

Abordajes moleculares en la **conservación** de peces anuales Sudamericanos

Dra. Verónica Gutiérrez

Contenido

1. Introducción a los Peces Anuales
2. Peces Anuales Sudamericanos
3. Abordajes genéticos
4. Abordajes genómicos
5. Abordajes transcriptómicos

1. Introducción a los Peces Anuales

¿Qué son los peces anuales?

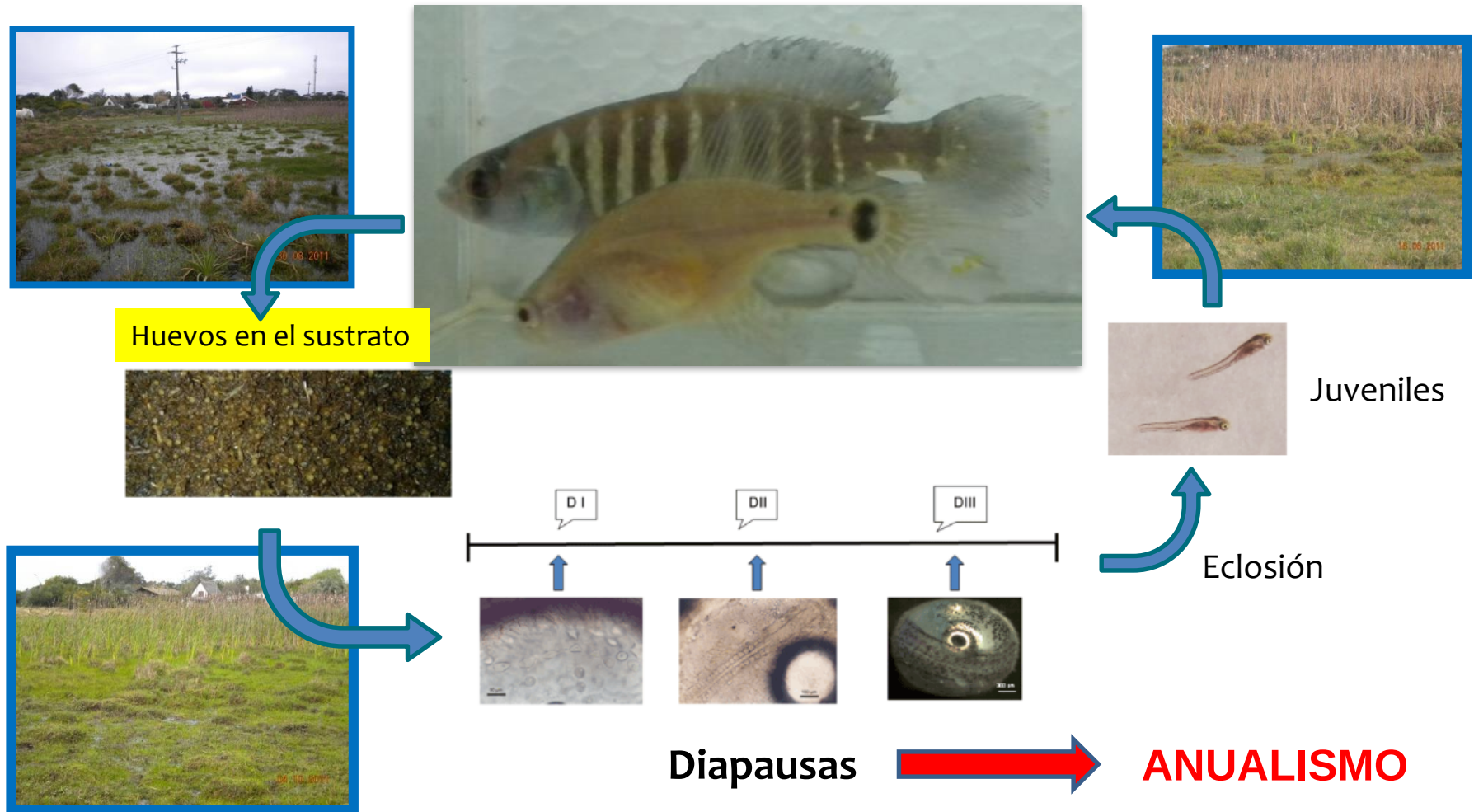


Garcialebias charrua (macho adulto)



Garcialebias charrua (macho y hembra adultos)

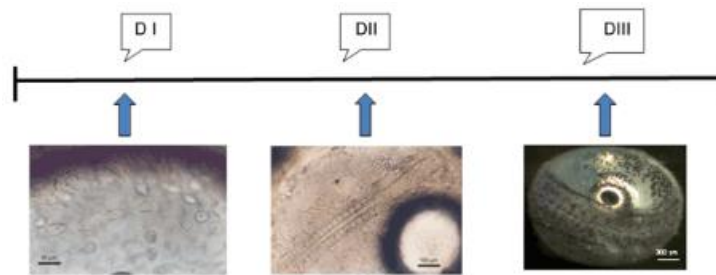
1. Introducción a los Peces Anuales: Ciclo de vida (< 1 año)



Fotos: charco ubicado en el balneario "La Coronilla" (Dpto. Rocha, Uruguay)

1. Introducción a los Peces Anuales: Diapausas

- Estado de desarrollo **suspendido**.
- Es una **adaptación evolutiva** clave que les permite sobrevivir en hábitats temporales.
- Los peces anuales pueden experimentar hasta **3 fases de diapausa**:
 - Son de duración variable
 - Pueden ocurrir o no



Diapausa I:

- Poco después de la fertilización.
- En las primeras divisiones celulares del embrión.
- En algunas especies, es **opcional**.

Diapausa II:

- Fase más avanzada del desarrollo (embrión con estructura más definida)
- Es la fase más importante y prolongada,
- Se mantiene hasta que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables.

Diapausa III:

- Justo antes de la eclosión del embrión.
- Puede ayudar a sincronizar la eclosión con la llegada de lluvias.
- Es más común en especies que habitan ambientes extremadamente impredecibles.

1. Introducción a los Peces Anuales: Hábitat (charcos temporales)

Charcos temporales de **agua dulce**



Primavera - verano



Otoño -invierno



Charco ubicado en el balneario “La Coronilla” (Dpto. Rocha, Uruguay)

Los peces anuales son organismos extremófilos

1. Introducción a los Peces Anuales: Hábitat (charcos temporales)



- Son ecosistemas únicos y dinámicos
- Son extremadamente frágiles

CARACTERÍSTICAS

- Estacionales (lleno / seco)
- Baja profundidad
- Alta productividad biológica (nutrientes)
- Aislamiento geográfico
- Condiciones variables (Temp, O₂, salinidad)

1. Introducción a los Peces Anuales: Hábitat (charcos temporales)



FACTORES de AMENAZA

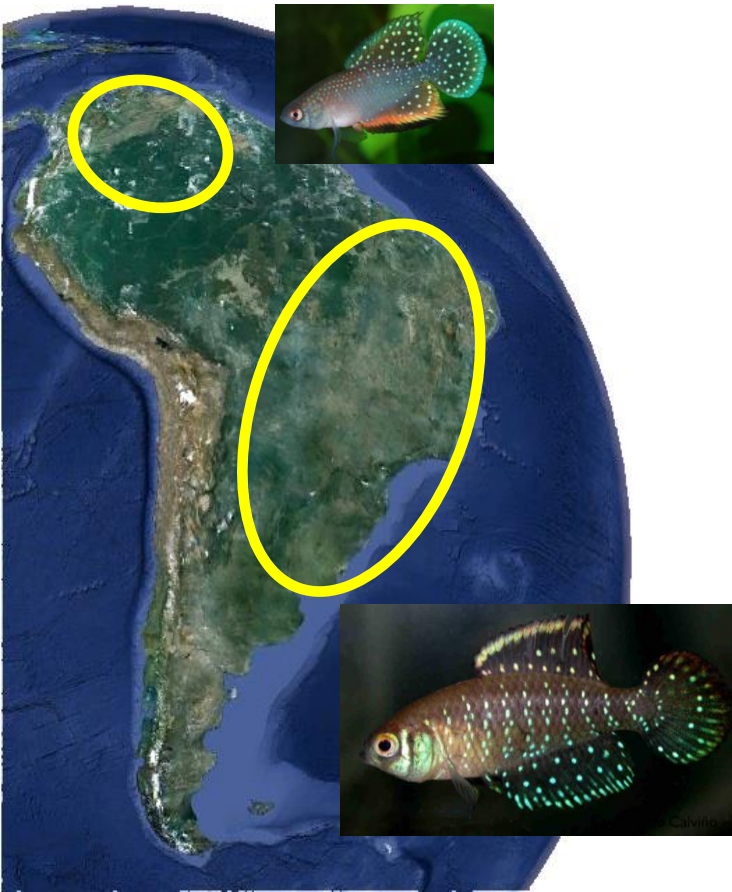
- Cambio climático (sequías prolongadas)
- Contaminación (agroquímicos)
- Especies invasoras
- **Pérdida de hábitats** (agricultura, ganadería o urbanización)

Enero 2024



2. Peces Anuales Sudamericanos

- Familia **Rivulidae**
- Endémica de **Sudamérica**
- Géneros: **49**
- **Especies : 458** (no todas anuales)



Géneros de peces anuales sudamericanos:

1. *Austrolebias* (Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay y Bolivia)
2. *Cynopoecilus* (Sur de Brasil y Uruguay)
3. *Austrofundulus* (Venezuela y Colombia)
4. *Hypsolebias* (Brasil)
5. *Neofundulus* (Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay)
6. *Papiliolebias* (Argentina)
7. *Plesiolebias* (Brasil y Bolivia)
8. *Pterolebias* (Argentina)
9. *Simpsonichthys* (Brasil)
10. *Stenolebias* (Brasil)
11. *Trigonectes* (Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay)

2. Peces Anuales Sudamericanos

2023

Zoological Journal of the Linnean Society, 2023, XX, 1–30
https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad032
Advance access publication 10 July 2023
Original Article

OXFORD

Original Article

From the mud to the tree: phylogeny of *Austrolebias* killifishes, new generic structure and description of a new species (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

Felipe Alonso^{1,2,*,†}, Guillermo Enrique Terán^{2,3,4,†},

Wilson Sebastián Serra Alanís^{2,4,5,†}, Pablo Calviño^{2,6}, Martín Miguel Montes^{2,6},

Ignacio Daniel García^{2,7}, Jorge Adrián Barneche^{2,6}, Adriana Almirón⁸, Liliana Ciotek⁹,

Pablo Giorgis⁹, Jorge Casciotta⁸

¹Instituto de Bio y Geociencias del NOA (IBIGEO), National Scientific and Technical Research Council (CONICET)-UNSA, Av. 9 de Julio 14, A4405BBA Rosario de Lerma, Salta, Argentina

²Killifish Foundation, La Plata, Buenos Aires Province, Argentina

³Fundación Miguel Lillo – Unidad Ejecutora Lillo (CONICET), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Tucumán Province, Argentina

⁴Sección Ictiología, Departamento de Zoología, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

⁵Centro Universitario Regional del Este (CURE) Sede Rocha, Rocha, Uruguay

⁶Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores – [CCT-CONICET – La Plata] Centro Científico Tecnológico Conicet, La Plata – [Conicet] Consejo Nacional De Investigaciones Científicas y Técnicas, La Plata, Buenos Aires Province, Argentina

⁷Instituto de Limnología 'Dr. Raúl Ringuete' (ILPLA)–UNLP–CONICET, La Plata, Buenos Aires Province, Argentina

⁸Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, División Zoología Vertebrados, La Plata, Buenos Aires Province, Argentina

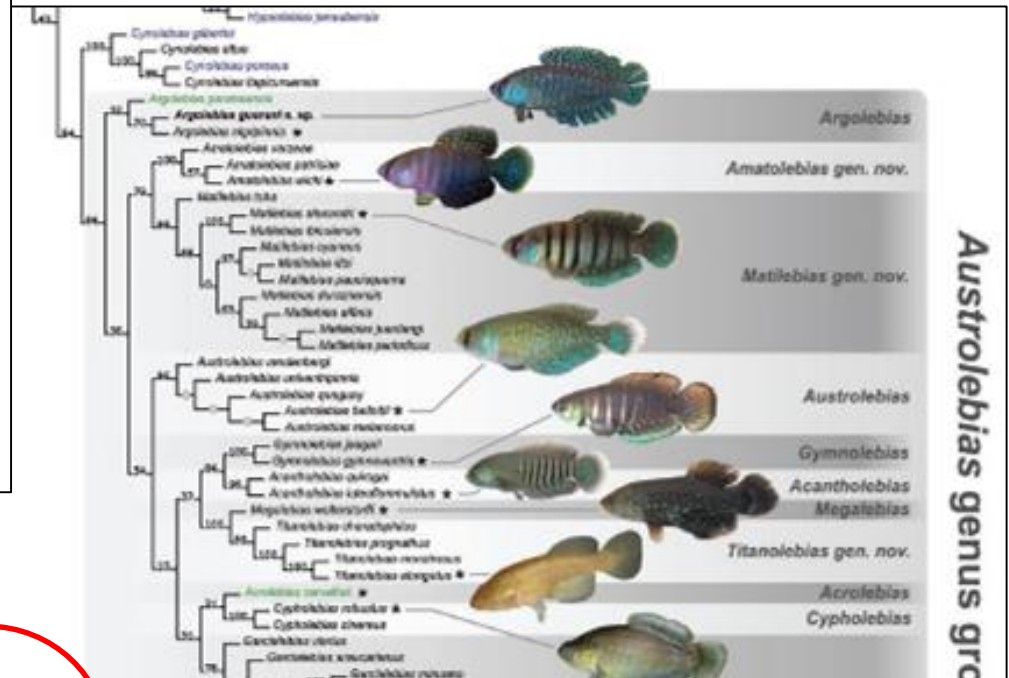
⁹Administración de Parques Nacionales, Parque Nacional Campos del Tuyú (7103), General Lavalle, Buenos Aires Province, Argentina

Grupo de géneros *Austrolebias*

~ 61 especies

11 géneros

45



Lista Roja de la UICN



Figure 1. Phylogenetic mitochondrial markers under implied weightin data analysed for the ta molecular markers: orange, only one molecular marker; - 1 vote species of the genus.

2. Peces Anuales Sudamericanos

Dimorfismo sexual



Garcialebias charrua

Los machos:

- Presentan colores brillantes
- Generalmente, son de mayor tamaño que las hembras

Las hembras:

- Colores más opaco (patrones marrones o grises)
- En algunas especies, presentan manchas dispersas



Argolebias nigripinnis

Foto tomada de *Alonso et al. (2023)*

2. Peces Anuales Sudamericanos

Diversidad morfológica

Gran tamaño



Titanolebias prognathus
(12 cm)



Titanolebias elongatus
(22 cm)

Titanolebias elongatus:

- Endémico de la porción sur de la región pampeana (Argentina)
- Es el pez anual **más grande** del mundo

Tamaño medio



Cypholebias vazferreirai
(10 cm)



Matilebias alexandri
(9 cm)

Tamaño pequeño



Matilebias affinis
(5 cm)



Garcialebias arachan
(4.4 cm)

2. Peces Anuales Sudamericanos

Varias especies son **simpátricas** y **sintópicas** o habitan áreas adyacentes.



Garcialebias charrua



Acantholebias luteoflammulatus

2 charcos ubicados en el balneario “La Coronilla” (Dpto. Rocha) separados por la calle principal.



3. Abordajes genéticos

Variabilidad cariotípica

García et al. (1993, 1995)

Intra-específica

Austrolebias affinis

(♀) $2n = 48$ y NF = 52

(♀) $2n = 49$ y NF = 53

Inter-específica

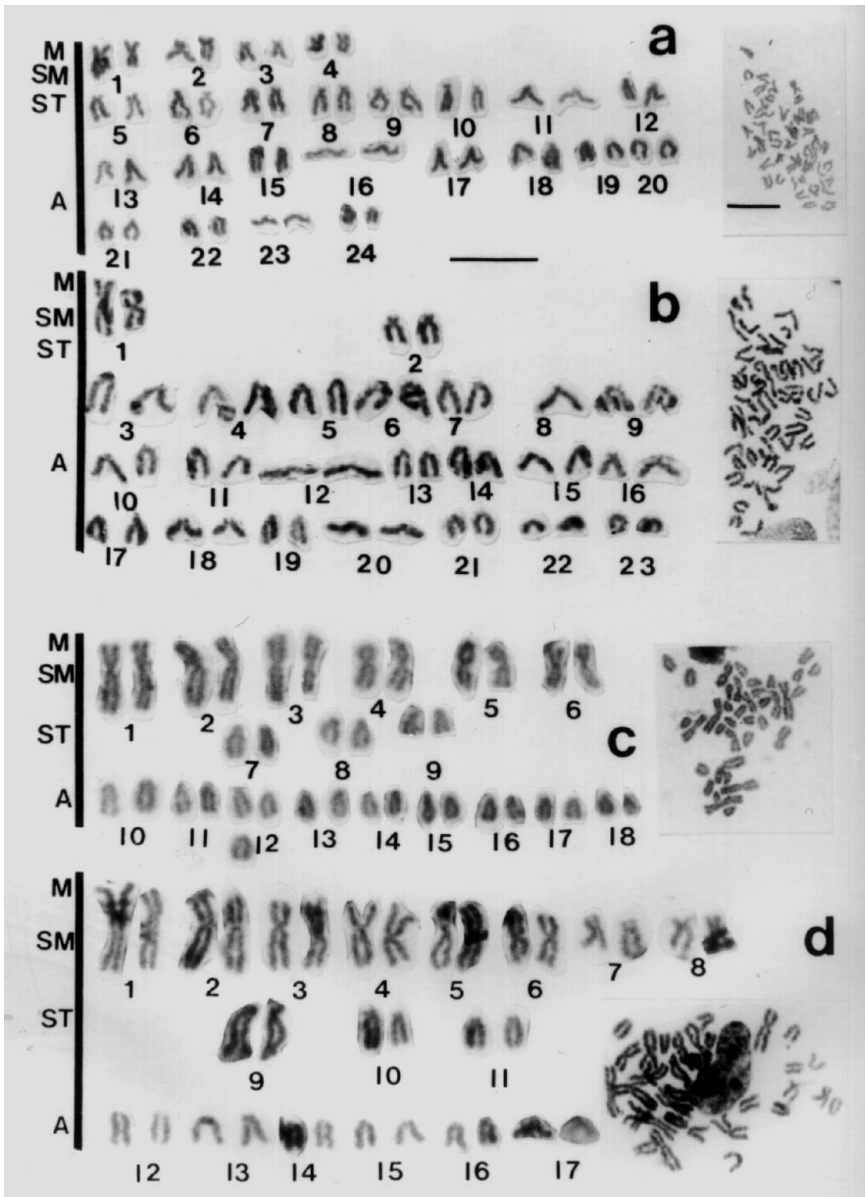
Austrolebias luteoflammulatus

$2n = 34$ y NF = 48

Austrolebias nigripinnis

$2n = 48$ y NF = 80

La evolución cromosómica puede haber jugado un papel importante en la **diversificación del género**



A. nigripinnis

A. viarius

A. prognathus

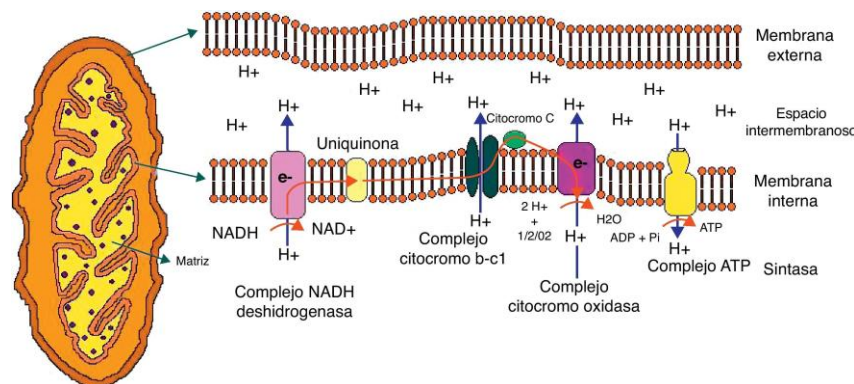
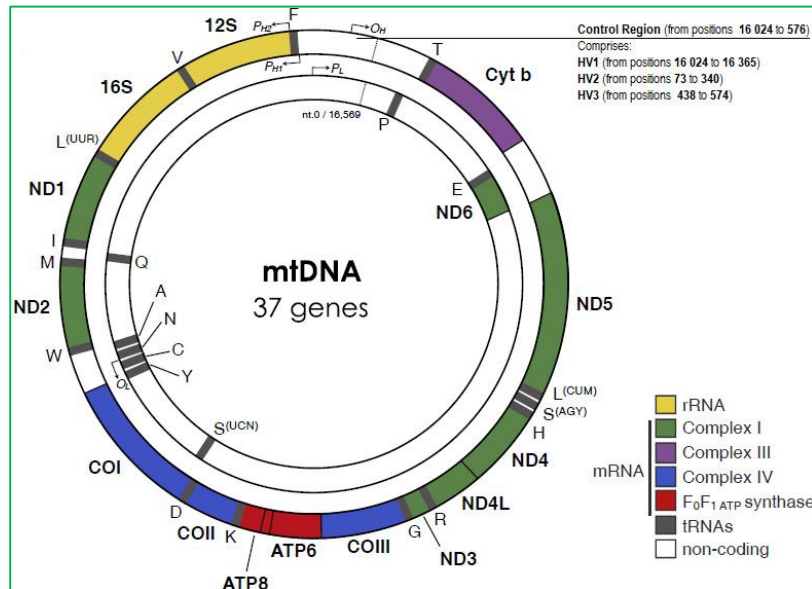
A. luteoflammulatus

3. Abordajes genéticos

ADN mitocondrial (ADNmt)

1990 – 2000

- Las secuencias del **gen citocromo b (cyt-b)** contienen **señales filogenéticas** en muchos niveles taxonómicos diferentes en numerosos taxa (incluidos los peces)
- Las secuencias del cyt-b se han utilizado ampliamente como un «**reloj molecular**» para estimar la cronología de la **especiación** en varios taxa.



Se sabía relativamente poco sobre las relaciones entre las especies de *Cynolebias*

Cynolebias → *Austrolebias* → grupo de géneros *Austrolebias*

3. Abordajes genéticos

2000

Zoological Journal of the Linnean Society (2000), 129: 93–110. With 6 figures

doi:10.1006/zjls.1999.0202, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®



High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

GRACIELA GARCÍA^{1*}, GABRIELA WLASIUK^{1,2} AND ENRIQUE P. LESSA²

¹Sección Genética Evolutiva and ²Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Igua 4225, Montevideo 11400, Uruguay

Publicaron un análisis inicial de las **relaciones filogenéticas** dentro del género *Cynolebias*

- Individuos de **13 especies diferentes**
- Charcos temporales de **Uruguay** y el sur de **Brasil**
- Gen *cyt-b* **(324 pb)**

• Extracción de ADN | PCR en tiempo final | Secuenciación

Las secuencias se obtuvieron mediante **secuenciación directa de productos de PCR** con cebadores marcados en el extremo (**³³P-dATP**) (Método Sanger)

Análisis de las secuencias

- Alineamiento
- Estimaciones pareadas de la **divergencia** de las secuencias mediante el algoritmo de Kimura dos-parámetros (1980), implementado en **MEGA versión 1.01** (Kumar et al., 1993).

Análisis filogenético

Análisis filogenéticos: (1) unión de vecinos (NJ) ; (2) Máxima Parsimonia.

3. Abordajes genéticos

2000

Análisis de las secuencias (cyt-b)



- Las secuencias muestran una variación sustancial.
- Entre las 14 secuencias de *Cynolebias*: $140/324 =$ variables ($\sim 43\%$)
- 72 % de las sustituciones se producen en la tercera base de los codones
- No hay deleciones ni inserciones
- Las secuencias se traducen correctamente a una cadena de 108 aminoácidos (20 aminoácidos son variables entre las secuencias)

3. Abordajes genéticos

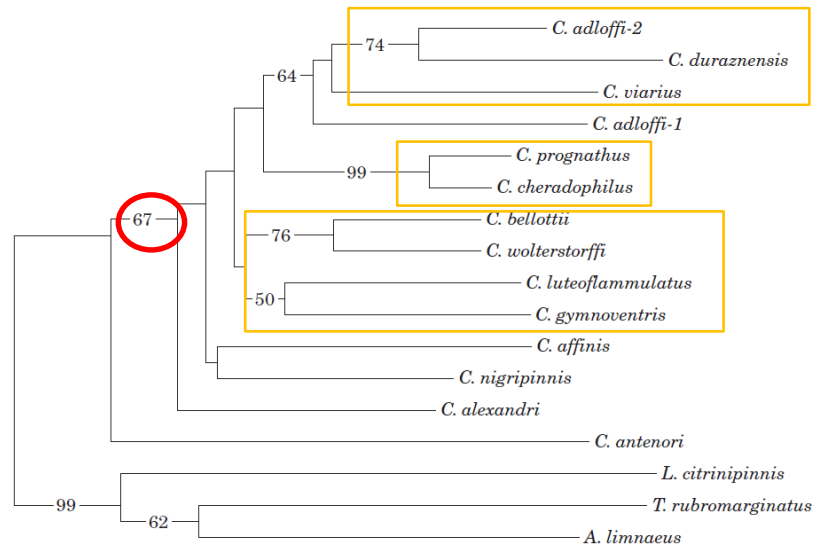
2000

Análisis filogenéticos (cyt-b)

Unión de vecinos (NJ)

Bootstrap con 100 réplicas

Unidades monofiléticas



Scale: each – is approximately equal to the distance of 0.003204

Figure 3. Phylogenetic tree constructed with the Neighbour-joining method from Kimura two-parameter distances of 14 ingroup taxa of the genus *Cynolebias* and three Rivulidae outgroups (*Leptolebias*, *Austrofundulus*, *Trigonectes*). Bootstrap values above 50% are shown on the relevant branches.

Máxima Parsimonia (MP)

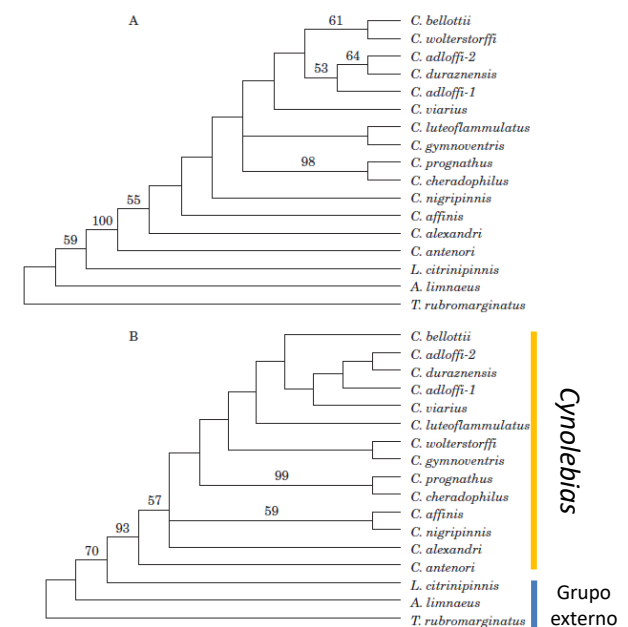


Figure 4. Phylogenetic relationships among 14 species of the genus *Cynolebias* and three Rivulidae outgroups (*Leptolebias*, *Austrofundulus*, *Trigonectes*), as inferred by parsimony heuristic searches with different weighting schemes. A, unweighted analysis: a most parsimonious consensus of two trees, 516 steps. B, weighted analysis: consensus of two shorter trees of 1234 steps. Bootstrap values above 50% are shown on the corresponding branches.

3. Abordajes genéticos

2002

Biological Journal of the Linnean Society, 2002, **76**, 49–59. With 6 figures

Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

G. GARCÍA^{1*}, F. ALVAREZ-VALIN² and N. GOMEZ³

¹Sección Genética Evolutiva and

²Biomatemáticas, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay

³Naos Laboratories, Smithsonian Tropical Research Institute, Republic of Panama

Reconstrucción filogenética
con 3 genes mitocondriales
(*cyt-b*; ARNr 12S; ARNr 16S)

En 1998...

PHYLOGENY AND CLASSIFICATION OF RIVULIDAE REVISITED: ORIGIN AND EVOLUTION OF ANNUALISM AND MINIATURIZATION IN RIVULID FISHES (CYPRINODONTIFORMES: APLOCHEILOIDEI)

Wilson J.E.M. Costa

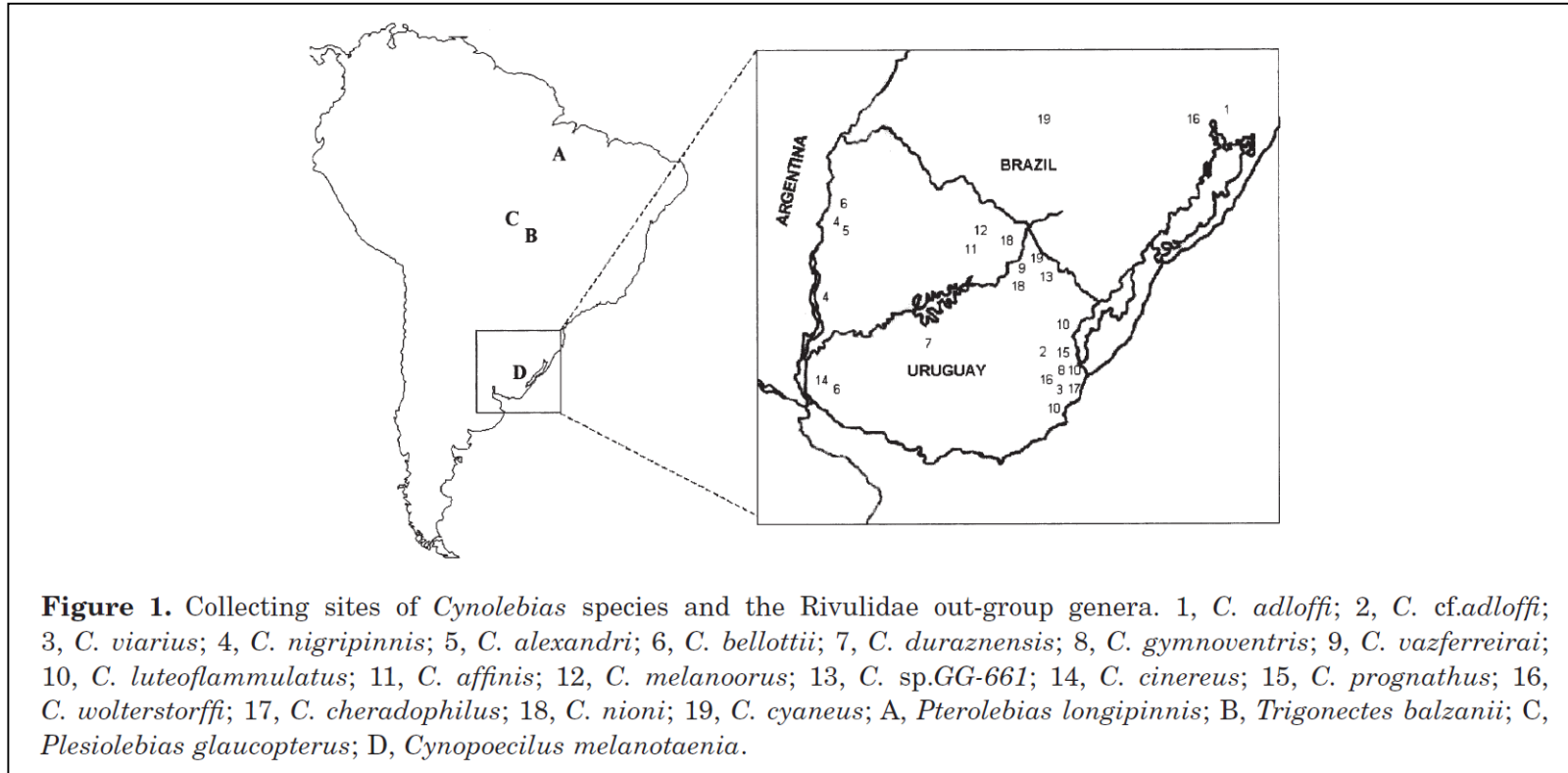
Lab. Ictiologia Geral e Aplicada, Departamento de Zoologia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Cx. Postal 68049,
21944-970 Rio de Janeiro RJ, BRAZIL. E-mail: wcosta@acd.ufrj.br

Basándose en el análisis
morfológico filogenético,
propuso dos nuevos
géneros, *Megalebias* y
Austrolebias,
que abarcan 29 especies
previamente clasificadas
como *Cynolebias*

3. Abordajes genéticos

2002

- TOTAL= 54 especímenes
- 19 especies descritas y no descritas de *Cynolebias* (3 *Megalebias* y 16 *Austrolebias*)



3. Abordajes genéticos

2002

Unión de vecinos (NJ) + Máxima Verosimilitud (ML)

Bootstrap con 500 réplicas

2 linajes monofiléticos principales

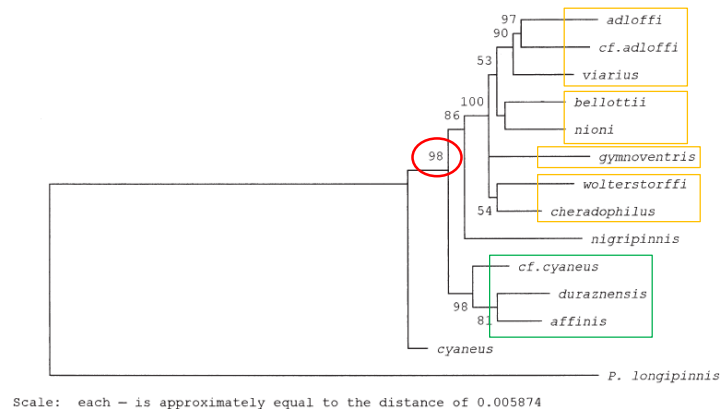


Figure 4. Rooted phylogenetic tree built by the neighbour-joining method from the pairwise distances estimated by the Kimura two-parameter model, using Ts + Tv substitutions in multisequence dataset with 13 ingroup taxa of the genus *Cynolebias*. *Pterolebias longipinnis* was used as an out-group Rivulidae genus. Bootstrap values above 50% are shown at the relevant nodes.

Análisis filogenéticos (*cyt-b* + ARNr 12S + ARNr 16S)

Máxima Parsimonia (MP)

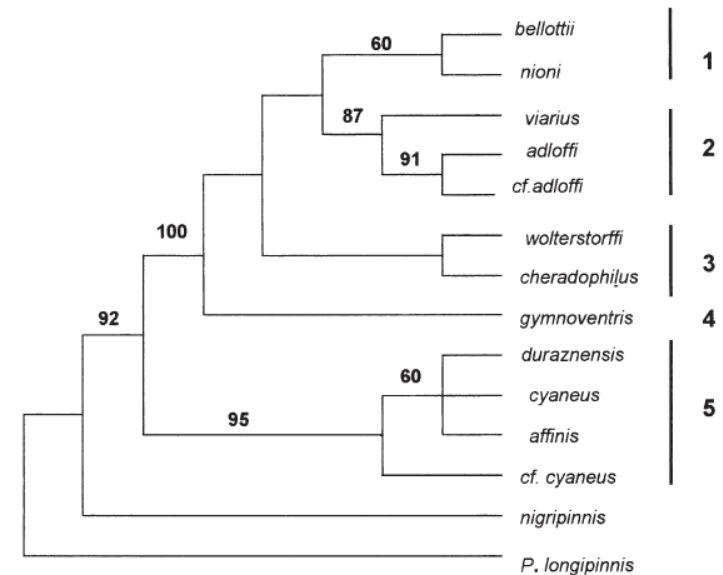


Figure 5. Phylogenetic relationships among 13 species of the genus *Cynolebias*, and one Rivulidae out-group taxon (*Pterolebias longipinnis*), revealed by heuristic searches in unweighted analysis: a most parsimonious consensus (50% majority rule) between two shortest trees of 2035 steps. Bootstrap values above 50% are shown on the relevant nodes.

Topologías similares!!

3. Abordajes genéticos

2002

Análisis filogenéticos (SOLO *cyt-b*)

RELACIONES DENTRO DE LA FAMILIA RIVULIDAE

Máxima Parsimonia (MP)

La **baja resolución filogenética** entre los géneros Rivulidae podría deberse (en parte) a **niveles muy altos de divergencia** nucleotídica

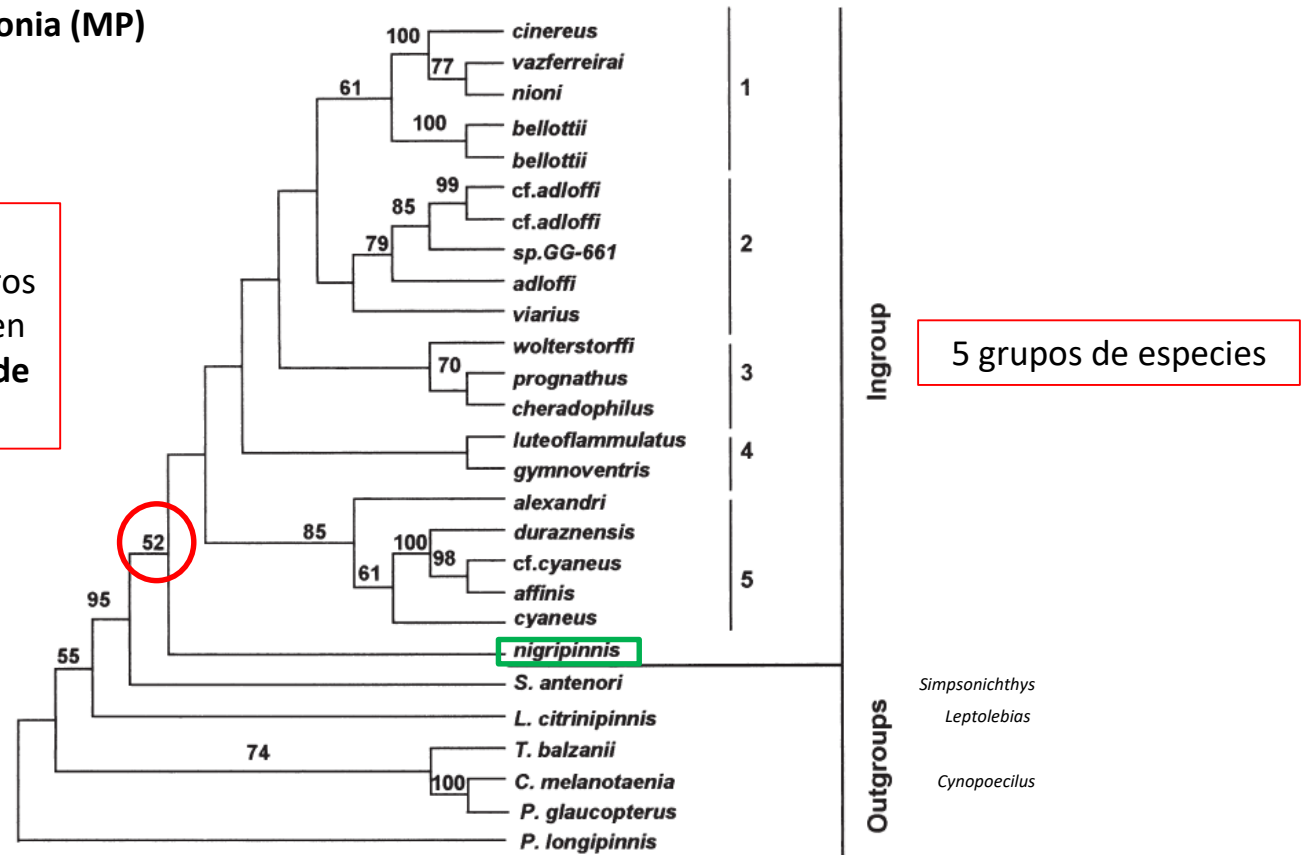


Figure 6. Phylogenetic relationships based on the *cyt-b* 27-taxa dataset revealed by heuristic searches in unweighted analysis: one shortest tree, L = 1698, CI = 0.548, RI = 0.574. Bootstrap values above 50% are shown on the relevant nodes.

3. Abordajes genéticos

2004

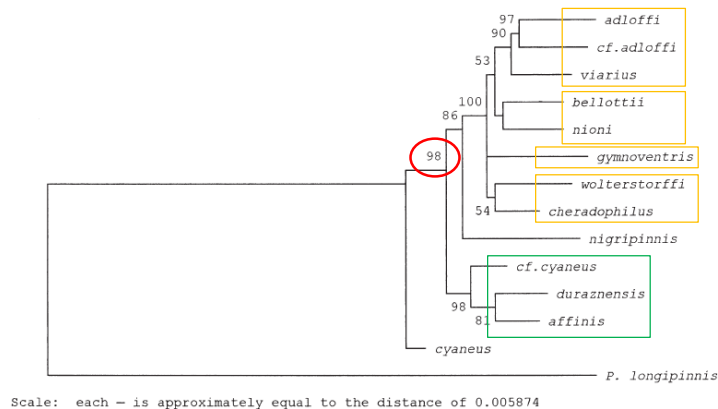
Diferenciación genética
entre especies en el sitio
de **Reserva de Biosfera de
Uruguay (Bañados del
Este)**

Environmental Biology of Fishes **70**: 247–256, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

**Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias*
(Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay**

Graciela García, Santiago Claramunt & Ana Inés Lalanne
*Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR, Iguá 4225, CP 11400,
Montevideo, Uruguay (e-mail: ggarcia@fcien.edu.uy)*

En 2002...



Clado bien consolidado compuesto por tres taxones
distribuidos parapatricamente en el sureste de
Uruguay:

- *Cynolebias adloffii* (Porto Alegre, Brasil)
- *C. cf. adloffii*
- *Cynolebias viarius*

Figure 4. Rooted phylogenetic tree built by the neighbour-joining method from the pairwise distances estimated using the Kimura two-parameter model, using Ts + Tv substitutions in multisequence dataset with 13 ingroup taxa of the genus *Cynolebias*. *Pterolebias longipinnis* was used as an out-group Rivulidae genus. Bootstrap values above 50% are shown on the relevant nodes.

3. Abordajes genéticos

2004



Home Quienes Somos Baña



Figure 1. Collecting sites of *Cynolebias* species from 'Baños del Este' Biosphere Reserve in southeastern Uruguay. Numbers in circles refers to the pond's number mentioned in the text. The localities for each taxon and group are as follow. Goup 1, *C. viarius*: ponds no.1, 4, 11, 23 and 49. Group 2, *C. adloff* from Porto Alegre city in Rio Grande do Sul, Brazil: PG ('Ponte Gravata') and BR ('BR 290'). Group 3, *C. cf. adloff* from southern 'Baños del Este': ponds no. 6, 8, 26, 28, 32, 37, 44 and 50. Group 4, *C. cf. adloff* from northern 'Baños del Este': ponds no. 54, 55, 43 and 42. *C. nigrofasciatus* at Rio Grande do Sul near the Uruguayan frontier: pond RG.

20 charcos

- *C. cf. adloff*
- *Cynolebias viarius*

C. adloff (Porto Alegre) DONADOS

3. Abordajes genéticos

2004

- **RAPD:** 18 cebadores y 6 de ellos (OPA01, 04, 10, 15, 18 y 19) mostraron patrones de bandas claros.

Análisis de datos

- Matriz de distancias
- Fenograma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
- Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (MDS).
- AMOVA: cada taxón (*C. viarius*, *C. cf. adloffi* y *C. adloffi*) se asignó a diferentes grupos y subregiones



Figure 1. Collecting sites of *Cynolebias* species from 'Baños del Este' Biosphere Reserve in southeastern Uruguay. Numbers in circles refers to the pond's number mentioned in the text. The localities for each taxon and group are as follow. Group 1, *C. viarius*: ponds no.1, 4, 11, 23 and 49. Group 2, *C. adloffi* from Porto Alegre city in Rio Grande do Sul, Brazil: PG ('Puente Gravata') and BR ('BR 290'). Group 3, *C. cf. adloffi* from southern 'Baños del Este': ponds no. 6, 8, 26, 28, 32, 37, 44 and 50. Group 4, *C. cf. adloffi* from northern 'Baños del Este': ponds no. 54, 55, 43 and 42. *C. nigrofasciatus* at Rio Grande do Sul near the Uruguayan frontier: pond RG.

3. Abordajes genéticos

2004

RAPD

- 54 individuos
- 61 bandas claramente polimórficas
- Ningún individuo de la muestra fue idéntico a otro

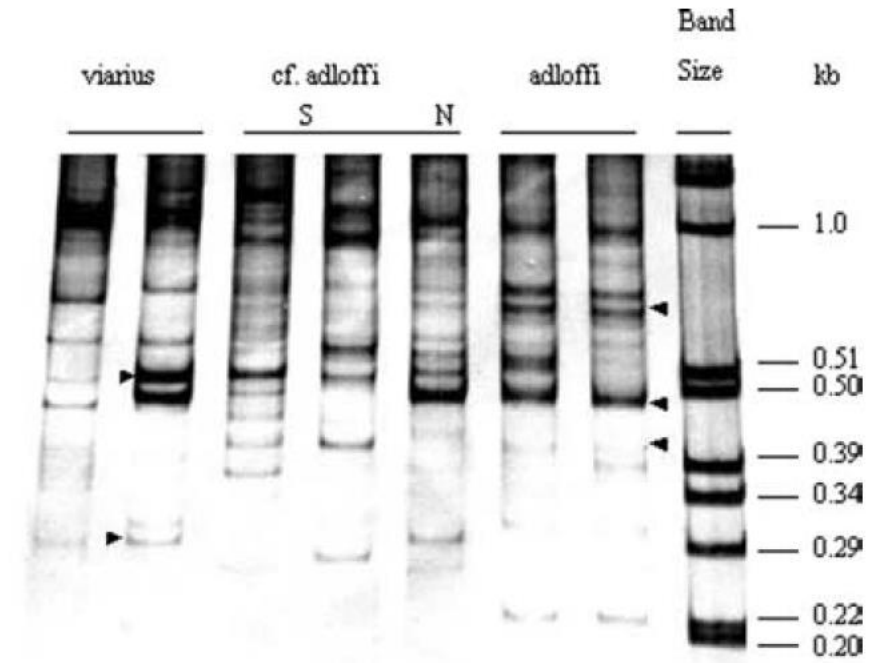


Figure 2. Electrophoretogram of one typical dominant RAPD products obtained from the OPA-15 primer in individuals belonging to three taxa analyzed. Left arrowheads indicate the variable bands shared by individuals of *C. viarius* and *C. cf. adloffi* (from N and S) Right arrowheads indicate the variable bands shared by individuals of *C. adloffi* and *C. cf. adloffi*. Lane 8 shows the band profile of the molecular weight marker, 1 kb DNA ladder.

3. Abordajes genéticos

2004

Fenograma UPGMA

(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

3 grupos principales:

C. viarius (1)

C. adloffi (PA) (2)

C. cf. adloffi (3 y 4)

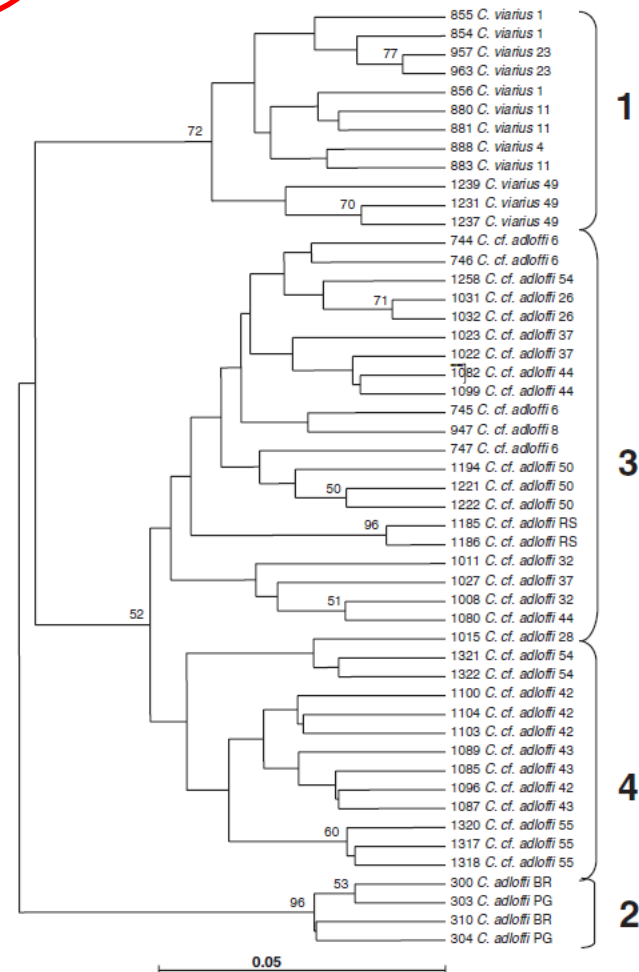


Figure 4. UPGMA phenogram of Nei and Li (1979) genetic distances for 50 individuals of *C. viarius* and *C. cf. adloffi* from 'Baños del Este' (Uruguay) and *C. adloffi* and *C. nigrofasciatus* from Rio Grande do Sul (Brazil). Number above branches are bootstrap values greater than 50%. Each individual is identified in the tree by its catalog number, followed by the corresponding taxon and the number of the pond as shown in Figure 1.

3. Abordajes genéticos

2006

Complejo de especies *Cynolebias adloffi* del sitio de Reserva de Biosfera de Uruguay (Bañados del Este)

© 2006 The Author
Journal compilation © 2006 Blackwell Verlag, Berlin

Accepted on 22 September 2005
JZS doi: 10.1111/j.1439-0469.2005.00346.x

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay

Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffi* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data

G. GARCÍA



Fig. 1. Collecting sites of *Cynolebias* species in the 'Bañados del Este' Biosphere Reserve Site (Insert: grey-shaded rectangular area) in Uruguay, the Atlantic southeastern wetlands. In the map the grey-shaded areas around rivers and coastal lagoons in the detailed map correspond to the Atlantic coastal wetlands. Numbers in circles refer to the pond's (CH) number mentioned in the text. The Uruguayan localities for each taxon are as follows: *C. viarius*, ponds 1, 4, 11, 23 and 49; *C. charrua*, ponds 6, 8, 26, 28, 32, 33, 37, 44, 50 and 54 from southern 'Bañados del Este', Rocha; *C. reicherti*, ponds 42, 43 and 55 from northern 'Bañados del Este', Rocha; *C. arachan*, pond PM ('Parque Municipal Melo') Cerro Largo from northeastern Uruguay. The Brazilian sites for each taxon are as follows: *C. nigrofasciatus*, pond RG Rio Grande do Sul, close to Uruguayan border; *C. adloffi*, ponds PG ('Puente Gravataí') and BR ('BR 290') Porto Alegre city, Rio Grande do Sul

***Cynolebias charrua*, ha sido considerado como un complejo de intergradación de poblaciones entre *C. adloffi* y *C. viarius* al mostrar altos niveles de variabilidad morfológica.**

- Total de 58 individuos
- 22 charcos

Especies:

- *C. viarius*
- *C. reicherti*
- *C. arachan*
- *C. charrua*
- *C. adloffi* (RG, Brasil)
- *C. nigrofasciatus* (RG, Brasil)

3. Abordajes genéticos

2006

Máxima Parsimonia (MP)

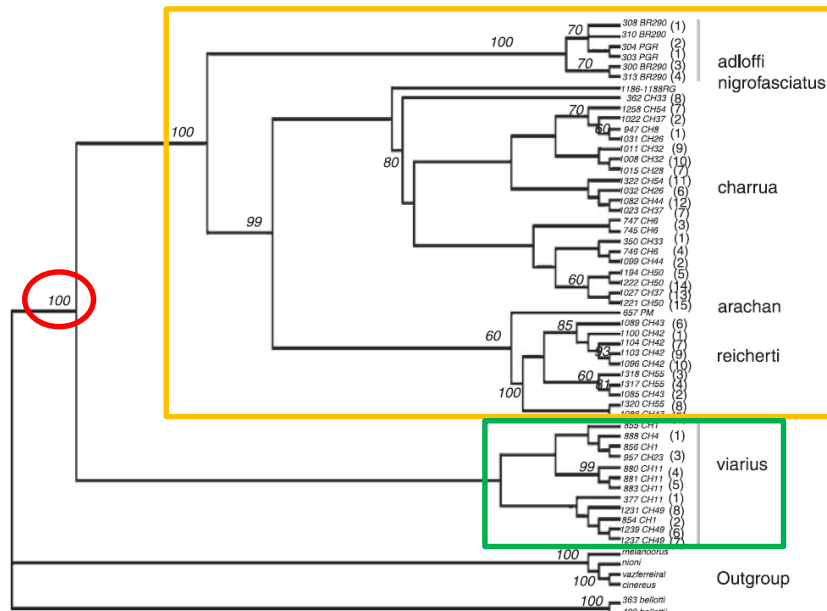


Fig. 2. Strict consensus of 74 258 most parsimonious trees (length = 1056) generated with 63 *cyt b* sequences belonging to individuals of *C. viarius*, *C. charrua*, *C. reicherti* and *C. arachan* from 'Bañados del Este' (Uruguay); *C. adloffii* and *C. nigrofasciatus* from Rio Grande do Sul (Brazil) and taxa of the *C. bellottii* complex from western and northeastern Uruguay. Number above branches is bootstrap values greater than 50%. Each individual of the *C. adloffii* species complex and *C. viarius* is identified in the tree by its catalogue number, followed by the corresponding number of the pond as shown in Fig. 1. Numbers of the corresponding haplotype have been included in brackets

Máxima Verosimilitud (ML)

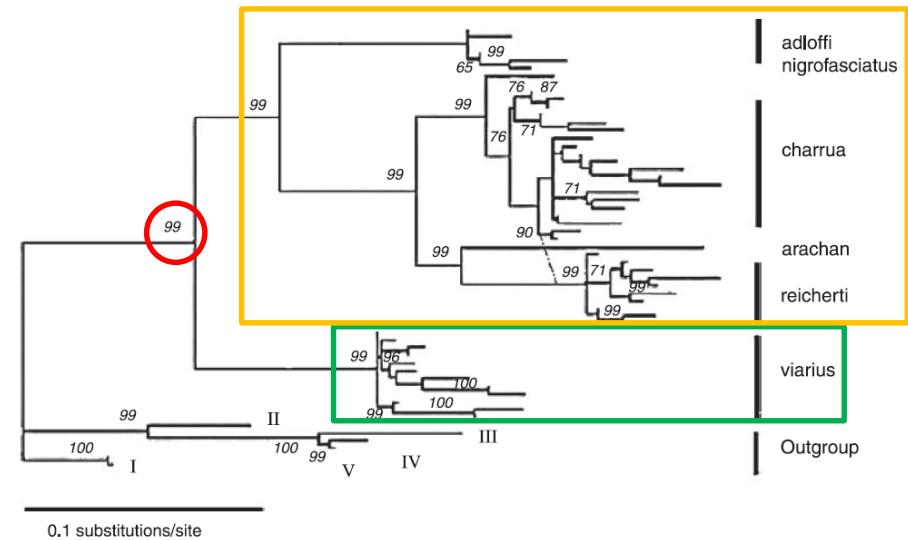


Fig. 3. Maximum likelihood analyses [general time-reversible model with gamma correction (GTR + G + I)], based on *cyt b* haplotypes of the *C. adloffii* species complex, *C. viarius* and the outgroup composed by taxa belonging to the *C. bellottii* complex: (I) *C. bellottii* from western Uruguay, (II) *C. melanoorus* from northeastern Uruguay, (III) *C. cinereus* from southwestern Uruguay, (IV) *C. nioni* and (V) *C. vazferreirai* from northeastern Uruguay. Numbers above the branches represent values from Bayesian inference obtained with the MRBAYES program. They represent the posterior probability that the clade is true. Reticulate events are indicated by dashed lines

C. viarius se consolida como el taxón hermano y basal del complejo de especies *C. adloffii*

3. Abordajes genéticos

2006

Laguna Merín

(a) $2n = 48$, **NF = 50**, (M–SM) = 2, (ST–A) = 46

(b) $2n = 48$, **NF = 52**, (M–SM) = 4, (ST–A) = 44

(c) $2n = 48$, **NF = 54**, (M–SM) = 6, (ST–A) = 42

Laguna Negra

(d) $2n = 48$, **NF = 56**, (M–SM) = 8, (ST–A) = 40

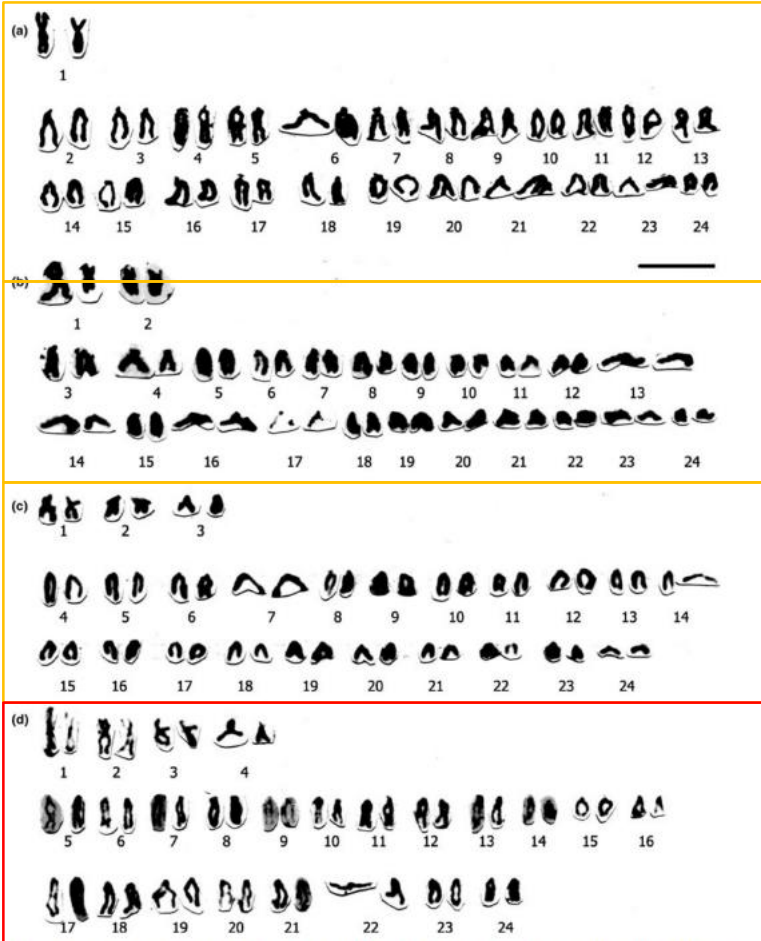


Fig. 5. Cariotipos de *C. charrua* de Laguna Merín (a-c) y Laguna Negra (d) en los humedales costeros del Atlántico (Uruguay). Citotipo (a) $2n = 48$, NF = 50, (M–SM) = 2, (ST–A) = 46; citotipo (b) $2n = 48$, NF = 52, (M–SM) = 4, (ST–A) = 44; citotipo (c) $2n = 48$, NF = 54, (M–SM) = 6, (ST–A) = 42; citotipo (d) $2n = 48$, NF = 56, (M–SM) = 8, (ST–A) = 40. Barra = 10 μ m.

La metapoblación podría representar las unidades de manejo en estos peces en peligro de extinción y las poblaciones de *C. charrua* de la cuenca de Laguna Merin podrían incluirse en un programa de conservación de alta prioridad

3. Abordajes genéticos

2020

Caracterizar los límites de
2 especies en la zona híbrida
en la **Reserva de la Biosfera y**
Sitios Ramsar

Microsatélites

Hydrobiologia

<https://doi.org/10.1007/s10750-019-04104-0>

PRIMARY RESEARCH PAPER

Characterization of a hybrid zone between two annual killifish genus *Austrolebias* from the Biosphere Reserve and Ramsar Sites in South America

Graciela García  · Verónica Gutiérrez · Néstor Ríos · Nicolás Papa · Sebastián Serra · Marcelo Loureiro

➤ Zona híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti*.

Hydrobiologia

Fig. 2 Morphotypes and pigmentation patterns of individuals belonging to two parental species *A. charrua* and *A. reicherti* and their putative hybrid populations. Males of *A. charrua* (A, D, G, J), *A. reicherti* (C, F, I), and males from putative hybrid populations (B, E, H). Females of *A. charrua* (M), *A. reicherti* (L), and from putative hybrid populations (K).

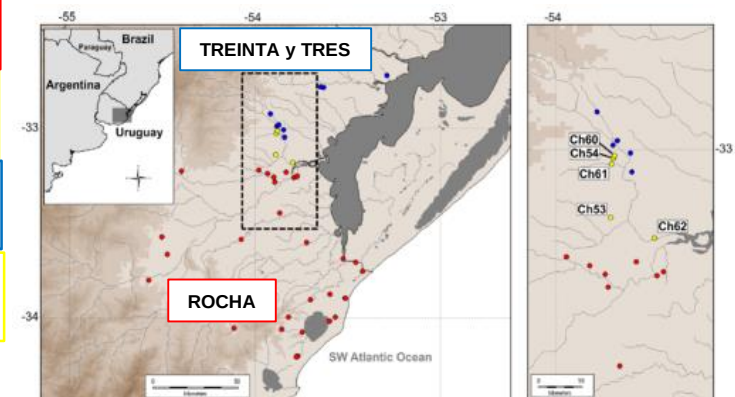
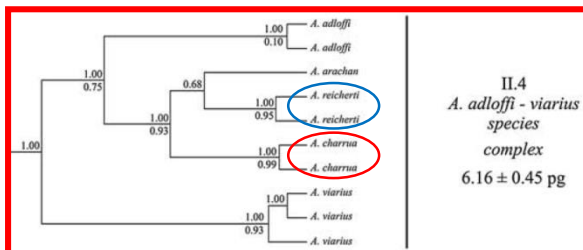
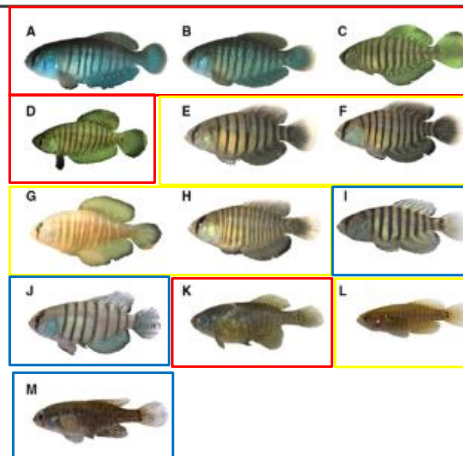


Fig. 1 Collecting sites of *A. charrua* (red circles), *A. reicherti* (blue circles), and hybrid populations (yellow circles) in the Dos Patos-Merín drainage system (DMS), in South America. In the right box the five hybrid ponds and the contact zone between both taxa are indicated

3. Abordajes genéticos

2020

Caracterizar los límites de
2 especies en la zona híbrida
en la **Reserva de la Biosfera y**
Sitios Ramsar

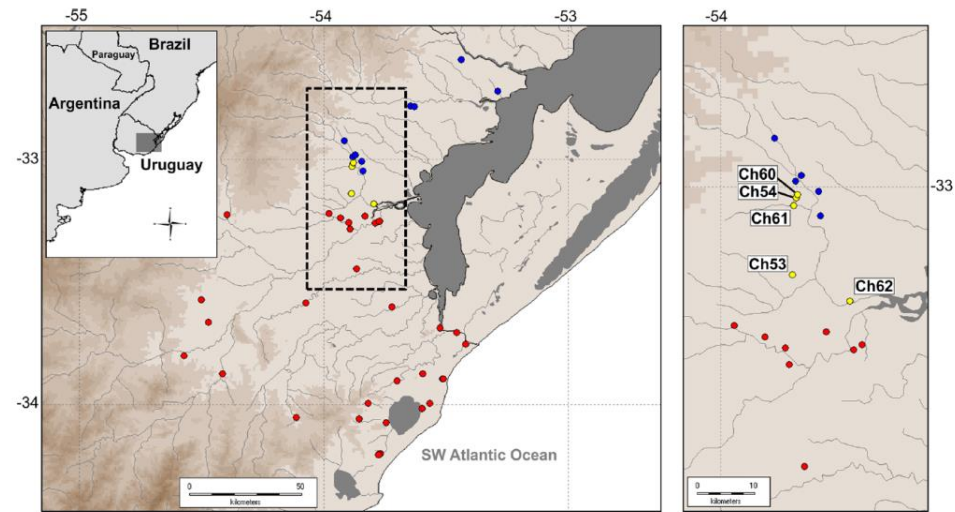


Fig. 1 Collecting sites of *A. charrua* (red circles), *A. reicherti* (blue circles), and hybrid populations (yellow circles) in the Dos Patos-Merín drainage system (DMS), in South America. In the

right box the five hybrid ponds and the contact zone between both taxa are indicated

➤ Zona híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti*.

- Caracterizar los **límites de las especies** en la zona híbrida y probar los mecanismos subyacentes a los eventos de **introgresión** y **contacto secundario** entre ambos taxones.
- **Marcadores nucleares: 7 loci de microsatélites (*)**
- Marcador mitocondrial: **Cytb**
- Marcadores morfológicos

3. Abordajes genéticos

2020

En 2014...

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-014-0266-9

MICROSATELLITE LETTERS

Isolation and characterization of eight microsatellites from the South American annual fish *Austrolebias charrua*

Verónica Gutiérrez · Silvana Pereyra ·
Néstor Ríos · Graciela García

Received: 13 June 2014 / Accepted: 7 July 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Table 1 Description of eight microsatellite loci in *A. charrua*

Locus	Accession no.	Repeat motif	Primer sequence (5'–3')	Temp. annealing (°C)	No. of alleles per locus	Size range (bp)	H _e	H'
Ach-1	KJ938493	(GATA) ₅	F: ACACGCTGGAGAGACTATGT R: TTCATGACCTTGCAGTAGATT	62	14 (4)	208–246 (219–237)	0.92 (0.79)	2.39 (1.26)
Ach-2	KJ938494	(AGAT) ₁₉	F: TTTAACCTTTGGAGTCTGTCC R: CTTTTATGTACATTGGACTCTGA	51	9 (2)	368–452 (388–402)	0.65 (0.25)	1.45 (0.38)
Ach-3	KJ938495	(GGAT) ₈	F: CCTCCTTACTTAGGCTGCTAC R: ATCTGTGAGGTGGACAGATTA	54	9 (4)	132–198 (128–152)	0.85 (0.50)	1.90 (1.07)
Ach-4	KJ938496	(AAG) ₂₀	F: AGTGAGGTGGAGGAGATTAC R: GAAGCAGCCAAAATAAAAA	49	12 (2)	88–189 (114–123)	0.80 (0.25)	1.93 (0.38)
Ach-5	KJ938497	(GT) ₆	F: TCTTTATTTCACATTGGATGC R: TGGTGGTGATATTTTATGGG	58	7 (2)	110–126 (110–112)	0.79 (0.57)	1.63 (0.69)
Ach-6	KJ938498	(GT) ₁₀	F: CAAAAACAGACCTCACGAATA R: GAGAATGAGCTGTGAGTTGTC	50	10 (3)	240–276 (272–275)	0.70 (0.80)	1.57 (1.09)
Ach-7	KJ938499	(TG) ₂₂	F: GGAATCAGGATAGTTCGTGCA R: CTGTTGAAATCACTTGTCAT	50	8 (3)	105–140 (112–132)	0.77 (0.73)	1.64 (1.01)
Ach-8	KJ938500	(ATGG) ₄	F: GCCTCCCTACTTAGGCTACTA R: CAAACAGAATGTCACCTGTGC	51	6 (2)	180–315 (278–196)	0.66 (0.54)	1.31 (0.66)

Between brackets are values for *A. reicherti*
H_e expected heterozygosity, H' Shannon-Wiener Diversity Indices

3. Abordajes genéticos

2020

Caracterizar los límites de
2 especies en la zona híbrida
en la **Reserva de la Biosfera y**
Sitios Ramsar

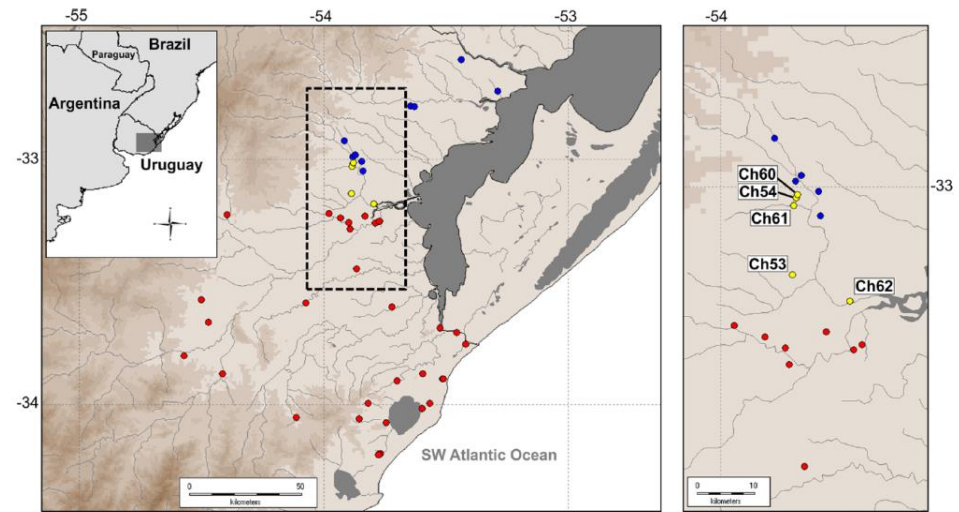


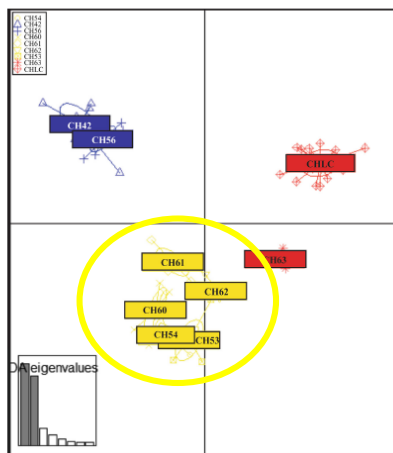
Fig. 1 Collecting sites of *A. charrua* (red circles), *A. reicherti* (blue circles), and hybrid populations (yellow circles) in the Dos Patos-Merín drainage system (DMS), in South America. In the

right box the five hybrid ponds and the contact zone between both taxa are indicated

Hydrobiologia

Análisis discriminante de Componentes Principales

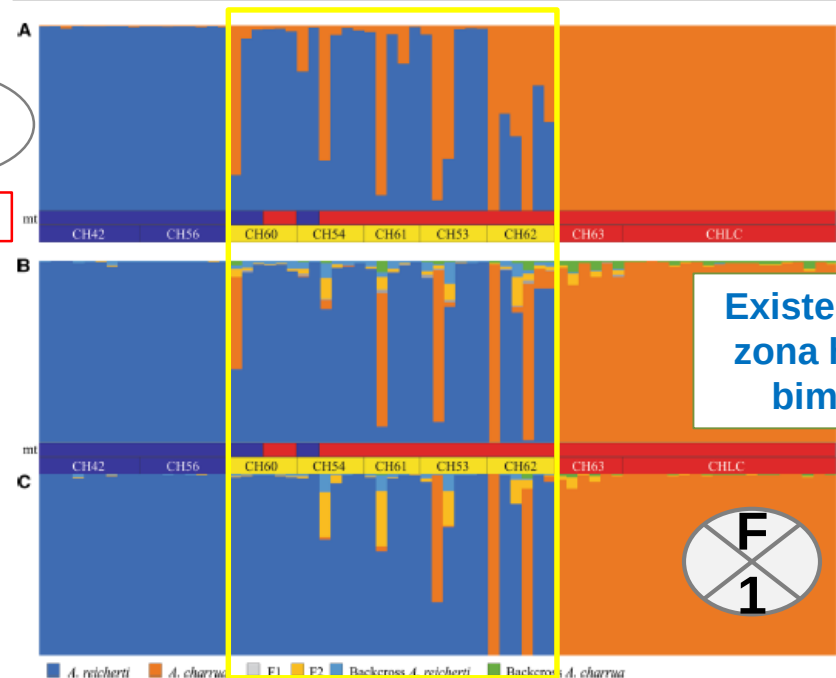
Fig. 3 DAPC. Scatterplot of DAPC (Jombart et al., 2010) performed on 7 microsatellite loci for nine populations of the parental species *A. charrua*, *A. reicherti*, and putative hybrids. Populations are shown by colors: *A. charrua* (red), *A. reicherti* (blue), hybrid populations (yellow), 95% inertia ellipses, and squares represent individual genotypes. Axes show the first two discriminant functions, and eigenvalues the genetic information retained by discriminant functions



5 pobl. híbridas

K=2

Hap. cyt



Existencia de
zona híbrida
bimodal

F
1

3. Abordajes genéticos

2014

Primera estimación del
tamaño genómico de varias
especies del género
“*Austrolebias*”

Tamaño GENOMICO

Genetica (2014) 142:87–98
DOI 10.1007/s10709-014-9756-7

**Burst speciation processes and genomic expansion
in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias*
(Cyprinodontiformes, Rivulidae)**

G. García · V. Gutiérrez · N. Ríos ·
B. Turner · F. Santiñaque · B. López-Carro ·
G. Folle

3. Abordajes genéticos

2014

Primera estimación del **tamaño genómico** de varias especies del género “*Austrolebias*”

- 29 especies de *Austrolebias*
- *Cynopoecilus melanotaenia*
- 33 charcos
- Cuenca de los ríos Uruguay- Paraná-Paraguay, Río Negro
- Lagunas costeras del este
- Cuencas de la costa atlántica de Uruguay y el sur de Brasil.

Tamaño GENOMICO

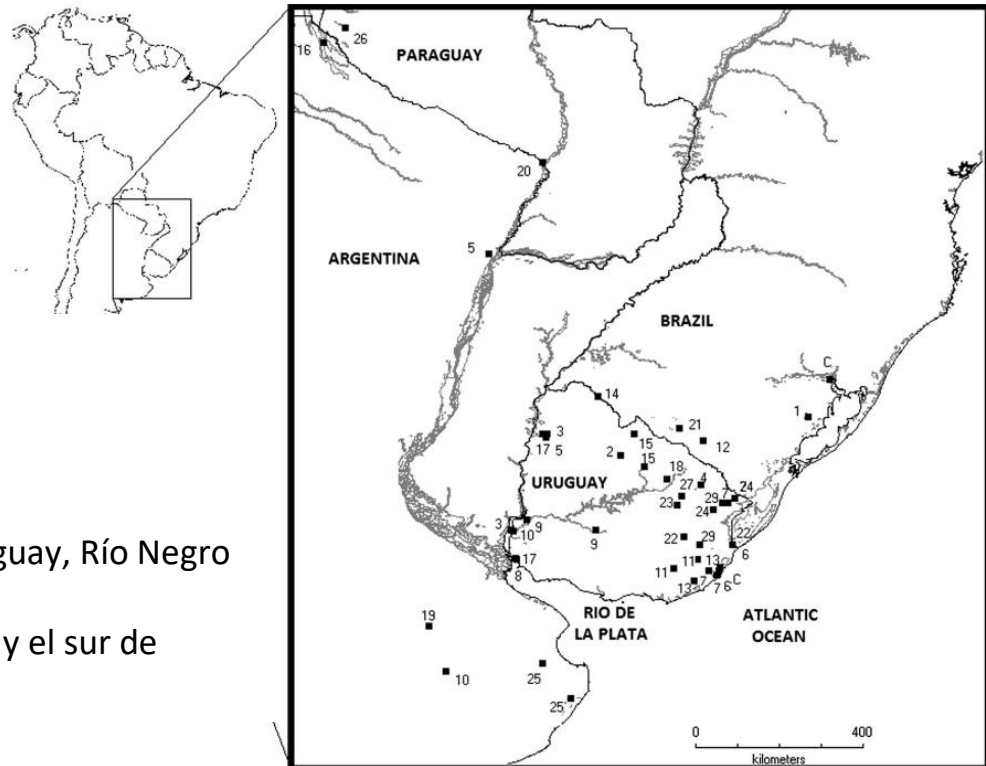


Fig. 1 Distribution map of collection sites for *Austrolebias* species and *Cynopoecilus melanotaenia* from natural populations. 1. *A. adloffi*, 2. *A. affinis*, 3. *A. alexandri*, 4. *A. arachan*, 5. *A. bellottii*, 6. *A. charrua*, 7. *A. cheradophilus*, 8. *A. cinereus*, 9. *A. durazniensis*, 10. *A. elongatus*, 11. *A. gymnoventris*, 12. *A. juanlangui*, 13. *A.*

luteoflammulatus, 14. *A. luzardoi*, 15. *A. melanoorus*, 16. *A. monstrosus*, 17. *A. nigripinnis*, 18. *A. nioni*, 19. *A. noniuliensis*, 20. *A. patriciae*, 21. *A. periodicus*, 22. *A. prognathus*, 23. *A. quirogai*, 24. *A. reicherti*, 25. *A. robustus*, 26. *A. vanderbergi*, 27. *A. vazferreirai*, 28. *A. viarius*, 29. *A. wolterstorffi*, C. *Cynopoecilus melanotaenia*

3. Abordajes genéticos

Tamaño GENOMICO

2014

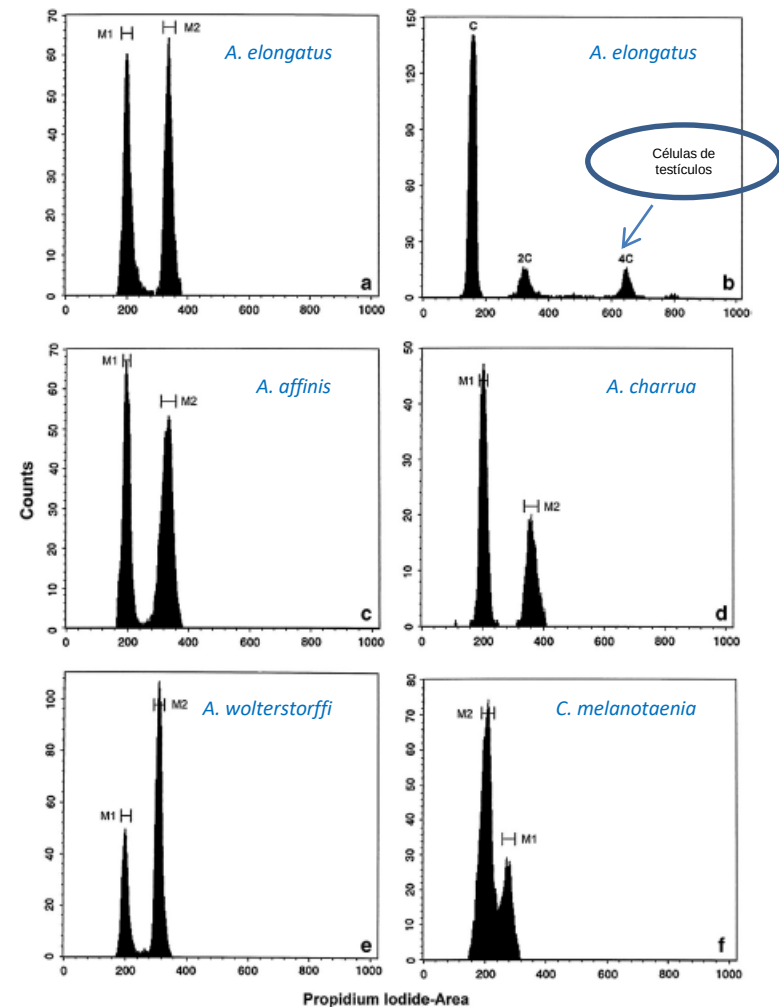
Primera estimación del tamaño genómico de varias especies del género “Austrolebias”

- 62 inds. diploides (16 spp. de *Austrolebias*)
- *Cynopoecilus melanotaenia*

Valor promedio de **5,95 ± 0,45 pg** (media ± SE) de ADN por célula

Estimación del contenido de ADN celular mediante citometría de flujo

Fig. 2 Flow cytometric DNA content determinations from liver cells of the different *Austrolebias* species complexes and *Cynopoecilus melanotaenia* (M2). The 2C peak corresponds to the M2 marker in liver cells. Zebrafish (*Danio rerio*) DNA content (mean 3.48 pg) was used as control (M1). a *A. elongatus* (5.83 pg); b DNA content of testicular cells analyzed in *A. elongatus*: C (M1), 2C (M2) and 4C testis cell subpopulations. c *A. affinis* (5.87 pg). d *A. charrua* (6.23 pg). e *A. wolterstorffi* (5.39 pg). f *C. melanotaenia* (2.63 pg)



3. Abordajes genéticos

Tamaño GENOMICO

2014

Primera estimación del tamaño genómico de varias especies del género “Austrolebias”

Table 1 Average of DNA content (mean $\pm$ SE) in each *Austrolebias* species and *C. melanotaenia* determined by flow cytometry

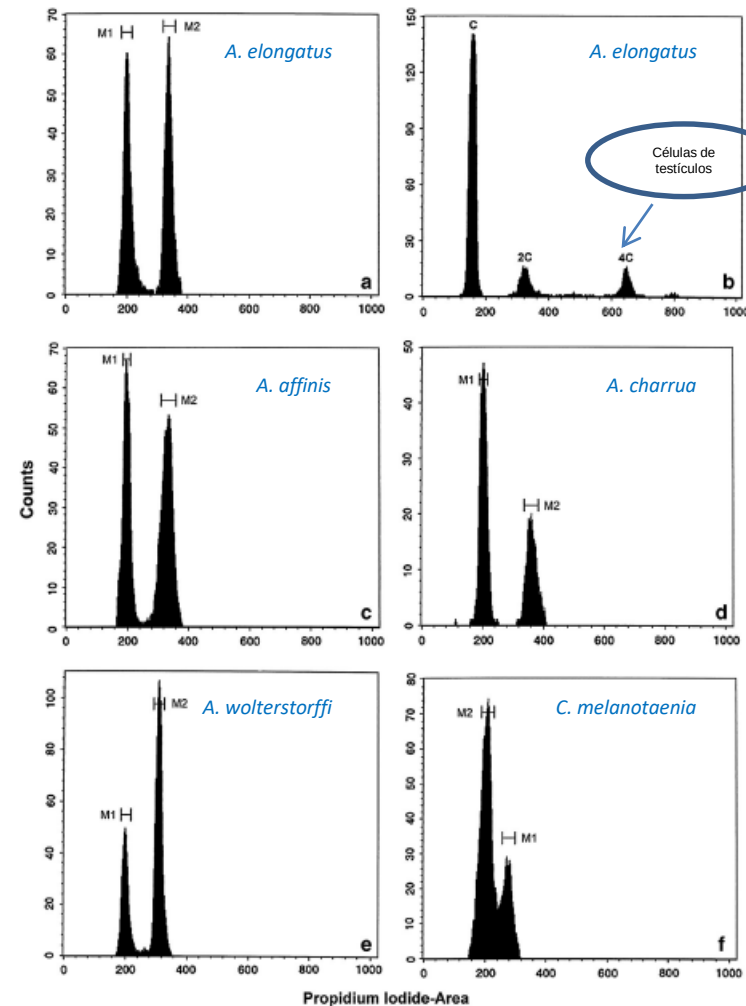
Species	2C DNA content (pg)	2n	NF
<i>A. affinis</i> + <i>A. duraznensis</i>	5.88 $\pm$ 0.35 (7)	48 ^a	52 ^a
<i>A. alexandrii</i>	5.23 $\pm$ 0.15 (3)	48 ^a	58 ^a
<i>A. charrua</i>	6.13 $\pm$ 0.32 (4)	48 ^{e,d}	52 ^{e,d}
<i>A. cheradophilus</i>	6.01 $\pm$ 0.46 (3)	39 ^f	48 ^f
<i>A. cinereus</i>	5.61 $\pm$ 0.04 (1)	44 ^b	50 ^b
<i>A. elongatus</i>	6.02 $\pm$ 0.34 (5)	42 ^h	50 ^h
<i>A. gymnoventris</i>	5.47 $\pm$ 0.16 (6)	48 ^a	62 ^a
<i>A. luteoflamulatus</i>	6.17 $\pm$ 0.41 (8)	34 ^c	48 ^c
<i>A. melanoorus</i>	5.61 (1) ⁺	48 ^b	50 ^b
<i>A. nigripinnis</i>	5.63 $\pm$ 0.45 (2)	48 ^{g,e}	62 ^{g,e}
<i>A. prognathus</i>	6.97 $\pm$ 0.18 (2)	36 ^c	52 ^c
<i>A. quirogai</i>	6.31 $\pm$ 0.10 (3)	34 ^h	52 ^h
<i>A. reicherti</i>	6.40 $\pm$ 0.03 (4)	48 ^{c,d}	52 ^{c,d}
<i>A. vazferreirai</i>	5.74 $\pm$ 0.06 (2)	46 ^b	50 ^b
<i>A. viarius</i>	5.95 $\pm$ 0.20 (4)	46 ^c	50 ^c
<i>A. wolterstorffi</i>	5.55 $\pm$ 0.12 (5)	46 ^c	50 ^c
<i>C. melanotaenia</i>	2.72 $\pm$ 0.06 (2)	44 ^{g,f}	76 ^{g,f}

The number of analyzed specimens is indicated between brackets. 2n: chromosome number; NF: arm number

^a García et al. (1995), ^b García et al. (2001), ^c Loureiro and García (2004), ^d García et al. (2006), ^e García et al. (1993), ^f Másoli and García (1988), ^g Scheel (1972), ^h present work. ⁺ Only one flow cytometry estimation was obtained

Estimación del contenido de ADN celular mediante citometría de flujo

Fig. 2 Flow cytometric DNA content determinations from liver cells of the different *Austrolebias* species complexes and *Cynopoeilus melanotaenia* (M2). The 2C peak corresponds to the M2 marker in liver cells. Zebrafish (*Danio rerio*) DNA content (mean 3.48 pg) was used as control (M1). a *A. elongatus* (5.83 pg); b DNA content of testicular cells analyzed in *A. elongatus*: C (M1), 2C (M2) and 4C testis cell subpopulations. c *A. affinis* (5.87 pg). d *A. charrua* (6.23 pg). e *A. wolterstorffi* (5.39 pg). f *C. melanotaenia* (2.63 pg)



3. Abordajes genéticos

2014

Primera estimación del **tamaño genómico** de varias especies del género “Austrolebias”

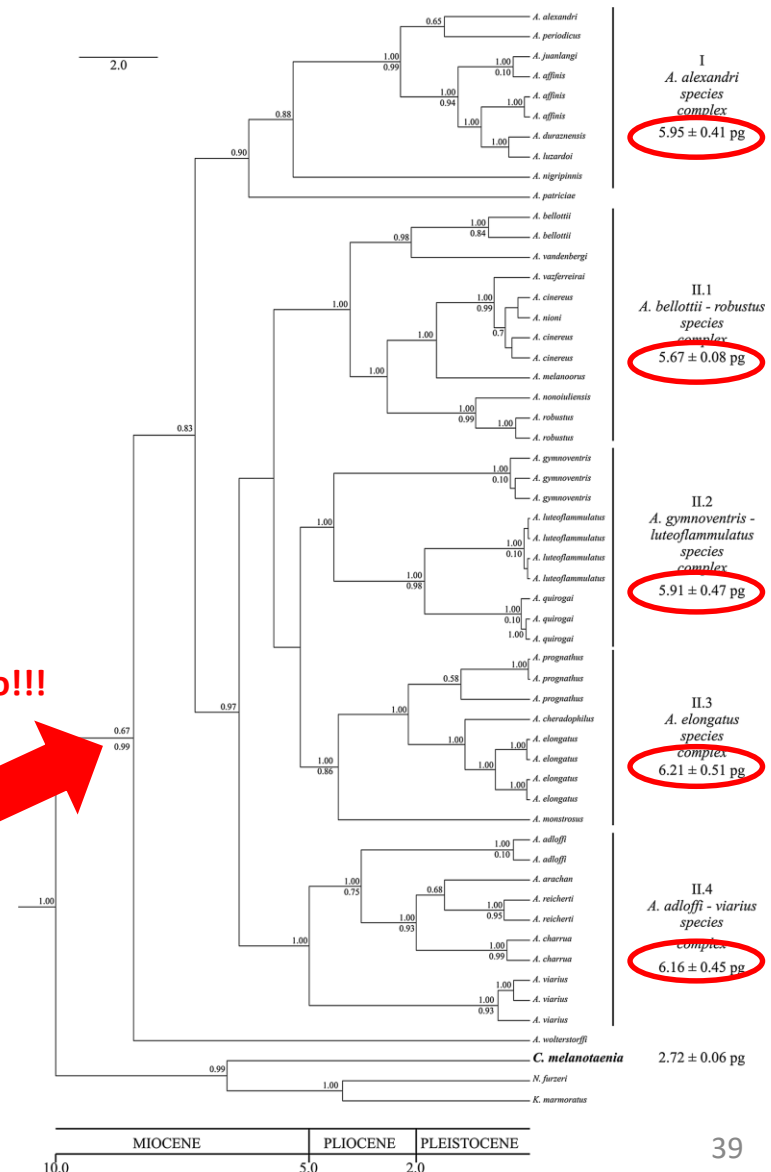
- 55 secuencias cyt-b
- Grupo externo:
 - ✓ *C. melanotaenia*, *K. marmoratus*
 - ✓ *Nothobranchius furzeri*
- Análisis: MP / Bayesiano / ML

MONOFILIA del género!!!

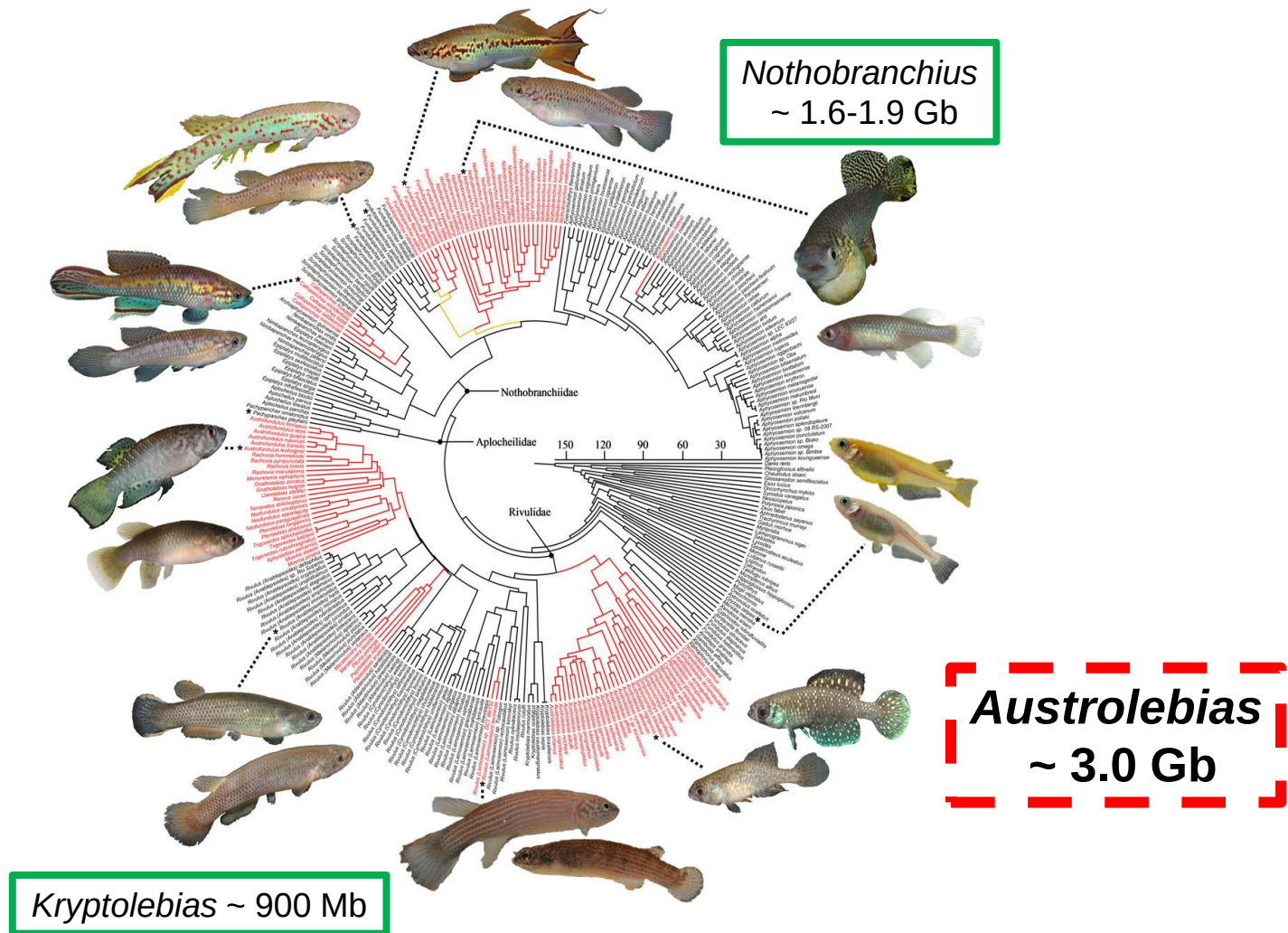
2C ~ 6 pg

“GENOMA GIGANTE”

Tamaño GENOMICO



En otros Rivúlidos...



4. Abordajes Genómicos

2014

Exploración del origen del genoma gigante mediante NGS

Genetica (2015) 143:353–360
DOI 10.1007/s10709-015-9834-5



Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)

G. García¹ · N. Ríos¹ · V. Gutiérrez¹

➤ 454 GS FLX Titanium technology (Macrogen, Korea)

Table 1 Cytogenetics, genomic and sequencing features of the Rivulidae studied species

Species	<i>Austrolebias charrua</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>
Chromosome number (2n)	48	44
1C value (pg)	3.07	1.36
Genome size (Gb)	3.0	1.33
Sequenced read number	134,390	141,218
Total read length (Mb)	47.6	55.1
454-Pyrosequencing genome coverage (%)	1 %	1.8 %
Repetitive DNA cluster number	364	151

4. Abordajes Genómicos

2014

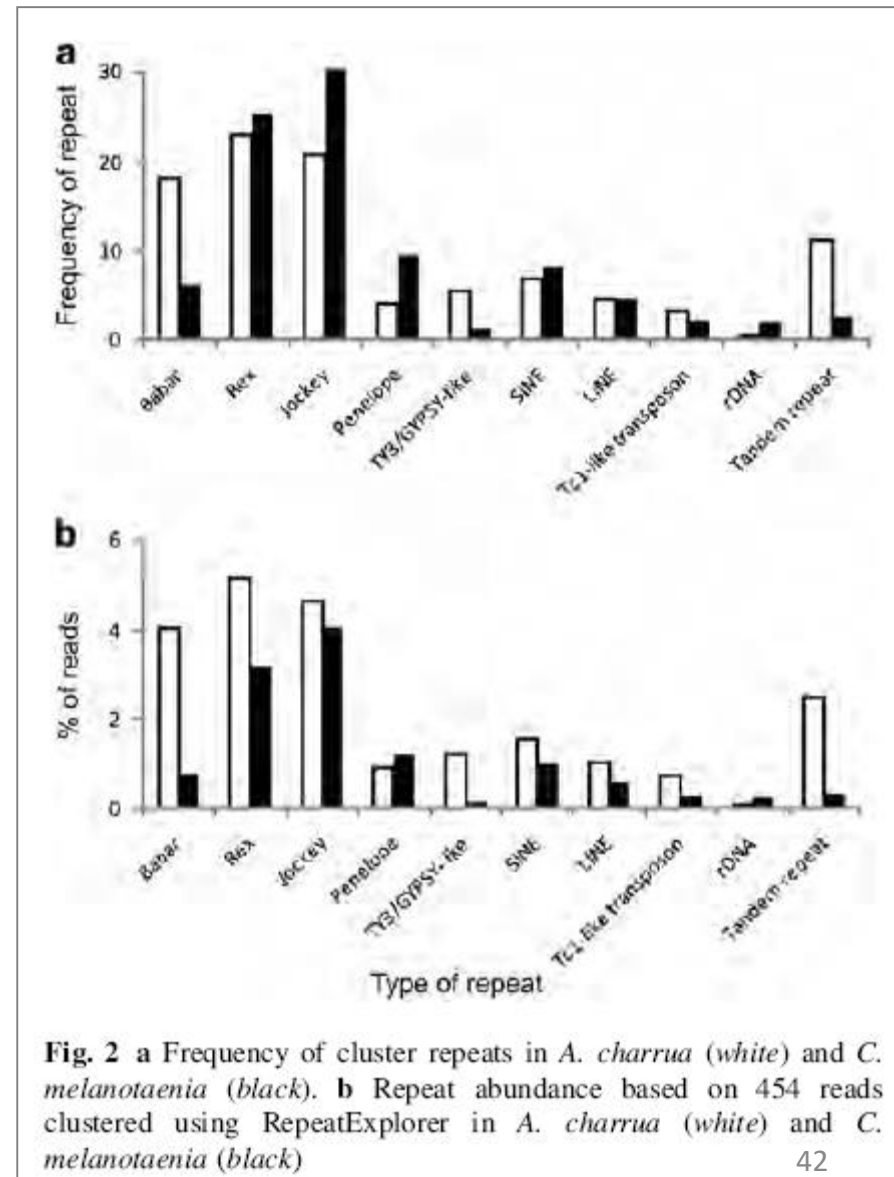
Exploración del origen del genoma gigante mediante NGS

- El ensamblaje de la secuencia repetida se realizó utilizando **RepeatExplorer** (<http://repeatexplorer.umbr.cas.cz/>)

ADN moderadamente repetido:

- *A. charrua*: ~ 45%.
- *C. melonataenia*: ~ 25%.

Corroboró la hipótesis de **expansión genómica** mediante invasión masiva de diferentes tipos de elementos transponibles (ETs)



4. Abordajes Genómicos

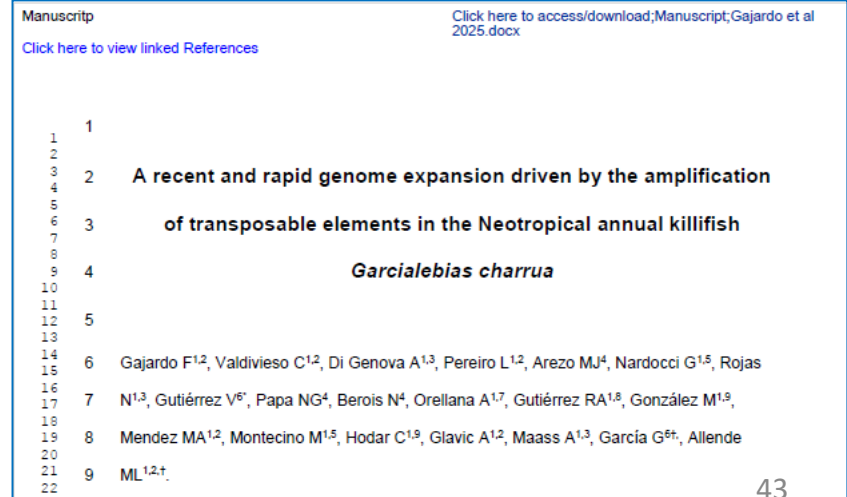
2025



Sección
Biología Celular

Gajardo et al. (2025)
EN REVISIÓN

Genoma
Transcriptoma



5. Abordajes Transcriptómicos

2019

Descubrimiento y validación
de **SNP** basados en el
transcriptoma en la zona
híbrida

GCAT
TACG
GCAT

genes

MDPI

Article

Transcriptome-Based SNP Discovery and Validation in the Hybrid Zone of the Neotropical Annual Fish Genus *Austrolebias*

Graciela García ^{1,*}, Néstor Ríos ¹, Verónica Gutiérrez ¹, Sebastián Serra ^{1,2,3} and
Marcelo Loureiro ^{2,3}

➤ Zona híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti*.

Hydrobiologia

Fig. 2 Morphotypes and pigmentation patterns of individuals belonging to two parental species *A. charrua* and *A. reicherti* and their putative hybrid populations. Males of *A. charrua* (A, D, G, J), *A. reicherti* (C, F, I), and males from putative hybrid populations (B, E, H). Females of *A. charrua* (M), *A. reicherti* (L), and from putative hybrid populations (K).

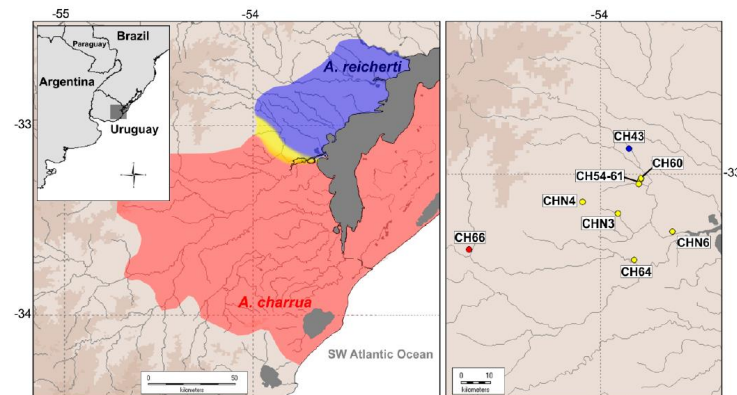
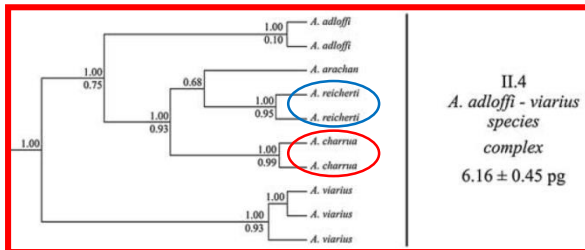
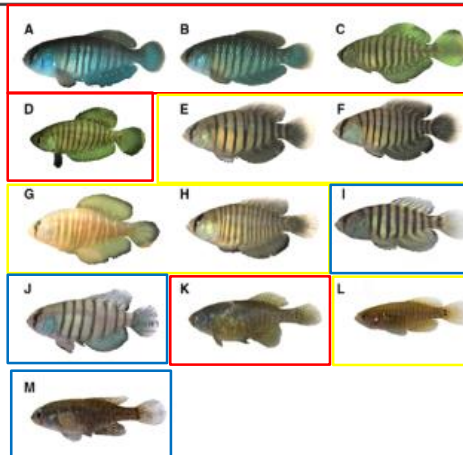


Figure 1. Geographic distribution of taxa in the hybrid zone. *A. charrua* (red area), *A. reicherti* (blue area) and hybrid populations (yellow areas) in the Dos Patos-Merín drainage system (DMS), South America. In the right-hand box, the hybrid ponds in the contact zone between both taxa are indicated.

5. Abordajes Transcriptómicos

2019

Descubrimiento y validación
de **SNP** basados en el
transcriptoma en la zona
híbrida

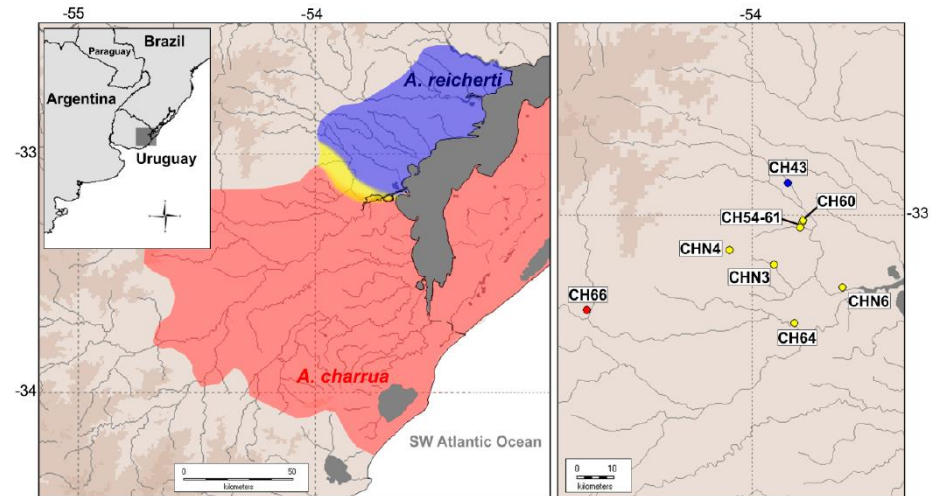


Figure 1. Geographic distribution of taxa in the hybrid zone. *A. charrua* (red area), *A. reicherti* (blue area) and hybrid populations (yellow areas) in the Dos Patos-Merín drainage system (DMS), South America. In the right-hand box, the hybrid ponds in the contact zone between both taxa are indicated.

➤ Zona híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti*.

- Probar los mecanismos subyacentes a los eventos de **introgresión y contacto secundario** entre ambos taxa.
- Obtención de **más marcadores nucleares** para respaldar el patrón bimodal de la zona híbrida.
- Marcadores morfológicos
- **Marcadores nucleares**: sec. de los transcriptomas (RNA-seq) de *A. charrua*, **híbridos naturales** y *A. reicherti*
- Marcador mitocondrial: Cytb

5. Abordajes Transcriptómicos

2019

Descubrimiento y validación
de **SNP** basados en el
transcriptoma en la zona
híbrida

➤ 103 marcadores SNP

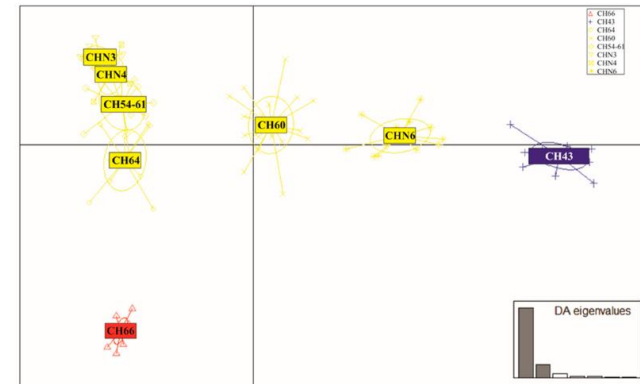


Figure 2. Discriminant analysis of principal components (DAPC) scatter plots [36] based on 103 SNP loci for eight populations of the parental species *A. charrua* and *A. reicherti* and putative hybrid ponds. Populations are shown by colours: *A. charrua* (red), *A. reicherti* (blue), hybrid populations (yellow) and 95% inertia ellipses, squares represent individual genotypes. Axes show the first two discriminant functions, and eigenvalues the genetic information retained by discriminant functions.

Hap. cytb

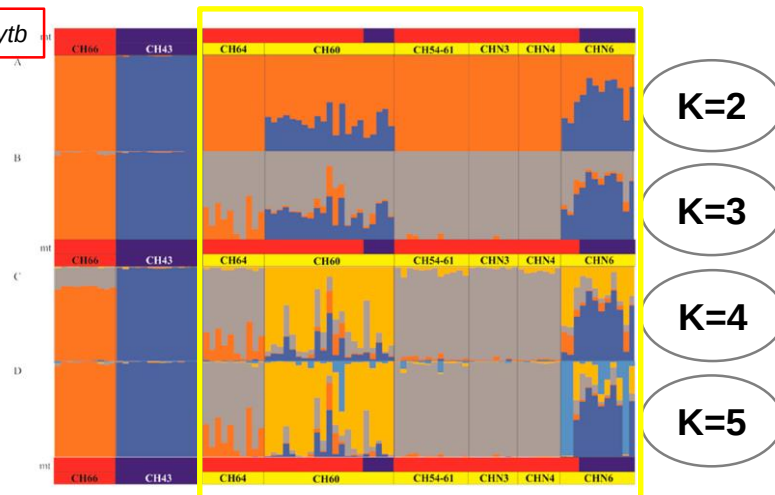


Figure 3. Individual assignment results using STRUCTURE software based on 103 loci. (A) $K = 2$; (B) $K = 3$, (C) $K = 4$ and (D) $K = 5$. Admixture analyses showing the proportion of the genome of each individual originated from *A. charrua* or *A. reicherti*. Each individual is represented as a vertical bar divided into segments representing the proportion of the genome corresponding to *A. charrua* (red) or *A. reicherti* (blue). Populations are labeled above the bar plots; mt bars: represent the *Cytb* haplotype assignment of each individual to *A. charrua* (red) or *A. reicherti* (blue) species.

SNPs + *Cytb* + morfología: revelaron una **estructura poblacional** en la que algunos **híbridos** presentan un nivel diferente de **introgresión** hacia una u otra especie parental según su distribución geográfica.

5. Abordajes Transcriptómicos



2023- 2025)

22520220100390UD	Vías regulatorias compartidas entre diapausa embrionaria y el envejecimiento en el pez anual sudamericano <i>Austrolebias charrua</i>	Facultad de Ciencias	AREZO REZZA	MARIA JOSE	2	GUTIERREZ COPPETTI	VERONICA ANDREA		1250000,00
------------------	---	----------------------	-------------	------------	---	--------------------	-----------------	--	------------

OBJETIVO GENERAL:

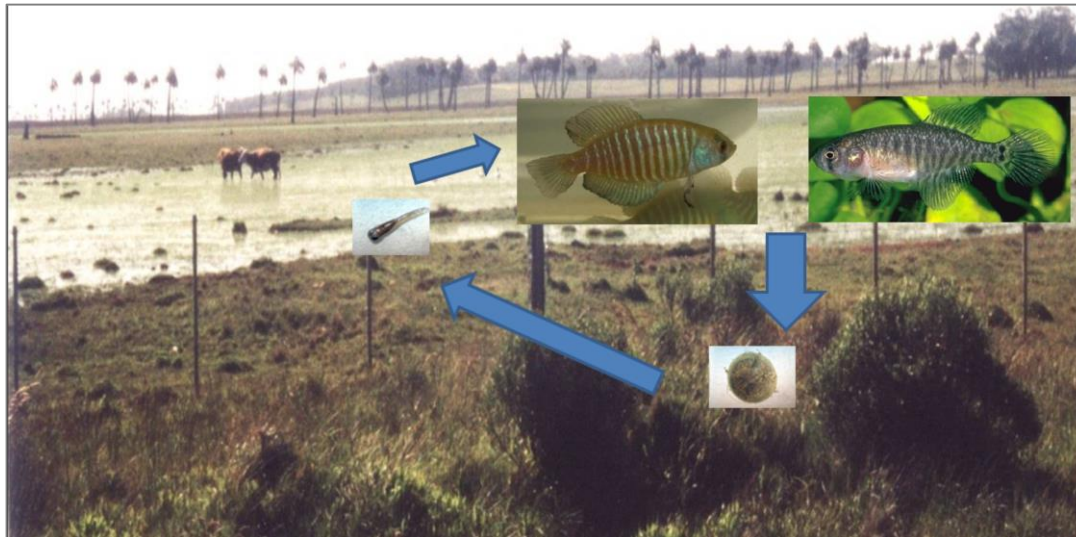
Contribuir al conocimiento de las claves moleculares asociadas a las diapausas y envejecimiento de los vertebrados mediante la identificación de genes y vías de regulación de la homeostasis en condiciones ambientales controladas en ambas etapas del ciclo de vida de *A. charrua*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

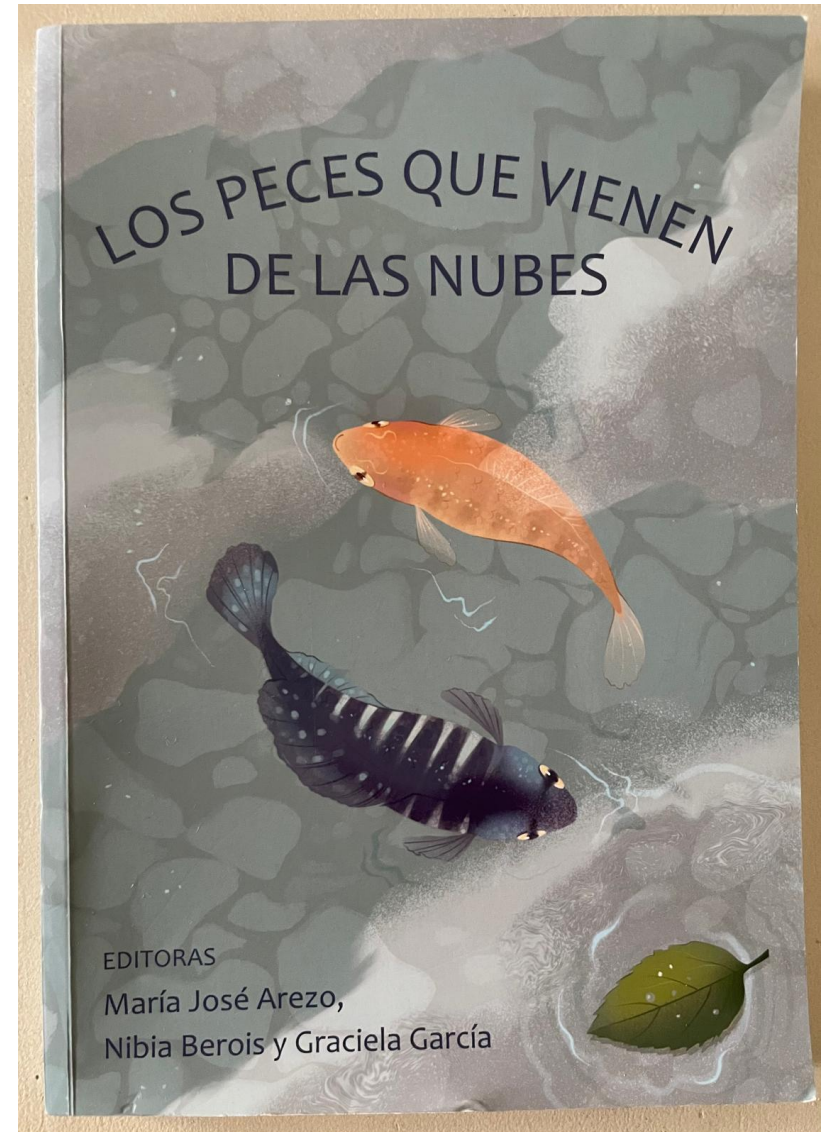
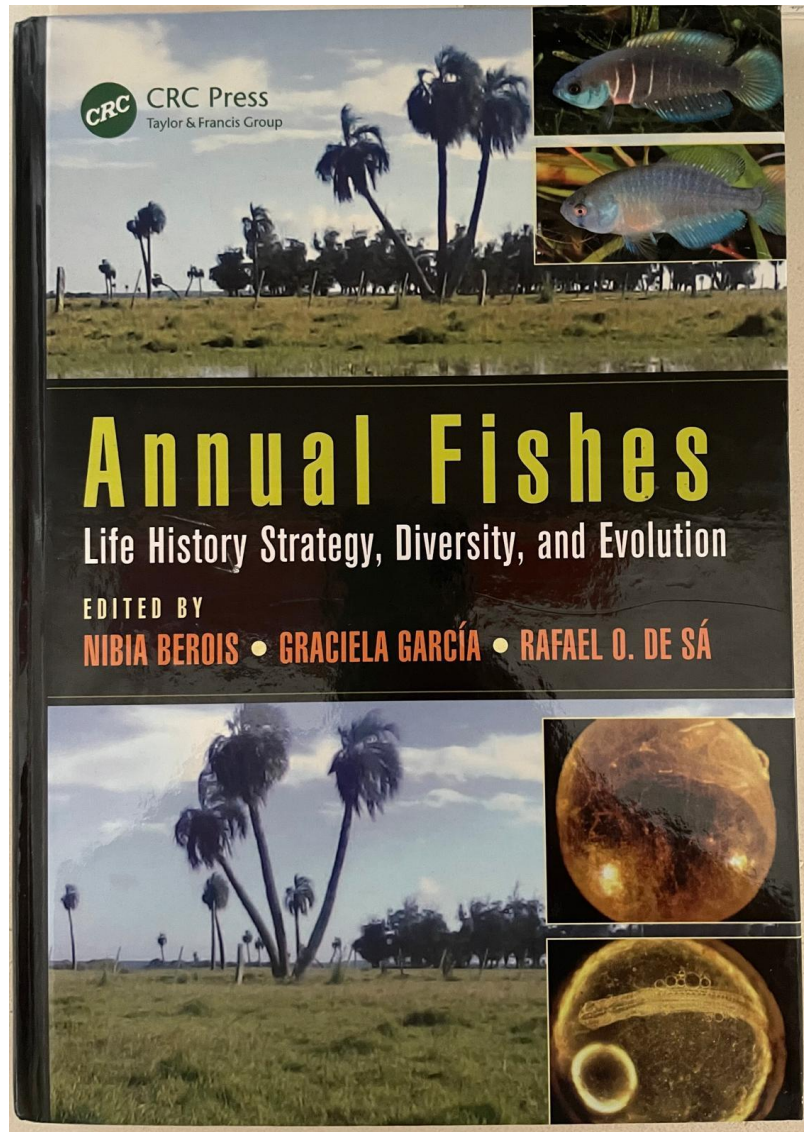
1. Obtener los transcriptomas del tejido branquial y hepático de juveniles y seniles de *A. charrua*.
2. Obtener un transcriptoma de referencia mediante el ensamble *de novo* de secuencias embrionarias y de tejidos adultos (juveniles y seniles).
3. Identificar genes con expresión diferencial entre cada tejido (branquial y hepático) de juveniles y seniles de *A. charrua*.
4. Establecer la presencia de genes encendidos y/o apagados y vías regulatorias compartidas entre embriones en diapausa I y los tejidos de individuos seniles de *A. charrua*.
5. Corroborar los resultados obtenidos en el punto anterior mediante amplificación en tiempo real (qPCR) de los principales genes expresados en ambas etapas.
6. Analizar los tipos de selección actuando sobre los genes candidatos identificados en ambas etapas de la ontogenia.

Reflexión final

Los estudios sobre los peces anuales son **multidisciplinarios**, con un enfoque especial en cómo las especies responden al **cambio climático**, la **contaminación** y la **fragmentación** de sus hábitats



García et al. (2022)





¡Muchas gracias por su atención!