

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA MADRECITA DE AGUA,
Cnesterodon decemmaculatus (Pisces, Poeciliidae), EN RÍOS Y ARROYOS DE LA
LLANURA PAMPEANA**



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 11/06/2020

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA MADRECITA DE AGUA,
Cnesterodon decemmaculatus (Pisces, Poeciliidae), EN RÍOS Y ARROYOS DE LA
LLANURA PAMPEANA**

Trabajo Final de Grado
del alumno

PATRICIA MERCEDES BIANCO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

Natalia Ossana
Co-Director

Soledad Byrne
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

AGRADECIMIENTOS

Definitivamente pasar de una secundaria con orientación contable a una carrera como licenciatura en genética no fue fácil, entré a un universo completamente desconocido. Durante mucho tiempo la carrera fue como manejar un auto en plena neblina y la única razón por la cual llegué a destino es por estar rodeada de cada una de las personas que voy a nombrar a continuación, no hay un orden especial, sólo cronológico, desde el comienzo hasta el fin.

Quiero agradecerle a mi familia: mamá, caio y fer por todo el aguante en estos años y al resto de mi familia por entender mis ausencias en varias reuniones familiares.

A mis amigos de Junín: Robert, Santi, Cristian y Nina.

A mis amigos de Pergamino: a todos los que cursaron conmigo a lo largo de todo este tiempo que es imposible nombrarlos a todos y en especial a: Vicky, Lu, Mati Mac, Andre, Cami, Gera, Gabo, Yami, Lu A, Tomi y Lau.

A mis amigos de Hughes: Sole, Gabi, Maru, Geor, Romi, Bel, Pau, Cel, lucre, mati.

A mi amigo tanto de Hughes como de Pergamino Momi por toda la compañía que me dio mientras el cantaba yo estudiaba.

A sil Salvatore que además de cuidar a mis mascotas como oro es amiga fiel de la familia.

A jeremías por ser el ser vivo que más me acompañó en todo este trayecto y lo sigue haciendo mientras estoy escribiendo esto.

A la UNNOBA por darme la oportunidad de emprender el viaje y transitar sus pasillos durante muchos años, a la Universidad de Luján por darme la oportunidad de terminar el viaje en sus instalaciones. Dentro de la UNNOBA me gustaría agradecer especialmente a

Susana Pistorale y también a cada uno de los profesionales que toman tiempo de sus vidas para enseñarnos. Dentro de la Universidad de Luján me gustaría dar especial agradecimiento al grupo GIEM por aceptarme en su lugar de trabajo y ayudarme en todas mis dudas, al grupo PRODEA por darme una enorme mano en lo que respecta al análisis del perfil fisicoquímico del agua, por aportar datos y ejemplares de madrecitas para que esta tesis fuera posible y a Mauro Palacio por tomarse el tiempo de ayudarnos con el análisis de componentes principales.

Y por último pero no menos importante a Soledad Byrne, Natalia Ossana y Gabriela Fernández. No puedo ni voy a poder dejar de agradecerles siempre por tomarse su tiempo para leerme, sacarme dudas y acompañarme, les agradezco la paciencia que tuvieron conmigo.

Todos ustedes fueron necesarios para que yo pudiera llegar sana y salva a la meta final, por eso les digo: que la fuerza y la ciencia los acompañen siempre. Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 ECOTOXICOLOGÍA.....	3
2.2 GENÉTICA DE POBLACIONES.....	4
2.3 ESTRUCTURA GENÉTICA.....	4
2.4 FILOGEOGRAFÍA.....	5
2.5 ADN MITOCONDRIAL.....	6
2.6 EFECTOS DEL IMPACTO ANTRÓPICO EN EL AMBIENTE SOBRE LA VARIABILIDAD Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA.....	8
2.6.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA DEL AMBA.....	9
2.7 RÍO RECONQUISTA.....	9
2.8 RÍO LUJÁN.....	9
2.9 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	13
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES Y UBICACIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO.....	18
5.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	22
5.3. AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR.....	23
5.4. VISUALIZACIÓN Y PURIFICACIÓN.....	24
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
5.6. ANÁLISIS DEL PERFIL FISCOQUIMICO DEL AGUA.....	26
6. RESULTADOS.....	29
6.1. ANÁLISIS GENÉTICO.....	29
6.1.1. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	29
6.1.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	30

6.1.3. RELACIONES GENEALÓGICAS DE LOS HAPLOTIPOS.....	31
6.2. ANÁLISIS DEL PERFIL FISICOQUIMICO DEL AGUA.....	33
6.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	35
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIÓN.....	47
9. ANEXO.....	48
10. BIBLIOGRAFÍA.....	51

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ac: (Acuario) población criada en cautiverio por el grupo PRODEA en la Universidad de Luján.

ACP: análisis de componentes principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADNn: ácido desoxirribonucleico nuclear

ARN: ácido ribonucleico

CP: componente principal

DBO: demanda biológica de oxígeno

DQO: demanda química de oxígeno

GIEM: Grupo de Investigación en Ecología Molecular

ICA: índice de calidad de agua

LF: población del Arroyo Las Flores, tributario del Río Luján.

MOP: material orgánico particulado

OD: oxígeno disuelto

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PRODEA: Programa de Ecofisiología Aplicada

PRS: fósforo reactivo soluble

RFLPs: (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

R1: población del Río Reconquista ubicado en la naciente del río, en la represa Roggero.

R2: población del Río Reconquista ubicado 18 Km aguas abajo de la naciente.

R6: población del sitio donde el río Luján cruza la ruta 6

1. RESUMEN

En este trabajo se analizó la diversidad y estructura genética de *Cnesterodon decemmaculatus* en poblaciones del noroeste de la Provincia de Buenos Aires y en una población criada en cautiverio. Se analizaron un total de 72 individuos obtenidos en las nacientes del Río Reconquista (R1, n= 15), 18 km aguas abajo en la cuenca media de dicho río (R2, n= 5), en el Arroyo Las Flores (LF, n= 18) perteneciente a la cuenca del río Luján, en el cruce del río Luján con la ruta 6 (R6, n= 17) y en la población criada en cautiverio (Acuario) (Ac, n= 17).

Para cada uno de ellos se obtuvo una secuencia de 715 pb de la región control del ADN mitocondrial. Posteriormente, se calculó la diversidad haplotípica (H) y nucleotídica (π) en cada población, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y se construyó una red haplotípica. Se obtuvieron 6 haplotipos de los cuales el H02 y el H03 estuvieron presentes en todas las poblaciones mientras que los haplotipos H01, H04, H05 y H06 solo se encontraron en la población R6. Los análisis de variabilidad genética arrojaron valores moderados de diversidad nucleotídica ($\pi= 0,0064-0,153$) y de moderados a altos de diversidad haplotípica ($H= 0,3824-0,7353$). Los resultados del AMOVA fueron no significativos tanto entre cuencas ($\Phi_{CT}= -0,00638$; $P= 1,000$) como entre las poblaciones de cada cuenca ($\Phi_{SC}= 0,00465$; $P= 0,2757$). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que los individuos colectados a campo conformarían una única población no estructurada geográficamente que mantendría una diversidad genética de moderada a alta. A su vez, la población criada en cautiverio (Ac) podría utilizarse como una fuente de individuos para realizar bioensayos debido a que no presentó diferencias genéticas significativas con las poblaciones R2 (Reconquista) y LF (Luján).

De todos los sitios se realizó una caracterización fisicoquímica y se calculó un Índice de Calidad de Agua (ICA). Estos resultados mostraron que el sitio LF tiene un buen estado presentando un ICA de 8, mientras que el sitio R2 es el más contaminado con un ICA de 3, indicando polución elevada en esa zona. Por último, un análisis de componentes principales (ACP) realizado a nivel exploratorio mostró que la diversidad genética tiene un gran peso en la varianza total que existe entre los sitios.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen los primeros para *C. decemmaculatus* en las cuencas de los ríos Luján y Reconquista, contribuyendo al conocimiento de la diversidad y estructura genética de dichas poblaciones, a la vez que generan nuevas interrogantes que deberán ponerse a prueba en futuras investigaciones.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ECOTOXICOLOGÍA

El creciente impacto ambiental de las actividades humanas, principalmente el vertido de sustancias químicas por procesos productivos, ha favorecido el desarrollo de una disciplina basada en la toxicología y la ecología: la ecotoxicología (Larraín, 1995), que estudia los efectos tóxicos causados por contaminantes naturales o sintéticos sobre los ecosistemas (Truhaut, 1977).

En estudios de ecotoxicidad, la interpretación de las respuestas de los animales acuáticos a la exposición de tóxicos es necesaria para evaluar la calidad de su medio. Para esto, debe tenerse en cuenta que la respuesta no sólo depende de la exposición al tóxico y del estado fisiológico del animal, sino también, del patrón de heterogeneidad ambiental de las poblaciones de una misma especie, que pueden responder adaptativamente a las particularidades locales ambientales en función de su diversidad genética (Manier *et al.*, 2007). Las poblaciones de una determinada especie pueden sufrir distintos niveles de estrés por contaminación, lo que sumado a un reducido flujo génico debido a características ambientales heterogéneas, podrían mostrar una considerable divergencia genética (O'Reilly *et al.*, 1993). Por lo tanto, el manejo y la conservación de las poblaciones naturales y sus ambientes, se basan en cierta medida en la información brindada por la genética de poblaciones respecto a los patrones de distribución de la variabilidad genética en el espacio y al grado de conectividad entre dichas poblaciones (Eguiarte, 2007).

2.2 GENÉTICA DE POBLACIONES

La teoría de la Genética de Poblaciones predice que aquellas poblaciones que presentan un alto grado de flujo génico no exhibirán diferencias en sus frecuencias génicas, mientras que la existencia de limitaciones para la dispersión (flujo génico) producirán aislamiento y divergencia entre las poblaciones como resultado de la acción de la deriva génica y/o la selección natural (Slatkin, 1985). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas ellas evolucionarán juntas; pero si hay poco flujo génico cada una evolucionará en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

2.3 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Se define como estructura genética poblacional a las diferencias en las frecuencias alélicas que existen entre las subpoblaciones en las que se dividió una población original como consecuencia de la ausencia o reducción del flujo génico entre ellas, el apareamiento entre individuos está condicionado a la localización geográfica de cada uno ellos y a la acción de la deriva génica que fija diferentes variantes genéticas en cada subpoblación (Hartl & Clark, 1997; Hamilton, 2009).

En general, altos niveles de diversidad genética se asocian con una mejor capacidad para responder tanto a la depredación, como a cambios en el ambiente, por ejemplo, la presencia de sustancias tóxicas (Hedrick, 2001). En el caso de poblaciones aisladas, éstas son más susceptibles a sufrir los efectos de la endogamia y la pérdida de diversidad genética, llevando a una disminución en el éxito reproductivo y a un aumento del riesgo de extinción (Frankham *et al.*, 2002). Los efectos deletéreos del aislamiento se encuentran a menudo exacerbados por la pérdida, degradación o fragmentación del

hábitat, situación experimentada por muchas poblaciones de la Región Pampeana (Viglizzo *et al.*, 2011).

El grado de conectividad entre poblaciones puede estar influenciado por una gran variedad de factores ambientales y biológicos, tales como el clima, la presencia de barreras para la dispersión, o la capacidad de dispersión de los individuos. En el caso de especies restringidas a ambientes acuáticos, es de esperarse que el flujo génico dependa de la estructura espacial de las redes fluviales, la que a su vez determinará la distancia de dispersión y la conectividad entre las mismas. La estructura jerárquica de las redes fluviales y las cuencas hidrográficas proporciona un marco espacial natural para analizar los efectos de la dispersión y el consecuente flujo génico en distintas especies asociadas a ambientes acuáticos (Meffe & Vrijenhoek, 1988; Grant *et al.*, 2007). A nivel mundial, son pocos los ecosistemas terrestres y acuáticos que no resultan afectados por la fragmentación antrópica y la consecuente pérdida de conectividad entre poblaciones (Pringle, 2001; Fischer & Lindenmayer, 2007). Por lo tanto, comprender la conectividad entre poblaciones que han sido alteradas es clave para la conservación de la biodiversidad (Crook *et al.*, 2015). En este sentido, la detección temprana de la pérdida de diversidad genética permite implementar medidas de manejo que limiten o reviertan los efectos perjudiciales de la misma. (De Roos *et al.*, 2006).

2.4 FILOGEOGRAFÍA

La estructura génica de una población puede analizarse por medio de la filogeografía. Esta disciplina surge por primera vez en el trabajo de Avise *et al.* (1987), reuniendo conceptos de la genética de poblaciones y la filogenia. Se basa en el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones mediante el uso de marcadores moleculares, teniendo en cuenta el contexto geográfico, es decir, la ubicación geográfica de las poblaciones. Permite obtener información específica de cómo eventos ambientales

y factores geográficos interactúan con aspectos ecológicos de las especies para modelar la estructura genética hallada en las poblaciones (Knowles, 2009).

Mediante la realización de estudios filogeográficos es posible (i) determinar si existe aislamiento entre poblaciones de una especie, (ii) inferir procesos y parámetros demográficos como el grado de flujo génico entre poblaciones, el tamaño efectivo de las mismas, la secuencia de colonización de nuevos ambientes y la ocurrencia de cuellos de botella, (iii) identificar fronteras entre especies, y/o entre unidades de conservación, y (iv) establecer cómo la estructura poblacional puede estar influenciada por fuerzas evolutivas como la deriva génica, el flujo génico o la selección natural (Avice, 2000; Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009; Hickerson *et al.*, 2010).

2.5 ADN MITOCONDRIAL

Los estudios filogeográficos con especies animales utilizan principalmente como marcadores moleculares secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) dado que presentan una alta tasa de mutación, no recombinan y su herencia es casi exclusivamente materna (Lanteri & Confalonieri, 2003). Las variantes (secuencias) de ADNmt, conocidas como haplotipos, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, lo que permite conectarlos en un filograma o red de haplotipos (Avice, 2000, 2008).

El ADN mitocondrial es una molécula circular cerrada de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares (Figura 1A). Este genoma, de aproximadamente 16.500 pares de bases (pb), codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales. Las proteínas restantes del ADNmt son codificadas por el ADN nuclear (ADNn).

Dentro del genoma mitocondrial existe una zona denominada Región Control (o D-loop) (Figura 1B), cuya tasa de sustitución nucleotídica la hace adecuada para estimar la

2.6 EFECTOS DEL IMPACTO ANTRÓPICO EN EL AMBIENTE SOBRE LA VARIABILIDAD Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA

El ambiente acuático en general constituye el receptor final de todos los contaminantes (naturales o artificiales) vertidos al medioambiente (Foguelman & Brailovsky, 1999). Las relaciones entre ríos y medios terrestres son múltiples, complejas y muy sensibles a alteraciones por actividades humanas. Los efectos de los contaminantes sobre los organismos son muy variados y pueden afectar diversos niveles de organización, desde el celular y subcelular hasta el poblacional o comunitario. Esos efectos pueden ser: cancerígenos, disruptores endocrinos, hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, promotores del estrés oxidativo, represores del sistema inmune, modificadores de la conducta, etc. (Seyle, 1976; Boudou & Ribeyre, 1997; Newman & Clements, 2008).

En este sentido Murdoch & Hebert (1994), utilizando como marcadores moleculares RFLPs (fragmentos de longitud polimórfica) obtenidos de ADN mitocondrial, observaron que la diversidad genética en distintas poblaciones de *Ameiurus nebulosus*, fue menor en sitios con mayor nivel de contaminación.

Por otro lado, Knapen *et al.* (2009), a través del análisis de *loci* de microsatélites y aloenzimas, observaron diferencias genéticas entre poblaciones naturales de la especie *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758) ubicadas en un gradiente de contaminación con dos metales pesados, cadmio y zinc.

Tales estudios son importantes porque en hábitats contaminados, la sensibilidad diferencial puede llevar a la selección de genotipos resistentes provocando la disminución del tamaño poblacional, de la variabilidad genética y, por lo tanto, a cambios en la estructura genética de las poblaciones (Gray, 1989; Bradshaw & Hardwick, 1989), lo que puede corresponderse con una mayor probabilidad de extinción local (Bradshaw, 1984; Koehn & Bayne, 1989; Hoffmann & Parsons, 1989). Es esencial, por lo tanto, conocer el

alcance del cambio genético que ha ocurrido en las poblaciones afectadas (Benton *et al.*, 1994).

2.6.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA DEL CONURBANO BONAERENSE (AMBA)

Los cuerpos de agua del conurbano Bonaerense han recibido, por décadas, el aporte sistemático de numerosos contaminantes, tanto de origen urbano como agropecuario-ganadero e industrial (Salibián, 2006; 2014). El grado de polución de las aguas dulces de las zonas urbanas y peri-urbanas del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) es alarmante, particularmente en los ríos que confluyen en el estuario del Río de la Plata. Los ríos periurbanos son un ejemplo de ecosistemas modulados por la actividad antropogénica que se desarrolla sobre sus márgenes y zonas de influencia (Porta, 1996; Evers *et al.*, 1997). Esto es consecuencia de una expansión desmedida y muchas veces no planificada de las áreas urbanas, así como del creciente asentamiento de industrias que generan vertidos residuales mal o escasamente tratados, con una elevada carga de contaminantes (Escalona & Winchester, 1994). Los ríos Luján, Reconquista y Matanza-Riachuelo son los ejes de las tres principales cuencas del AMBA. Este trabajo se centra en los ríos Reconquista y Luján.

2.7 RÍO RECONQUISTA

El río Reconquista está situado al norte de la ciudad de Buenos Aires, su curso principal tiene 82 km de largo y la cuenca entera se extiende a 1.574 km² en 20 distritos que contienen más de 4.653.407 millones de personas (INDEC, 2010).

Se origina en la confluencia de los arroyos La Choza, Durazno y La Horqueta que forman el lago San Francisco en la represa Roggero. Una vez formado, el cauce principal recibe caudales por parte de los arroyos Las Catonas y Morón en la cuenca media. La temperatura media anual en la zona varía entre 13 y 17 ° C y las precipitaciones se distribuyen a lo largo del año en un rango de 600–1.200 mm (Rigacci *et al.*, 2013).

La calidad del agua del río Reconquista en su origen es bueno y similar al Lago San Francisco, pero a unos pocos kilómetros aguas abajo, la calidad del agua disminuye debido a que recibe el aporte contaminante de 700 industrias y desechos urbanos domésticos. Si bien el embalse de Roggero produce una mejora significativa de la calidad del agua del lago San Francisco y la naciente del río Reconquista presenta una buena calidad, la descarga de los contaminantes aguas abajo invierte rápidamente este efecto (Rigacci *et al.*, 2013). En consecuencia, las cuencas medias-bajas y bajas del río se ven afectadas por la presencia de aguas residuales, así como por las descargas de industrias que no están equipadas con instalaciones adecuadas para el tratamiento de efluentes (Salibián 2006). La flora y fauna características de la región, han sido gradualmente reemplazadas por un tejido agrícola, urbano e industrial heterogéneo (Mondino, 2007). Los partidos pertenecientes a la cuenca se muestran en la Figura 2.



FIGURA 2. División política de los partidos pertenecientes a la cuenca de río Reconquista, extraída de COEPSA (2009).

2.8 RÍO LUJÁN

La cuenca del río Luján tiene una superficie de 3.778 km². El río Luján nace de la confluencia del arroyo de Los Leones y El Durazno en el Partido de Suipacha. Su recorrido tiene una dirección general sudoeste-noreste y una longitud de 115 km, hasta desembocar en el delta del Paraná (Buzai & Lanzelotti, 2015). La temperatura media anual en la zona varía entre 14 y 30 ° C y posee una precipitación media de 1.077 mm.

La cuenca se distribuye entre los partidos de Suipacha, Mercedes, Luján, San Andrés de Giles, Pilar, Escobar, Tigre, Malvinas Argentinas y José C. Paz (Figura 3). Según el último Censo Nacional (INDEC, 2010) la población que ocupa los partidos que recorre este río alcanza a 1.992.349 personas.

En la cuenca alta, uno de los arroyos tributarios que origina el río Luján (Arroyo Durazno) recibe descargas industriales del rubro lácteo y de la planta de tratamiento de efluentes líquidos de la ciudad de Suipacha. Cuando pasa por la ciudad de Mercedes, el río recibe las descargas de la planta de tratamiento de efluentes líquidos urbanos e industriales, y lo mismo ocurre cuando pasa por Jáuregui y Luján. En la localidad de Jáuregui se reciben los desechos de una curtiembre de gran tamaño, con mucha materia orgánica y algunos metales pesados, tales como cromo, cobre y mercurio (Ossana, 2011).

Esta cuenca ha sido y es utilizada para explotación agrícola-ganadera; sin embargo, los principales aportes puntuales son descargas líquidas urbanas e industriales que comienzan en la cuenca alta y se incrementan, dado el crecimiento de las ciudades y también de la actividad industrial, especialmente en la subcuenca inferior donde el uso agropecuario de la tierra es reemplazado por el urbano-industrial (Giorgi, 2001; Sánchez Caro, 2010).

La cuenca del río Luján presenta un estado ecológico variable con un deterioro paulatino hacia la desembocadura, concentrado en dos tramos. El tramo entre Luján y Pilar está muy eutrofizado, presentando productividades altas y esporádicos episodios de anoxia asociados a las fluctuaciones anuales de temperatura y carga orgánica de las descargas provenientes del Parque Industrial de Pilar y la Planta de tratamientos de efluentes líquidos de esa ciudad (Momo *et al.*, 2003; Sánchez Caro, 2010). En el tramo inferior hay una marcada discontinuidad dada por el ingreso de aguas provenientes del Paraná de las Palmas, luego de la confluencia con el Canal Gobernador Arias.

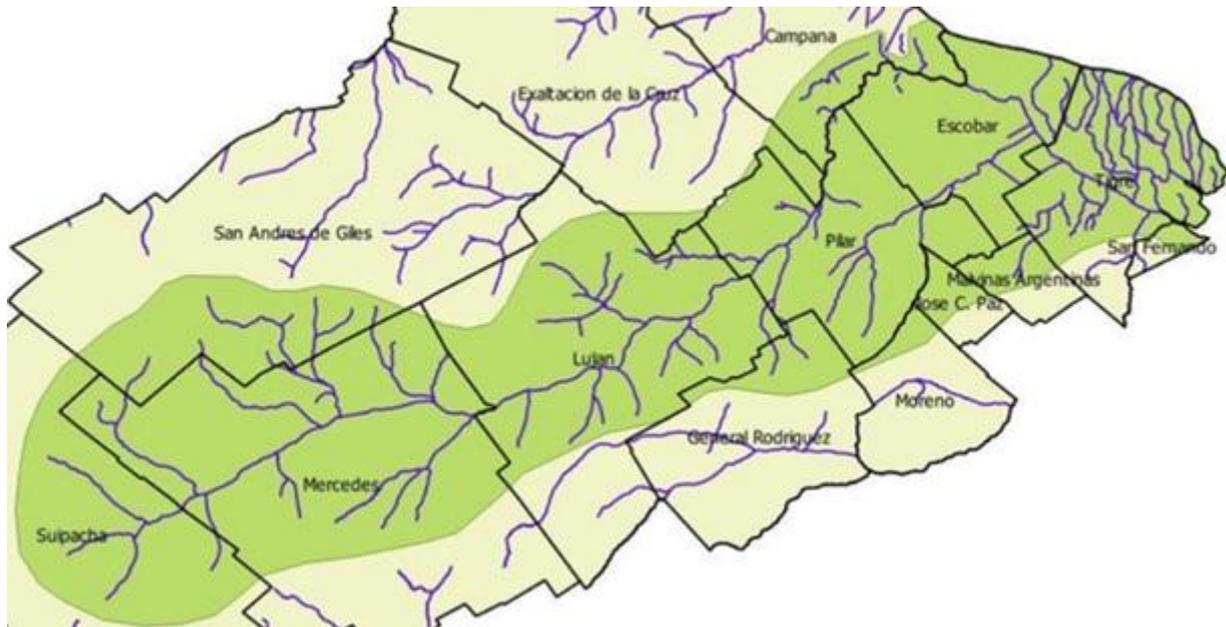


FIGURA 3. Partidos pertenecientes a la cuenca del río Luján. Extraída de Buzai & Lanzelotti, (2015).

2.9 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

Cnesterodon decemmaculatus (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) (Jenyns, 1842), comúnmente llamada madrecita de agua, es un pequeño pez de aguas continentales y distribución neotropical. Se encuentra en climas subtropicales con un rango de preferencia térmica de 17 a 21 °C. Es una especie bentopelágica, de agua dulce a salobre (rango de pH: 7,5-8,2; dureza: 0,5-3,9 mmol CaCO₃/L), tolerante a variaciones de salinidad y temperatura, microomnívora, vivípara y con marcada diferenciación sexual. Los machos presentan una aleta anal modificada en órgano intromitente o gonopodio, mientras que las hembras se caracterizan por un color plateado más brillante que el de los machos. Poseen un gran éxito en su estrategia reproductiva, rápido crecimiento y corta vida generacional (Ringuelet *et al.*, 1967; Molero & Pisano, 1987; Gómez, 1996).

Presentan un cuerpo comprimido, boca oblicua, dorso recto o aplanado, ojos grandes, pedúnculo caudal alto y comprimido lateralmente. El rango de tamaño y peso promedio de los adultos criados es de 1,8 a 3,7 cm y 50,1 a 524,1 mg para las hembras y

de 1,64 a 2,13 cm y 23,1 a 49,9 mg para los machos (Ferrari *et al.*, 2017). (Figura 4, Tabla 1).

Su distribución geográfica se extiende desde Argentina, parte de Brasil y Uruguay (Lucinda, 2005). En Argentina, en particular, ocupa la Región Pampeana y presenta una amplia distribución tanto en ríos y arroyos como en ambientes lénticos. Su presencia se ha registrado en varios ríos, como por ejemplo: Río de la Plata, el Salado, Limay, Suquía y en el tramo medio e inferior del Río Uruguay y Paraná, cuenca alta y media del Río Reconquista y Luján; y también en arroyos y lagunas de la provincia de Buenos Aires (Almirón *et al.*, 1992; Baigún *et al.*, 2002).

Cnesterodon decemmaculatus, es una especie nativa que ha sido utilizada ampliamente en la determinación de la toxicidad a metales pesados (Baudou *et al.*, 2017, 2019; Mastrángelo & Ferrari, 2013), pesticidas (Menendez Hellman *et al.*, 2012; Paracampo *et al.*, 2015; Bonifacio *et al.*, 2017), contaminantes emergentes (González Nuñez, 2018), uno de los principales componentes de los desechos industriales y en numerosos bioensayos tanto de laboratorio como de campo, ya que se encuentra entre las especies recomendadas para la realización de bioensayos de toxicidad por las normas IRAM (Instituto Argentino de Normatización y Certificación) (IRAM, 2008).



Figura 4: Vista lateral de macho y hembra de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Clasificación	
Taxonómica	
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Osteichthyes
Clase	Actinopterygii
Orden	Cyprinodontiformes
Familia	Poeciliidae
Género	<i>Cnesterodon</i>
Especie	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenys, 1842)
Nombre vulgar	Madrecita de agua

3. HIPÓTESIS

- **Hipótesis 1:** La diversidad genética de *C. decemmaculatus* es menor en los sitios más contaminados de las cuencas, producto del impacto antrópico generado por la presencia de tóxicos, que produce una reducción en el tamaño poblacional como consecuencia de una disminución en el éxito reproductivo de los individuos.
- **Hipótesis 2:** La población criada en cautiverio en el laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA), generada a partir de la colecta de individuos en ambientes naturales más preservados, es genéticamente similar a la población del Arroyo Las Flores (sitio LF), lo que valida su uso como control.
- **Hipótesis 3:** Los sitios de estudio ubicados en diferentes cuencas presentan una mayor diferenciación genética que los sitios ubicados en la misma cuenca.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar, mediante el uso de un segmento de la región control del ADN mitocondrial, la diversidad y estructura genética de *Cnesterodon decemmaculatus* en dos cuencas del noreste de la Provincia de Buenos Aires, y relacionar los resultados obtenidos con el impacto antrópico generado por la presencia de diferentes contaminantes en los sitios de estudio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la diversidad genética utilizando como marcador molecular un fragmento de la región control del ADNmt, de poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus* capturadas en dos sitios de la cuenca del río Luján y en dos de la cuenca del río Reconquista con diferente grado de impacto antrópico. Se analizarán además individuos pertenecientes a una población criada en cautiverio en el laboratorio, libre de contaminación.
2. Comparar la diversidad genética observada en dichos sitios, determinando si existe una correlación entre el grado de impacto antrópico y la diversidad genética.
3. Analizar la existencia de estructuración genética en el área de estudio, para determinar si la misma está asociada a la estructura espacial de las cuencas, las cuales determinarían la distancia de dispersión y la conectividad entre sitios.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES Y UBICACIÓN DE LOS SITIOS

Se utilizaron 20 individuos de *Cnesterodon decemmaculatus* pertenecientes a la población criada en cautiverio (Acuario) en el laboratorio del PRODEA (Programa de Ecofisiología Aplicada) en la Universidad Nacional de Luján y a cada uno de los dos sitios ubicados en las cuencas de los ríos Luján y Reconquista (Figura 5; Tabla 2). La colecta de los animales en los sitios de cada cuenca, se realizó mediante la utilización de un copo, pasando la red por la superficie del agua, ya que la mayoría de los cardúmenes se encuentran dentro de los primeros 10 cm, particularmente en zonas cercanas a la ribera y con vegetación. Los peces capturados se colocaron en un balde con agua del sitio de colecta y se trasladaron con aireación al laboratorio.

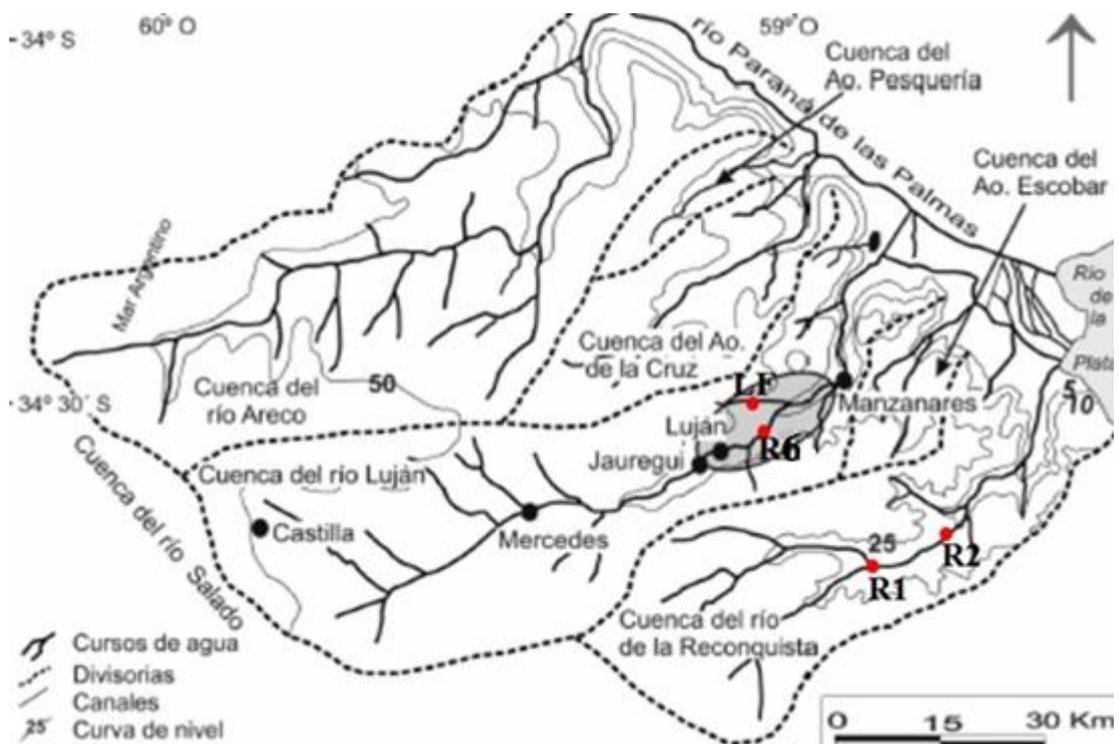


Figura 5. Cuencas de los ríos Luján y Reconquista en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los círculos rojos indican la posición aproximada de los sitios de muestreo (modificado de Blasi *et al.*, 2010).

Tabla 2: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo naturales utilizados en la investigación.

Río	Sitios	Coordenadas	Descripción del sitio
Reconquista	R1	34°40'16.47'' S; 58°52'46.19'' O	En las nacientes del río Reconquista en la represa Roggero (Figuras 6)
Reconquista	R2	34°36'25.37'' S; 58°43'01.37'' O	18 km aguas debajo de la naciente, sobre la cuenca media del río Reconquista (Figuras 7)
Luján	LF	59°07'O; 34°29'S	El arroyo Las Flores, tributario del río Luján (Figura 8)
Luján	R6	34°31'15.20''S ; 50°02'15.50''O	Río Luján, luego de atravesar el ejido urbano de la ciudad de Luján, donde cruza la Ruta Provincial N°6 (Figura 9).

El uso de la población criada en cautiverio (Acuario) (Figuras 12 y 13) será considerada como control, esto se basa en la puesta a punto y generación de un sistema de cría, reproducción y mantenimiento de *Cnesterodon descemmaculatus* en laboratorio que realizó el PRODEA en el marco de un proyecto de extensión y vinculación tecnológica “Bioensayos de ecotoxicidad con organismos nativos como herramienta de evaluación de contaminación de agua y sedimentos de ambientes acuáticos en la región pampeana” financiado por el Ministerio de Educación de la Nación (2007), cuya finalidad es la provisión de animales para fines experimentales libres de contaminación previa, evitando la sobreexplotación de las poblaciones silvestres (Ferrari *et al.*, 2017).



Figura 6: Represa Roggero (A) y el inicio del río Reconquista (B), donde se ubica el sitio R1.





Figura 7: A y B. Sitio R2, 18 km aguas abajo en el Barrio Trujui, Moreno.

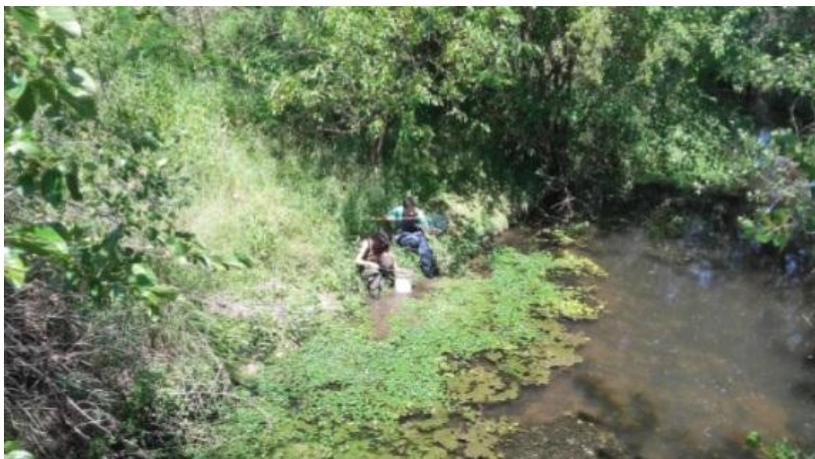


Figura 8: Arroyo Las Flores (LF), tributario del Rio Luján.



Figura 9: Sitio R6, donde el Rio Luján cruza por la ruta provincial N°6.

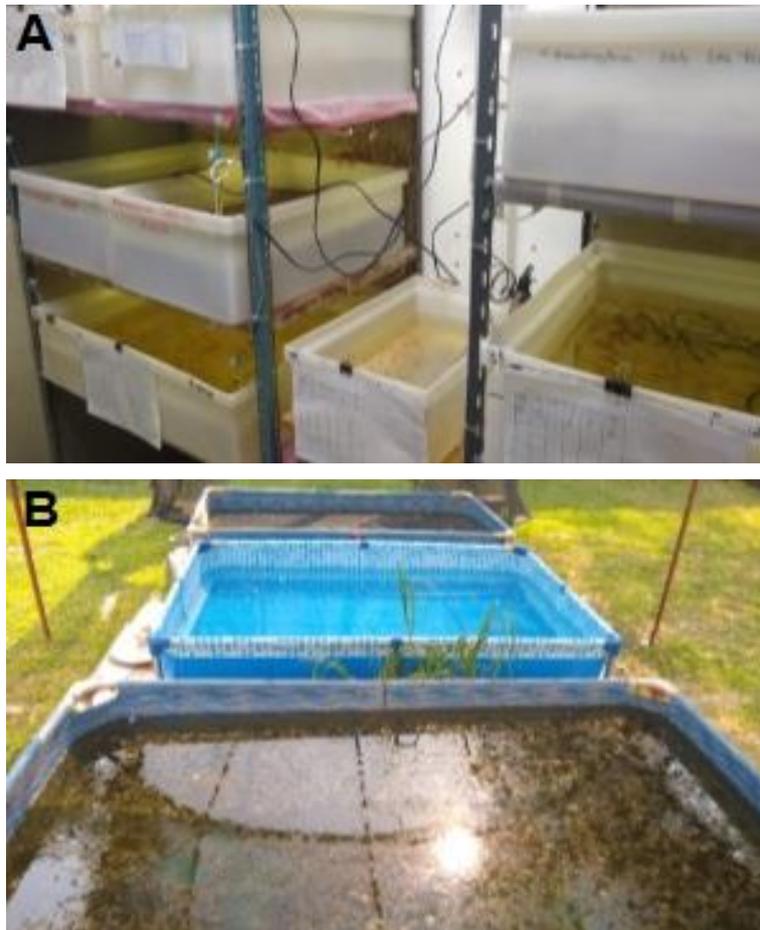


Figura 10: Población criada en cautiverio (Acuario) por el grupo PRODEA en la universidad de Luján. Cultivo *indoor* (A) y *out door* (B).

5.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Los individuos fueron anestesiados en frío y luego sacrificados el mismo día de la colecta mediante un corte trasversal a nivel del opérculo y de la médula espinal con bisturí. Se sacrificaron siguiendo los criterios propuestos por AVMA (2013) y el Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Luján (DISP SE ACAD LUJ- 0001438-18).

Se obtuvo un fragmento de la cola de cada uno de aproximadamente 1 cm de largo que luego fue disgregado con la ayuda de un bisturí e incubado a 50°C durante toda la noche en un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 500 µl de buffer de extracción (TRIS-HCl 10mM, pH = 8; EDTA 0,1M; SDS 1%), 2,5 µl de RNAsa A, 4 mg/ml y 10 µl de

Proteinasa K, 10 mg/ml. Terminado este período de incubación, se completó la extracción del material genético mediante el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se realizaron dos lavados con 500 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando en cada caso por 5 minutos a 14.000 rpm para recuperar la fase acuosa. Un lavado adicional utilizando un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) igual al de la fase acuosa recuperada del paso anterior y una centrifugación por 5 minutos a 14.000 rpm permitieron la eliminación de los restos de fenol presentes en la mezcla. El siguiente paso consistió en el agregado de un volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol 100% a -20°C a la fase acuosa obtenida anteriormente.

La mezcla fue centrifugada por 20 minutos a 14.000 RPM para que el ADN precipite. El pellet obtenido fue lavado dos veces en 500 µl de etanol 70% a -20°C evitando su resuspensión y centrifugado por 5 minutos a 14.000 RPM luego de cada lavado. Por último, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser resuspendido en 50 µl de agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C.

5.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR

El ADN obtenido fue utilizado posteriormente para amplificar por PCR un fragmento de 715 pb correspondiente a la región control del ADN mitocondrial. El par de *primers* que se utilizó para tal fin fue desarrollado por el Grupo GIEM (Grupo de Investigación en Ecología Molecular) de la Universidad Nacional de Luján, como una modificación de los diseñados por Bruno *et al.* (2016) (Tabla 3).

Cada tubo de reacción de PCR contenía: 2 µl de buffer de reacción 10X; 0,5 µl de dNTPs 10mM; 1 µl de cada *primer* 10 µM; 0,5 µl de MgCl₂; 0,1 µl de *Taq Pegasus*, 3-4 µl de ADN y agua hasta completar el volumen final de 10 µl.

Para cada una de las PCR realizadas se incluyeron controles positivos (el ADN utilizado correspondió a una muestra de tejido amplificada previamente) y negativos (el material genético se reemplazó por igual volumen de agua libre de nucleasas).

El protocolo de amplificación en termociclador Eppendorf-Mastercycler Gradient consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de PCR, cada uno formado por un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, uno de *annealing* a 52°C por 1 minuto y uno de extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Tabla 3: Secuencias de los *primers* (CdK y CdG) utilizados para la amplificación de un fragmento (715pb) de la región control mitocondrial.

Primers	Secuencia
<i>CdK</i>	5'- CAACCTCCGCCCTAACTCC-3'
<i>CdG</i>	5'-GGGGGTTTAGGCCCGTAAAA-3'

5.4 VISUALIZACIÓN Y PURIFICACIÓN

Alícuotas de 3 µl de los productos de PCR obtenidos fueron visualizadas bajo luz UV en geles de agarosa 1% teñidos con Bromuro de Etidio. Los 7 µl restantes de las muestras que amplificaron el fragmento deseado, fueron purificados mediante el método enzimático EXO/SAP (Werle *et al.*, 1994) y enviados para su secuenciación a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar con los mismos *primers* utilizados para la amplificación por PCR.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente utilizando el programa Chromas, versión 2.23, y alineadas en busca de sitios polimórficos utilizando el programa MEGA 7.0.18 (Kumar *et al.*, 2016).

La frecuencia absoluta y relativa de los haplotipos, la diversidad haplotípica y nucleotídica dentro de las poblaciones (Tajima, 1983; Nei, 1987) y las comparaciones pareadas del porcentaje de divergencia de las secuencias fueron calculadas utilizando el programa ARLEQUÍN, versión 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). La varianza molecular entre poblaciones se calculó agrupando los sitios de muestreo de acuerdo a la cuenca hidrográfica a la que pertenecen, para ello las poblaciones de LF y R6 se asignaron a la cuenca del Río Luján, las de R1 y R2 a la del río Reconquista. Los individuos pertenecientes al Acuario no se asignaron a ninguna. Estos análisis se realizaron utilizando el paquete AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), que forma parte del programa ARLEQUÍN. Se computaron estimaciones del índice Φ_{ST} , análogo al índice de fijación F_{ST} de Wright. El nivel de significancia estadística fue ajustado utilizando la corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones simultáneas múltiples (Rice, 1989).

Para visualizar la posible existencia de estructuración genética construimos una red de haplotipos utilizando el método *median-joining* implementado en el programa PopART 1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>). Este método emplea el criterio de parsimonia para combinar todos los Árboles de Expansión Mínima obtenidos (MSTs, del inglés, *minimum-spanning trees*) en una única red de haplotipos, posibilitando obtener una información poblacional más detallada que la obtenida mediante el uso de árboles bifurcados (Posada & Crandall, 1998). En la figura 14 se resumen las actividades realizadas.

Finalmente, para poder relacionar la diversidad genética de los sitios con respecto a los parámetros físico-químicos de cada uno de ellos se realizó un análisis multivariado

con el método de análisis de ordenación de componentes principales (PCA), utilizando una versión libre del programa Past 3.

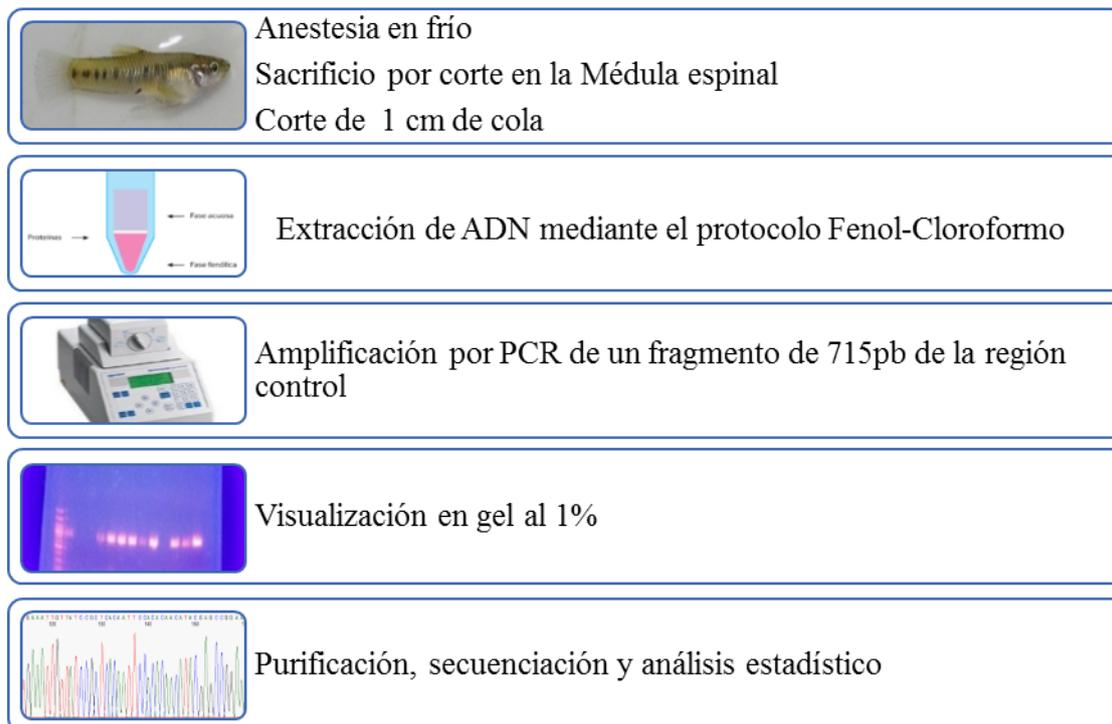


Figura 11. Resumen de las metodologías llevadas a cabo en el laboratorio.

5.6 ANÁLISIS DEL PERFIL FISICOQUIMICO DEL AGUA

En el momento de la captura de los animales se tomaron muestras de agua para realizar una caracterización fisicoquímica de cada sitio. Se efectuaron *in situ* las determinaciones de los siguientes parámetros: temperatura, oxígeno disuelto (OD), temperatura, conductividad y pH, utilizando los sensores Hach. Además, se tomaron muestras para las determinaciones en laboratorio en botellas de plástico y/o vidrio y se trasladaron en frío (4 °C) hasta el laboratorio donde se procesaron.

En el laboratorio se determinaron según APHA (2005): dureza, alcalinidad, turbidez, oxígeno disuelto (OD) por Winkler, cloruros, compuestos nitrogenados (amonios, nitritos), fósforo reactivo soluble (PRS), demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), material particulado en suspensión (MPS), materia orgánica particulada (MOP), concentración de metales pesados (Pb, Cd, As, Cr, Cu, Zn) y

se calculó un Índice de calidad de agua (ICA) de Berón (1984). Los valores de cada uno de los parámetros fueron contrastados con los Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (República Argentina) para la Protección de la Biota Acuática en conjunto con las leyes 24051, 26221 y la resolución ADA 336-03.

Para el cálculo del ICA se utilizaron los valores de OD, temperatura, Cl^- , DBO_5 y NH_4^+ , este es un índice de polución orgánica cuya escala va del 0 al 10, siendo el cero indicativo de una descarga cloacal a cielo abierto mientras que el 10 corresponde a una muestra prístina. El ICA permite resumir una gran cantidad de datos y brindar una primera aproximación a la determinación del estado de deterioro de una cuenca o sitio determinado, así como efectuar comparaciones temporales y/o espaciales (Topalián & Castañé, 2003). En la tabla 4 se muestran los parámetros analizados y la metodología utilizada y en el anexo se detalla la metodología utilizada de las técnicas analíticas de los parámetros físico-químicos.

Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos analizados y metodología utilizada para cada uno de ellos.

Parámetros	Unidades	Metodología
Temperatura	°C	Sensor de campo
pH	upH	Sensor de campo
Conductividad	mS/cm	Sensor de campo
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	Titulación con H ₂ SO ₄
Dureza	mg CaCO ₃ /L	Titulación complejométrica con EDTA
Turbidez	UNT	Nefelometría
Oxígeno disuelto (OD)	mg/L	Titulación Winkler
Demanda biológica de Oxígeno (DBQ)	mg O ₂ /L	Titulación Winkler
Demanda química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	Reflujo cerrado con dicromato
Fósforo reactivo soluble (PRS)	mg P-P ₄ ³⁻ / L	Colorimetría
Amonio	mg N-NH ₄ ⁺ /L	Colorimetría
Nitritos	mg N- NO ₂ ⁻ /L	Colorimetría
Cloruros	mg Cl ⁻ /L	Titulación con AgNO ₃
Sólidos disueltos		Gravimétrico
Metales: As, Zn, Cu, Cd, Cr, Pb	mg/L	Espectrometría de absorción atómica

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS GENÉTICO

6.1.1 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Se obtuvo un total de 72 secuencias para el fragmento de región control analizado (715pb), entre todos los sitios de muestreo (poblaciones), R1 (n=15), R2 (n=5), LF (n=18) y R6 (n=17) y el Acuario (Ac) (n=17). Los análisis de variabilidad genética arrojaron valores moderados de diversidad nucleotídica ($\pi=0,0064-0,153$) y de moderados a altos de diversidad haplotípica ($H=0,3824-0,7353$) (Tabla 5).

Las secuencias definieron un total de 6 haplotipos (H01-H06), siendo los más abundantes el haplotipo H02 con 35 individuos (48.6%) y el H03 con 33 (45.8%), mientras que el resto estuvo representado por un solo individuo (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis intra-poblacional: diversidad haplotípica y nucleotídica de cada población.

	R1	R2	R6	LF	Acuario
Diversidad Haplotípica	0,419	0,600	0,735	0,523	0,382
Diversidad Nucleotídica	0,007	0,010	0,153	0,009	0,006

Tabla 6. Distribución de los haplotipos entre los sitios de muestreo. Se muestran las frecuencias absolutas y relativas de cada uno.

Haplotipos	R1	R2	R6	LF	Acuario
H01	-	-	1(0,0588)	-	-
H02	11(0,733)	3(0,6)	7(0,412)	10(0,556)	4(0,235)
H03	4(0,267)	2(0,4)	6(0,353)	8(0,444)	13(0,765)
H04	-	-	1(0,0588)	-	-
H05	-	-	1(0,0588)	-	-
H06	-	-	1(0,588)	-	-
Total	16	5	17	18	17

6.1.2 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Los AMOVA realizados agrupando las poblaciones según las cuencas hidrográficas mostraron que no existen diferencias significativas entre las poblaciones pertenecientes a las cuencas de los ríos Luján y Reconquista ($\Phi_{CT} = -0,00638$; $p = 1,000$) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados AMOVA agrupando las poblaciones de acuerdo a la cuenca hidrográfica a la que pertenecen.

Componente de la varianza	% de la varianza total	Φ	valores de p
Entre cuencas	0	$\Phi_{CT} = -0,00638$	1,000
Entre poblaciones dentro de cuencas	0	$\Phi_{SC} = 0,00465$	0,2757
Entre individuos dentro de sitios	100	$\Phi_{ST} = -0,00168$	0,349

Las comparaciones de F_{ST} pareados indicaron que no existen diferencias significativas entre los pares de poblaciones correspondientes a las dos cuencas y que la población del acuario del PRODEA es genéticamente similar a las poblaciones del sitio R2 y LF (Tabla 8).

Tabla 8. Comparaciones pareadas de los valores de F_{ST} . R1 y R2 pertenecen al río Reconquista, LF (arroyo Las Flores) y R6 son las poblaciones pertenecientes al río Luján y Ac es la población en cautiverio. Los valores remarcados en negrita indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

	R1	R2	LF	R6	Ac
R1	0,00000	-	-	0,01977	0,35822
R2	-0,10451	0,00000	-	-0,08423	0,15462
LF	0,00526	-0,14169	0,00000	0,02316	0,14410
R6	-	-	-	0,00000	-
Ac	-	-	-	0,03808	0,00000

6.1.3 RELACIONES GENEALÓGICAS ENTRE LOS HAPLOTIPOS

La relación genealógica entre los haplotipos mostrada en la Figura 12, evidencia un patrón de estructura filogenética con dos grupos principales (H02 y H03), haplotipos compartidos por todos los sitios (poblaciones) de estudio. El resto de los haplotipos (H01, H04, H05 y H06) sólo se encontraron en el sitio R6.

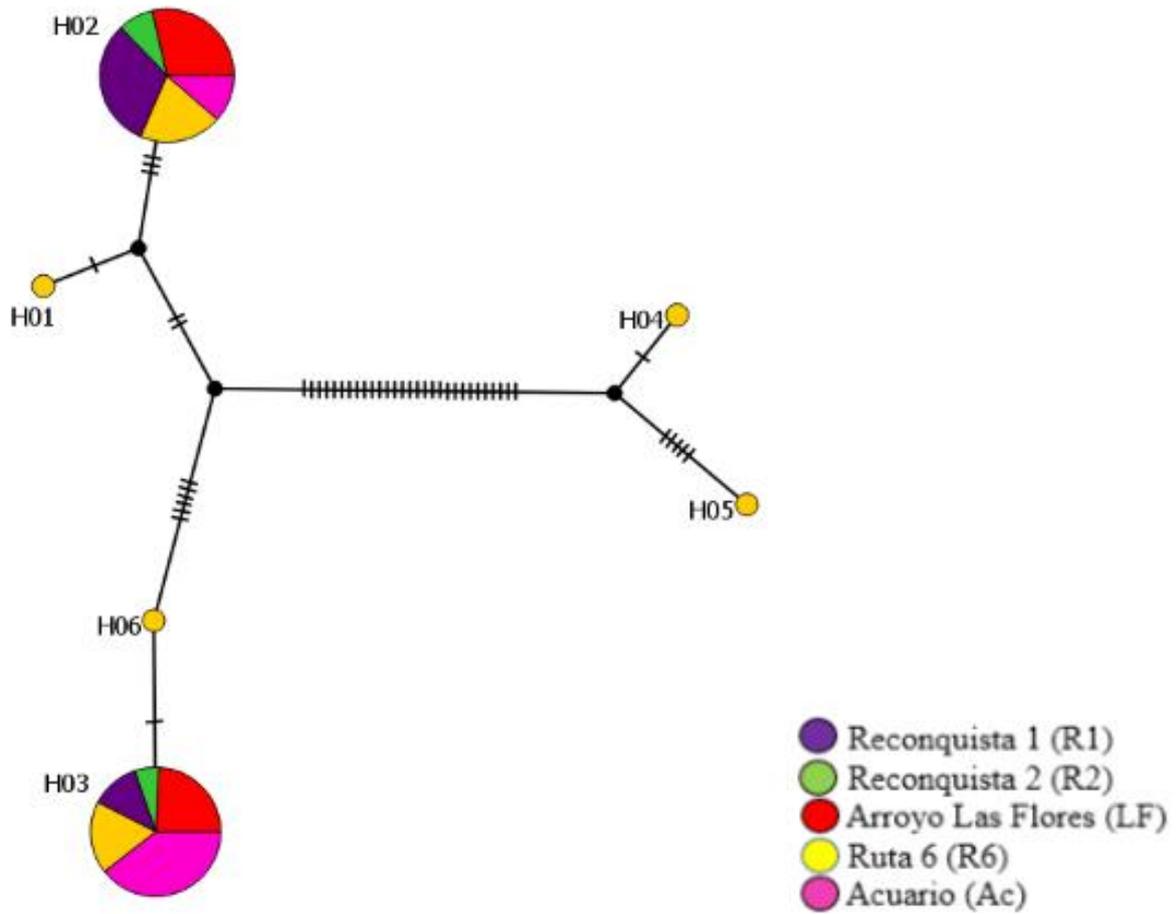


Figura 12. Relaciones genealógicas entre los 6 haplotipos obtenidos para el fragmento de región control utilizado (715pb), en las poblaciones de madrecitas analizadas (R1, R2, LF, R6 y Ac). Los tamaños de los círculos son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos.

6.2 ANÁLISIS DEL PERFIL FISICOQUÍMICO DEL AGUA análisis del perfil fisicoquímico del agua

A continuación, en la tabla 9 se detallan los valores del perfil físico químico del agua:

Tabla 9. Valores de los parámetros físico-químicos, del ICA y concentración de metales pesados. En azul los valores que estuvieron por encima de los niveles guía; nm= no determinado; ICA= Índice de Calidad de Agua (Berón, 1984)

Parámetros	Unidades	R1	R2	R6	LF	Acuario	Valores guía
Temperatura	°C	16,6	16,2	nm	Nm	nm	≤40
pH	UpH	8,84	7,85	8,36	7,85	8,3	6,5-10
Conductividad	mS/cm	0,97	1,23	1,89	0,79	1,02	-
Alcalinidad	mg CO ₃ Ca/L	360	440	nm	Nm	nm	≤400
Dureza	mg CO ₃ Ca/L	89	147	209	110	87	≤400
Turbidez	UNT	75	135	nm	Nm	nm	-
OD	mg O ₂ /L	2,29	0,9	6,4	6,2	7,5	≥5
DBO	mg O ₂ /L	3,2	18	7,6	1,9	1,7	≤50
DQO	mg O ₂ /L	49	43	20	30	0	≤250
PRS	mg PO ₄ ⁻ ³ /L	0,4	1	nm	Nm	nm	<1,0
Amonio	mg N- NH ₄ ⁺ /L	0,02	4,72	0,17	0,12	0,01	0,05–0,47
Nitritos	mg N-NO ₂ ⁻ /L	0,02	0,02	0,21	0,08	0,92	<0,06

Cloruros	mg Cl-/L	48	76	195	8,5	15	≤250
MPS	mg/L	182, 38	202	27,6	14,45	nm	-
MOP	mg/L	24,4 6	48,6	12,85	12,1	nm	-
Metales pesados	mg/L					nm	
Pb		<0,0 05	0,006	0,006	0,01	nm	0,001
Cd		<0,0 01	<0,001	<0,001	<0,001	nm	0,0001–0,0004
As		0,03	0,031	0,025	0,016	nm	<0,015
Cr		0,00 5	0,015	0,005	0,005	nm	0,002
Cu		<0,0 50	<0,050	<0,050	<0,050	nm	0,002–0,004
Zn		0,19 0	1,04	0,11	0,4	nm	<0,030
ICA Berón		8	3	6	8	8	

El análisis de oxígeno disuelto (OD) reveló que el sitio R2 presenta el valor más bajo en comparación con los otros sitios, lo que indica una condición de hipoxia en el lugar. Cuando analizamos los valores de DBO se considera que aquellos sitios con un valor mayor a 5 mg O₂/L contienen agua contaminada, los que tengan un valor entre 5 y 3 mg O₂/L se los considera de pureza intermedia mientras que aquellos que tengan un valor menor a 3 mg O₂/L se consideran equivalentes al agua pura. Los valores de DBO encontrados establecen que el único sitio con agua pura es el sitio LF (1,9 mg O₂/L) mientras que los sitios R2 (18mg O₂/L) y R6 (7,6mg O₂/L) presentan una DBO > 5

indicando que sus aguas están contaminadas y el sitio R1 (3,2 mg O₂/L) presenta una pureza intermedia. Ninguno de los sitios sobrepasa el valor guía, al igual que con los valores de DQO. Para poder estimar el índice de biodegradabilidad se establece una relación entre DBO y DQO, esta relación (DQO/DBO, Anexo) dio como resultado un valor de 15 para los sitios R1 y LF indicando la presencia de material orgánico poco degradable y valores de 2,4 para R2 y 2,6 para R6 indicando que el material orgánico es moderadamente degradable (ver anexo). Los resultados del análisis del perfil físico químico de agua revelaron que en el sitio R2 los valores del amonio (4,72 mg N-NH₄⁺/L) sobrepasan el valor guía (0,05-0,47 mg N-NH₄⁺/L), mientras que en el resto de los sitios los valores se mantienen dentro del valor guía siendo el sitio R1 el que contiene menos amonio (0,02mg N-NH₄⁺/L). En el caso de los nitritos, el sitio R6 es el que sobrepasa el valor guía (0,06 mg N-NO₂⁻/L) siendo su concentración hallada de 0,21 mg N-NO₂⁻/L. El cálculo del Índice de Calidad de Agua (ICA Berón) mostró valores de 8 para los sitios LF, R1 y Acuario indicando un buen estado para esos sitios. Para el sitio R6 el valor obtenido del ICA fue de 6 indicando una contaminación moderada del agua mientras que para R2 el valor fue de 3 indicando una polución elevada de este sitio.

6.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

Para poder analizar la relación entre la diversidad genética y los parámetros físico-químicos del agua realizamos un análisis de componentes principales teniendo en cuenta las cuatro poblaciones de campo.

En la figura 13 se muestran los resultados utilizando las poblaciones de campo (R1, R2, LF y R6) en donde se tuvo en cuenta: la diversidad genética de cada sitio y los valores de los parámetros fisicoquímicos (OD, DBO, DQO, amonio, nitritos, cloruros, dureza, arsénico, cromo, zinc, pH, conductividad, MPS y MOP).

En el análisis de componentes principales los primeros dos ejes (PC1y PC2) explican un alto porcentaje de la varianza total, en este caso los dos ejes en conjunto explican el 84% de la varianza total siendo el PC1 el eje que explica un 50% (Tabla 10).

Las variables que más aportan en PC1 son el oxígeno disuelto (OD) y MOP (material orgánico particulado), en el PC2 las variables que más aportan son la diversidad genética y la dureza (Tabla 11).

Al analizar la figura 16 podemos ver que las poblaciones están separadas entre sí por los distintos valores de diversidad genética de cada población y los valores de los parámetros fisicoquímicos analizados. Cuando analizamos CP1 podemos ver que las poblaciones se separan en LF y R6 y por otro lado R1 y R2, esto es así porque las variables que más explican el CP1 son OD y MOP, el oxígeno disuelto (OD) es alto en R6 y LF mientras que es bajo en R1 y R2, con el material orgánico particulado (MOP) pasa lo contrario, los sitios LF y R6 tienen menos MOP que R1 y R2. Si vemos el CP2 las poblaciones se separan en R6 y R2 y por otro lado LF y R1, en este caso las variables que más aportan al CP2 son la diversidad genética y la dureza, ambos parámetros son más altos en R6 y R2 que en R1 y LF, por eso esta componente separa las poblaciones de esa manera. Por último, la diversidad génica es un factor importante para el PCA con una carga positiva de 0.4 que permite separar las poblaciones analizadas.

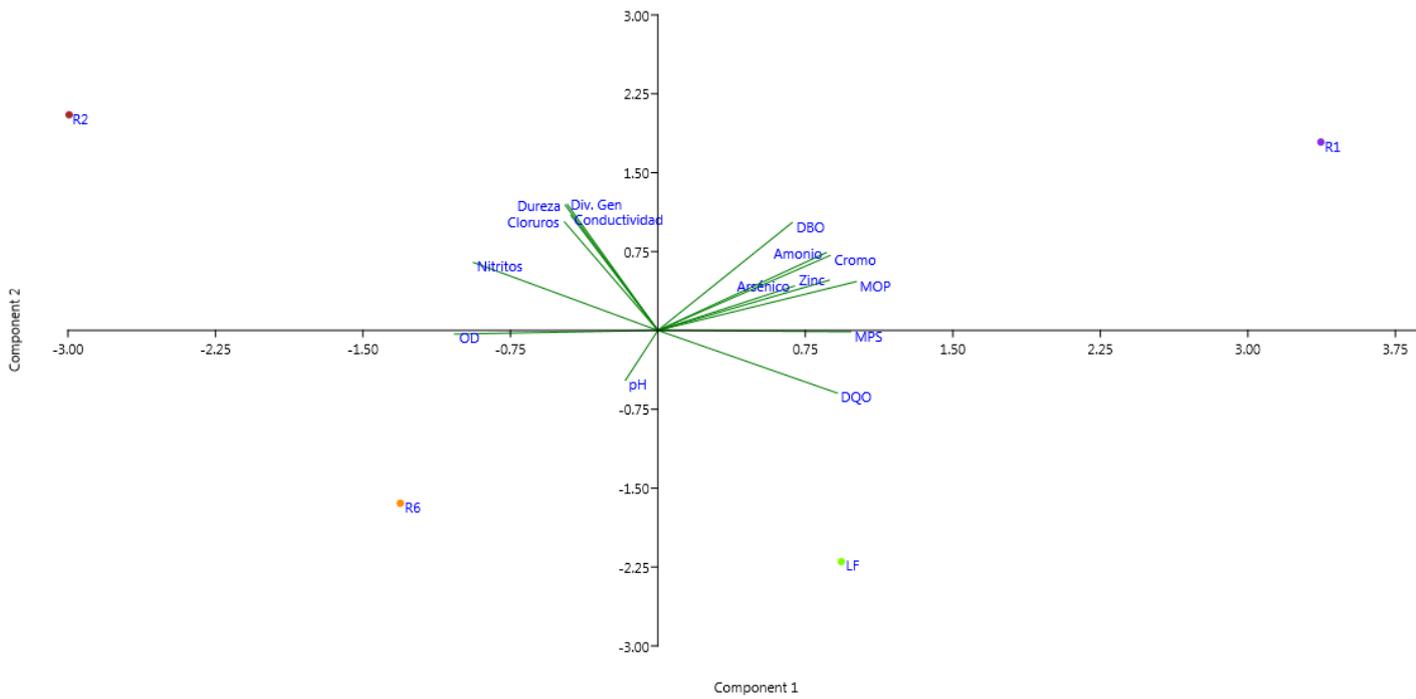


Figura 13. Gráfico del análisis de componentes principales sin la población del Acuario.

Tabla 10. Porcentaje de variabilidad explicada por cada CP.

PC	Eigenvalue	% de variancia total
1	7,639	50,924
2	4,984	33,228
3	2,377	15,848

Tabla 11. Variables analizadas y su aporte a cada una de las componentes principales (CP). Las variables marcadas en rojo son aquellas que más aportan a las CP.

	PC 1	PC 2	PC 3
Diversidad genética	-0,15483	0,40275	-0,05947
OD	-0,34759	-0,01172	-0,17932
DQO	0,30651	-0,20024	0,18632
DBO	0,22960	0,34502	-0,04106
Amonio	0,28774	0,24879	-0,15760
Nitritos	-0,31540	0,21732	0,04466
Cloruros	-0,15969	0,34680	0,29420
Dureza	-0,15864	0,40106	0,05059
Arsénico	0,23349	0,14192	0,45084
Cromo	0,29423	0,23961	-0,14874
Zinc	0,29301	0,16080	-0,30096
pH	-0,05540	-0,15910	0,59810
Conductividad	-0,14874	0,36766	0,25721
MPS	0,32943	-0,00424	0,26816
MOP	0,33905	0,15607	0,01463

En el segundo estudio de ACP realizado incluimos la población Acuario, en este caso relacionamos la diversidad genética de cada una de las poblaciones con los parámetros fisicoquímicos (OD, DQO, DBO, amonio, nitritos, cloruros, dureza, pH y conductividad).

Podemos observar que los primeros 3 ejes explican más del 80% de la varianza total (Tabla 12) siendo PC1 (45%) y PC2 (30%) los que más explican la varianza total.

Las variables que más aportan a la componente principal 1 (PC1) son la diversidad genética, DBO y dureza, mientras que en la CP2 las que más aportan son OD y DQO (Tabla 13).

Al agregar la población Acuario, podemos ver en la figura 14 que la componente principal 1 (CP1) separa las poblaciones en R2 y Acuario y por otro lado R1, R6 y LF. En la Tabla 13 se observa que en este componente las variables que más aportan son la diversidad genética, la DBO y la dureza. La diversidad genética exhibe valores altos en los sitios R2 y R6, y el valor más bajo en Acuario. En cuanto a la DBO el valor más alto es para el sitio R2 mientras que la dureza tiene valores altos indicando aguas duras en el sitio R2 y R6 mientras que en los demás el agua es moderadamente dura.

La segunda componente principal separa a las poblaciones en: Acuario, R6 y LF y por otro lado a R1 y R2, esto es así porque los valores de OD son más bajos en R1 y R2 y los valores de DQO son más altos que en las otras poblaciones (Acuario, R6 y LF). Esta segunda componente nos separa las poblaciones por sus cuencas ya que R1 y R2 pertenecen al río Reconquista mientras que el resto de las poblaciones pertenecen al río Luján.

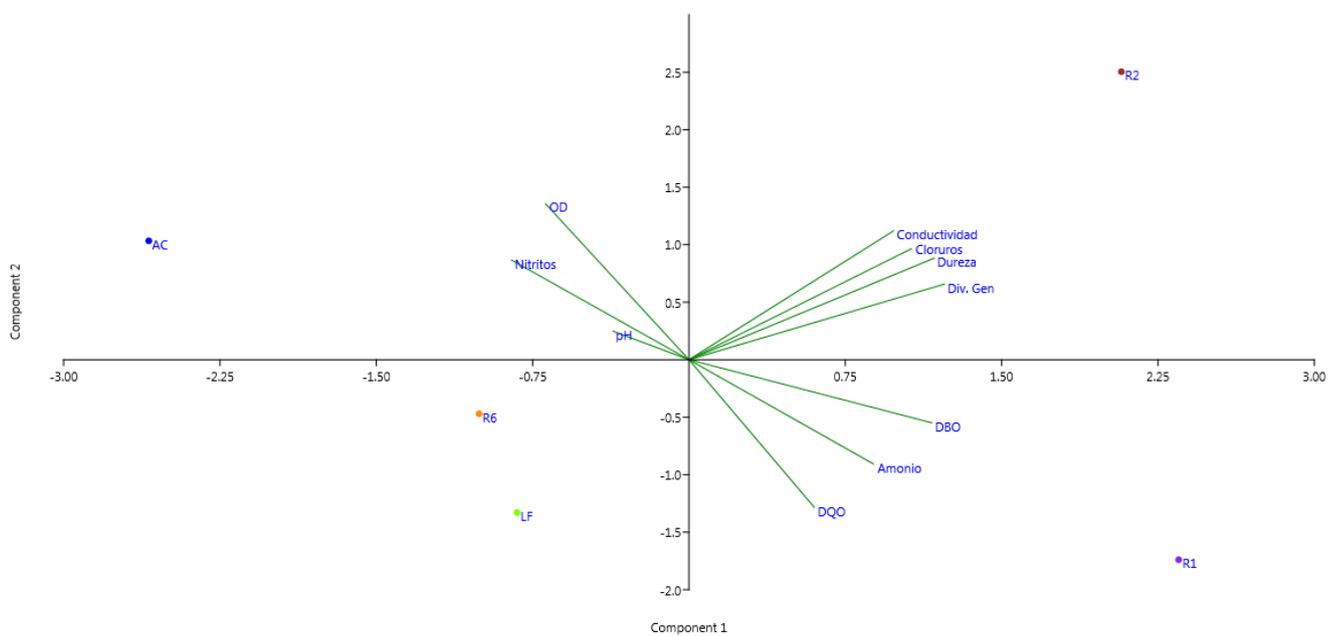


Figura 14. Gráfico del análisis de componentes principales con la población del Acuario.

Tabla 12. Porcentaje de variabilidad explicada por cada CP.

PC	Eigenvalue	% de variancia total
1	4,558	45,584
2	3,087	30,870
3	1,581	15,811
4	0,774	7,736

Tabla 13. Variables analizadas y su aporte a cada una de las componentes principales. Las variables marcadas en rojo son aquellas que más aportan a las CP.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
Diversidad Genética	0,41264	0,22139	-0,03261	-0,30266
OD	-0,23181	0,45685	-0,16191	-0,29934
DQO	0,20242	-0,43206	0,3662	-0,17953
DBO	0,39215	-0,18466	-0,26116	0,33320
Amonio	0,29798	-0,30509	-0,38342	0,31236
Nitritos	-0,28662	0,29172	-0,31638	0,51425
Cloruros	0,35922	0,32491	0,21818	0,11734
Dureza	0,39622	0,29743	-0,00587	-0,12043
pH	-0,12280	0,08356	0,68132	0,47668
Conductividad	0,33042	0,37723	0,10716	0,24087

7. DISCUSIÓN

7.1 ANÁLISIS GENÉTICO

En este trabajo se estimaron la diversidad genética y nucleotídica utilizando un fragmento de la región control del ADN mitocondrial para poblaciones de *Cnesterodon decemmaculatus* ubicadas en las cuencas de los ríos Reconquista y Luján. Los valores obtenidos para ambos índices fueron de moderados a altos sugiriendo un cierto grado de flujo génico entre los sitios comprendidos en el área de estudio. Por otra parte, las relaciones filogenéticas halladas indicaron la existencia de haplotipos compartidos entre los sitios ubicados en las cuencas de los ríos Luján y Reconquista y los resultados del AMOVA mostraron que la varianza genética poblacional no se encuentra significativamente particionada entre ambas cuencas. Las comparaciones de F_{ST} pareados no mostraron diferencias significativas entre pares de poblaciones localizadas en un mismo río o en cuerpos de agua diferentes. Estos resultados en conjunto, refuerzan la idea de la existencia de cierto grado de flujo génico entre los ríos Luján y Reconquista, a la vez que rechazan la hipótesis 3 que establecía una mayor diferenciación genética entre los sitios de diferentes cuencas.

La falta de estructuración poblacional como consecuencia del flujo génico entre los ríos puede deberse a inundaciones periódicas que favorecen el intercambio de individuos pertenecientes a las distintas cuencas. La historia paleográfica de la cuenca del río Luján se caracteriza por haber atravesado periodos de inundaciones y sequías (Prieto *et al.* 2004). Alrededor de unos 10.000 años antes del presente (AAP), el nivel del mar era menor que el actual, el clima en el área de estudio era húmedo y el alto nivel de precipitaciones habría favorecido la formación de grandes humedales en las llanuras de inundación de la cuenca del río Luján. Luego de este periodo húmedo, se produjo una

reducción en los cuerpos de agua como producto de la prevalencia de condiciones climáticas más secas hace unos 7.000 años atrás. En ese mismo tiempo, el aumento en el nivel del mar en la parte inferior del río Luján causó el desarrollo de un estuario de 10km de ancho y la ampliación del valle aluvial del Río de La Plata. Además, se desarrolló en la parte inferior del río Luján un estuario de entre 10 y 20 km (Iriondo, 1993). Luego de esto, entre los 6.000-5000 AAP, el nivel del mar disminuyó favoreciendo el cambio progresivo del cauce del río Luján hacia su actual posición (Cavalloto *et al.* 1999; Prieto *et al.* 2004). Estas fluctuaciones en el clima y los cambios en el caudal de los cuerpos de agua (reducciones en volumen alternados con períodos de inundación), podrían haber favorecido la dispersión de los peces entre las cuencas, causando la ausencia de estructura genética hallada entre las cuencas de los ríos Luján y Reconquista.

Otra causa que explicaría el flujo génico entre ambas cuencas es la construcción de un canal artificial sobre el río Reconquista que derivaba sus aguas hacia el río Luján en la década de 1970. Durante una inundación muy grande, la represa que operaba en el área se quebró inundando, en consecuencia, un área de aproximadamente 12.000 hectáreas. Esta gran masa de agua generada pudo haber favorecido el intercambio de individuos entre ambas cuencas (Suarez & Lombardo, 2004).

La falta de diferencias genéticas halladas en este trabajo entre las poblaciones R2 (Reconquista) y LF (Luján) con respecto a la población criada en cautiverio (Acuario) permitiría utilizar a los individuos de esta última población para estudios de biomonitoreo, los cuales son utilizados para el análisis del impacto que diferentes factores externos (tóxicos) generan sobre la especie y los ecosistemas a lo largo del tiempo (Market *et al.*, 1999). Para esta clase de estudios suelen utilizarse especies bioindicadoras que son especies que permiten detectar alteraciones en las condiciones del ambiente como consecuencia de la presencia de contaminantes en el mismo, posibilitando así obtener

información sobre la calidad y estado del ecosistema (Li *et al.*, 2010; Gerhardt., 2002). *Cnesterodon decemmaculatus* ha sido utilizada como un organismo *test* para la realización de bioensayos y estudios de biomonitoreo (Ossana *et al.*, 2019; Baudou *et al.*, 2017; IRAM 2008). La falta de diferencias genéticas hallada entre estos sitios permite aceptar la hipótesis 2.

Esta afirmación debe tomarse con cautela y futuros estudios son necesarios, ya que la cantidad de secuencias comparada y el N de cada población es bajo.

Las relaciones genealógicas muestran que hay dos haplotipos (H04 y H05) que se encuentran distanciados del resto de los haplotipos encontrados en las poblaciones, a través de un gran número de pasos mutacionales (29 mutaciones, Fig. 12). Para asegurar que no fue un error durante la recolección de individuos se realizó un BLAST en donde se comparó a esas dos secuencias con la base de datos del GenBank, esto permitió asegurar que las secuencias correspondientes a estos haplotipos correspondían a *C. decemmaculatus* y no a otra especie. También se controló la edición y corte de esas secuencias. Estos resultados permiten suponer que estos haplotipos que solo se encontraron el sitio R6 podrían llegar a encontrarse en los demás sitios si se realizan más recolecciones de muestras ya que el N en algunos sitios fue bajo. Sería interesante continuar con este estudio en estas y otras poblaciones de ríos y arroyos pampeanos.

7.2 ANÁLISIS DEL PERFIL FISICOQUIMICO DEL AGUA

El análisis del perfil físico químico del agua revela que el sitio más contaminado es el sitio R2 debido al bajo nivel de Oxígeno disuelto (OD) presentando una condición de hipoxia, valores altos de amonio, nitritos, PRS, DBO₅ (alta presencia de materia orgánica), DQO y cloruros. Además, en el análisis de concentraciones de metales pesados, la concentración de arsénico, cobre y zinc está por encima de los Niveles Guía para la

protección de la Biota Acuática (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación). Por último, el cálculo del Índice de Calidad del Agua dio un valor de 3 indicando polución grave. Todos estos resultados son similares a los encontrados en trabajos anteriores (Demichelis *et al.*, 2001; Olgúin *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2005; Ossana, 2011; Riggaci *et al.*, 2013).

Los sitios menos contaminados fueron R1 y LF, presentando valores de ICA de 8, en ambos casos, por lo que se consideran que sus aguas tienen una buena calidad. Cabe aclarar que el arroyo Las Flores (sitio LF) recibe escasa influencia humana, ya que no existen industrias ni centros urbanos importantes sobre su cuenca de drenaje y la mayoría de los terrenos que lo rodean se dedican a la cría de caballos; sus aguas son utilizadas como potables por algunos habitantes de la zona (Casset *et al.*, 2001; Feijoó *et al.*, 1999). Este sitio es utilizado frecuentemente como sitio control de los estudios ecotoxicológicos llevados a cabo con peces (Scarcia *et al.*, 2014). Si bien el ICA hallado en este trabajo establece que el agua está en buenas condiciones, Riggaci *et al.* (2013) estimaron un valor de 7, lo que significa que en ese tiempo de estudio el agua de R1 estaba levemente contaminada. El valor del ICA para R6 fue de 6 indicando una contaminación intermedia del agua y para el Acuario el valor fue de 8 al igual que los sitios R1 y LF. Teniendo en cuenta que los valores de los parámetros fisicoquímicos van cambiando continuamente se recomienda la estimación de estos valores de manera periódica.

7.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

En el primer análisis podemos destacar que las poblaciones se encuentran separadas entre sí tanto por la diversidad genética como por los valores de los parámetros fisicoquímicos como el OD, MOP y Dureza, siendo la diversidad genética un factor muy importante a la hora de analizar todo el conjunto de datos de los cuatro sitios

teniendo una carga positiva de 0,4 en la componente 2, la cual explica un gran porcentaje de la varianza total.

En el segundo análisis tuvimos en cuenta los datos del Acuario, en este caso podemos ver que las poblaciones quedan separadas entre sí incluso el Acuario y LF, a pesar de que la población del Acuario es originaria del sitio LF. Al ver las variables que resultaron con mayor peso en la segregación de los sitios ("*Loadings*") la DQO fue un parámetro importante cuyo valor en el agua potable del acuario fue de 0 a diferencia de los valores encontrados en los otros sitios muestreados.

En general, el análisis de componentes principales nos permitió relacionar la diversidad genética y los parámetros fisicoquímicos estableciendo que la diversidad genética tiene un peso importante en la varianza de los sitios estudiados. Así mismo, resulta importante aumentar el tamaño de las muestras y realizar un análisis estacional no solo de los parámetros fisico-químicos sino también de la diversidad genética.

Por último, cabe destacar que en este trabajo no hubo relación entre la contaminación y la disminución de la diversidad genética por lo que se rechaza la hipótesis 1 que establecía que en aquellos sitios de mayor contaminación la diversidad debía ser menor. Es importante seguir analizando estos resultados aumentando el N de cada uno de los sitios y tomar medidas periódicas de los parámetros fisicoquímicos utilizados.

8. CONCLUSIONES

- No se encontró estructuración poblacional entre los sitios de estudio para ninguna de las cuencas (Reconquista y Luján), lo que sugiere la existencia de cierto grado de flujo génico entre ellos.
- Al no haber diferencias genéticas entre los sitios R2, LF y el Acuario, esta última población podría utilizarse como fuente de individuos en los estudios de biomonitorio.
- El sitio LF, perteneciente a la cuenca del río Luján, es uno de los sitios con menores niveles de contaminación por lo que se sería correcto utilizarlo como control de campo en estudios realizados en la zona.
- El sitio R2, perteneciente al río Reconquista, es el más contaminado de todos los sitios analizados.
- Para poder obtener más información sobre la relación entre la diversidad genética y la contaminación del medio acuático es necesario realizar estudios periódicos que nos permitan detectar posibles variaciones estacionales.

9. ANEXO

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA PARA ANALIZAR LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA A PARTIR DE LAS TÉCNICAS ESTABLECIDA EN (APHA, WWA, 2005).

Oxígeno disuelto (OD): Se utilizó el método iodométrico por titulación (Winkler). Permite determinar la cantidad de mg/l de oxígeno disuelto a través de una valoración química. Las aguas corrientes superficiales no contaminadas suelen estar bien oxigenadas, e incluso sobresaturadas (>7-8 mg/l de O₂) (Lopretto & Tell, 1995).

Alcalinidad: Se entiende por alcalinidad del agua a su capacidad de neutralizar ácido. Realizamos una valoración acidimétrica con ácido sulfúrico frente a un indicador mixto con un viraje a pH 4.3 para medir la alcalinidad total (Conzonno, 2010).

Dureza total: Se entiende por dureza total la suma de las concentraciones de calcio y magnesio, expresadas como carbonato de calcio, en mg/L. Se determinó por valoración complejométrica con sal sódica del ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) como titulante.

Turbidez: Se define como una propiedad de una suspensión que hace que la luz se disperse y no se transmita a través de la misma. Es un modo de estimar cuántos materiales sólidos hay en suspensión en el agua. Fue determinada por nefelometría. En este caso, leímos la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525nm.

Amonio: Se utilizó un kit de Wiener. El amonio reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino produciendo azul de indofenol, reacción catalizada por nitroferrocianuro. La

intensidad del color resultante es proporcional a la concentración de amonio presente y es medida por espectrofotometría a 635 nm.

Nitritos: Los niveles de nitritos en el agua se midieron por colorimetría. Se basa en el fundamento de que la sulfanamida en medio ácido forma con los nitritos del agua un compuesto complejo que se colorea a violeta- rojizo cuando al agregarle N-(1-naftil) etilendiamina. Se mide por espectrofotometría a 543 nm.

Fosforo reactivo soluble (PRS): La técnica de análisis consiste en la reacción de los iones ortofosfatos (PO_4^{3-}) -en solución acidificada con ácido sulfúrico con el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio para formar un complejo, el cual es reducido por el ácido ascórbico dando lugar al azul de molibdeno, color que es proporcional a la concentración de ortofosfato. Medimos la absorbancia en espectrofotómetro a 880 nm.

Cloruros: Determinamos la concentración de cloruros mediante la valoración con AgNO_3 usando como indicador para el punto final de la reacción el cromato de potasio.

Demanda química de oxígeno (DQO): Constituye la porción de materia orgánica, biodegradable o no, de una muestra que es susceptible a oxidación por un fuerte oxidante químico (dicromato de potasio). Se lee la absorbancia a 420 nm del blanco y los patrones y se construye una curva de calibración y a partir de ella calculamos la DQO de las muestras.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO): Es la cantidad de oxígeno necesaria para descomponer la materia orgánica presente, por la acción bioquímica aeróbica. Permite determinar la materia orgánica biodegradable. El método consiste en incubar una muestra de agua con dilución, durante un tiempo determinado (5 días) en condiciones estandarizadas (oscuridad a 23°C). Se mide OD al inicio y al final del período de incubación. A partir de estas determinaciones calculamos el consumo de oxígeno.

Relación DQO/DBO: el índice de biodegradabilidad resulta de la división entre la demanda química de oxígeno y la demanda bioquímica de oxígeno (DQO/DBO). La relación entre esos dos parámetros establece:

DQO/DBO= 1,5 el material orgánico es muy degradable

DQO/DBO= 2 el material orgánico es moderadamente degradable

DQO/DBO=10 el material orgánico es poco degradable

Material particulado en suspensión (MPS) y materia orgánica particulada (MOP):

El material particulado en suspensión (MPS) lo determinamos filtrando la muestra y registrando el volumen de cada una con filtros de fibra de vidrio MF/C pre-combustionados y pre-pesados. Y el material orgánico particulado (MOP) lo calculamos a partir de la diferencia entre el material particulado en suspensión (MPS) y el material particulado inorgánico (MPI).

Metales pesados: Sobre las muestras acidificadas a $\text{pH} \leq 2$ determinamos el contenido de metales pesados disueltos por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AA 200) equipado con horno de grafito acoplado.

ICA (índice de calidad de agua): Para estimar la calidad del agua de la muestra ambiental se calculará el ICA desarrollado por Berón (1984). Para el cálculo del índice de calidad del agua se utilizarán los siguientes parámetros fisicoquímicos (determinados en las muestras de agua): pH, temperatura, cloruros, amonio, DBO_5 y OD. La escala del ICA va del 0 al 10, siendo el cero indicativo de una muestra altamente poluída mientras que el 10 corresponde a una muestra prístina. El ICA permite resumir una gran cantidad de datos y brindar una primera aproximación a la determinación del estado de deterioro de una cuenca o sitio determinado, así como efectuar comparaciones temporales y/o espaciales (Topalián & Castañé, 2003).

10. BIBLIOGRAFÍA

Almirón A, Gómez S & Toresani N (1992). Peces de agua dulce de la provincia de Buenos Aires. 1-29 p. *En: H.L. López & E.P. Toni (eds.). Situación ambiental de la provincia de Buenos Aires 2(12)*. Buenos Aires, Argentina.

APHA-AWWA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21st Ed. Washington, DC.

Avise J, Arnold J, Ball M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J, Reeb C, Saunders N (1987) Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 18: 489-522.

Avise J (2000). Phylogeography: the history and formation of species. *Harvard university press*.

Avise J (2008). Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr*, 36: 3–15.

Baigún C, López G, Domanico, A (2002). Presencia de *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842), una nueva especie brasílica en el norte de la Patagonia (río Limay) y consideraciones ecológicas relacionadas con su distribución. *Ecol. Austral.* 12 (1):.41-48.

Baudou F, Ossana N, Castañé P, Mastrángelo M, & Ferrari L (2017). Cadmium effects on some energy metabolism variables in *Cnesterodon decemmaculatus* adults. *Ecotoxicology.* 26 (9): 1250-1258.

Benton M, Diamond S, & Guttman S (1994). A genetic and morphometric of *Helisoma trivolvis* and *Gambusia holbrooki* from clean and contaminated habitats. *Ecotox. Environ. Safe.* 29: 20-37.

Berón L. (1984). Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza - Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua. Secretaria de Vivienda y Ordenamiento Ambiental. Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires.

Blasi A, Castiñeira Latorre C, Del Puerto L, Prieto A, Fucks E, De Francesco C, Hanson P, García-Rodríguez F, Huarte R, Carbonari J, & Young, A (2010). Paleoambientes de la cuenca media del río Luján (Buenos Aires, Argentina) durante el último período glacial (EIO 4-2). *Lat. Am. J. Sedimentol. Basin Anal.* 17(2): 85-111.

Boudou A, & Ribeyre F (1997). Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environm Health Persp* 105 (Suppl 1): 21-35

Bradshaw A (1984). The importance of evolutionary ideas in ecology and viceversa. En: *B. Shorrocks. (Ed.). Evolutionary Ecology* (pp. 1-25. Oxford Press. Blackwell. UK.

Bradshaw A, & Hardwick K. (1989). Evolution and stress—genotypic and phenotypic components, *Biological Journal of the Linnean Society, Volume 37, Issue 1-2, 05/06, Pages 137–155.*

Bruno M, Mapelli F, Casciotta J, Almirón A, & Lizarralde M (2016). Phylogeography of *Cnesterodon decemmaculatus* (Cyprinodontiformes: poeciliidae) in Southern Pampas,

Argentina: ancient versus recent patterns in freshwater fishes. *Environ. Biol. Fish.* 99: 293–307.

Buzai G & Lanzelotti S (2015). Delimitación de la cuenca del río Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Casset M, Momo F, & Giorgi A (2001). Dinámica poblacional de dos especies de anfípodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del Río Lujan (Argentina). *Ecol.Austral.* 11:79-85.

Cavallotto, J.L., Violante, R.A., & Parker, G. (1999). Historia evolutiva del Río de La Plata durante el Holoceno. In “XIV Congreso Geológico Argentino”, Salta province, Argentina. p 508-511.

COEPSA (Centro Oeste de Estudios Políticos y Socio Ambientales) (2009). Proyecto Saneamiento del Reconquista. Buenos aires: Coepsa.

Conzonno V. (2010). Limnología Química. Ed. Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

Cothran E, Juras R, & Macijauskiene V (2005). Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among 5 maternal lines of the *Zemaitukai* horse breed. *Genet. Mol. Biol.* 28(4): 677-681.

Crook D, Lowe W, Allendorf F, Erős T, Finn D, Gillanders B, & Kilada R (2015). Human effects on ecological connectivity in aquatic ecosystems: integrating scientific approaches to support management and mitigation. *Sci. Total. Environ.* 534: 52-64.

De Roos A, Boukal D, & Persson L (2006). Evolutionary regime shifts in age and size at maturation of exploited fish stocks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biol Sci*, 273(1596), 1873-1880.

Demichelis S, de la Torre F, Ferrari L, García M, & Salibián A (2001). Tadpoles assay: its application to water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environ Monit Assess* 68: 63-73.

Domínguez-Domínguez O, & Vázquez-Domínguez R (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1): 59-70.

Eguiarte L (2007). Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología.

Escalona L, & Winchester J (1994). La tendencia de la urbanización en Sur América: inferencias a partir de una base de datos del "World Resources Institute". *Interciencia* 19: 64-71.

Evers C, Lopez J, Gómez N, Rodrigues Capítulo A, & Janiot L (1997). Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando- Magdalena). Consejo Permanente para el monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata.

Excoffier L, Smouse, P, & Quattro J (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131(2), 479-491.

Excoffier L, Laval G, & Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*, 1, 117693430500100003.

Feijoó C, Giorgi A, García M, & Momo F (1999). Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. *Hydrobiologia*. 394: 41-52

Ferrari L (Comp.), Benítez J, Ficella M, Mastrángelo M, Palacio M, Somma A, & Trípoli L (2017). "Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Editorial EdUnLu. Libro digital, PDF, ISBN: 978-987-3941-20-7.

Ferrari L, de la Torre F, Demichelis S, García M, & Salibián A (2005). Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay. *Chemosphere* 59: 567-575.

Fischer J & Lindenmayer D (2007). Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global. Ecol. Biogeogr.* 16(3): 265-280.

Foguelman D, & Brailovsky A (1999). Buenos Aires y sus Ríos. *El agua en el Área Metropolitana. Lugar Editorial*. Buenos Aires, Argentina.

Frankham R, Briscoe D, Ballou J (2002). Introduction to conservation genetics. *Cambridge university press*.

Galtier N, Nabholz B, Glémin S, & Hurst G (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol.* 18: 4541-4550.

Gerhardt A (2002). Bioindicator species and their use in biomonitoring. In Environmental Monitoring I. *Encyclopedia of Life Support Systems. Edited by UNESCO.*

Giorgi A (2001). Cost of remediation of the Luján River (Argentina). *En: Y. Villacampa, C.A. Brebbia, & J.L. Usó (Eds). Ecosystems and sustainable development III, Wit Press, Southampton.pp. 563 - 570.*

Gómez S (1996). Resistenza alla temperatua ea alla salinitá in pesci Della provincia di Buenos aires (Argentina,), con implicazioni zoogeo grafiche. *En: Convegno Nazionale Associaziones Itaiana Ittiologia Acque Dolci, 4, Trento, Att. Istituto Agrario di S. Michele all'Aldige. 171-192.*

Gonzalez-Nuñez A (2019). Tesis de grado: Bioensayos de genotoxicidad en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (ciprinodontiformes, Poeciliidae) expuestos a ibuprofeno. Departamento de Ciencias Básicas Universidad Nacional de Luján.

Grant E, Lowe W, & Fagan W (2007). Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. *Ecol Lett, 10:165–175.*

Gray J (1989). Effects of environmental stress on species rich assemblages, *Biol. J. Linn. Soc. Volume 37, Issue 1-2, 05/06 1989, Pages 19–32.*

Hamilton M (2009). Population Genetics. *Wiley-Blackwell. Hong Kong.422pp.*

Hartl D, & Clark A (1997). Principles of population genetics (Vol. 116). *Sunderland: Sinauer associates.*

Hassan A, El Nahas S, Kumar S, Godithala P, & Roushdy K (2009). Mitochondrial D-loop nucleotide sequences of Egyptian river buffalo: Variation and phylogeny studies. *Livest. Sci.* 125:37-42.

Hedrick P (2001). Conservation genetics: where are we now? *Trends. Ecol. Evol.* 16(11): 629-636.

Hickerson M, Carstens B, Cavender-Bares J, Crandall K, Graham C, Johnson J, Rissler L, Vactoriano P & Yoder A (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avise*, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54(1): 291-301.

Hoffman A & Parsons P (1989). Selection for increased desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*: Additive genetic control and correlated responses for other stresses. *Genetics* 122, 837-845.

INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) (2010): www.censo2010.indec.gov.ar (página visitada el 13/12/2019 http://www.censo2010.indec.gov.ar/index_cuadros.asp).

IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2008). Calidad ambiental- Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Norma N° 29112/2008.

Iriondo M (1993). El litoral. In: "El Holoceno en Argentina". (Ed M. Iriondo) Vol.2. pp. 1 – 21. CADINQUA, Buenos Aires.

Knapen D, De Wolf H, Knaepkens G, Bervoets L, Eens M, Blust R, & Verheyen E (2009). Historical metal pollution in natural gudgeon populations: Inferences from allozyme, microsatellite and condition factor analysis, *Aquat. Toxicol.* 95(1): 17-26.

Knowles L (2009). Statistical Phylogeography. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40:593–612.

Koehn R, Bayne B (1989). Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response, *Biol. J. Linn. Soc.* 37. Issue 1-2, 05/06, Pages 157–171

Kumar S, Stecher G, & Tamura, K (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*33(7): 1870-1874.

Lanteri A & Confalonieri V (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. *In: J. J. Morrone & J. Llorente (Eds.). Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía: 185–194* CONABIO, México.

Larraín A (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cien. Tecn. Mar CONA.* (N.º Esp.): 39-47.

Li I., Zheng B., and Liu L (2010) Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia. Environ. Sci.*2: 1510-1524.

Loehr J, Worley K, Grapputo A, Carey J, Veitch A, & Coltman DW (2005). Evidence for cryptic glacial refugia from north American mountain sheep mitochondrial DNA. *J. Evol. Biol.*19:419-430.

Lopretto E, Tell G (Eds) (1995). Ecosistemas de Aguas Continentales. Metodologías para su estudio. *Ediciones Sur*, La Plata.

Lucinda P (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon garman*, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotrop. Ichthyol.* 303–311.

Manier M, Seyler C, & Arnold S (2007). Adaptive divergence within and between ecotypes of the terrestrial garter snake, *Thamnophis elegans*, assessed with FST-QST comparisons. *J. Evol. Biology*, 20(5): 1705-1719.

Markert, B., Wappelhorst, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U. & Friese, K., (1999). The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 240(2): 425-429.

Mastrángelo M, & Ferrari L (2013). *Cnesterodon decemmaculatus* juveniles as test organism in toxicity assessment: cadmium case. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91,49- 54

Meyer A (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En P. Hochachka & C. Mommsen (eds.). *Biochemistry and molecular biology of fishes.* (2) Elsevier Science Publishers B.V.

Meffe G, & Vrijenhoek R (1988). Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conserv Biol.* 2:157–169.

Menendez Helman R, Ferreyroa G, Dos Santos Afonso M, & Salibián A (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6-9.

Molero A & Pisanó A (1987). Estudios de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) *Rev. Brasil. Biol.* 47: 115-125.

Momo F, Ventura A, Maccor T (2003). Estado ecológico de la cuenca del Río Luján. En: Las aguas bajan turbias en la Región Metropolitana del Gran Buenos Aires. *Griselda Alsina (Ed). Universidad Nacional de General Sarmiento* p 103-112.

Mondino, E (2007). Informe especial del estado de la Cuenca del Río Reconquista. Buenos Aires, Argentina: Defensoría del pueblo de la Nación.

Murdoch M, & Hebert P (1994). Mitochondrial DNA diversity of brown bullhead from contaminated and relatively pristine sites in the great lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 (8): 1281-1289,

Nei M (1987). Molecular evolutionary genetics. *Columbia university press*.

Newman M, & Clements W (2008). Ecotoxicology. A comprehensive treatment. *Taylor & Francis Group*. Boca Raton, FL.

O' Reilly P, Reimchent T, Beech R, & Strobeck C (1993). Mitochondrial DNA in *Gasterosteus* and Pleistocene glacial refuge on the Queen Charlotte Island, British Columbia. *Evol.* 47(2): 678-684.

Olguín H, Puig A, Loez C, Salibián A, Topalián M, Castañé P, & Rovedatti M (2004). An integration of water physicochemical, alga bioassays, phytoplankton, and zooplankton for ecotoxicological assessment in a highly polluted lowland river. *Water Air Soil Pollut* 155: 355-381.

Ossana N (2011). Tesis doctoral: Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Ossana N, Baudou F, Castañé P, Trípoli L, Soloneski S, Ferrari L (2019). Histological, Genotoxic, and Biochemical Effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): Early Response bioassays to assess the impact of receiving waters. *J. Toxicology*. 1-13pp.

Paracampo A, Solis M, Bonetto C, & Mugni H (2015). Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *Int J. Environ. Health Res.* 25(1):96-103.

Porta A (1996). Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 30: 67-79

Posada D & Crandall K (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* (Oxford, England), 14(9), 817-818.

Prieto, A.R., Blasi, A.M., De Francesco, C.G., & Fernández, C. (2004). Environmental history since 11,000 14C yr B.P. of the northeastern Pampas, Argentina, from alluvial sequences of the Luján River. *Quaternary Res.* 62:146–161.

Pringle C (2001). Hydrologic connectivity and the management of biological reserves: a global perspective. *Ecological Applications.* 11: 981-998.

Rice W (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.* 43(1), 223-225.

Rigacci L, Giorgi A, Vilches C, Ossana N, & Salibián A (2013). Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 9161-9168

Ringuelet R, Aramuru R, & Aramburu A (1967). Los peces de agua dulce. Comisión de investigaciones de la Provincia de Buenos Aires, 602 pp.

Rocha-Olivares A, Garber N, Garber A, & Stuck K (2005). Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of *Mugil cephalus*. *Hidrobiológica* 15 (2 Especial): 139-149.

Saccone C, Lanave C, Pesole G, Sbisá E (1993). Peculiar features and evolution of mitochondrial genome in mammals. *En: S. DiMauro, D.C. Wallace (Eds). Mitochondrial DNA in human pathology.* Raven Press, New York, NY, pp. 27-37.

Salibián A (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista river of Argentina. *En: G.W. Ware (Ed) Environ Contam Toxicol* New York: Springer, 185: 35-65.

Salibán A (2014). Los fármacos como contaminantes emergentes de los ambientes acuáticos. Revista Farmacéutica Reviews (Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Argentina) 156 (1/2), pp. 76-92. ISSN 0034-9496

Sambrook J, Fritsch E, & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, New York, 1659 pp.

Sánchez Caro A (2010). Calidad del agua del río Luján. *En: Información ambiental de la cuenca del río Luján*. Carballo CT (Ed) Prometeo, Buenos Aires, Argentina, p 123-131.

Scarcia P, Calamante G, & de la Torre F (2014). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in Situ Exposure in a periurban zone of Luján River (Argentina). *Environ. Toxicol.* 29: 1-12.

Seyle H (1976). Stress in Health and disease. *Butterworth Publ*, Boston

Slatkin M (1985). Gene flow in natural populations. *Annual. Rev. Ecol. Systemat.* 16(1): 393-430.

Slatkin M (1994). Gene flow and population structure. *En Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton.

Suarez F & Lombardo R (2004). Pitting the polluted against the flooded: water resource management in Tigre, Buenos Aires. *Environ. Urban.* 16: 185-198.

Subsecretaría de Medio Ambiente, Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente de la Nación (1981). Evaluación ambiental de los recursos hídricos del sistema metropolitano Bonaerense, Buenos Aires.

Tajima F (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437-460.

Topalián M, & Castañé P (2003). Chemical index apply for the evaluation of the water quality of the Reconquista River. *In: The waters of the river are muddy in the greater metropolitan area of Buenos Aires. Ed. Al Margen y Departamento de Publicaciones-Universidad Nacional de General Sarmiento, Argentina (in Spanish). 157 pp.*

Truhaut R (1977). "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives", *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 1 (2): 151–173.

Viglizzo E, Frank F, Carreño L, Jobbagy E, Pereyra H, Clatt J, & Ricard M (2011). Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Global. Change. Biol.* 17(2): 959-973.

Werle E, Schneider C, Renner M et al., (1994). Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* (22):20 4354-4355