transgression that occurred 10–5 Ma (Hernández *et al.*, 2005). Also, within this clade, there are species of the São Francisco river, which reveal, according to Montoya-Burgos (2003), a colonization event of the São Francisco river from the La Plata basin.

In clade D4, the node that contains the species inhabiting the La Plata basin is dated to 13.5 Ma; since then at least 10 species were formed. This estimated age is in accordance with the first event of maximum flooding of the marine transgression that occurred 15–13 Ma (Hernández *et al.*, 2005). As previously mentioned, within this clade emerges *H. johnii* from Northern South America coastal rivers and *H. luetheni* from Eastern South America coastal rivers. This result demonstrates two dispersal events; both are posterior to the origin of the species diversity of the La Plata basin.

It is important to note that intra-basin diversification increases with the age of the origin of the lineage. In clade D2 the intra-basin diversification started 7.45 Ma and generated seven species; in clade D3 it started 9.35 Ma and gave rise to eight species; in clade D4 it started 13.5 Ma and resulted in ten species. These species numbers are underestimates as new species might be discovered and others might have become extinct. In this respect, the new species described here, *H. arecuta*, contributes importantly to our understanding that clade D4 is the most ancient and diverse *Hypostomus* lineage inhabiting almost exclusively the La Plata basin. This high diversity is the result of intra-basin speciations.

Therefore, we see that *Hypostomus* species diversity in the Paraná river, and in consequence in the La Plata basin, is moulded by two processes. One is the inter-basin diversification, which generated groups of species inhabiting different basins as result of dispersal events, as proposed by the hydrogeological hypothesis (Montoya-Burgos, 2003). In this context, paleo hydrogeological changes during the Miocene have promoted vicariance and dispersal routes yielding a high degree of diversification of species of fishes in the Neotropical region. The other process that shaped species diversity of *Hypostomus* is intra-basin speciation, which produced groups of species inside a basin due to habitat fragmentation. We see that the origin of species diversity inside the La Plata basin temporally matches with the marine transgression in the Paraná river basin. As proposed by the museum hypothesis (Nores, 1999), this marine incursion could have fragmented the La Plata basin resulting in several allopatric speciation events. The historical biogeography of *Hypostomus* argues that several documented hydrological and sea level changes deeply influenced the cladogenetic events observed in the phylogeny of this genus.

Possible connection between the Paraná and Uruguay rivers

The hydrographical patterns of the Paraná and Uruguay rivers indicate that they can be considered as belonging to the same basin (La Plata basin) as the Lower Paraná is connected to the Lower Uruguay via the Río de la Plata estuary. This configuration has been maintained almost unchanged for the last 10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). Sivasundar *et al.* (2001) mentioned that several conspecific populations are currently distributed along the Paraná and Uruguay rivers, dispersing probably through the Río de la Plata estuary. This dispersal route, which allows gene flow between the two rivers, may explain why representatives of *H. commersoni* are genetically similar in those two rivers as well as in the Río de la Plata estuary. However, according to the distribution range of some *Hypostomus* species in the La Plata basin, we can propose other possible ancient dispersal routes between the Paraná and Uruguay rivers. The examined material in this work and the bibliography about *Hypostomus luteomaculatus*, *H. uruguayensis*, and *H. ternetzi* show that these species are distributed in the Paraná and Uruguay rivers. Contrary to *H. commersoni*, these species have never been reported from the Río de la Plata estuary. These three species could have either gone extinct or have left the Río de la Plata estuary. Alternatively, they might have dispersed through temporal connections between Northern tributaries of the Paraná and Uruguay rivers.

During the Miocene (24–5 Ma), the Paraná and Uruguay rivers became disconnected from one another resulting in the present configuration (Beurlen, 1970). However, the topology and proximity between some tributaries of these two rivers allows us to hypothesize that water pathways between the Paraná and Uruguay rivers could have existed during flood periods. Weber (1987) suggested that the Aguapey river can be a connection between the Paraná and Uruguay rivers. Later on, Casciotta *et al.* (2005) mentioned that it is probable that at present ichthyofaunal exchanges can take place between the Laguna Iberá (Paraná river basin) and the Miriñay river (Uruguay river basin) during flood periods. An exhaustive population genetic analysis could be useful to understand the dispersal routes used by some *Hypostomus* species to maintain gene flow between populations inhabiting Paraná and Uruguay rivers basin.

Acknowledgements

We are grateful to F. Brancolini, E. Rueda, A. Paracampo, F. Vargas, and members of the INICNE (UNNE) for helping us in the field trips and in the sampling process. We thank R. Corvain and S. Fisch-Muller (MHNG) for sharing samples with us. We thank Convenio IBOL-CONICET Argentina, CONICET, and Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Claraz Foundation, and the Canton de Genève for their financial support for field trips and laboratory equipment. We also thank the PUCRS for sharing with us specimens of *H. luteomaculatus* and *H. luteus*, and James Maclaine of NHM for the images of syntypes of *H. strigaticeps*. We are grateful to M. Rodrigues de Carvalho and two anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions.

Additional specimens examined

Argentina. *Hypostomus boulengeri*, MACN-ict 9644, 1 ex., 121.8 mm, Corrientes Province, Paraná river at Ituzaingó. *Hypostomus commersoni*: ILPLA1907, 8 ex., El Pescado, La Plata, Buenos Aires. *Hypostomus paranensis*: ILPLA1914, 2 ex., Córdoba, Córdoba Capital, Suquia river. *Hypostomus ternetzi*, MACN-ict 9645, 1 ex., 150 mm Corrientes Province, Paraná river at Yahape. *Hypostomus uruguayensis*, MACN-ict 9651, 1 ex., 159.0 mm, Corrientes Province, Paraná river at Yahape. Brazil. *Hypostomus luteus*: MCP19991, 1 ex., Santa Catalina, Uruguay river basin, Uruguai river, proximo a pedra da Fortaleza. MCP20751, 1 ex., Santa Catalina, Uruguay river basin, Uruguai river, proximo a pedra da Fortaleza. *Hypostomus regani*: MCP19989, 1 ex., Santa Catalina, Uruguay river basin, Uruguai river, proximo a pedra da Fortaleza. MCP28628, 1 ex., Rio Grande do Sul, Uruguay river basin, Uruguai river, no Remanso da Timbaúva, cerca de 1500m do início do Salto do Yucuma. MHNG 2547.017, 3 ex., 141, 86–162,09 mm, Sao Pablo, Mogui Guazu Cach.

References

- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692–4693.
- Beurlen, K. (1970) Geologie Von Brasilien. *Gebriider Borntraeger*, Berlin/Stuttgart.
- Boeseman, M. (1968) The genus *Hypostomus* Lacepede, 1803, and its Surinam representatives (Siluriformes, Loricariidae). *Zoologische Verhandelingen*, 99, 389.
- Bonetto, A. (1994) Austral Rivers of South America. R. Margalef (Ed.): *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Cardoso, Y.P., Montoya-Burgos J.I. (2009) Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, 18, 947–964.
- Cardoso, Y.P., Brancolini, F., Protogino, L., Lizarralde, M. (2011) Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894) Distribution extension and first record for Argentina. *Check List*, 7, 596–598.
- Cardoso, Y.P., Brancolini F., Paracampo A., Lizarralde M., Montoya-Burgos J.I. A new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper Paraguay river basin, Argentina. In preparation.
- Casciotta, J., Almirón, A., Bechara, J. (2005) *Peces del Iberá - Hábitat y diversidad*. Fundacion Ecos. 1st. edition, ISBN 987-05-0375-6. 244 pp.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R. (eds.). (14 July 2011) Catalog of Fishes electronic version. Available from: <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Ferraris, C.Jr. (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418, 1–628.
- Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hernández, R.M., Jordan T.E., Dalenz Farjat A., Echavarría L., Idleman B.D., Reynolds J.H. (2005) Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in the south Bolivia and Argentina. *South American Earth Sciences*, 19, 495–512.
- Hollanda Carvalho, P., Lima, F.C.T., Zawadzki, C.H. (2010) Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8, 39–48.
- Hoorn, C. (1993) Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 105, 267–309.
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D., Renno, J.F. (2007) Phylogeography of the piranha *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversifications of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 16, 2115–2136.
- Huelsenbeck, J.P., Crandall, K.A. (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 28, 437–466.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Jobb, G., von Haeseler, A., Strimmer, K. (2004) TreeFinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 18.
- Kosakovsky Pond, S.L., Muse, S.V., Frost, S.D.W. (2004) Hyphy package: hypothesis testing using phylogenies. Available from: <http://www.hyphy.org>.
- López, H.L., Miquelarena, A. (1991) Los Hypostominae (Pisces: Loricariidae) de Argentina. Vol 40, *Pisces. Fascículo 2 Hypostominae. Profadu (CONICET). Programa de Fauna de Agua Dulce Museo de La Plata. La Plata. Argentina*.
- Lovejoy, N.R., De Araújo, L.G. (2000) Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis* *Molecular Ecology*, 9, 259–268.
- Lundberg, J.G. (1998) The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, edited by L. R. MALABARBA, R. E. REIS, R. P. VARI, Z. M. LUCENA and C. A. S. LUCENA (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 49–68.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of Tropical South American rivers. In *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, edited by L. R. MALABARBA, R. E. REIS, R. P. VARI, Z. M. LUCENA and C. A. S. LUCENA (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 13–48.
- Montoya-Burgos, J.I., Weber, C., Le Bail, P.Y. (2002) Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Revue Suisse de Zoologie*, 109, 369–382.
- Montoya-Burgos, J.I. (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12, 1855–1867.
- Muller, S., Weber, C. (1992) Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie, Annales de la Société zoologique suisse et du Muséum d'Histoire naturelle de Genève*, 99, 747–754.
- Nores, M. (1999) An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26, 475–485.
- Nylander, J.A.A. (2004) MrAIC.pl. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oyakawa, O.T., Akama, A., Zanata, A.M. (2005) Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape

- basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa*, 921, 1–27.
- Rasanen, M.E., Lima, A., Santos, J., Negri, F. (1995) Late Miocene Tidal Deposits in the Amazonian Foreland Basin. *Science*, 269, 386–390.
- Reis, R.E., Weber, C., Malabarba, L.R. (1990) Review of the genus *Hypostomus* Lacepede, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of the three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 97, 729–766.
- Rodriguez, M.S., Ortega, H., Covain, R. (2011) Intergeneric phylogenetic relationships in catfishes of the Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae), with the description of *Fonchiiloricaria nanodon*: a new genus and species from Peru. *Journal of Fish Biology*, 79, 875–895.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10, 407–417.
- Weber, C. (1985) *Hypostomus dlouhyi*, nouvelle espèce, de poisson chat cuirasse du Paraguay (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 92, 955–968.
- Weber, C. (1987) *Hypostomus microstomus* sp. nov. et autres poissons-chats cuirassés du Rio Parana (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 40, 273–284.
- Weber, C. (2003) Hypostominae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. and Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, pp. 351–372.
- Zawadzki, C.H., Renesto, E., de Paiva, S., Lara-Kamei, M.C.S. (2004) Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, 121, 251–257.
- Zawadzki C.H., Weber, C., Simone Pavanelli, C. (2010) A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. *Neotropical Ichthyology*, 8, 719–725.

A new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and detailed record of *H. boulengeri* from the Paraguay river basin, Argentina

Yamila P. Cardoso^{1*}, Florencia Brancolini², Ariel Paracampo², Marta Lizarralde¹ and Juan I. Montoya-Burgos³

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Regional de Estudios Genómicos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Av. Calchaquí 23,5km, Florencio Varela, C.P. 1888, Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Limnología “Dr. Raúl A. Ringuelet”. La Plata, Bulevar 120 y 62 C.P.1900, Buenos Aires, Argentina.

³ Department of Genetics and Evolution, University of Geneva, 30 quai Ernest Ansermet, 1211, Geneva 4, Switzerland.

*Corresponding author: Telephone and fax number: +54-11-4275 8100. E-mail: yamilapcardoso@gmail.com

Hypostomus formosae n. sp. is described for the Paraguay river basin, Argentina. It can be distinguished from all other *Hypostomus* by having the combination of the following features: dorsum of head, body and all fins bright grey covered by numerous rounded dark dots and 11 ventral plates between end of anal-fin base and caudal fin (vs. more than 11). In addition, the new species is distinguished from the most similar sympatric species, *H. boulengeri* by slightly higher cleithral width, dorsal-fin base length, caudal-peduncle depth and by narrower caudal-peduncle length, eye diameter and mandibular ramus length. *Hypostomus formosae* belongs to the Amazonian “*H. plecostomus* species group” and our molecular phylogenetic results show that it is the sister species to the Guianese *H. plecostomus*, highlighting past inter-basin ichthyofauna exchanges. We also provide detailed record of *H. boulengeri* for the first time in Argentina, collected in Paraguay river, at Formosa city.

Keywords

Armored catfish, Mitochondrial Control Region, phylogeny, Neotropical fish, South America.

Introduction

The Paraguay river is the main tributary of the Paraná river basin. Its waters run through four countries: Brazil, Bolivia, Paraguay and Argentina. Despite its great extension and importance, knowledge about its ichthyofauna is still scarce and, in particular, about the species of the loricariid catfish genus *Hypostomus* Lacepede, 1803. Nevertheless, the Paraguay river hosts several species of *Hypostomus* which were recently listed by Zawadzki et al. (2010). As stated by these authors, ten valid species were described based on specimens collected in the Paraguay river basin: *H. cochliodon* Kner, 1854; *H. ternetzi* (Boulenger, 1895); *H. borellii* (Boulenger, 1897); *H. boulengeri* (Eigenmann & Kennedy, 1903); *H. latirostris* (Regan, 1904); *H. variostictus* (Miranda Ribeiro, 1912); *H. latifrons* and *H. piratatu* Weber, 1986; *H. mutuae* Knaack, 1999; and *H. peckoltoides* Zawadzki et al., 2010. In addition, four species of *Hypostomus* were cited for the Paraguay river basin: *H. commersoni* Valenciennes, 1836; *H. robinii* Valenciennes, 1840; *H. paranensis* Weyenbergh, 1877; and *H. regani* (Ihering, 1905) (Liotta, 2005; Zawadzki et al., 2010).

Weber (1985, 1986, 1987) provided a regional revision of *Hypostomus* from Paraguayan rivers, but in his publication of 1986 he worked only with species inhabiting the Paraguay river basin. In that work, he reviewed *Hypostomus boulengeri*, described *H. piratatu* and *H. latifrons*, and designated the lectotype of *H. commersoni*. He also clarified that the specimens collected in the Paraguay river basin and which had been previously identified as *H. plecostomus* (Linnaeus, 1758), were in fact *H. boulengeri*. The absence of *H. plecostomus* in the Paraguay river basin reinforce the conclusions of Boeseman (1968), who showed that the distribution of *H. plecostomus* is limited to the coastal area of Suriname, Guyana and French Guyana. Recently, Weber et al. (2012) investigated the identity of *H. plecostomus* based on classical morphometrics and allozyme analyses and designated a lectotype to stabilize the taxonomy of this species.

On the other hand, Weber (2003) and López et al. (2005) listed *Hypostomus boulengeri* from Argentina, though they did not provide locality details nor examined material, leaving uncertain about its accurate distribution in that country.

From a biogeographical point of view, the Paraguay river cannot be separated from the Middle and Lower Paraná river. Lower Paraguay river reaches its end joining with the Middle Paraná river and at that point there is no evidence of physical barrier to fish fauna exchange. Thus, it is expected that the species that inhabit the Middle Paraná river could also be present in the Lower Paraguay river. Species of *Hypostomus* with such a distribution could be *H. alatus* Castelnau, 1855; *H. hermanni* and *H. paulinus* (Ihering, 1905); *H. albopunctatus* (Regan, 1908); *H. luteomaculatus* (Devincenzi, 1942); *H. microstomus* Weber, 1987; and *H. uruguayensis* Reis et al., 1990 (López et al. 2005; Liotta, 2005; Cardoso et al. 2012).

According to Weber (2003), the highest diversity in species of *Hypostomus* is found in rivers of the Paraná-Paraguay system. In an attempt to better comprehend fish species diversity in this system, we present and describe here a new species of *Hypostomus* from Paraguay river basin and provide a detailed record of *H. boulengeri* for Argentina.

Material and methods

Taxon sampling and morphological analyses

Specimens were collected in bañado La Estrella (Pilcomayo river basin), Saladillo stream (affluent of Paraguay river basin), riacho Porteño (Pilcomayo river basin), Bermejo river (affluent of Paraguay river basin), and Paraguay river at Formosa city, Formosa province, Argentina (Fig. 1). Fishes were caught using cast nets and hand nets. The permissions to collect fish were given by the Ministerio de la Producción y Ambiente, Dirección de Registro, Control y Fiscalización de la Provincia de Formosa, Argentina. Tissue samples for genetic studies were preserved in ethanol 96 % and stored at -20 °C, the vouchers specimens were fixed in formalin 4 % for morphological studies and deposited at Ichthyology Collection of Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN-Ict). All measurements were taken point to point with digital calipers to the nearest 0.01 mm. Measurements and counts of bilaterally symmetrical features were taken from the left side of the body whenever possible; if a feature was missing or broken on the left side, it was examined on the right side. Counts and measurements were taken following Boeseman (1968), Weber (1985), and Reis et al. (1990). Body plate counts and nomenclature follow Oyakawa et al. (2005). The oral disk width was measured at point of insertion of the maxillary barbels.

Figure 1

DNA amplification, sequencing, alignment and phylogenetic reconstruction
Total DNA was extracted using the salt-extraction protocol (Aljanabi & Martinez, 1997). The PCR amplification of the Control Region (D-loop) of the mitochondrial DNA was performed as in Cardoso et al. (2011). The PCR products were purified and sequenced by the company MACROGEN (Korea). New sequences of *Hypostomus commersoni*, *H. boulengeri* and *H. formosae* n. sp. were deposited in GenBank with the accession number: JX290092-JX290099. The editing of the sequences, the alignment and the phylogenetic analyses were performed as in Cardoso et al. (2012). For the phylogenetic tree reconstruction, we used sequences of different *Hypostomus* species deposited in GenBank (AJ318344; AJ318347–AJ318358; AJ318369–AJ318379). See also Appendix in Montoya-Burgos et al. (2002) for taxonomic and collections details. In addition, nine species of the family Loricariidae were used as outgroup which GenBank accession numbers are: AJ318345 (*Hemiancistrus chlorostictus*); J318346 (*Aphanatorulus ammophilus*); AJ318359 (*Hemiancistrus fuliginosus*); AJ318360 (*Pterygoplichthys zuliaensis*); AJ318361 (*Liposarcus multiradiatus*); AJ318362 (*Glyptoperichthys scrophus*); AJ318363 (*Squaliforma squalinus*); AJ318364 (*Squaliforma emarginatus*) and AJ318365 (*Isorineloricaria spinosissima*), as in Montoya-Burgos (2003).

Hypostomus formosae new species.

Holotype. MACN-Ict 9720 (Field number AR11-208), 177 mm SL, Argentina, Formosa, arroyo Saladillo, affluent of Paraguay river basin, 26°26'28"S 58°24'03"W, 22 Nov 2011, Y. P. Cardoso, A. Paracampo, J. I. Montoya-Burgos & C. Rivera.

Paratypes. MACN-Ict 9721 (Field number AR11-207), 170 mm SL, same data of holotype. MACN-Ict 9722, (field number AR11-452 to AR11-455), 4, 74.2-141 mm SL, Argentina, Formosa, bañado La Estrella, affluent of Paraguay river basin, 24°24'32,2"S 60°20'02,9"W, 24 Nov 2011, Y. P. Cardoso, A. Paracampo, J. I. Montoya-Burgos & C. Rivera. ILPLA 1972, (field number YC-940 and YC-941), 2, 64.1-74 mm SL, Argentina, Formosa, Pilcomayo river basin, Porteño stream, close to Veraí lagoon, 25°10'32"S 57°58'11"W, 21 Feb 2007, C. Baigún, F. Brancolini & P. Minotti.

Diagnosis. Distinguished from all congeners by the combination of two characters: dorsum of head and body and all fins bright grey covered by numerous rounded dark dots and 11 ventral plates between end of anal-fin base and caudal fin. This color pattern distinguishes *H. formosae* n. sp. from species with cream roundish dots on a dark background (such as *H. albopunctatus*, *H. peckoltoides*, *H. luteus*, *H. regani*, *H. luteomaculatus*, *H. luetkeni*, *H. strigaticeps*, *H. multidentis* and *H. microstomus*) and from species with homogenous color (such as *H. ternetzi*, *H. cochliodon*, and *H. latirostris*). Distinguished from sympatric species with similar color pattern (dark roundish dots on a lighter background) by the number ventral plates between end of anal-fin base and caudal fin, 11 vs. 13 or 14 in *H. latifrons*, 14 in *H. boulengeri* and *H. piratatu*, 15 in *H. commersoni* and *H. uruguayensis*, 16 in *H. dlouhyi*, and 17 in *H. paranensis*. According to our phylogenetic tree, *H. formosae* n. sp. is the sister species to *H. plecostomus*, from which it differs by the same character (11 vs. 14 plates in *H. plecostomus*). Also differentiated from *H. commersoni*, *H. paranensis*, *H. dlouhyi*, *H. piratatu*, and *H. uruguayensis* by the number of plates along lateral line (25 or 26 vs. more than 27). Analyzed specimens of *H. formosae* n. sp. and *H. boulengeri* with similar SL (54-82 mm SL) differ in some morphometric characters: cleithral width (32.0±0.5 vs. 31.2±0.8 percent of SL), dorsal-fin base length (31.0±1.5 vs. 28.7±0.5 percent of SL), caudal-peduncle length (30.5±2.3 vs. 35.1±1.3 percent of SL), caudal-peduncle depth (11.4±0.4 vs.

10.3±0.5 percent of SL), eye diameter (15.9±1.7 vs. 18.9 ±0.8 percent of HL), and mandibular ramus length (11.9±1 vs. 14.3±1.1 percent of HL).

Description. Morphometric and meristic data given in Table 1. Overall view of body in Figs. 2 and 3. Dorsal profile slightly straight from snout tip to inter-orbital area, somewhat convex from interorbital area to dorsal-fin origin, and gently descending from this point to end of caudal peduncle. Ventral profile almost straight from snout tip to caudal fin. Dorsal plates between end of dorsal-fin and adipose-fin spine flattened. Body width at cleithral region greater than head depth. Head covered dorsally with plates, except for naked area on snout tip. Noticeable keel originating laterally to nare, passing through supra-orbital, and extending to throughout dorsal-fin base. Mouth rounded, lower lip not reaching transversal through gill openings, ventral surface covered with numerous small papillae decreasing in size posteriorly. Premaxillary teeth 13-21 (mode 16), dentary teeth 10-20 (mode 17). Snout tip naked even in specimens larger than 140 mm SL. Dorsal-fin base naked. Body with four well-developed keels along flanks. Dorsalmost keel situated on dorsal series plates. Keel on mid-dorsal series of plates interrupted to end dorsal-fin base. Keels on median series of plates and mid-ventral originating immediately posterior to cleithrum, more conspicuous on anterior half of trunk. Caudal peduncle laterally compressed, roughly ovoid in cross section.

Abdomen completely covered with minute platelets in specimens larger than 140 mm SL, with exception of small areas around pectoral- and pelvic-fin insertions and at urogenital opening. Dorsal plates 21, mid-dorsal plates 24 (one specimen with 25), median plates 24 or 25, mid-ventral plates 25, ventral plates 21. Pre-dorsal plates 3, plates below dorsal fin 8, plates between adipose fin and caudal fin 6 or 7, plates between anal fin and caudal fin 11. Dorsal-fin rays II,7, its origin at vertical through midpoint between pectoral and pelvic fins, or slightly posterior to that point. Dorsal-fin margin straight. Adipose-fin spine curved inward. Pectoral-fin rays I,6, its posterior border straight. Pectoral-fin spine slightly curved inward, covered with weakly developed odontodes, slightly more developed on its distal portion in specimens larger than 140 mm SL. Pectoral-fin tip reaching half pelvic-fin spine length. Pelvic-fin rays i,5, its posterior border slightly curved. Pelvic-fin spine just surpassing anal-fin origin when depressed. Anal-fin rays i,4, its tip reaching seventh plate after its origin. Anal-fin rays progressively increasing in size, third branched ray usually longest. Caudal-fin rays i,14,i, its margin slightly curved with inferior lobe longer than superior one.

Figures 2 and 3. Table 1

Coloration in alcohol. Overall ground colour of body and fins light grey, lighter on ventral surface. Dorsal surface of head, body, and fins entirely covered by numerous conspicuous dark dots, smaller and closer on head. Ventral surface also with evident dark dots in specimens larger than 140 mm SL. All fins with dots regularly arranged in rows along rays.

Distribution and habitat. *Hypostomus formosae* n. sp. is known from the Paraguay river basin at three different localities: bañado La Estrella, arroyo Saladillo and riacho Porteño, all situated in Argentina. In the sampling points, the bottom of the streams was composed mostly by large boulders of sandstone with patches of sand and pebbles. The species was found in well oxygenated waters (5.9-6.62 mg/l) having moderate current speed. Water turbidity was 51.1-98.1 N.T.U. Conductivity was 67.1-660 µScm⁻¹. The pH was 6.43-7.29.

Other species of *Hypostomus* have been cited close to the sampled localities, in the Paraguay and Paraná rivers basin. Thus, *H. formosae* n. sp. seems to be sympatric with *H. microstomus*, *H. luteomaculatus*, *H. ternetzi*, *H. boulengeri*, *H. commersoni*, *H. paranensis*, *H. latifrons*, and *H. uruguayensis*.

Etymology. The specific epithet *formosae* is derived from the Formosa province, Argentina, where this species seems to be restricted.

Hypostomus boulengeri (Eigenmann & Kennedy, 1903)

Plecostomus boulengeri Eigenmann & Kennedy, 1903.

Plecostomus guacari (Lacepede, 1803), *sensu* Regan 1904.

Plecostomus plecostomus (Linne, 1758), *sensu* Eigenmann et al., 1907.

Description. Morphometric and meristic data given in Table 1. We also show in Fig. 4 a live specimen. Dorsal profile slightly straight from snout tip to inter-orbital area. Dorsal plates between end of dorsal-fin and adipose-fin spine flattened. Body width at cleithral region greater than head depth. Head covered dorsally with plates, except for naked area on snout tip. Mouth rounded, lower lip not reaching transversal through gill openings, ventral surface covered with numerous small papillae. Premaxillary teeth 17-28 (mode 25), dentary teeth 20-29 (mode 25). Median plates series 26-27. Pre-dorsal plates 2, plates below dorsal fin 8-9, plates between adipose fin and caudal fin 5 or 6, plates between anal fin and caudal fin 13-14. Dorsal-fin rays II,7, its margin straight. Adipose-fin spine curved inward. Pectoral-fin rays I,6, its posterior border straight. Pectoral-fin spine slightly curved inward. Pelvic-fin rays i,5, its posterior border slightly curved. Pelvic-fin spine just surpassing anal-fin origin when depressed. Anal-fin rays i,4, its tip reaching seventh plate after its origin. Anal-fin rays progressively increasing in size, third branched ray usually longest. Caudal-fin rays i,14,i.

Figure 4

Coloration in alcohol. Overall ground colour of body and fins light grey/brown, lighter on ventral surface. Dorsal surface of head, body, and fins entirely covered by numerous dark patches, smaller and closer on head and less clear in the caudal peduncle.

Distribution. *Hypostomus boulengeri* is known from the Paraguay river basin, Argentina, Brazil and Paraguay. In Argentina, it is only known at Formosa city. Previous records did not provide information about sampling localities.

Ecological notes. Specimens of *Hypostomus boulengeri* were found in the brim of the large Paraguay river. The bottom of the river was composed mostly by sand and pebbles. A layer of vegetation was at the surface of water. The species was found in well oxygenated waters (4.97 mg/l) having low current speed. Water turbidity was 193 N.T.U. Conductivity was 163.3 μScm^{-1} . The pH was 6.9.

Material examined. MACN-Ict 9723, (field number AR11-609 to AR11-624), 16, 54.2-75.3mm SL, Argentina, Formosa, Paraguay river, at Formosa city, 26°12'4,6''S 58°08'43,9''W.

Phylogenetic analyses. A molecular phylogenetic approach was used to corroborate the species status of *Hypostomus formosae* n. sp., and to place it within the evolutionary tree of the genus. The mitochondrial D-loop sequences were obtained for four individuals of *H. formosae* n. sp., three *H. boulengeri* and one *H. commersoni* from Paraguay river basin. The sequence alignment of the mitochondrial D-loop region comprised 592 positions and 81 sequences of different species of *Hypostomus*. The evolutionary relationships of the genus *Hypostomus* is the same as found in Montoya-Burgos (2003) and Cardoso et al. (2012). All species of *Hypostomus* form a monophyletic clade named Clade D (Fig. 5). This clade can be organized into four monophyletic groups, D1, D2, D3, and D4. According to our phylogenetic tree, *H. formosae* n. sp. together with *H. boulengeri*, *H. derbyi*, *H. paranensis*, *H. commersoni*, *H. plecostomus*, *H. watwata*, and seven *Hypostomus* spp. form the clade D2 (see Fig. 5). Inside this clade, note that *H. formosae* n. sp. clusters with the species inhabiting the Amazonian basin. *Hypostomus plecostomus*, mainly distributed in the lower part of Guianese rivers (Weber et al. 2012) appear as sister species to *H. formosae* n. sp. In turn, these two species cluster with five *Hypostomus* spp. from the Amazonian basin and Northeastern South America coastal rivers and finally with *H. watwata* from French Guyana.

The second sub-clade inside D2 (Fig. 5) includes species from Eastern South America coastal rivers (*H. puntactus*) and the La Plata basin (*H. commersoni*, *H. derbyi*, *H. paranensis*, *H. boulengeri*, and two *Hypostomus* spp.: Tib13 and 1211). As expected, the four sequences of *H. boulengeri* cluster together and the sequence of *H. commersoni* from Bermejo river, a tributary of the Paraguay river, cluster with the other representatives of this species.

Figure 5

Discussion

Hypostomus formosae n. sp forms part of the “*H. plecostomus* species group” as defined by Muller & Weber (1992) in external morphology, presenting black widespread dots on the body, median sized mandible and short crowned teeth. Inside this group, *H. formosae* n. sp. is morphologically very similar to *H. boulengeri*, *H. dlouhyi*, *H. commersoni*, *H. piratatu*, *H. plecostomus* and *H. uruguayensis*. Notwithstanding, the number of ventral plates between the end of anal-fin base and the caudal fin (11) distinguishes *H. formosae* n. sp. from species of *Hypostomus* inhabiting Paraguay and Middle Paraná rivers, but also from *H. plecostomus*, that inhabits the coastal area of the Guianese rivers. This morphological diagnostic character is very useful since it allows the easy identification of *H. formosae* n. sp. in the field and for non-expert taxonomists working on loricariids. According to the published pictures in the work describing *H. mutuae*, *H. formosae* n. sp. can be differentiated from this sympatric species by the color pattern (background grey vs. brown, respectively) and by the width of the mouth (*H. mutuae* presents an unusually wide mouth). Regrettably, Knaack (1999) did not give any morphometric data about the mouth of *H. mutuae* or counts of the number of ventral plates between end of anal-fin base and caudal fin that would permit to confirm the differentiation between these two species.

In addition to the external morphological similarities between *Hypostomus formosae* n. sp. and *H. plecostomus*, our molecular phylogenetic result showed that they are sister species. The close relationship between these two species and other *Hypostomus* spp. from the Amazon system – that comprises the Amazon basin, French Guyana and Northeastern South America coastal rivers – is intriguing. Past temporary connections between the Southern tributaries of the Amazon and upper

Paraguay river basins could have been frequent as previously suggested by several authors (e.g. Lovejoy & De Araújo, 2000; Sivasundar et al., 2001; Montoya-Burgos, 2003; Hubert et al., 2007; Cardoso et al., 2012). The evolutionary position of *H. formosae* n. sp. in the phylogenetic tree of *Hypostomus* provides new evidence for fish fauna exchange between the Amazon basin and the Paraguay river basin.

We also present here an extension of the distribution of *Hypostomus boulengeri*, which now includes Rio Paraguay at Formosa city in Argentina. We provide the exact locality where this species was found in Argentina and deposited the specimens in a national collection in the Museo Argentino de Ciencias Naturales (see catalog numbers above) as reference material.

Weber (1986) defined two groups of *Hypostomus boulengeri* from Paraguay: “chacoenien” and “oriental”. These groups can be differentiated by their geographical distribution. Following the sampled locality, our specimens of *H. boulengeri* would belong to the “oriental group”. Despite the fact that we examined the morphology of juvenile specimens only, they display some meristic and morphometric characteristics corresponding to the “oriental group”, as the number of median plates and teeth (see Table 1). The molecular phylogenetic analysis for this species revealed that the sequences of the specimens collected in Asuncion, Paraguay (type locality) and Formosa city, Argentina (this study), do not show high genetic divergence. These results confirm the identification of these specimens at the species level. It would be very interesting to add molecular data of samples from the “chacoenien group” to corroborate the distinction between the two groups proposed by Weber (1986). Finally, the discovery of the new species increases the species diversity of the Paraguay river basin, Argentina. Furthermore, we confirm with molecular data the present of *H. commersoni* in the studied region.

The combined analysis of molecular and morphological data represents a very useful tool to elucidate the systematics of complex groups such as *Hypostomus*. As an outcome of this integrated analysis, we were able to recognize and to describe a new species of *Hypostomus* and provide a detailed record of *H. boulengeri* for the Paraguay river basin in Argentina.

Material comparative examined.

Argentina. *Hypostomus aspilogaster*: ILPLA 2154 (Field number YC09-011), 395.0 mm SL, Buenos Aires province, Punta Lara, Río de la Plata basin; ILPLA 2155 (Field number YC09-082), 372.9 mm SL, Buenos Aires province, Punta Lara, Río de la Plata basin; ILPLA 2156 (Field number YC09-089 and YC09-090), 2, 281.2-285.2 mm SL, Entre Ríos province, stream Mandisoví Grande, Federación department, Uruguay River basin. *Hypostomus arecuta*: Holotype. MACN-ict 9677 (Field number 198), 185.5 mm SL, Corrientes province, Ituzaingó, Paraná River. *Hypostomus commersoni*: ILPLA1907, 8, 50-87.5 mm SL, El Pescado, La Plata city, Buenos Aires; MACN-Ict 9724 (Field number AR11-325), 176mm SL, Formosa province, El Colorado, Bermejo River. *Hypostomus cordovae* (*Plecostomus cordovae*): Dorsal, ventral and lateral pictures of the holotype BMNH 1878.4.4.1. *Hypostomus laplatae* (*Plecostomus taeniatus*): Dorsal, ventral and lateral pictures of the holotype BMNH 1908.8.29.17. *Hypostomus paranensis*: ILPLA1914, 2, 58-78.8 mm SL, Córdoba, Córdoba Capital, Suquia river. *Hypostomus ternetzi*: MACN-ict 9645, 150 mm Corrientes province, Yahape, Paraná river. *Hypostomus uruguayensis*: MACN-ict 9651, 159.0 mm, Corrientes province, Yahape, Paraná river.

Brazil. *Hypostomus luteus*: MCP 19991, Santa Catarina, Uruguay river basin, Uruguay river, close to pedra da Fortaleza. MCP 20751, 1, Santa Catarina, Uruguay river basin, Uruguay river, close to pedra da Fortaleza. *Hypostomus regani*: MCP 19989, 1, Santa Catalina, Uruguay river basin, Uruguay river, close to pedra da Fortaleza. MCP 28628, 1, Rio Grande do Sul, Uruguay river basin, Uruguay river, in Remanso da Timbaúva, close to 1500m of Yucuma waterfall. MHNG 2547.017, 3, 141,86-162,09 mm SL, Sao Pablo, Mogui Guazu Cach. *Hypostomus strigaticeps*: dorsal, ventral and lateral pictures of some of the syntypes BMNH 1907.7.6.10-12.

Guyane. *Hypostomus plecostomus* sensu Boeseman, 1968: MHNG 2651.066, 2, Berbice River, Dubulay Ranch. MHNG 2651.077, 1, Berbice River, Cambo Cambo Creek, tributary of Wuruni River, Wuruni.

Suriname. *Hypostomus plecostomus* sensu Boeseman, 1968: MHNG 2708.046, 4, and MHNG 2708.047, 8, Commewijne River Basin, Mapana Creek, tributary of Commewijne River. MHNG 2621.023, 17, Suriname River Basin, mouth of Paulus Creek, tributary of Lower Suriname River. MHNG 2708.042, 1, Suriname River Basin, Klass Creek, Brokopondo. MHNG 2671.065, 16, Corantijn River Basin, Lower Corantijn River at Matapi.

Acknowledgements

We would like to thank the Donation G. and A. Claraz, Fonds Augustin Lombard, Etat de Genève and IBOL-CONICET Argentina, for their financial support for field trips and laboratory equipment. We also thank Carlos S. de Lucena for loan the specimens of *H. luteomaculatus*, *H. luteus*, *H. aspilogaster* and *H. commersoni*. Thanks to Raphael Covain and Sonia Fish-Muller, to share with us the specimens of *H. plecostomus*. We are grateful to Ministerio de la Producción y Ambiente, Dirección de Registro, Control y Fiscalización de la Provincia de Formosa for the permissions to collect fish.

Literature Cited

- Aljanabi, S.M. & I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- Boeseman, M. 1968. The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, and its Surinam representatives (Siluriformes, Loricariidae). *Zoologische Verhandelingen*, 99: 389.
- Cardoso, Y. P., A. Almirón, J. Casciotta, D. Aichino, M. Lizarralde & J. I. Montoya-Burgos. 2012. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. *Zootaxa*, 3453: 69-83.
- Cardoso, Y. P., F. Brancolini, L. Protogino & M. Lizarralde. 2011. Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894). Distribution extension and first record for Argentina. *Check List*, 7: 596-598.
- Devincenzi, G. J. & Teague, G. W. 1942. Ictiofauna del Rio Uruguay medio. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (Serie 2)*, 5, 1-100 + index + i-viii, pls. 1-6.
- Hubert, N., F. Duponchelle, J. Nuñez, C. Garcia-Davila, D. Paugy & J. F. Renno. 2007. Phylogeography of the piranha *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversifications of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 16: 2115-2136.

Trabajo enviado a Ichthyological Exploration of Freshwaters

- Knaack, J. 1999. A new species of suckermouth catfish (*Hypostomus* Lacépède 1803) from the Mato Grosso, Brazil (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Tropical Fish Hobbyist* 47: 102-108.
- Liotta J. 2005. Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. Serie Documentos N3, ProBiota FCNyM, UNLP, La Plata, Argentina.
- López, H. L., A. M. Miquelarena & J. Ponte Gómez. 2005. Biodiversidad y distribución de la ictiofauna mesopotámica. *Insugeo Miscelánea*, 14: 311-354.
- Lovejoy, N. R. & L. G. De Araújo. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9: 259-268.
- Montoya-Burgos, J. I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855-1867.
- Montoya-Burgos, J. I., Weber, C. & P.Y. Le Bail. 2002. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Revue Suisse de Zoologie*, 109: 369-382.
- Muller, S. & C. Weber. 1992. Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie, Annales de la Société zoologique suisse et du Muséum d'Histoire naturelle de Genève*, 99: 747-754.
- Oyakawa, O. T., A. Akama & A. M. Zanata. 2005. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa*, 921: 1-27.
- Reis, R. E., C. Weber & L. R. Malabarba. 1990. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of the three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 97: 729-766.
- Sivasundar, A., E. Bermingham, & G. Ortí. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.
- Weber, C. 1985. *Hypostomus dlouhyi*, nouvelle espèce, de poisson chat cuirasse du Paraguay (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 92: 955-968.
- Weber, C. 1986. Revision de *Hypostomus boulengeri* (Eigenmann & Kennedy), et deux especes nouvelles de poissons-chats du Paraguay (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 93: 979-1007.
- Weber, C. 1987. *Hypostomus microstomus* sp. nov. et autres poissons-chats cuirassés du Rio Parana (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 40: 273-284.

Trabajo enviado a Ichthyological Exploration of Freshwaters

Weber, C. 2003. Hypostominae. Pp. 351-372. In: Reis, R. E., S. O. Kullander, & C. J., Ferraris-Jr., (eds.), Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre.

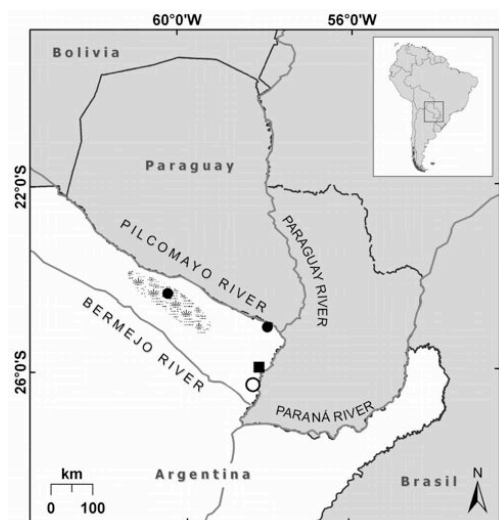
Weber C., R. Covain & S. Fisch-Muller. 2012. Identity of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758), with an overview of *Hypostomus* species from the Guianas (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). Cybium, 36: 195-227.

Zawadzki C. H., C. Weber & C. S. Pavanelli. 2010. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. Neotropical Ichthyology, 8: 719-725.

446 Tables and Figures
 447 **TABLE 1.** Morphometric and meristic data and counts of holotype and 7 paratypes of *Hypostomus*
 448 *formosae* n. sp. and 16 specimens of *H. boulengeri*.

	<i>H. formosae</i> n. sp.			<i>H. boulengeri</i>	
	Holotype	Range	Mean / SD	Range	Mean / SD
Standard length SL (mm)	177.0	64.1-177.0	108.7±46.3	54.2-75.3	66.7±7.4
	Percents of SL			Percents of SL	
Predorsal length	35.48	34.8-41.9	37.9±2.9	36.5-41.5	39.6±1.9
Head length (HL)	31.12	31.1-39.3	35.4±3.1	30.0-32.1	31.3±0.8
Cleithral width	31.18	30.6-33.7	32.2±1.0	35.4-37.6	36.4±0.7
Dorsal-fin spine length	34.57	29.1-40.5	35.9±3.7	32.9-37.6	30.3±2.0
Dorsal-fin base length	30.28	28.9-33.0	31.2±1.3	28.2-30.0	28.9±0.7
Thoracic length	23.72	22.0-26.0	24.5±1.1	22.2-27.1	24.2±1.7
Pectoral-fin spine length	33.61	30.4-33.6	31.6±1.2	30.5-32.7	31.6±0.7
Abdominal length	24.18	19.1-30.3	22.5±3.6	19.2-22.6	20.6±1.3
Pelvic-fin spine length	27.51	23.2-27.5	31.6±1.2	24.2-28.3	31.6±0.7
Caudal-peduncle length	31.29	29.1-34.8	31.2±2.3	33.2-36.3	35.2±1.2
Caudal-peduncle depth	10.84	10.8-11.9	11.3±0.4	9.8-11.1	10.3±0.5
Adipose-fin spine length	33.55	7.9-11.9	10.4±1.3	10.2-13.5	11.5±1.2
Upper caudal-fin ray length	33.55	25.1-35.5	31.5±3.3	27.8-39.5	33.5±4.5
Lower caudal-fin ray length	26.55	20.1-48.5	34.3±10.8	26.1-45.4	35.1±7.9
	Percents of HL			Percents of HL	
Head depth	64.60	54.0-90.5	64.9±12.2	55.0-79.1	60.9±8.2
Snout length	60.25	51.7-60.3	57.7±2.9	54.4-60.0	57.2±2.0
Orbital diameter	13.06	11.6-18.0	14.3±2.4	17.8-20.1	18.8±0.8
Interorbital width	44.82	41.3-46.6	43.5±1.8	40.0-43.8	42.8±1.3
Maxillary barbel length	17.96	9.8-18.0	12.7±3.33	8.5-12.2	10.3±1.4
Mandibulary ramus length	11.25	10.7-12.9	11.7±0.7	11.5-16.0	13.9±1.5
Counts	mode			mode	
Median plates series	25	25-26	25	26-27	27
Predorsal plates	3	3	3	2	2
Dorsal plates below dorsal-fin base	8	8	8	8-9	9
Plates between dorsal and adipose fin	6	6-7	6	5-6	6
Plates between adipose and caudal fin	3	3-4	3	2	2
Plates between anal and caudal fin	11	11	11	13-14	13
Premaxillary teeth	13/14	13/21	16	17/28	25
Dentary teeth	10/14	10/20	17	20/29	25

449



450

451 **Fig. 1.** Map showing the sampling localities. Circles: localities of *Hypostomus formosae* n. sp., white

452 circle: type locality. Square: *H. Boulengeri*.



453

454 **Fig. 2.** *Hypostomus formosae* n. sp., MACN-Ict 9720 (Field number AR11-208), Holotype, 177 mm SL.

455 Dorsal, lateral, and ventral views. Photo: Yamila P. Cardoso.



Fig. 3. Lateral view of a live juvenile specimen of *Hypostomus formosae* n. sp., MACN-Ict 9722 (Field number AR11-452), 82.8 mm SL, collected in the bañado La Estrella, Formosa province, Argentina.

Photo: Yamila P. Cardoso.



Fig. 4. Lateral view of a live juvenile specimen of *Hypostomus boulengeri*, MACN-Ict 9723 (Field number AR11-611), 57.8 mm SL, collected in the Paraguay river, at Formosa city, Formosa province,

Argentina. Photo: Yamila P. Cardoso.

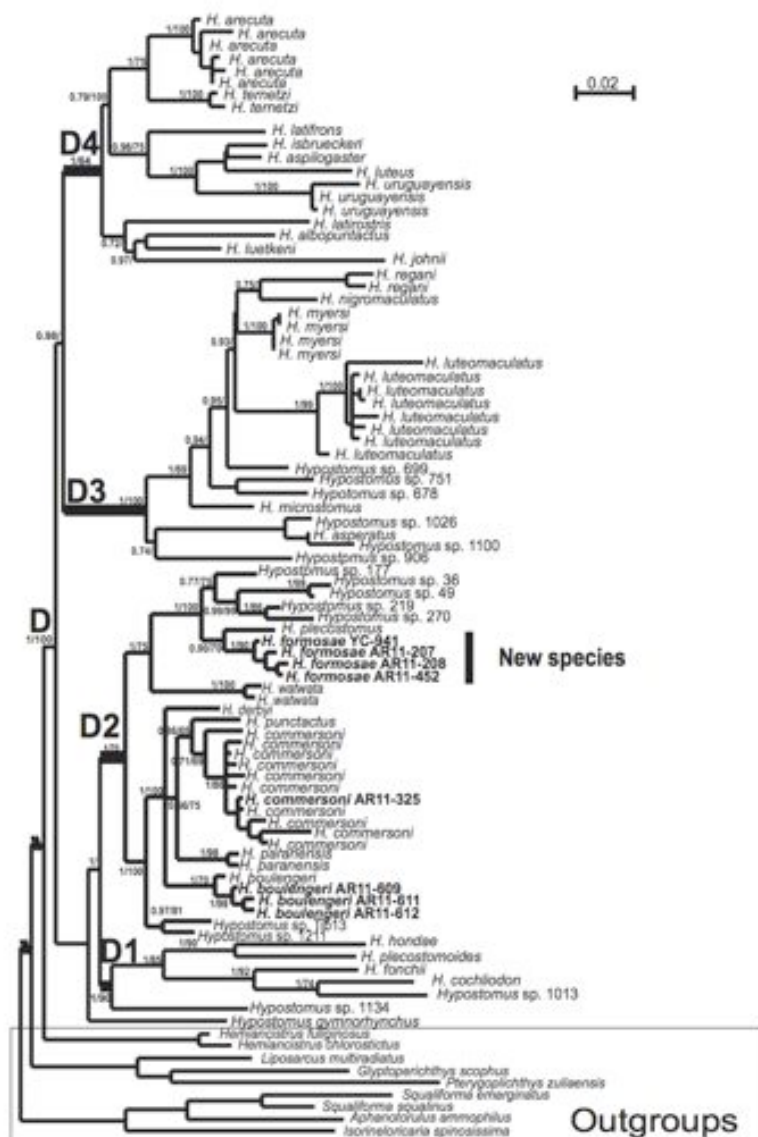


Fig. 5. *Hypostomus* phylogenetic tree based on the mitochondrial D-loop region. Numbers next to branches are Bayesian posterior probabilities followed by bootstrap values (1000 pseudoreplicates) when these are above 50%, respectively. Bold letters are abbreviations used for naming clades (see text). The specimens of *H. formosae* n. sp., *H. bouleengeri* and *H. commersoni* used in this work, are marked with the number of their identification tag.

Bibliografía

- ALBERT, J. & R. REIS, 2011. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (Univiversity of California Press, Berkeley, Los Angeles, London).
- ALJANABI, S. M. & I. MARTINEZ, 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**:4692–4693.
- ARMBRUSTER, J. W., 2003a. *Peckoltia sabaji*, a new species from the Guyana Shield (Siluriformes: Loricariidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **344**:1–12.
- ARMBRUSTER, J. W., 2003b. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa* **249**:1–60.
- ARMBRUSTER, J. W., 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfish (Loricariidae) with emphasis on the *Hypostominae* and *Ancistrinae*. *Zoological Journal of the Linnean Society* **141**:1–80.
- ARNOLD, M. L., M. R. BULGER, J. M. BURKE, A. L. HEMPEL & J. H. WILLIAMS, 1999. Natural hybridization: how low can you go and still be important? *Ecology* **80**:371–381.
- ARRATIA, G., M. B. PEÑAFORT & S. MENU-MARQUE, 1983. Peces de la región sureste de los Andes y sus probables relaciones biogeográficas actuales. *Deserta, Mendoza* **7**:48–107.
- AYRES, J. M. C. & T. H. CLUTTON-BROCK, 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *The American Naturalist* **140**:531–537.

- BEURLIN, K., 1970. Geologie Von Brasilien. *Gebrüder Borntraeger. Berlin/Stuttgart* .
- BLEEKER, J. A., 1977. *Geographic variation, speciation, and clines* (Princeton University Press, Princeton).
- BONETTO, A., 1994. Austral Rivers of South America. In *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems*, edited by R. MARGALEF (Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands).
- BROMHAM, L. & D. PENNY, 2003. The modern molecular clock. *Nature (London)* **4**:216–224.
- BROOKS, D., M. VAN VELLER & D. MCLENNAN, 2001. How to do BPA, really. *Journal of Biogeography* **28**:345–358.
- BUCKUP, P., 2011. The Eastern Brazilian Shield. In *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*, edited by J. ALBERT & R. REIS (University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London), pp. 203–210.
- BÓ, R. F., F. A. KALESNIK & R. QUINTANA, 2002. *Flora y fauna silvestres de la porción terminal de la cuenca del Plata* (Columbia University Press, New York).
- CARDOSO, Y. P., A. ALMIRON, J. CASCIOTTA, D. AICHINO, M. LIZARRALDE & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2012. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. *Zootaxa* **3453**:69–83.
- CARDOSO, Y. P., F. BRANCOLINI, A. PARACAMPO, M. LIZARRALDE & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2013a. A new species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and first record of *H. boulengeri* from the Paraguay river basin, Argentina. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **00**:00–10.
- CARDOSO, Y. P., F. BRANCOLINI, L. PROTOGINO & M. LIZARRALDE, 2011. Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894). Distribution extension and first record for Argentina. *Check List* **7**:596–598.
- CARDOSO, Y. P. & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2009. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology* **18**:947–964.

- CARDOSO, Y. P., A. PARACAMPO, C. RIVERA, C. E. J. DES COMBES, M. LIZARRALDE & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2013b. River basin fragmentation explains population diversification and speciation in South American freshwaters. *En preparación*.
- CARVALHO, P. H., 2006. *Morphological and molecular approaches on Hypostomus (Siluriformes: Loricariidae), a key genus for understanding Neotropical diversification of fishes* (Travail de master, Université de Genève).
- CASTELLANOS, A., 1959. Historia Hidrológica del río Corriente. *Univ. Nac. del Litoral Fac. de Filosofía, Ciencias y Letras, Rosario*.
- CHIACHIO, M. C., C. OLIVEIRA & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**:606–617.
- COLINVAUX, P. A., P. E. D. OLIVEIRA, J. E. MORENO, M. C. MILLER & M. B. BUSH, 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* **274**:85–88.
- COVAIN, R., 2011. *Etude Morphologique et phylogénétique des poissons chats cuirassés neotropicaux de la sous-famille Loricariinae* (Thesis doctoral, Université de Genève -Suisse et Université de Lyon -France).
- COVAIN, R., S. DRAY, S. FISCH-MULLER & J. I. MONTOYA-BURGOS, 2008. Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**:986–1002.
- COVAIN, R. & S. FISCH-MULLER, 2007. The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa* **1462**:1–40.
- CRAMER, C. A., S. L. BONATTO & R. E. REIS, 2011. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**:43–52.
- CRISCI, J., L. KATINAS & P. POSADAS, 2000. *Introducción a la teoría y práctica de la biogeografía histórica* (Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires).

- DRUMMOND, A. J., S. Y. W. HO, M. J. PHILLIPS & A. RAMBAUT, 2006. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* **4**:(5): e88, DOI: 10.1371/journal.pbio.0040088.
- DRUMMOND, A. J. & A. RAMBAUT, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees **7**:214.
- FELSENSTEIN, J., 1981. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Journal of Molecular Evolution* **17**.
- FELSENSTEIN, J., 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**:164–166.
- FERRARIS, C. J., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* **1418**:1–300.
- FISCH-MULLER, S., 2003. Loricariidae-Ancistrinae. In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, edited by R. E. REIS, S. O. KULLANDER & C. J. F. JR (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 373–400.
- FJELDSÅ, J., 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* **3**:207–226.
- GASPARETTO-BIFI, A., C. SIMONE-PAVANELLI & C. H. ZAWADZKI, 2009. Three new species of *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin, Paraná State, Brazil. *Zootaxa* .
- GHAZZI, M. S., 2008. Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do sul do Brasil. *Iheringia, Sér. Zool* **98**:100–122.
- GOLOGOFF, P., J. S. FARRIS & K. C. NIXON, 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**:774–786.
- GUINDON, S. & O. GASCUEL, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**:696–704.
- HAFFER, J., 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**:131–137.

- HAFFER, J., 1982. General aspects of the refuge theory. In *Biological Diversification in the Tropics*, edited by P. GT (Columbia University Press, New York), pp. 6–24.
- HAFFER, J., 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* **6**:451–476.
- HALL, J. P. W. & D. J. HARVEY, 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riordinid butterflies. *Evolution* **56**:1489–1497.
- HALL, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **41**:95–98.
- HAQ, B., J. HANDERBOL & P. VAIL, 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* **235**:1156–1167.
- HERNÁNDEZ, R., T. JORDAN, A. D. FARJAT, L. ECHAVARRÍA, B. IDLEMAN & J. REYNOLDS, 2005. Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in the south Bolivia and Argentina. *South American Earth Sciences* **19**:495–512.
- HUBERT, N., F. DUPONCHELLE, J. NUÑEZ, C. GARCÍA-DAVILA, D. PAUGY & J.-F. RENNO, 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* **16**:2115–2136.
- HUBERT, N. & J.-F. RENNO, 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* **33**:1414–1436.
- HUELSENBECK, J. P. & F. RONQUIST, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754–755.
- IRIONDO, M., 1993. Geomorphology and late Quaternary of the Chaco (South America). *Geomorphology* **7**:289–303.
- IRIONDO, M. & E. DRAGO, 1972. Descripción cuantitativa de dos unidades geomorfológicas de la llanura aluvial del Paraná Medio, Argentina. *Revista de la Asociación Geológica Argentina, Tome XXVII* **2**:65–75.

- IRIONDO, M. & D. KROHLING, 2008. *Cambios ambientales en la cuenca del río Uruguay. Desde dos millones de años hasta el presente* (??Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé).
- IRIONDO, M., J. PAGGI & M. PARMA, 2007. *The Middle Paraná River Limnology of a Subtropical Wetland* (??Springer, Heidelberg).
- JACOTDESCOMBES, C., 2012. *Biogéographie historique comparée des poissons-chats Loricariidae des Guyanes inférée par l'analyse de séquences d'ADN* (Travail de maîtrise universitaire en Biologie, orientation Biodiversité et Systématique, Université de Genève).
- JOB, G., A. VON HAESLER & K. STRIMMER, 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* **4**:18.
- KAWAKAMI, T., R. K. BUTLIN, M. ADAMS, K. M. SAINT, D. J. PAULL & J. B. COOPER, 2007. Differential gene flow of mitochondrial and nuclear DNA markers among chromosomal races of Australian morabine grasshoppers (*Vandiemena*, *viatica* species group). *Molecular Ecology* **16**:5044–5056.
- KENNAN, L., S. LAMB & L. HOKE, 1997. High-altitude palaeosurfaces in the Bolivian Andes: evidence for late Cenozoic surface uplift. In *Palaeosurfaces: Recognition, reconstruction and palaeoenvironmental interpretation*, edited by M. WIDDOWSON (Geological Society Special, London, No120), pp. 307–323.
- KLINGER, M., J. S. TAYLOR, T. OERTLE, M. E. SCHWAB, C. A. O. STUERMER & H. DIEKMANN, 2004. Identification of Nogo-66 Receptor (NgR) and homologous genes in fish. *Molecular Biology and Evolution* **21**:76–85.
- LIOTTA, J., 2005. *Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina* (Serie Documentos N3, ProBiota FCNyM, UNLP, La Plata, Argentina).
- LOVEJOY, N. R. & M. L. G. D. ARAÚJO, 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology* **9**:259–268.
- LUNDBERG, J. G., 1998. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In

- Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, edited by L. R. MALABARBA, R. E. REIS, R. P. VARI, Z. M. LUCENA & C. A. S. LUCENA (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 49–68.
- LUNDBERG, J. G., L. G. MARSHALL, J. GUERRERO, B. HORTON, M. MALABARBA & F. WESSELINGH, 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, edited by M. L. R., R. R. E., V. R. P., L. Z. M. & L. C. A. S. (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 13–48.
- LÓPEZ, H. L., R. C. MENNI, M. DONATO & A. MIQUELARENA, 2008. Biogeographical revision of Argentina (Andean and Neotropical Regions): an analysis using freshwater fishes. *Journal of Biogeography* **35**:1564–1579.
- LÓPEZ, H. L. & A. M. MIQUELARENA, 2005. Biogeografía de los peces continentales de la Argentina. In *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines*, edited by J. LLORENTE-BOUSQUETS & J. J. MORRONE (UNAM, México), pp. 509–550.
- MONTOYA-BURGOS, J. I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* **12**:1855–1867.
- MONTOYA-BURGOS, J. I., C. WEBER & P. Y. L. BAIL, 2002. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Revue Suisse de Zoologie* **190**(2):369–382.
- MORRONE, J., 1997. Biogeografía cladística: conceptos básicos. *Arbor* **158**:373–388.
- MORRONE, J., 2001. *Biogeografía de América Latina y el Caribe* (M and T?Manuales and Tesis SEA, Zaragoza).
- MORRONE, J., 2009. *Evolutionary biogeography: an integrative approach with case studies* (Columbia University Press, New York).
- MULLER, S. & C. WEBER, 1992. Les dents des sous-familles Hypostominae et Ancistrinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae) et leur valeur taxonomique. *Revue Suisse de Zoologie* **99**:747–754.

- NYLANDER, J., 2004. MrAIC.pl. Program Distributed by the Author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala*.
- NYLANDER, J. A., U. OLSSON, P. ALSTROM & I. SANMARTIN, 2008. Accounting for Phylogenetic Uncertainty in Biogeography: A Bayesian Approach to Dispersal-Vicariance Analysis of the Thrushes (Aves: *Turdus*). *Systematic Biology* **57**.
- PAGES, R. D. & E. C. HOLMES, 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach* (Blackwell Science, Glasgow).
- PATTON, J. L. & M. N. F. D. SILVA, 1998. Rivers, refuges and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In *Endless forms: species and speciation*, edited by S. BERLOCHER & D. HOWARD (Oxford University Press, New York), pp. 202–216.
- PATTON, J. L., M. N. F. D. SILVA & J. R. MALCOLM, 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution* **48**:1314–1323.
- POPOLIZIO, E., 1972. Geología del relieve de plataforma de la provincia de Misiones y zonas aledañas. In *Anales de la Sociedad Argentina de Estudios Geográficos*, edited by GÆA (Geological Society Special, Buenos Aires, Tomo XV,), pp. Cap 1–5.
- POPOLIZIO, E., 1980. Los antiguos cauces del río Paraná de Corrientes a Esquina. *Centro de Geociencias Aplicadas de la UNNE* **13**.
- POPOLIZIO, E., 1987. Estudio del Macrosistema Iberá. Cartografía Geomorfológica-Hidrográfica. *Geociencias* **18**.
- POPOLIZIO, E., 1999. El Paraná, un río y su historia geomorfológica. *Centro de Geociencias Aplicadas de la UNNE* **19**.
- POSADAS, P., M. A. GROSSI & E. ORTIZ-JAUREGUIZAR, 2013. Where is historical biogeography going? The evolution of the discipline in the first decade of the 21st century. *Progress in Physical Geography* **00**:1–20.
- POSADAS, P. & J. MORRONE, 2003. Biogeografía histórica de la familia Curculionidae (Coleoptera) en las subregiones Subantártica y Chilena Central. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **62**:75–84.

- QUÉROUIL, S., 2003. Interets et limites de l'approche moleculaire pour aborder la biogeographie et la speciation: l'exemple de quelques mammifères d'Afrique tropical. *B. Soc. Zoo. Fr.* **127**:359–370.
- REE, R. H., B. R. MOORE, C. O. WEBB & M. J. DONOGHUE, 2005. A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* **59**.
- REE, R. H. & S. A. SMITH, 2008. Maximum Likelihood Inference of Geographic Range Evolution by Dispersal, Local Extinction, and Cladogenesis. *Systematic Biology* **57**.
- REIS, R. E., S. O. KULLANDER & C. J. FERRARIS, 2003. Check list of freshwater fishes of South and Central America (Academia brasileira de ciencias, Porto Alegre), p. 729.
- REIS, R. E. & E. H. L. PEREIRA, 2000. Three New Species of the Loricariid Catfish Genus *Loricariichthys* (Teleostei: Siluriformes) from Southern South America. *Copeia* **4**:1029–1047.
- RENNO, J. F., P. BERREBI, T. BOUJARD & R. GUYOMARD, 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. *Journl of Fish Biology* **36**:85–95.
- RIBEIRO, A., 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* **4**:225–246.
- RIDDLE, B. R., M. N. DAWSON, E. A. HADLY, D. J. H. M. J. HICKERSON, S. J. MANTOOTH & A. D. YODER, 2008. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography* **32**:173–202.
- RODRIGUEZ, M. & R. REIS, 2008. Taxonomic review of *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from the Laguna dos Patos drainage, Southern Brazil, with the descriptions of two new species and the recognition of two Species Groups. *Copeia* **9**:1077–1085.
- RODRIGUEZ, M. S., 2003. *Sistemática y distribución geográfica de peces de la familia Loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes) de la Argentina con especial referencia a la tribu Loricariini* (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata).

- RONQUIST, F., 1997. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* **46**:195–203.
- RONQUIST, F. & J. P. HUELSENBECK, 2003. MRBAYES 3: Bayesian inference of phylogeny under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572–1574.
- ROXO, F., C. ZAWADZKI, M. ALEXANDROU, G. C. SILVA, M. CHIACHIO, F. FORESTI & C. OLIVEIRA, 2012. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution* **2**.
- SANMARTIN, I., P. V. MARK & F. RONQUIST, 2008. Inferring dispersal: a Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *Journal of Biogeography* **35**:428–449.
- SCHAEFER, S. A., 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae). In *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, edited by L. R. MALABARBA, R. E. REIS, R. P. VARI, Z. M. LUCENA & L. C. A. S. (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 375–400.
- SIVASUNDAR, A., E. BERMINGHAM & G. ORTÍ, 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* **10**:407–417.
- VERA-ALCARAZ, H. S., C. S. PAVANELLI & C. H. ZAWADZKI, 2012. Taxonomic revision of the *Rineloricaria* species (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraguay River basin. *Copeia* **2**:333–349.
- WARD, R. D., 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* **9**:1077–1085.
- WEBER, C., 2003. Subfamily Hypostominae. In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, edited by R. E. REIS, S. O. KULLANDER & C. J. F. JR (Edipucrs, Porto Alegre, Brasil), pp. 351–372.
- WILEY, E. O., 1987. Methods in vicariance biogeography. *Journal of Biogeography* **28**:345–358.

- YANG, Y. S. & S. M. STRITTMATTER, 2007. The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biology* **8**:234.1–234.10.
- YU, Y., A. J. HARRIS & X. HE, 2013. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *PLOS One* **0**:00.
- ZAWADZKI, C. H., E. RENESTO, S. DE PAIVA & M. C. S. LARA-KAMEI, 2004. Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* **121**:251–257.